

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

**MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE KOSTİMÜLATÖR
B7 AİLESİ LİGANDLARININ EKSPRESYONU
VE
YARDIMCI T HÜCRE YANITLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzm. Biol. Pınar KARAŞAR

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2013**

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE KOSTİMÜLATÖR
B7 AİLESİ LİGANDLARININ EKSPRESYONU
VE
YARDIMCI T HÜCRE YANITLARI ÜZERİNE ETKİSİ

Uzm. Biol. Pınar KARAŞAR

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Güneş Esendağlı

ANKARA
2013

Anabilim Dalı : **Temel Onkoloji**
 Program : **Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi**
 Tez Başlığı : **Meme kanseri hücrelerinde kostimulatör B7 ailesi
 ligandlarının ekspresyonu ve yardımcı T hücre yanıtları
 üzerine etkisi**
 Öğrenci Adı-Soyadı : **Pınar KARAŞAR**
 Savunma Sınavı Tarihi : **17.06.2013**

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: **Prof. Dr. Dicle Güç**
Hacettepe Üniversitesi
 Tez danışmanı: **Doç. Dr. Güneş Esendağlı**
Hacettepe Üniversitesi
 Üye: **Doç. Dr. A. Lale Doğan**
Hacettepe Üniversitesi
 Üye: **Prof. Dr. Vedat Bulut**
Gazi Üniversitesi
 Üye: **Yrd. Doç. Dr. Güldal Yılmaz**
Gazi Üniversitesi



ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.


 Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU
 Müdür

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sırasında beni her zaman yüreklendiren, destek olan, kendimi geliştirmemde bana yol gösteren, öğrencisi olmaktan onur duyduğum değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Güneş Esendağlı'ya en içten duygularıyla minnettarlığımı ifade ederim. Benden ilgilerini esirgemeyen, bana güvendiğini her an hissettiren Sayın Prof. Dr. Dicle Güç'e, engin bilgi ve tecrübeleriyle bana ışık tutan Sayın Prof. Dr. Emin Kansu'ya, her zaman güler yüzlü pozitif enerjileriyle motivasyonumu artıran sevgili hocalarım Sayın Doç. Dr. Lale Doğan'a, Sayın Öğr. Gör. Dr. Hande Canpınar'a ve Sayın Öğr. Gör. Dr. Füsün Özmen'e en içten duygularıyla şükranlarımı sunarım. Benden hiç bir konuda yardımını esirgemeyen bilgileriyle çalışmalarına katkıda bulunan Dr. S. Altuğ Kesikli'ye ve Uzm. Biol. Yusuf Dölen'e, benim aile sıcaklığını hissettiğim huzurlu ve mutlu bir ortamda çalışmama katkıda bulunan tüm Temel Onkoloji ailesine sonsuz teşekkür ederim.

Sevgili çalışma arkadaşlarıma ve dostlarıma, yardımları ve desteğiyle her zaman yanımda olan Hakkı Toy ve Simge Çelebi'ye beni hiçbir zaman yalnız bırakmadıkları sevgi ve hoşgörüyle yaklaştıklarından dolayı şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan, beni her daima motive eden ve özellikle tez yazımı aşamasında bütün nazımı ve kaprisimi büyük bir sevgi ve sabırla çeken sevgili Volkan Şen'e çok teşekkür ederim.

Beni her zaman koşulsuz seven, sınırsızca destekleyen, hayattaki en büyük moral kaynağım olan çok değerli canım anneme, babama ve kardeşime yürekten teşekkür ederim.

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Karaşar P. Meme Kanseri Hücrelerinde Kostimülatör B7 Ailesi Ligandlarının Ekspresyonu ve Yardımcı T Hücre Yanıtları Üzerine Etkisi. Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2013. B7 ligandları T hücre yanıtlarını düzenleyen en kritik kostimülatör moleküllerdir. Bu moleküller esas olarak profesyonel antijen sunucu hücreler üzerinde bulunmalarına rağmen tümör hücreleri üzerinde de eksprese olabilirler. B7 ligand ailesi üyelerinden B7-1 ve B7-2 naif T hücrelerin uyarılmasında kritik bir rol oynar ancak aktive T hücre üzerinde eksprese olan CTLA-4'e bağlanarak inhibe edici özellik de gösterebilir. B7-H1, B7-DC ve B7-H4 inhibe edici, B7-H2 aktive edici, B7-H3'ün ise T hücre yanıtlarında düzenleyici etkileri vardır. Bu çalışmada, meme kanseri hücrelerinde bulunan B7 ligandlarının yardımcı T hücre yanıtlarına etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Lüminal MCF-7, BT-474, SK-BR-3, T-47D, ZR-75-1; bazal-benzeri, MDA-MB-231, MDA-MB-468, HCC38 meme kanseri hücre hatlarının ve normal meme epiteli hücre hattı MCF-12A'nın kültürleri gerçekleştirildi. Ayrıca, hücreler LPS ve IFN- γ ile uyarıldı. Tüm B7 ailesi moleküllerinin mRNA düzeyleri RT-PCR ile; B7-H1, B7-H2 ve B7-DC protein düzeyi ise akım sitometri ile belirlendi. Periferik kandan ayrımlanan CD4⁺ T lenfositler anti-CD3 uyarıcı antikör varlığında miyeloid hücreler ile uyarıldı ve daha sonra geri saflaştırıldı. Bu hücrelerin meme kanseri hücreleri ile farklı oranlarda ko-kültürü yapıldı. CD154, CD25 ve CD69 T hücre aktivasyon belirteçlerinin ve CFSE analizi ile çoğalma düzeyleri değerlendirildi. PD-1 ligandları, B7-H1 ve B7-DC ko-inhibitör moleküllerinin bazal-benzeri moleküler tipteki meme kanseri hücre hatlarında, ICOS ligandı B7-H2 ko-aktivatör molekülünün ise luminal tipteki hücrelerde seçici ve belirgin düzeyde eksprese oldukları bulunmuştur. LPS ile uyarım ekspresyon düzeylerinde belirgin bir fark yaratmazken, IFN- γ 'nın bazal-benzeri hücrelerde B7-H1 ve B7-DC düzeylerini artırdığı gözlenmiştir. İlginç olarak, ko-kültürler sonucunda bazal-benzeri meme kanseri hücre hatlarının T lenfosit aktivasyonunu ve çoğalmasını desteklediği yönünde bulgular elde edilmiştir. Yapılan analizlerde bu kanser hücreleri tarafından salgılanan faktörlerin uyarıcı, yüzey moleküllerinin ise inhibitör etkiye sahip olabileceği görüldü. Bulgularımız, bazal-benzeri meme kanserlerinin T hücre aktivasyon ve inhibisyon mekanizmalarını eş zamanlı olarak modüle edebildiğine işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, kostimülasyon, B7 ligand ailesi

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.(BAB, Destek No: 013D03104001)

ABSTRACT

Karasar, P. The expression of co-stimulatory B7 ligands on breast cancer cells and their effects on T helper responses. Hacettepe University Cancer Enstitute. A dissertation for the degree of Master of Science in Tumor Biology and Immunology. Ankara, 2013. B7 ligands are the most critical costimulatory molecules that regulate T cell responses. Although these molecules are mainly expressed on professional antigen presenting cells, they may also be expressed on tumor cells. Among the members of B7 ligand family, B7-1 and B7-2 play a critical role in stimulating naive T cells. However, these molecules may also engage CTLA-4 that is expressed on activated T cells and inhibit T cell function. B7-H1, B7-DC and B7-H4 exert inhibitory effects, whereas B7-H2 has activatory and B7-H3 has regulatory effects on T cell responses. The aim of this study is to determine the effects of B7 ligands, which are present on on breast cancer cells, on T helper cell responses. Luminal breast cancer cell lines MCF-7, BT-474, SK-BR-3, T-47D, ZR-75-1; basal-like breast cancer cell lines MDA-MB-231, MDA-MB-468 and HCC38 as well as a normal basal-like breast epithelial cell line MCF-12A were propagated in *in vitro* cultures. Additionally these cells were stimulated with LPS and IFN- γ . The mRNA levels of all B7 family members were analyzed with RT-PCR and proteine levels of B7-H1, B7-H2 and B7-DC were analyzed with flow cytometry. CD4⁺ T lymphocytes sorted from peripheral blood of healthy subjects were stimulated with myeloid cells in the presence of anti-CD3 monoclonal antibodies and were back-sorted afterwards. These activated lymphocytes were co-cultured with breast cancer cell lines at different ratios. T cell proliferation levels were investigated by CFSE analyses and the presence of CD154, CD25 and CD69 activation markers were determined. Selective and significantly increased expression of co-inhibitory PD-1 ligands B7-H1 and B7-DC on basal-like breast cancer cell lines as well as of the co-activatory ICOS ligand B7-H2 on luminal breast cancer cell lines were observed. Although stimulation with LPS did not change the expression levels significantly, levels of B7-H1 and B7-DC were significantly increased on basal-like cells upon IFN- γ stimulation. Interestingly, basal-like breast cancer cell lines were found to support T cell activation and proliferation. Our analyses revealed that factors secreted by these cancer cells may have stimulatory effects, whereas surface molecules expressed on them may impose inhibitory actions. These findings indicate that basal-like breast cancers may modulate the mechanisms for T-cell activation and inhibition simultaneously.

Key words: Breast cancer, costimulation, B7 ligand family

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit. (BAB, Grant Number, 013D03104001).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Meme Kanseri.....	3
2.2. Meme Kanserinin Moleküler Alt-Tipleri	3
2.2.1. Lüminal A Alt-tipteki Meme Kanserleri	5
2.2.2. Lüminal B Alt-tipteki Meme Kanserleri	6
2.2.3. HER2-Pozitif Alt-tipteki Meme Kanserleri.....	6
2.2.4. Bazal-benzeri Alt-tipteki Meme Kanserleri	7
2.2.5. Normal Meme-Benzeri Alt-tipteki Meme Kanserleri	8
2.2.6. Klaudin düşük Alt-tipteki Meme Kanserleri.....	8
2.2.7. Apokrin Alt-tipteki Meme Kanserleri	9
2.3. Meme Kanserine Karşı İmmün Yanıtlar	9
2.3.1. Meme Kanseri ve İnflamasyon.....	9
2.3.2 Meme Kanserinde T Hücre Yanıtları	14
2.4 Kostimülasyon.....	20
2.4.1 B7 Kostimülatör Ligand Ailesi	20
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
3.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler	28
3.2. Hazırlanan Tamponlar ve Çözeltiler	28
3.3. Hücre Kültürü Deneyleri.....	30
3.3.1. Hücre Hatlarının Kültürü.....	30
3.3.2. CD4 ⁺ T Hücrelerin İzolasyonu	32

3.3.3 Ko-kültür Deneyleri	33
3.4. Akım Sitometri Analizleri	37
3.5. Moleküler Teknikler	39
3.5.1. RNA İzolasyonu	39
3.5.2. İzole Edilen RNA'nın Saflık ve Kalite Analizi	39
3.5.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (<i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR)	41
3.5.6. Agaroz Jel Elektroforezi	43
3.6. İstatistiksel Analiz.....	44
4.BULGULAR.....	45
4.1. Meme Kanseri Hücre Hatlarında B7 Ligand Gen Ekspresyonunun Araştırılması.....	45
4.3. Lüminal ve Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücre Hatlarının CD4 ⁺ T Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi	54
4.3.1 Miyeloid Kökenli KG-1 Hücreleri ile T Hücre Proliferasyonunun Uyarımı	54
4.3.2. Meme Kanseri Hücreleriyle Ko-kültürü Yapılan Naif veya Ön-Uyarımı Yapılmış T Hücrelerin Proliferasyonu.....	56
4.3.3. CD4 ⁺ T Hücrelerin, KG-1 ve Fikse veya Kontrol Meme Kanseri Hücreleri Varlığında Proliferasyonu	60
4.4. Meme Kanseri Hücreleri ile Ko-Kültürü Yapılan CD4 ⁺ T Hücrelerde Aktivasyon Belirteçlerinin Analizi.....	66
5. TARTIŞMA.....	70
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	80
KAYNAKLAR	82
EKLER	91
EK-I: Etik Kurul İzni	91
EK-II: Çalışmanın sunulduğu bilimsel toplantılar.....	92

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AR	Androjen reseptörü
AC	Adenokarsinom
ASH	Antijen sunucu hücre
BBMK	Bazal-benzeri meme kanseri
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CK	<i>Cytokeratin</i>
COX2	Siklooksijenaz 2
CSC	<i>Cancer stem cell</i>
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
DC	Dendritik hücre
DEPC	Dietil pirokarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ECM	<i>Extra celular matrix</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	<i>Epithelial to mesenchimal transition</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	Fötal Buzağı Serumu
GATA3	<i>Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3</i>
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni-stimüle edici faktör
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIF1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1α</i>
hTERT	<i>Human Telomerase reverse transcriptase</i>
ICOS	<i>Inducible T-cell Costimulator</i>
IDC	İnvaziv duktal karsinom
IDO	İndolamin 2,3-dioksijenaz
IFGBP-2	Insulin-like growth factor-binding protein 2
IFN	İnterferon
Ig	İmmünglobulin

IgSF	<i>Immunoglobulin superfamily</i>
LAG3	Lymphocyte-activation gene 3
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MHC	Major histocompatibility complex
MKI67	Antigen KI-67
MYBL2	Myb-related protein B
NF- κ B	<i>Nuclear factor-κB</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NKT	<i>Natural killer T</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositide 3-kinases</i>
PR	<i>Progesterone receptor</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RTK	Reseptör tirozin kinaz
SHP	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TAM	<i>Tumor-associated macrophages</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TN	<i>Triple negative</i>
TNF	Tumor Necrosis factor
TNFRSF	<i>Tumor necrosis factor superfamily</i>
Treg	<i>Regulatory T cells</i>
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Meme dokusu hücreleri ve memenin dukto-lobüler (kanal-lobül) yapısı	4
Şekil 2.2. Meme kanserinin gen ekspresyon profiline göre moleküler sınıflandırması..	4
Şekil 2.3. Kanser gelişiminde etkili inflamatuvar yollar	11
Şekil 2.4. Meme kanseri gelişimi immün hücrelerin bol infiltrasyonu ile karakterizedir..	12
Şekil 2.5. Tümör gelişimi süresince T hücre yanıtlarının polarizasyonu	14
Şekil 2.6. CTL'ler tarafından tümörün reddi.	15
Şekil 2.7. Th2-tipi immün yanıtların TSLP ile indüklenmesi.....	17
Şekil 2.8. Treg hücreleri tarafından kullanılan baskılama mekanizmaları....	19
Şekil 2.9. B7 ligand ailesi ve reseptörlerinin yapısı.....	21
Şekil 2.10. B7-CD28 ligand-reseptör ilişkisinin modellemesi T hücrenin ikinci sinyaller aracılığı ile uyarılması ve daha sonra baskılanması..	22
Şekil 2.11. T hücrelerde ko-sinyal etkileşimleri.....	23
Şekil 2.12. CD28 ailesi reseptörlerinin ko-stimülatör ve ko-inhibitör sinyal yolları.	24
Şekil 3.1. A. CD4 ⁺ T hücrelerin FACS yöntemiyle izole edilmesi. B. Sort başarısı analizi..	33
Şekil 3.2. A. CD4 ⁺ T hücrelerin geri saflaştırılması. B. Geri ayırım başarısı analizi.....	34
Şekil 3.3. Meme kanseri hücreleri ile CD4 ⁺ T hücrelerin 96 kuyucuklu kültür kabına ekim oranları. (1 = 2.5x10 ⁴ hücre).....	36
Şekil 3.4. 50 bp DNA <i>ladder</i> (MBI Fermentas, Litvanya)	44
Şekil 4.1. Optimize edilen RT-PCR koşulları ile elde edilmiş ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucu.	45

Şekil 4.2. Meme kanseri hücre hatlarında B7 ligandlarının gen ekspresyon RT-PCR analizi sonuçları.....	46
Şekil 4.3. B7-H2 molekülünün temsili akım sitometri histogramları.	49
Şekil 4.4. B7-H2 pozitifliği gösteren meme kanseri hücrelerinin yüzdeleri...	50
Şekil 4.5. B7-H1 molekülünün temsili akım sitometri histogramları.	51
Şekil 4.6. B7-H1 pozitifliği gösteren hücrelerin yüzdeleri.	52
Şekil 4.7. B7-DC molekülünün temsili akım sitometri histogramları.....	53
Şekil 4.8. B7-DC pozitifliği gösteren meme kanseri hücrelerinin yüzdeleri..	54
Şekil 4.9. A. CD4 ⁺ T hücrelerin miyeloid kökenli KG-1 hücreleri ile uyarımı gerçekleştirilen CFSE analizine ait temsili akım sitometri grafikleri. B. CD4 ⁺ T hücrelerin miyeloid kökenli KG-1 hücreleri ile yapılan ko-kültür ve ön-uyarımda T hücrelerin proliferasyon yüzde değerleri.	56
Şekil 4.10. Naif CD4 ⁺ T hücreler ile iki lüminal (MCF-7, BT-474) ve iki bazal-benzeri (MDA-MB-468, MDA-MB-231) özellikteki meme kanseri hücrelerinin ko-kültüründen 96 saat sonra, T hücre proliferasyonunun temsili akım sitometri histogramları.....	57
Şekil 4.11. Ön-uyarılmış CD4 ⁺ T hücreler ile iki lüminal (MCF-7, BT-474) ve iki bazal-benzeri (MDA-MB-468, MDA-MB-231) özellikteki meme kanseri hücrelerinin ko-kültüründen 96 saat sonra, T hücre proliferasyonunun temsili akım sitometri histogramları.	58
Şekil 4.12. Lüminal ve bazal-benzeri hücreler ile ön-uyarımı yapılmış veya yapılmamış T hücreler anti-CD3 mAb varlığında 96 saat boyunca yapılan ko-kültürlerde, T hücre proliferasyonu yüzdeleri..	59
Şekil 4.13. Fikse edilmiş meme kanseri hücreleriyle beraber T ve KG-1 hücrelerinin ko-kültürlerinde T hücre proliferasyonunun temsili akım sitometri grafikleri.	61
Şekil 4.14. Fikse edilmemiş (kontrol) meme kanseri hücreleriyle beraber T ve KG-1 hücrelerinin ko-kültürlerinde T hücre proliferasyonunun temsili akım sitometri grafikleri.....	62

Şekil 4.15. Fikse edilmiş ve edilmemiş (kontrol) meme kanseri hücreleriyle beraber T hücre ve KG-1 hücrelerinin üçlü ko-kültürlerinde anti-CD3 mAb varlığında T hücrelerinin proliferasyon yüzdeleri.....	63
Şekil 4.16. MDA-MB-231 hücreleri ile T hücre ve KG-1 hücrelerinin üçlü ko-kültür sonuçlarının temsili akım sitometri histogramları.....	64
Şekil 4.17. A. Naif ve ön-uyarımı yapılmış T hücrelerle meme kanseri hücrelerinin ikili ko-kültürü ile elde edilen T hücre proliferasyon değerleri ...	65
B. KG-1, T hücre ve fikse edilen veya fikse edilmeyen (kontrol) meme kanseri hücreleriyle yapılan üçlü ko-kültürlerde (0.125:1:1) T hücre proliferasyon değerleri gösterilmiştir.....	65
Şekil 4.18. Naif T hücreler ile meme kanseri hücrelerinin (MCF-7, BT-474, MDA-MB-468 ve MDA-MB-231) 20 saat ko-kültüründen sonra T hücre aktivasyon belirteçleri CD25, CD69 ve CD154 ekspresyonlarının temsili akım sitometri histogramları.....	67
Şekil 4.19. Ön-uyarımı yapılmış T hücreler ile meme kanseri hücrelerinin (MCF-7, BT-474, MDA-MB-468 ve MDA-MB-231) 20 saat ko-kültüründen sonra T hücre aktivasyon belirteçleri CD25, CD69 ve CD154 ekspresyonlarının temsili akım sitometri histogramları.	68
Şekil 4.20. Naif ve Ön-uyarımı yapılmış T hücreler ile meme kanseri hücrelerinin (MCF-7, BT-474, MDA-MB-468 ve MDA-MB-231) 20 saat ko-kültüründen sonra aktivasyon belirteçleri CD25, CD69 ve CD154 ekspresyonlarının karşılaştırmalı grafikleri (*P<0.05).	69

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Meme kanseri hücre hatları ve özellikleri.....	30
Tablo 3.2. Akım sitometride kullanılan antikorlar	38
Tablo 3.3. cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri ve koşullar	41
Tablo 3.4. Standart PCR bileşen miktarları ve son konsantrasyonları.....	42
Tablo 3.5. Standart PCR <i>thermal cycler</i> koşulları.....	42
Tablo 3.6. Gen ekspresyon analizlerinde kullanılan primer dizileri.	43

1.GİRİŞ

Meme kanseri klinik, morfolojik ve moleküler düzeyde farklı gösterir. Bu heterojenite tümör histopatolojisi, klinik seyir ve tedaviye verilen cevaplar açısından incelendiğinde; bütün meme kanseri çeşitlerinin kendine özgü bir moleküler portresi olduğu ortaya çıkmıştır (1). Meme kanseri gen ekspresyon profillerine göre 5 ana alt-tipe ayrılmaktadır; östrojen reseptörü (ER)-pozitif ve progesteron reseptörü (PR)-pozitif olan Lüminal A, Lüminal B alt-tipleri ve ER-negatif olan HER2-pozitif, bazal-benzeri ve normal meme benzeri alt-tipleridir (1).

İnflamasyon, kanserin temel belirteçlerindendir. Çeşitli immün hücreler tümöre karşı veya tümörü destekleyici özellik gösterir. İmmün hücreler, normal meme stromasının önemli bileşenlerinden değildir. Ancak, edinsel ve doğal immün sistem hücreleri meme kanserinde belirgin düzeyde artış gösterir. İmmün hücre infiltrasyonu hem *in situ* hem de invaziv karsinomlarda gözlenmektedir. İmmün hücre infiltrasyonunun artışı, memede tümörögenезin ilerlemesi ile paralellik gösterir.

Naif T hücrelerin aktivasyonu için MHC/antijen kompleksinin tanınması yeterli değildir. T hücresinin etkin aktivasyonu için ASH tarafından sağlanan kostimülatör moleküllere ihtiyaç vardır. Fakat T hücre aktivasyonunu sağlayan kostimülatör moleküllerin tümör mikroçevresindeki ekspresyonu sınırlı düzeydedir (2). CD28 ve B7 en iyi tanımlanmış ve kostimülasyonda en önemli rol oynayan IgSF reseptörler ailesidir. B7 ailesi üyeleri; B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-H2 (ICOSLG, CD275) , B7-H1 (PD-L1, CD274), B7-DC (PD-L2, PDCD1LG2, CD273), B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1) ve B7-H6'dır.

Meme kanserinde B7 ailesi düzeylerinin ekspresyonunun varlığı veya nasıl düzenlendiğine dair sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Meme kanserinde, B7-H1 (PD-L1), B7-H4 moleküllerinin ekspresyonu bilinmektedir ve kötü prognozla korelasyon gösterir (3-5). B7-H3 molekülü primer meme kanserinde eksprese olmakta ve metastazla ilişkilidir (6).

Bu çalışmanın amacı kapsamında; meme kanseri hücreleri üzerinde B7 ailesi moleküllerinin varlığı ve ekspresyonunun inflamatuvar koşullar

altında nasıl düzenlendiği araştırılmıştır. Meme kanseri hücresi üzerinde yüksek düzeyde varlığı saptanan kostimölatör moleküllerin yardımcı T hücre fonksiyonlarını nasıl etkilediği de belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar lüminal ve bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinin yardımcı T hücre aktivasyonu ve proliferasyonunu farklı kostimölatör yolaklar ile modöle ettiğine işaret etmektedir. Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinin T hücre aktivasyonunu desteklemesi ancak aktive T lenfositlerin yüzeyinde bulunan PD-1 inhibitör reseptörüne ait ligandlar B7-H1 ve B7-DC'yi sürekli eksprese etmesi söz konusudur.

2.GENEL BİLGİLER

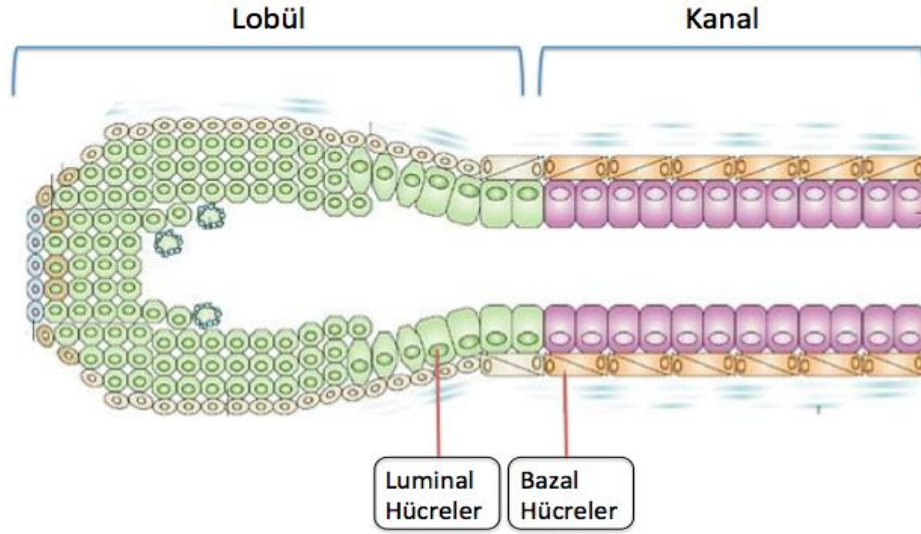
2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser çeşididir. Meme kanserinin sıklığı Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya'da; Afrika, Güney ve Doğu Asya'daki diğer bölgelere kıyasla daha yüksek seyredir (7). Meme kanseri klinik, morfolojik ve moleküler düzeyde farklılıklar gösterir. Bu heterojenite tümör histopatolojisi, klinik seyir ve tedaviye verilen cevaplar açısından incelendiğinde; bütün meme kanseri çeşitlerinin kendine özgü bir moleküler portresi olduğu ortaya çıkmıştır (1).

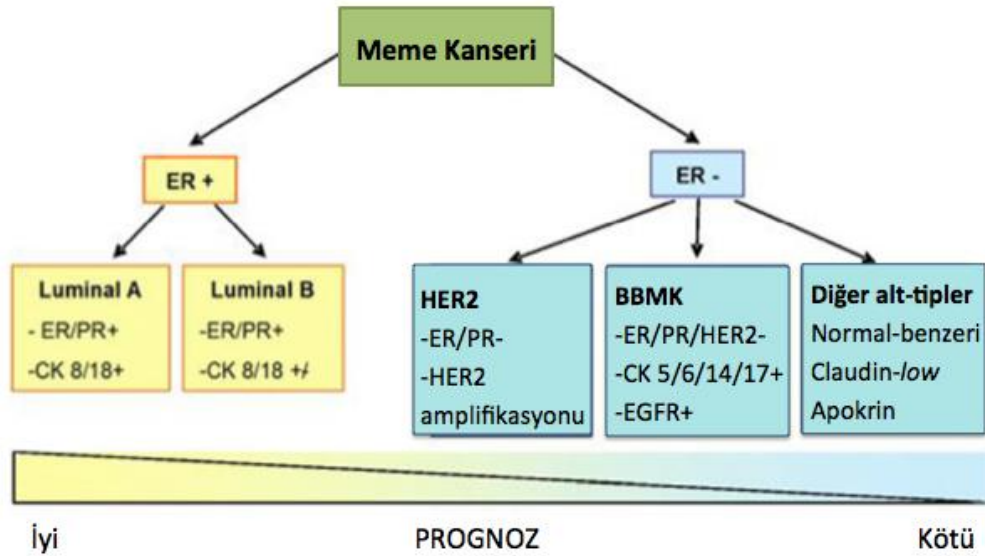
2.2. Meme Kanserinin Moleküler Alt-Tipleri

Meme kanserinin alt-typleri iki esas epitel hücre tipinin gen ekspresyon profiline göre isim almışlardır. Lüminal epitel hücreler normal meme dokusunda kanal veya lobüllerin lümenini kaplayan tek sıralı hücre tabakasını oluşturur. Bazal miyoepitelyal hücreler ise lüminal hücreleri çevreleyen ikincil hücre katmanını oluşturur. Bu katman bazal membran ile doğrudan temas halindedir (1). Meme dokusunun yapısal bileşenlerini oluşturan hücrelerin yerleşimi Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Gen mikrodizin analizlerine göre; meme kanseri östrojen reseptörü (*estrogen receptor*, ER)-pozitif ve ER-negatif olmak üzere iki temel alt-tipe ayrılmaktadır. Daha sonra, farklı biyolojik ve klinik özelliklerine göre ek alt gruplar ayrılır (Şekil 2.2). Meme kanserlerinin yaklaşık %75'i ER ve/veya progesteron reseptör (*progesterone receptor*, PR) pozitifliği gösterir. ER-pozitif tümörler tipik olarak lüminal epitel hücrelere özgü genleri ifade ederler. Bu nedenle, bu alt-grup "Lüminal" olarak adlandırılmıştır. Lüminal grup kendi arasında Lüminal A ve Lüminal B şeklinde iki alt gruba daha ayrılır (1).



Şekil 2.1. Meme dokusu hücreleri ve memenin dukto-lobüler (kanal-lobül) yapısı (Smalley ve Ashworth (8)'den uyarlanmıştır.)



Şekil 2.2. Meme kanserinin gen ekspresyon profiline göre moleküler sınıflandırması. (Valentin, M.D., 2012 (1)'den uyarlanmıştır).ER; östrojen reseptörü, PR; progesteron reseptörü, BBMK; bazal-benzeri meme kanseri, CK; sitokeratin.

Meme kanserinin %20-25'ini ER-negatif tümörler oluşturur. ER-negatif kanserler HER2-pozitif, bazal-benzeri ve normal meme-benzeri olmak üzere üç alt-gruba ayrılır: HER2-pozitif tümörler, HER2 gen amplifikasyonuna sahiptirler veya bu yolakla ilişkili genleri yüksek seviyede eksprese ederler. Normal meme-benzeri grubundaki tümörler adipoz hücre ve epitel-olmayan hücre tiplerine ait genlerin yüksek ekspresyon profilini taşırlar. Aynı zamanda, düşük seviyelerde lüminal belirteçleri de eksprese ederler (9). Ancak, bu alt grubun varlığı araştırmacılar arasında halen tartışma konusudur. Bazal-benzeri alt-tipe ait tümörler sitokeratin (*cytokeratin*, CK)5, CK14, CK17 ve laminin gibi bazal/miyoepitel belirteçlerini yüksek düzeyde barındırırlar. Bu grupta ER, PR ve HER2 reseptörlerine rastlanmaz. Bu nedenle, üçlü negatif (*triple negative*, TN) olarak da nitelendirilirler. Yine de üçlü negatif ve bazal-benzeri terminolojilerinin birbirinin yerini tutmadığı bildirilmektedir (10).

Meme kanserinin yeni tanımlanan alt-tiplerinden biri de klaudin genini düşük düzeyde eksprese eder. Bu nedenle, bu grup Klaudin-düşük (*Claudin-low*) olarak isimlendirilmiştir. Bu alt-tip, sıkı bağlantı bölgelerinin ve hücre-hücre adezyon molekülleri olan klaudin 3, klaudin 4, klaudin 7, occludin ve E-kaderin ile ilgili genlerin düşük düzeyde ifade olmalarıyla karakterizedir. Bu meme kanseri hücrelerinde epitelyal-mezenkimal dönüşüm (*epithelial to mesenchymal transition*, EMT) sürecinde rol alan ve kök hücre özelliklerini yansıtan genlerin yüksek ifadesi gözlenir.

Meme kanserinin en son tanımlanan alt-tipi ise Moleküler Apokrin Tümörler (*Molecular Apocrin Tumors*)'dir. Bu tümörler immünhistokimyasal olarak ER-, PR- ve androjen reseptörü (AR)-pozitifdir (1).

2.2.1. Lüminal A Alt-tipteki Meme Kanseri

Lüminal A, meme kanserinin %50-60 oranıyla en sık rastlanan alt tipidir. Meme kanallarının lüminal epitel hattı boyunca ER transkripsiyon faktörünün aktive ettiği genlerin ekspresyonu ile karakterizedir. Hücre proliferasyonu ile ilgili genleri ise düşük düzeyde eksprese ederler. İmmünhistokimyasal profili ER, PR, Bcl-2, lüminal CK 8/18 pozitif; HER2

negatiftir. Düşük histolojik evre gösterir. Lüminal A alt-tipinde GATA3 biyobelirteçleri yüksek seviyededir. Bu alt-tipteki meme kanseri hastaları iyi prognoz gösterir ve diğer alt-tiplere göre önemli ölçüde düşük relaps oranına sahiptir. Relapstan sonra sağkalım süresi de uzun (median 2.2 yıl) seyreder. Ancak, relapslar farklı organ metastazları ile ortaya çıkabilir. Yüksek oranda kemik metastazı, düşük oranlarda ise merkezi sinir sistemi, karaciğer ve akciğer metastazları gözlenebilir (11).

2.2.2. Lüminal B Alt-tipteki Meme Kanseri

Meme kanserlerinin %10-20'sini Lüminal B alt-tipi oluşturur. Lüminal A ile karşılaştırıldığında daha agresiftir ve kötü prognoz gösterir. ER düzeyi Lüminal A alt-tipine göre daha düşüktür. Memenin lüminal epitel içeriklerinin, örneğin lüminal sitokeratinlerin CK8/18, ER ve ER aktivasyonunuyla-ilişkili genlerin (siklin D1 gibi) ekspresyon paternini taşır. İki alt-tip arasındaki esas biyolojik farklılık, MKI67, MYBL2 ve siklin B1 gibi proliferasyon genlerinin ekspresyonlarındaki artıştır. Lüminal B'de epidermal büyüme faktörü reseptörü (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) ve HER2 ekspresyonu da gözlenebilir. Meme kanserinde, fosfatidilinozitol 3 kinaz (PI3K) sinyal yolağı aktivasyonu mevcuttur. ERBB2/HER2 aktivasyonu, PTEN gibi negatif düzenleyicilerin kaybı, Akt ve PIK3CA amplifikasyonları meme kanserinde gösterilmiştir. Preklinik çalışmalar PI3K sinyal yolağında yer alan genlerin ekspresyon artışını Lüminal B alt-tipindeki meme kanserlerinin bir özelliği olarak tanımlamıştır (11-14).

2.2.3. HER2-Pozitif Alt-tipteki Meme Kanseri

Meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'sini HER2-pozitif alt-tipi oluşturur. HER2, EGFR ailesine ait bir reseptör tirozin kinaz (RTK)'dir (15). HER2 17q12 kromozom bölgesinde bulunur. HER2-pozitif meme kanseri, HER2 geni ve HER2 sinyal yolağıyla ilişkili genlerin yüksek ekspresyonu veya amplifikasyonu ile karakterizedir. (11). HER2'nin alt sinyal yollarına sinyal iletebilmesi için diğer ERBB (HER olarak da bilinir) ailesi üyeleri (EGFR, ERBB3, ERBB4) ile dimerizasyonu veya oligomerizasyonu gereklidir.

HER2 geninin amplifiye olması durumunda rastgele dimerizasyonlar gerçekleşir ve sinyal iletiminde artış gözlenir (15).

HER2-pozitif tümörlerde hücrel proliferasyonla ilişkili genler aşırı düzeyde ifade bulur. Bu tümörlerin %75'i ileri histolojik evrededir ve %40'tan fazlası p53 mutasyonlarını taşır. İmmünohistokimyasal profili, ER-negatif/HER2-pozitif olan tümörlerin sadece %70'inin HER2 proteinini aşırı düzeyde eksprese ettiği bulunmuştur. Ayrıca, mikrodizin analizlerine göre bütün HER2 amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu gösteren tümörlerin de bu alt-gruba dahil edilemeyeceği sonucuna varılmıştır. Örneğin, klinik olarak ER/HER2-pozitif tümörlerin önemli bir bölümü moleküler olarak Lüminal B alt-grubuna girer. HER2 amplifikasyonuna sahip tümörler de kendi aralarında klinik sağkalım açısından 3 alt-gruba ayrılır. İlk grup, %12 oranında 10 yıllık sağkalım gösterir ve kötü prognoza sahiptir. Diğer gruplar ise, %50 ve %55 oranlarında 10 yıllık sağkalım gösterirler. Bu durum, tümörlerin iyi ve kötü prognoza göre derecelendirilmesini sağlamış ve HER'nin prognostik belirteç olarak kullanılmasına yol açmıştır (11).

2.2.4. Bazal-benzeri Alt-tipteki Meme Kanseri

Meme kanserlerinin %10-20'sini bazal-benzeri alt-tip oluşturur. Genellikle bazal/miyoepitel hücre belirteçlerini yüksek düzeyde eksprese ederler. Bunlar, yüksek moleküler ağırlık gösteren sitokeratinler CK5, CK6, CK14, CK17, vimentin, P-kaderin, caveolin1, caveolin2, nestin, CD44 ve EGFR'dir. Ayrıca, lüminal epitel genleri olan CK8/18 ve c-Kit de eksprese edebilirler. Ancak, bu genlerin ifade seviyeleri lüminal alt-tipteki kanserlerden belirgin seviyede düşüktür. Bazal-benzeri tümörler yüksek mitotik indeks, nekroz, yayılım ve belirgin lenfositik infiltrasyon ile karakterize invaziv duktal karsinom özelliklerini taşımaktadır. Bazal-benzeri meme kanserleri, sıklıkla merkezi sinir sistemine ve lenf düğümlerine metastaz yapar. İmmünohistokimyasal profili, ER-, PR- ve HER2-negatiftir. Bu nedenle üçlü negatif de denir. Bazal-benzeri alt-tipi belirlemek için immünohistokimyasal olarak 5 belirteç belirlenmiştir: ER, PR, HER2, EGFR ve CK5/6 (11). Bu tip kanserlerde integrin moleküllerinin ekspresyonunda da düzensizlikler

saptanmıştır. Bazal-benzeri meme kanseriyle ilişkili pek çok gen, hücre proliferasyonu, sağkalımı, migrasyonu ve invazyonunu destekler. Bu süreçte çok çeşitli sinyal yolları rol oynasa da mitojen-aktiflenmiş protein kinaz (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK), PI3K-AKT ve nükleer faktör-kB (*nuclear factor-kB*, NF-kB) en çok düzensizlik gösteren sinyal yollarıdır (1). Bazal-benzeri meme kanserinde Wnt sinyal yolağının aktivasyonu da gözlenmektedir. Sitoplazmada ve çekirdekte β -katenin birikimi söz konusudur. İnsan meme tümörlerinde ve fare modellerinde aktive olan Wnt sinyal yolağının meme tümörögenezini desteklediği gösterilmiştir (16, 17) .

Bazal-benzeri tümörler, lüminal alt-tipteki tümörlere göre daha kötü prognoz gösterir. Bu tümörlerin taşıdıkları p53 mutasyonları agresifliğinin ve kötü prognozunun kanıtı niteliğindedir. BRCA1 geninde *germ-line* mutasyon taşıyan tümörler de bu gruba girmektedir. BRCA1, DNA tamirinde önemli rol oynar. BRCA1'in mutasyonları nedeniyle inaktivasyonu, tümör büyümesiyle ilişkili genetik instabilitenin oluşmasına yol açar (11).

2.2.5. Normal Meme-Benzeri Alt-tipteki Meme Kanseri

Meme kanserlerinin %5-10'unu normal meme-benzeri alt-tip oluşturur. Adipoz doku genlerinin ekspresyonuyla karakterizedir. Normal meme-benzeri alt-tipinin prognozu lüminal alt-tipe kıyasla daha kötü, bazal-benzeri alt-tipe kıyasla ise daha iyidir. Bazal-benzeri alt-tipteki meme kanserleri gibi üçlü negatif immünohistokimyasal profile sahiptirler. Ancak, bazal-benzeri alt-tipte görülen CK5 ve EGFR genlerini eksprese etmezler (11). Bazı araştırmacılar mikrodizin çalışmaları sırasında tümör dokusunun adipoz/bağ doku ile yüksek kontaminasyonu nedeniyle bu grubun belirlendiğini düşünmektedir (18) .

2.2.6. Klaudin düşük Alt-tipteki Meme Kanseri

Sıkı bağlantı ve hücreler arası adezyon molekülleriyle ilgili genlerin düşük ekspresyonlarıyla karakterizedir. Klaudin 3, klaudin 4, klaudin 7, cingulin, ocludin ve E-kaderin ekspresyonu eksikliklerinden dolayı "Klaudin-düşük (*claudin low*)" adını alırlar. Hiyerarşik gruplamada bu alt-tip bazal-

benzeri alt grubun yanında yer alır. Ancak, bazal-benzeri alt-grubun aksine tümörde immün infiltrasyonun artmasını indüklediği bilinen 40 adet geni aşırı düzeyde eksprese eder. Bu tümörlerde hücre çoğalmasıyla ilişkili genler düşük düzeyde ifade olmasına rağmen kötü prognoz görülür. Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve mezekimal farklılaşma ile ilgili genlerin ekspresyonları sebebiyle “kanser kök hücre” (*cancer stem cell*, CSC) fenotipi kazanırlar. İmmünohistokimyasal olarak üçlü negatif olarak nitelendirilirler. Ancak, bazal-benzeri alt-tipte olduğu gibi klaudin-düşük alt-tipinde vakaların yaklaşık %20’sinin hormon reseptörü pozitifliği de gösterebileceği bildirilmiştir (1, 11).

2.2.7. Apokrin Alt-tipteki Meme Kanseri

Apokrin tümörler, invaziv duktal karsinomların bir alt-tipi olarak tanımlanmışlardır. Bu tümörler, androjen reseptörü (AR) ekspresyonu ile karakterizedir. Fakat ER ve PR ekspresyonu yoktur. Apokrin tipteki kanserlerde sıklıkla HER2’nin aşırı ekspresyonu görülmektedir. HER2 ekspresyonu olmayan apokrin tümörler üçlü negatif fenotipine girer.

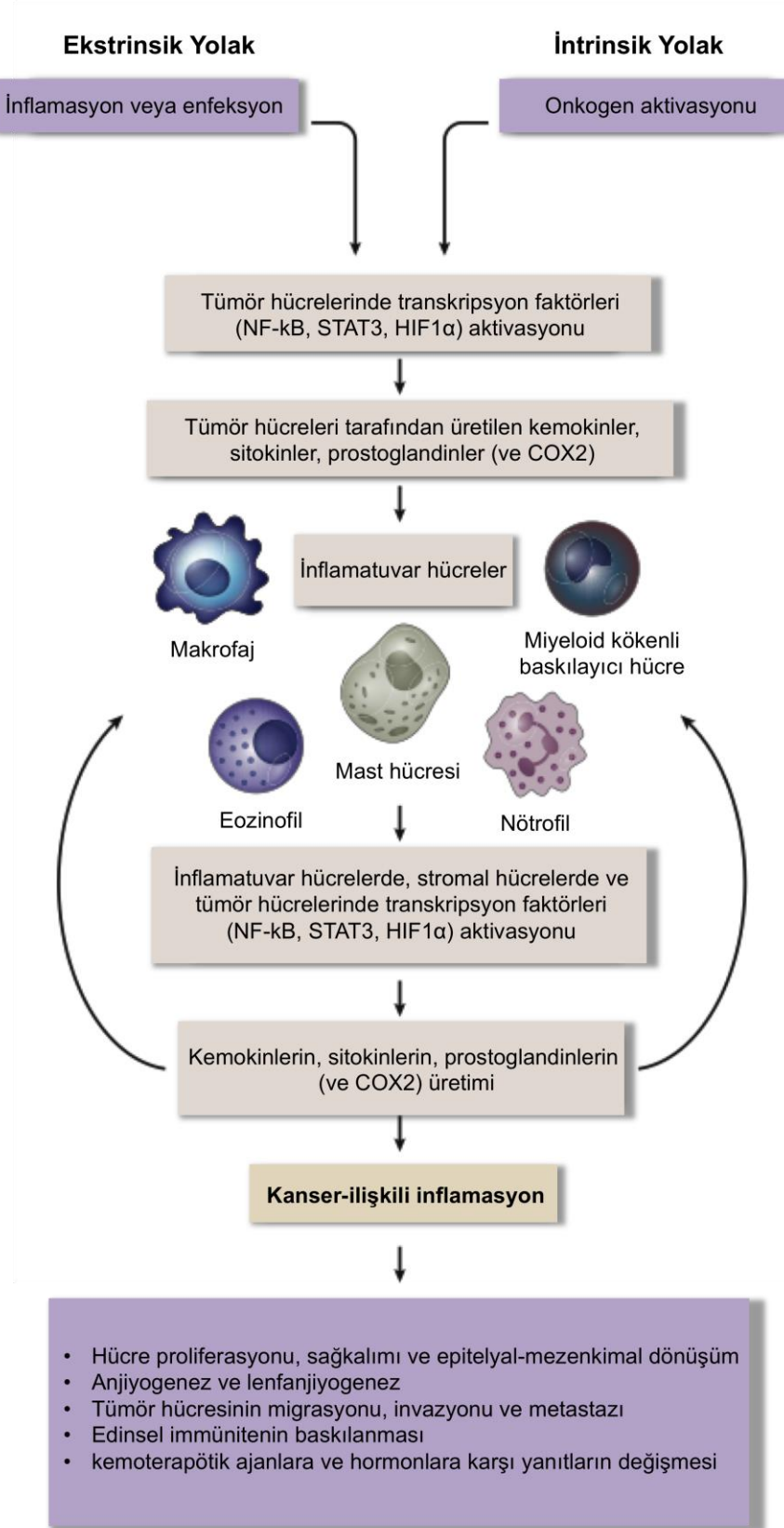
2.3. Meme Kanseri Karşı İmmün Yanıtlar

Lökosit infiltrasyonu ve tümör mikroçevresinde yer alan hücre tipleri meme dokusunun neoplastik dönüşümünde ve kanserin progresyonunda önemli etkilere sahiptir (19).

2.3.1. Meme Kanseri ve İnflamasyon

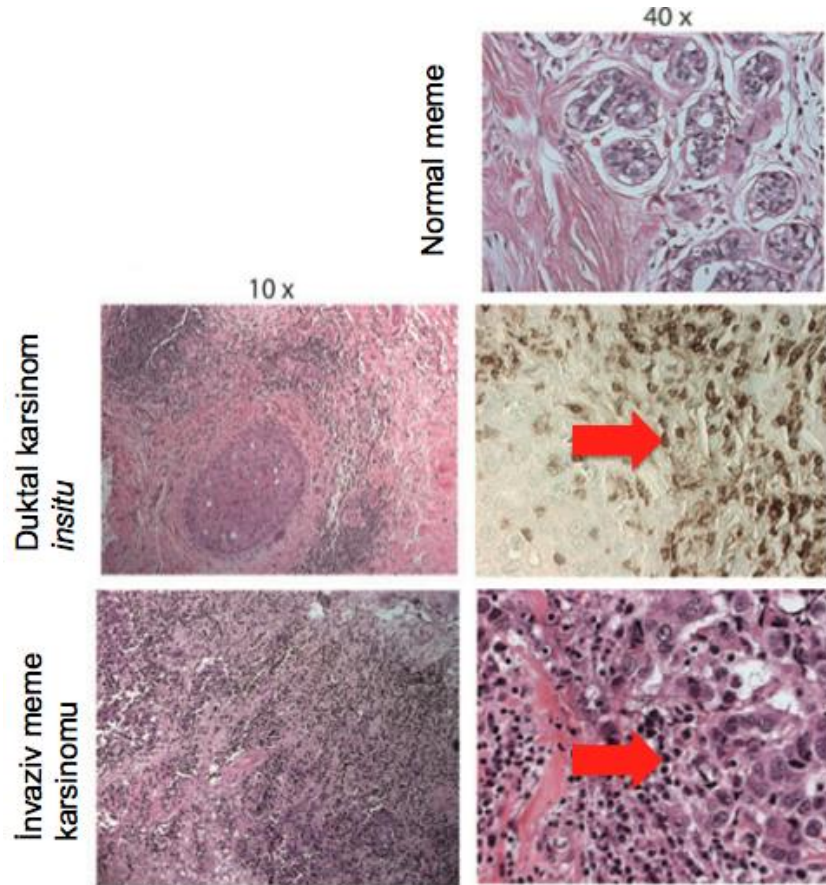
İnflamasyon, kanserin temel belirteçlerindendir. Çeşitli immün hücreler tümöre karşı veya tümörü destekleyici fonksiyon gösterir. İnflamasyon ve kanser arasındaki ilişki iki yolak altında incelenmektedir: İntrinsik yolak ve ekstrinsik yolak (Şekil 2.3). İntrinsik yolak, neoplaziye sebep olan genetik değişikliklerle aktive olur. Bu değişiklikler, mutasyon sonucu onkogen aktivasyonu, kromozom rearanjmanı veya amplifikasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonudur. Bu süreçte, transforme olan hücrelerin inflamatuvar araçlar üretmesi nedeniyle inflamatuvar bir mikroçevre oluşur.

Meme kanserinde de bu yolak çalışmaktadır. Ekstrinsik yolakta ise, patojen veya yaralanma sonucu oluşan inflamasyon ve enfeksiyon kanser gelişimi riskini artırır. Her iki yolak da, tümör hücrelerindeki benzer transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Bu süreçte yer alan en önemli transkripsiyon faktörleri, nükleer faktör-kB (NF-kB), *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), *hypoxia-inducible factor 1 α* (HIF1 α)'dır. Bu transkripsiyon faktörleri sitokinler ve kemokinler gibi inflamatuvar araçların ve siklooksijenaz 2 (COX2)'nin üretimini düzenler. Bu sayede tümör dokusuna çeşitli lökositler çağırılır ve aktive edilirler. Üretilen inflamatuvar sitokinler de stromal hücreler ve tümör hücrelerinde yine benzer transkripsiyon faktörlerini uyarırlar. Böylece, inflamatuvar araçların düzeyi yükselir ve kanser mikroçevresi gelişir. Kanser nedenli inflamasyonun alevlenmesinin tümörü destekleyen pek çok yanı vardır. Hücre proliferasyonu, sağkalımı, epitelyal mezenkimal dönüşüm, anjiyogenez, tümör hücresinin migrasyonu, invazyonu ve metastaz desteklenirken, özellikle edinsel anti-tümör immün yanıtlar inhibe edilir



Şekil 2.3 Kanser gelişiminde etkili inflamatuvar yollar (Mantovani ve ark. (20)'den uyarlanmıştır).

İmmün hücreler, normal meme stromasının önemli bileşenleri arasında değildir. Ancak, edinsel ve doğal immün sistem hücreleri meme tümörü dokusunda belirgin düzeyde artış gösterir. İmmün hücre infiltrasyonu hem *in situ* hem de invaziv karsinomlarda gözlenmektedir. İmmün hücre artışı, memede tümörögenезin ilerlemesi ile paralellik gösterir (Şekil 2.4). Tümör mikroçevresinde hem doğal bağışıklık hücreleri, doğal öldürücü (*natural killer*, NK) hücreler, doğal öldürücü T (*natural killer T*, NKT) hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler (DC), hem de edinsel bağışıklık hücreleri; yardımcı T hücreleri, sitotoksik T hücreleri ve B hücreleri bulunur (19).



Şekil 2.4. Meme kanseri gelişimi immün hücrelerin bol infiltrasyonu ile karakterizedir. Normal, pre-malin ve malin tümörlerin hematoksilen ve eozin (H&E) boyası ile boyanmış temsili fotoğrafları gösterilmiştir. Kırmızı oklar tümöre infiltre olan immün hücreleri göstermektedir (DeNardo ve ark., (19)'den uyarlanmıştır).

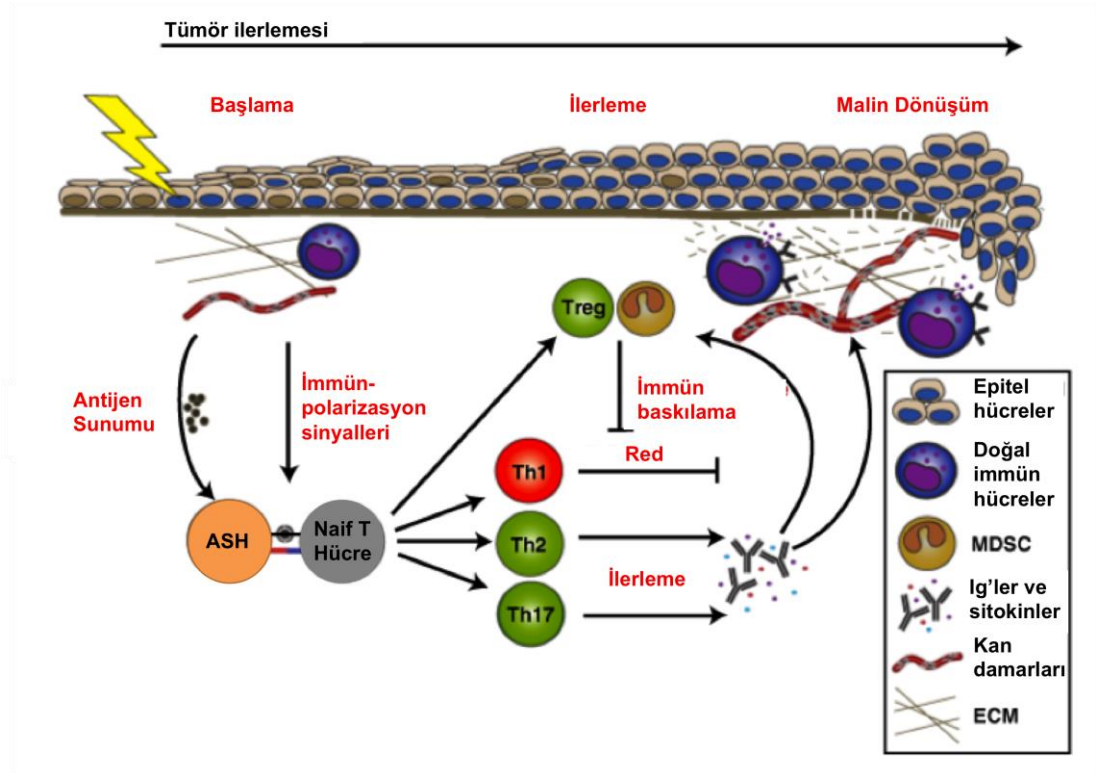
Doğal bağışıklık hücreleri dokunun tamirinde ve yeniden şekillendirilmesinde görev alır. Bu hücreler tarafından salgılanan faktörler genellikle tümör büyümesini destekler (21). Makrofajlar salgılanan proinflamatuvar sitokinlerin ana kaynağıdır. Bu hücreler genellikle tip 1 (M1) veya tip 2 (M2) fenotipinde bulunurlar. M1'lerden salgılanan IL-12, yardımcı T hücre 1 (Th1) gelişimine ve anti-tümör sitotoksik etkilerine yardımcı olur (22). M2'ler immün baskılayıcı sitokinler salgılar ve tümör hücrelerinin büyümesini destekler. Tümör-ilişkili makrofajlar (TAM'lar) genellikle M2 fenotipindedirler. Bu hücrelerin infiltrasyonu pek çok kanserde kötü prognozun belirtecidir. TAM'lar invazyon ve metastazı artıran pek çok proteaz salgılar. Salgıladıkları sitokinler tümöre özgül edinsel immün yanıtları inhibe eder ve anjiyogenik faktörler de neovaskülerizasyonu artırır (23).

Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (*Myeloid-derived suppressor cells*, MDSC'ler), kanser büyümesine destek olan başka bir grup doğal immün sistem hücreleridir. MDSC'ler miyeloid öncüllerden matür miyeloid hücre oluşumunun engellendiği kronik inflamasyon sırasında oluşurlar. Bu hücreler edinsel immün yanıtları çeşitli mekanizmalarla inhibe ederler. Salgıladıkları faktörlerle düzenleyici T hücreleri (*regulatory T cells*, Treg) uyarırlar. Ayrıca, MDSC'lerin anti-tümör immüniteyi yardımcı T hücre 2 (Th2) yanıtlarına dönüştürmede rol oynadığı da gösterilmiştir (Sinha, P. ve ark. 2007).

Diğer immün sistem hücreleri; nötrofiller, mast hücreleri ve eozinofiller de proliferatif özellikteki tümör mikroçevresinin oluşumuna katkıda bulunur (21). Ayrıca, dendritik hücreler (DC), etkin anti-tümör immün yanıtların uyarılmasında kritik öneme sahiptir. Tümör mikroçevresinde yer alan DC'ler ve diğer profesyonel antijen sunucu hücreler, T hücreleri uyarmakta başarısız olarak tümörün immün sistemden kaçışına yardımcı olabilirler (24). Adaptif immün sistem hücreleri de tümör büyümesine yardımcı olabilir. B hücrelerinin de doğal immün sistem hücrelerinin tümöre yönelmesinde önemli rol oynayabildiği gösterilmiştir (25).

2.3.2 Meme Kanserinde T Hücre Yanıtları

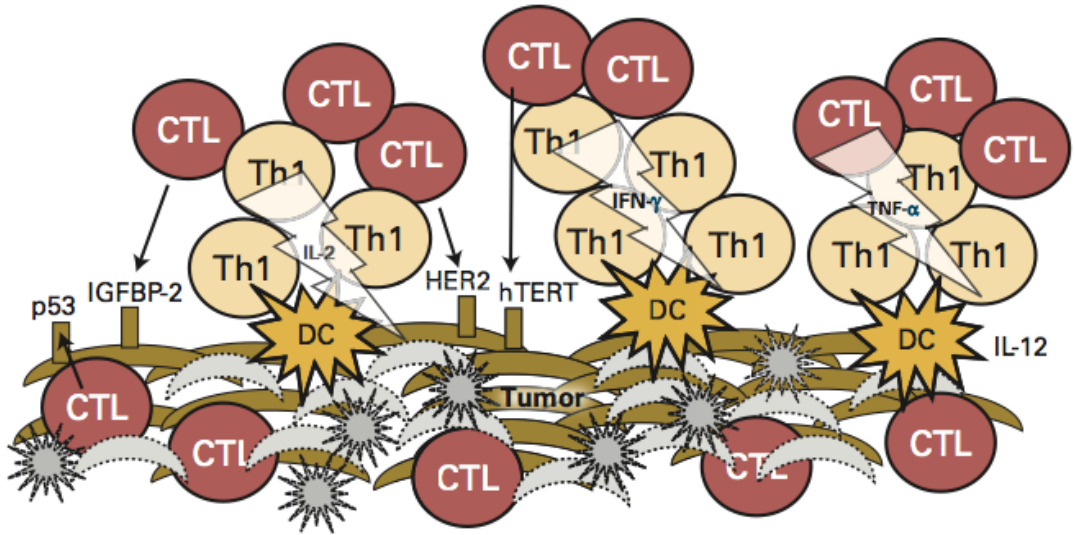
Tümöre özgül immün yanıtlar, matür antijen sonucu hücreler ve pro-inflamatuvar çevre arasındaki etkileşimler tarafından yönetilir (26). $CD4^+$ yardımcı T hücreler, inflamatuvar süreçlerde anahtar rol üstlenir. Yardımcı T hücrelerin alt grupları; Th1, Th2, Th9, Treg, Th17 ve Th22, farklı inflamasyon tiplerini desteklemek üzere özelleşmişlerdir. Salgıladıkları sitokinler özgül immün yanıtların oluşmasına olanak sağlar. Tümör gelişimi sırasında tüm yardımcı T hücre alt-tiplerinin farklı şekillerde fonksiyon gördüğü bilinmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Tümör gelişimi süresince T hücre yanıtlarının polarizasyonu (Johansson, M. (26)'dan uyarlanmıştır.

Th1 alt tipindeki $CD4^+$ sitotoksik T lenfosit (CTL) aktivasyonunu, immünglobulin (Ig)G2a ve IgG3 üretimini destekler (27). Bu sayede hücre içi patojenler dahil, pek çok enfeksiyöz mikroorganizmanın yok edilmesinde önemli rol oynarlar. Kanseri gelişiminde, interferon (IFN)-aracılı anti-tümör immünite, Th1 yanıtlarını düzenler (28). Th1 polarizasyonu, T hücre reseptör

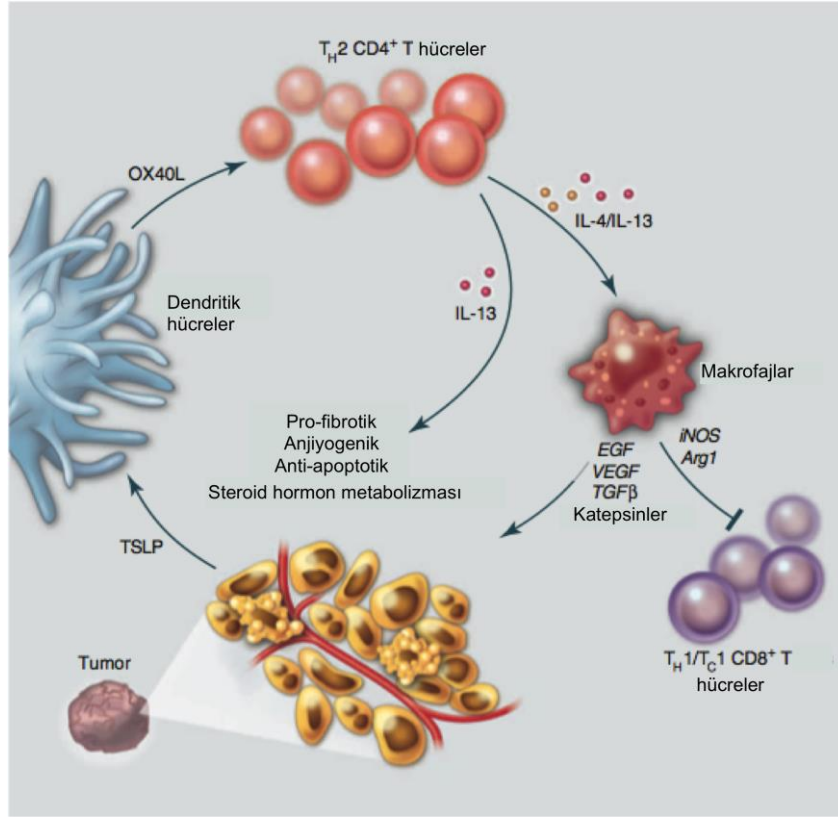
(TCR) aktivasyonunun STAT1 sinyal yolağı aracılığıyla gerçekleşmesi ile oluşur. Bu yolağı uyaran sinyaller IL-12 reseptörü IL-12R β 2 zincirinin ekspresyonunu artırır (29). Böylece, Th1 farklılaşması için gerekli olan IL-12 daha yüksek düzeyde algılanır. Bu durum IFN- γ ve IL-18R- α ekspresyonunu da uyarır. Matür Th1 efektör hücreler TCR-bağımlı yolaklarla IFN- γ üretir; ancak, IL-12 ve IL-18 ile aktive edilirlse antijen uyarımından bağımsız olarak da sitokin üretebilmektedir (26). Th1 hücreleri dendritik hücrelerin uyarımıyla akut inflamasyonu indükler ve CTL oluşumunu destekler. IL-12, IFN- γ , TNF- α ve IL-2 gibi sitokinler ve tümör hücrelerinden eksprese edilen pek çok tümöre özgül antijenler (mutant veya aberan eksprese edilen p53, IGFBP-2, HER2 ve hTERT gibi) CTL'lerin çoğalmasını, tümöre infiltrasyonunu ve tümör hücrelerinin öldürülmesini sağlar (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. CTL'ler tarafından tümörün reddi. Gri şekiller lizise uğrayan ve ölü tümör hücrelerini göstermektedir (Disis, M (30)'den uyarlanmıştır)

Th2 hücrelerinin tümörü ilerletme kapasiteleri iyi bilinmektedir. Meme kanseri, yüksek seviyede IL-4, IL-13 ve TNF α eksprese eden Th2 hücrelerini infiltre edilebilir (31). Bu hücreler, dendritik hücrelerin tümörden salgılanan timik stromal lenfopoietin (*thymic stromal lymphopoietin*, TSLP)'ye yanıt olarak eksprese ettikleri OX40 ligand (OX40L) tarafından yönlendirilirler (Şekil 2.7) (32). Th2 hücrelerinin IL-13 üretimi açısından insan özellikleri

taşıyan farelerde meme kanserinin büyümesini artırdığı gösterilmiştir (31). IL-13, miyeloid hücrelerin TGF β üretimini uyarır. Bu durum, Treg hücrelerinin gelişimini tetikler ve sitotoksik T lenfositleri baskılar (33). Meme kanseri hücreleri IL-13 uyarımına yanıt olarak STAT6 (*phospho-signal transducer and activator of transcription 6*) eksprese eder. Böylece kanser hücrelerinde anti-apoptotik yollar aktive olur. Ayrıca, bu durumun sitotoksik CD8⁺ T hücrelere ve sitotoksik ilaçlara dirençle de ilgisi olabilir (34). Transgenik meme kanseri modelinde IL-4'ün ise TAM'ların M2 fenotipine geçişini sağladığı gösterilmiştir (35). Th2'ler tümör mikroçevresinde IL-4 ve IL-13 salgılayarak doğrudan veya makrofajlar aracılığıyla dolaylı olarak tümör gelişimini destekler. Doğrudan etkileri, epitel kanser hücreleri üzerinde anti-apoptotik yolları veya steroid metabolizmasını çalıştırmasıdır. Dolaylı etkileri ise, TAM'ların EGF ve pro-anjiyogenik VEGF ekspresyonunu artırmaktır. Ayrıca, TAM'lar indüklenebilen nitrik oksit sentaz (iNOS) ve arjinaz eksprese ederek CD8⁺ T hücre proliferasyonunu baskılar. Klinik olarak, Th2 hücreleri ve transkripsiyon faktörü GATA-3 meme kanseri hastalarının lenf düğümlerinde arttığı gözlenmiştir. Bu artış hastalığın ilerlemesini hızlandırır ve sağkalım oranlarını düşürür (36) (Bkz. Şekil 2.5).



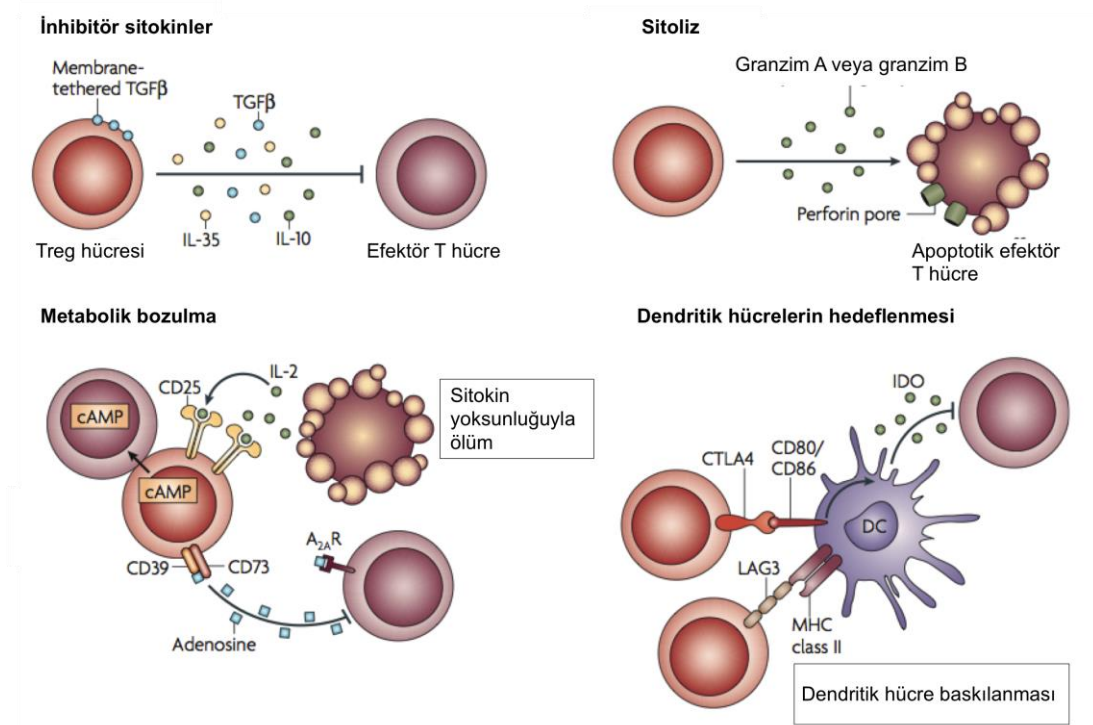
Şekil 2.7 Th2-tipi immün yanıtların TSLP ile indüklenmesi. Tümör mikroçevresinde bulunan DC'ler tümörden salgılanan faktörlere maruz kaldığında, ekprese ettikleri OX40L ile Th2-tip inflamasyonu başlatır. (Coussens ve ark., (36)'den uyarlanmıştır).

CD4⁺ hücrelerin bir diğer sınıfı düzenleyici T (Treg) hücreleridir. Treg'ler, transkripsiyon faktörü FoxP3'ü yüksek düzeyde taşır ve özgül immün yanıtları ve inflamasyonu baskılar (37). T hücre reseptörünün antijenle uyarımı, IL-2 salınımı ve transforme edici büyüme faktörü-β (TGF-β) varlığında Foxp3 indüklenir (38). Treg'ler sitotoksik T lenfositlerin efektör etkilerini baskılar ve otoimmün hastalıklardan korunmada önemli rolleri vardır (39, 40). Treg hücrelerinin, timusta bulunan doğal Treg hücreleri ve periferik dokularda farklılaşan adaptif Treg hücreleri olarak tanımlanan iki alt grubu bulunmaktadır. Doğal Treg hücreleri CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ hücrelerdir ve timusta biçimlendirilirler (40). Doğal Treg'ler hücre yüzey molekülleri olan

CTLA4, membran bağımlı TGF- β ile immün yanıtları baskırlar. Adaptif Treg hücreleri CD4⁺CD25⁺FoxP3^{+/low} hücrelerdir ve IL-10, TGF- β varlığında periferel dokularda biçimlenirler. Adaptif Treg hücreleri IL-10 ve TGF- β salgılayarak immün yanıtları baskırlar (Bkz. Şekil 2.6).

Treg'lerin aktivasyonu için TCR uyarımı gereklidir. Ancak, Treg hücresi bir kez aktive oldu mu körü körüne diğeri T hücreleri baskırlar (27). Treg hücrelerinin dört temel baskılama mekanizması; inhibitör sitokinler IL-10, IL-35, TGF β aracılı baskılama, sitoliz (granzim-A, granzim-B ve perforin-bağımlı) ile baskılama, metabolik bozulma ve DC'lerin matürasyonunu veya fonksiyonunu değıştirerek baskılama olarak sıralanabilir. Metabolik bozulmada Treg hücresi IL-2'ye yüksek afinite gösteren CD25 molekülünü eksprese eder. CD25 IL-2R2 α alt birimidir ve ortamdaki IL-2'yi bağlayarak uzaklaştırır. Ayrıca, silik AMP (cAMP) aracılı baskılama veya CD39-CD73, adenosin reseptör 2A aracılı baskılama da metabolik düzeyde gerçekleşir. DC hedeflendiğinde ise, lenfosit aktive edici gen 3 (LAG3)-MHC sınıf II aracılı baskılama yapar ve CTLA-4-CD80/CD86 etkileşimi ise immünsüpresif bir molekül olan indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)'nun eksprese edilmesini sağlar (Şekil 2.8).

Meme kanserinde Treg hücreleri FoxP3 pozitifliği gösterir ve tümörün agresifleşmesine paralel olarak artış gösterir. İnvaziv meme kanserlerinde bulunan yüksek sayıdaki FoxP3⁺ T hücreleri hastaların sağ kalımındaki düşüşle korelasyon gösterir (41).



Şekil 2.8 Treg hücreleri tarafından kullanılan baskılama mekanizmaları. Sitokin aracılı baskılama, sitoliz, metabolik bozulma ve DC'lerin baskılanması gösterilmektedir (Dario ve ark. (42)'den uyarlanmıştır).

Naif T hücrelerden Th17 gelişimi TGF- β ve IL-6 varlığında meydana gelir (43). IL-1, IL-18 ve IL-23 varlığında uyarılmış Th17 hücrelerinde sitokin üretimi daha da güçlenir (27). CD4⁺ Th17 hücreleri hücre dışı bakterilerin yok edilmesine, otoimmün hastalıklarda granülositlerin göçünü ve IgM, IgG, IgA ekspresyonunu sağlayarak katkıda bulunur (27). Tümöre infiltre Th17 hücreleri düşük düzeyde anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10 da eksprese ederler ancak bu hücrelerin çok büyük bir bölümü efektör sitokinler olan IL-2, granülosit-makrofaj koloni-stimüle edici faktör (GM-CSF), IFN- γ ve tümör nekroz faktör (TNF) üretirler (44). IL-17 ve IFN- γ , tümör hücrelerinden CXCL9 ve CXCL10 kemokinlerinin ekspresyonunu uyarır. Bu durum sitotoksik CD8⁺ T hücrelerinin tümöre yönelmesine yol açar. Bu hücrelerin esas protümöral etkileri anjiyogenezle ilgilidir. Miyeloid hücrelerin tümör mikroçevresine göçüne ve nötrofillerin elastaz salgılamasına yol açarlar.

2.4 Kostimülasyon

Dokuda yerleşen antijen sunan hücreler (ASH), antijenin hücre içerisine alınması ve sunulmasında mükemmel rol üstlenirler. Ancak, bunların neoplastik dokuda anti-tümör immün yanıtların en etkin oyuncusu olan T hücreyi uyarma yetenekleri sınırlıdır. Naif T hücrelerin aktivasyonu için MHC/antijen kompleksinin tanınması yeterli değildir. T hücresinin etkin aktivasyonu için ASH tarafından sağlanan kostimülatör moleküllere ihtiyaç vardır. Fakat T hücre aktivasyonunu sağlayan kostimülatör moleküllerin tümör mikroçevresindeki ekspresyonu sınırlı düzeydedir (2). Ancak, kostimülatör moleküllerin bazı tümör hücrelerinin yüzeyinde (örneğin, akut miyeloid lösemiler, B hücreli lenfoma, multipl myeloma gibi) eksprese olduğu bildirilmektedir. Bu kostimülatör moleküller immün yanıtta aktivasyon, düzenleme ve inhibisyon gibi farklı etkileri bulunmaktadır.

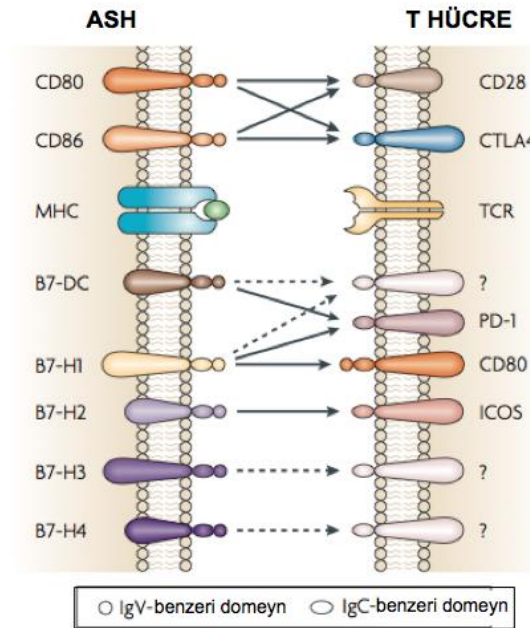
Bir çok ko-sinyal molekülü immün immünglobulin süperailisi (*Immunoglobulin superfamily*, IgSF) veya tümör nekroz faktörü süperailisi (*tumor necrosis factor superfamily*, TNFRSF) üyesidir. B7 kostimülasyon molekül ailesi IgSF içinde yer almaktadır. Ayrıca, CD150 sinyali lenfositik aktivasyon molekülü (SLAM) ve CD2 kostimülasyon molekül aileleri de bulunmaktadır.

2.4.1 B7 Kostimülatör Ligand Ailesi

CD28 ve B7 en iyi tanımlanmış ve kostimülasyonda en önemli rol oynayan IgSF reseptörler ailesidir. CD28 ailesi üyeleri iki istisna dışında B7 ailesi üyeleri ile etkileşirler. Bunlardan birisi TNFRSF14'e bağlanan ko-inhibitör reseptör; B ve T lenfosit attenüe edici (BTLA) molekülü, diğeri ise doğal öldürücü hücre p30-ilışkili protein (NKp30)'a bağlanan B7-H6'dır (45). B7 ailesinin ko-aktivatör reseptörler ile etkileşimi immün yanıtları güçlendirir. Ancak, bazı B7 molekülleri ko-inhibitör reseptörler ile etkileşir ve immün cevapların sonlandırılmasında rol alır (46). B7 ailesi üyeleri; B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-H2 (ICOSLG, CD275), B7-H1 (PD-L1, CD274), B7-DC (PD-L2, PDCD1LG2, CD273), B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1) ve B7-H6'dır.

T hücrede bulunan kostimülatör reseptör sitotoksin T hücre antijen 4 (*Cytotoxic T lymphocyte antigene 4*, CTLA-4, CD28, indüklenebilir T hücre kostimülatör (*Inducible T cell costimulator*, ICOS) ve programlı hücre ölümü (*programmed cell death 1*, PD-1) tek bir immünglobulin değişken (IgV) bölgesinden oluşur. B7-1, B7-2, B7-DC, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4 ise benzer yapısal özellikler taşırlar. Membrana yakın olan immünglobulin sabit (IgC) bölgesi ve uzak olan IgV bölgelerinden oluşurlar (47) (Şekil 2.9).

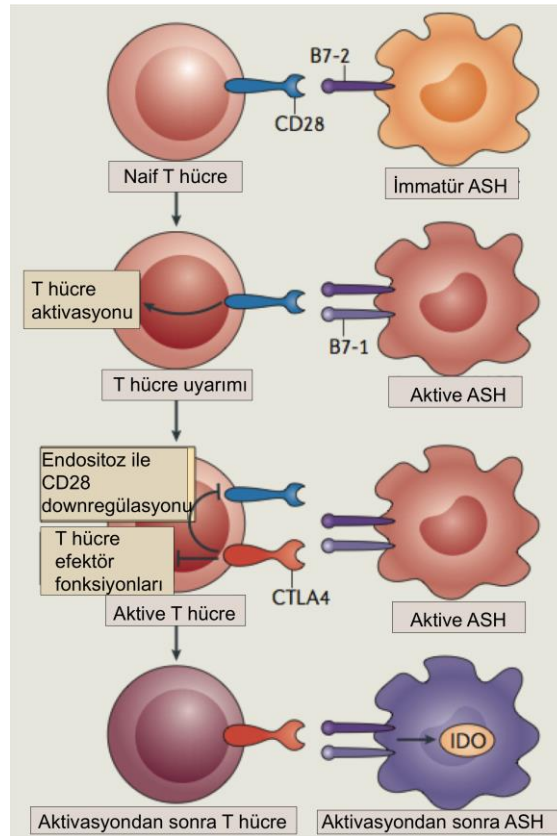
B7 ligand ailesinin hem aktivatör hem de inhibitör özellik gösteren üyeleri vardır. B7-1 ve B7-2 bağlandıkları reseptöre göre T hücreleri aktive edici veya inhibe edici sinyaller gönderebilirler. B7-H2 molekülü de aktive edici sinyal gönderen molekülüdür. B7-H1, B7-H4 ve B7-DC molekülleri ise inhibitör sinyaller gönderen ko-inhibitör molekülüdür (Şekil 2.11). Ayrıca B7-H3 hem aktivatör hem de inhibitör sinyaller gönderen B7 ligandıdır.



Şekil 2.9. B7 ligand ailesi ve reseptörlerinin yapısı (Zou ve Chen (48)'den uyarlanmıştır). ASH, antijen sunan hücre.

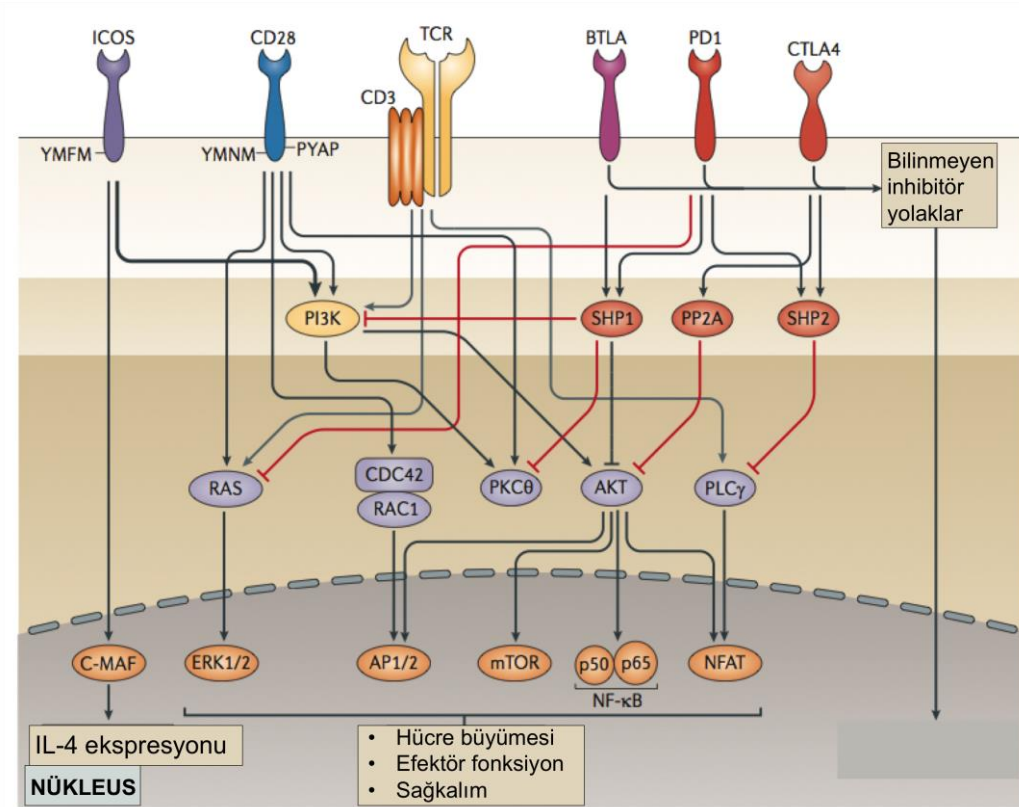
T hücre aktivasyonu için, antijenle uyarım ve ikincil uyarımın gerekli olduğu klasik “iki sinyal” hipotezi oluşturulmuştur. Naif CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreler sürekli olarak CD28 eksprese ederler. CD28’in antijen sunucu

hücreler üzerinde bulunan B7-1 ve B7-2 ile bağlanması T hücrelerin büyümesi ve sağkalımı için gerekli ikinci sinyali oluşturur. T hücre aktivasyonu sonucu eksprese olan CTLA-4 T hücre yanıtlarını inhibe edebilecek sinyaller ileten bir reseptördür. CTLA-4'ün ekspresyonu arttıkça, CD28 endositoz ile hücre yüzeyinden uzaklaştırılır (49). Antijen sunucu hücre aktivasyonu ile B7-1 ve B7-2 moleküllerinin ekspresyonu düzenlenir. B7-2'nin ASH'ler üzerinde düşük seviyelerde ekspresyonu devamlı olarak bulunur. ASH'lerin enfeksiyon, stres veya hücre hasarlarını tanımasından sonra B7-1 ve B7-2 moleküllerinin ekspresyonları uyarılır. Bu nedenle, T hücreler ve ASH'ler üzerindeki reseptörlerin ve ligandların düzenlenmesi, T hücrelerin aktivasyonu ve yabancı antijenlere karşı yanıtlarının yanı sıra anormal veya otoreaktif T hücre yanıtlarının kontrolü için de gereklidir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 B7-CD28 ligand-reseptör ilişkisinin modellemesi T hücrenin ikinci sinyaller aracılığı ile uyarılması ve daha sonra baskılanması. IDO, indolamin 2,3-dioksijenaz (Chen ve Flies (45)'den uyarlanmıştır).

CD28 molekülünün pek çok fonksiyonu sitoplazmik kuyruklarında bulunan YMNM ve PYAP motifleri aracılığıyla oluşur. Proksimal YMNM motifi PI3K sinyal yolağıyla ilişkilidir. CD28-PI3K-AKT yolağının aktivasyonu, NFκB aktivasyonu ile beraber T hücrelerin çoğalmasını ve sağ kalımını destekler (52). ICOS'da bulunan proksimal motif PI3K yolağının aktivasyonunu daha yüksek seviyede yapar böylece CD28 ile karşılaştırıldığında AKT sinyalleri güçlü uyarılır. ICOS ayrıca C-MAF yolağı aracılığıyla IL-4 üretimini de tetikler (53). Ko-inhibitör moleküller BTLA, PD-1 ve CTLA-4 T hücre aktivasyonunu ve fonksiyonlarını hücre-içi SH2 bölgesi-içeren tirozin fosfatazlar (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*, SHP1) ve SHP2 aracılığıyla baskılar. Bu fosfatazların defosforilasyonu T hücrelerin ko-stimülasyonu için elzemdir. PD-1 ayrıca RAS-ERK sinyal yolağını da baskılar (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 CD28 ailesi reseptörlerinin ko-stimülatör ve ko-inhibitör sinyal yolları (Chen ve Flies (45)'den uyarlanmıştır).

İmmün kontrol moleküllerinden olan PD-1 ve ligandı PD-L1, PD-L2 ekspresyonu T hücre yanıtlarını düzenleyen inhibitör yollarının başında gelir. Tümör ve tümöre infiltre miyeloid hücrelerde PD-L1 ekspresyonu, PD-1 eksprese eden T hücreler üzerinde inhibe edici sinyaller gönderir ve tümör hücrelerinin immün gözetimden kaçışını sağlar. Tümör mikro çevresinde sürekli olarak antijenlere maruz kalan $CD4^+$ T hücreler ve $CD8^+$ T hücreler PD-1 eksprese ederler. Kronik viral enfeksiyonlarda, PD-1 sinyal yolağının blokajı $CD8^+$ T yanıtlarını artırmıştır (54, 55) Bunun aksine, başka çalışmalarda konvansiyonel kemoterapinin PD-L1 eksprese eden makrofajların sayısını artırdığı ve $CD8^+$ T hücrelerini inhibe ettiği gösterilmiştir(55).

Aktive T hücreler üzerinde eksprese olan PD-1 ko-reseptörünün ve periferel dokularda ve aktive T hücre, B hücre, monosit ve DC'lerde ekspresyonu bilinen PD-1 ligandları B7-H1 (PD-L1) ve B7-DC (PD-L2)'nin (2) etkileşerek immünsüpresif bir tümör mikroçevresi oluşturduğunu gösterilmiştir. B7-H1 normal meme dokusunda eksprese olmaz, fakat meme kanseri doku örneklerinde ER-pozitif tümörlerde %21, ER-negatif tümörlerde ise %45 oranlarında B7-H1 pozitifliği gösterilmiştir (3). Ayrıca bazı meme kanseri hücre hatlarında da sürekli ekspresyonunun olduğu bilinmektedir(56). B7-H1 polimorfizmlerinin sporadik meme kanseriyle ilişkili olduğu da Hua ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (57). Tümörde B7-H1 ekspresyonu, ER-negatif/PR-negatif tümörlerde Evre III ile ilişkilidir. Evre III ve HER2-pozitif meme tümörlerine infiltre olan lenfositlerde PD-1 pozitifliğinin tümör boyutu arttıkça yükseldiği gösterilmiştir. Ayrıca, meme kanseri doku örneklerinde B7-H1 ekspresyonu ile FoxP3⁺ Treg infiltrasyonu arasında korelasyon belirlenmiştir (58). Tümörde B7-H1 ekspresyonu, FoxP3⁺ Treg ve PD-1⁺ lenfositlerin infiltrasyonu yüksek histolojik evre ile ilişkilidir (3, 59). B7-H1 ekspresyonu, IFN- γ başta olmak üzere pek çok sitokin tarafından düzenlenir(60). Birçok hücre hattıyla yapılan çalışmalarda IFN- γ 'nın, B7-H1 ekspresyonunu yüksek seviyelere çıkardığı bulunmuştur (59). IFN- γ , normal epitel hücrelerinde, vasküler endotelial hücrelerde ve miyeloid DC'lerde B7-

H1 ekspresyonunu artırır (3, 59). B7-H1 eksprese eden kanser hücreleri de bu bağlanmanın sonucunda anti-apoptotik sinyaller alırlar (61, 62).

B7-H2 (ICOSL), B hücreler, makrofajlar ve lenfoid-olmayan dokularda eksprese olur. CD28 ailesinin diğer bir üyesi olan, B ve T hücreler üzerinde bulunan ICOS reseptörüne bağlanarak ko-aktivasyona aracılık eder. B7-H2-ICOS bağlantısı CD4⁺ T hücrelerin aktivasyonu, efektör hücreye farklılaşması ve fonksiyonlarının düzenlenmesi için gereklidir. En son dönemde yayınlanan bir çalışmada, B7-H2 kostimülatör molekülünün CD28 reseptörüne de bağlanabildiği ve T hücre aktivasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir (63). ICOS, Th2 hücrelerin çoğalmasını ve fonksiyonlarını artıran sinyaller üretir. Ancak, ICOS'un diğer yardımcı T hücrelerin (Th1, Th2, Th17, T_{FH}) ve Treg'lerin de fonksiyonlarını ve çoğalmalarını belirli koşullarda desteklediği gösterilmiştir (49, 53, 64). B7-H2-ICOS bağlanması T hücrelerde yüksek düzeylerde IL-4 ve IL-10 üretimini uyarır. *In vivo* çalışmalarda ICOS'un Th1 ve Th2 hücrelerinde hem ilk uyarımda hem de efektör fonksiyonları boyunca sitokin üretimine destek olduğu belirlenmiştir (65). B7-H2 ekspresyonu doku tümörlerinde, miyeloma ve akut miyeloid lösemi hücrelerinde bulunmaktadır (66, 67). Ayrıca T hücre, B hücre, makrofaj, epitel ve endotel hücreler üzerinde de ekspresyonu bulunur (68). Faget ve arkadaşları meme kanserinde infiltre ICOS⁺ T hücrelerle ilgili yaptıkları çalışmada; ICOS⁺ hücrelerin lenfoid agregatlarda yüksek sayıda bulunduğunu, bu infiltrasyonun lüminal A/B moleküler alt-tiplerle, negatif ER ve HER2/neu aşırı ekspresyonu ve üçlü negatiflik durumuyla ilişkili olduğunu, ancak ICOS Ligandı B7-H2'yi hem hücre hatlarında hem de meme kanseri dokularında gösteremediklerini belirtmişlerdir (69).

İnsan B7-H3 molekülü aktive monosit ve dendritik hücrelerde, hava yolu epitel hücrelerinde, kas hücrelerinde, inflamasyon koşullarında sinoviyositlerde ve pek çok tümör hücresinde eksprese olabilir. B7-H3'ün T hücrelerin hem ko-aktivasyonunda, hem de ko-inhibisyonunda rol oynadığı yönünde bulgular vardır. Bu nedenle, T hücre aracılı immün cevapları düzenlemede fonksiyon gördüğü düşünülmektedir. B7-H3'ün immün aktivasyonun erken dönemlerinde Ag-spesifik T hücre proliferasyonunu

artırdığı, sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonu ve IFN- γ üretimini uyardığı belirlenmiştir. Diğer yandan, bağımsız gruplar tarafından gerçekleştirilen farklı çalışmalarda B7-H3'ün T hücre yanıtlarını inhibe edebildiği yönünde de bulgular elde edilmiştir. Pek çok kanserde B7-H3 ekspresyonunun ileri evre, metastaz ve/veya kötü prognoz ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (70, 71). Primer duktal ve lobüler meme kanseri hastalarında yapılan bir çalışmada alınan örneklerin %90.6'sında B7-H3 molekülünün ekspresyonu gösterilmiştir (72).

B7-H4 molekülünün immün sistem hücrelerinden ziyade epitel dokuda, böbrek, akciğer ve pankreasta ekspresyonu vardır. IL-6 ve IL-10 monosit, makrofaj ve miyeloid dendritik hücrelerde B7-H4 ekspresyonunu uyarır. GM-CSF ve IL-4 ise azaltır. *In vitro* çalışmalar B7-H4'ün CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre proliferasyonunu, sitokin üretimini ve alloreaktif sitotoksik T lenfosit gelişimini inhibe ettiğini göstermiştir (4, 5). B7-H4 ekspresyonu kanser dokusunda yüksek düzeyde olabilir. Ovaryum kanserlerinde TAM populasyonları üzerinde yüksek seviyelerde B7-H4 bulunmuştur. B7-H4⁺ makrofajlar T hücre efektör fonksiyonlarını etkin şekilde inhibe edebilmektedir (73). Tringler ve arkadaşları, immünhistokimyasal olarak belirlenen %95 primer meme kanserinde ve %98 metastatik meme kanserinde (invaziv duktal ve invaziv lobüler) B7-H4 pozitifliği belirlemişlerdir (5).

B7 ailesinin en son keşfedilen üyesi, B7-H6 yüzey molekülünün ekspresyonu normal insan dokularında bulunmamış ancak tümör dokularında gözlemlenmiştir. B7-H6, doğal öldürücü NK hücreleri üzerinde bulunan aktivatör NKp30 reseptörüne bağlanır. Bu sayede, NK hücre-aracılı anti-tümör immün yanıtların tetiklendiğine dair bulgular mevcuttur (74).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Temmuz 2012 – Mayıs 2013 tarihleri arasında, Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyolojik malzeme tedarik edildiği firmalara göre aşağıda sıralanmıştır.

Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) (Tablet) (ICN Biomedicals INC., ABD); 2-mercaptoethanol, dietil pirokarbonat (DEPC), LPS, hidrokortizon, epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin (Sigma Chemical Co., ABD); Tris-Borik asit-EDTA (TBE) (Dr. Zeydanlı, Türkiye); Seakem® Le Agaroza (Lonza, ABD); L-glutamin, Penisilin-Streptomisin, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), RPMI 1640 (Lonza, Belçika); Tripsin-EDTA (1x) (PAA Cell Culture Co., Avusturya); Fötal Buzağı Serum (FBS) (Biological Industries, İsrail); 10x Taq Buffer (NH₄)₂SO₄, MgCl₂, dNTP mix, Taq DNA Polimeraz (rekombinant) (Thermo Scientific, Litvanya); *Ficoll* 1.077 (Biochrome AG, Almanya); McCoy's 5A (Invitrogen, Gibco, İngiltere); Karboksifloresan süksinimidil ester (CFSE) (Invitrogen Eugene, ABD); IFN-γ (R&D Systems, ABD); non-esansiyel amino asitler (HyClone,); *Facs Flow cell wash* (BD Biochemicals, ABD); Anti-insan CD3 monoklonal antikor (eBioscience, ABD)

3.2. Hazırlanan Tamponlar ve Çözeltiler

Tris-Borik asit-EDTA (TBE) Çözeltisi: 10x TBE çözeltisi distile su ile 1x'e seyreltili.

PBS Çözeltisi (1x): Bir tablet PBS 100 ml distile suya eklendi ve iyice karıştırıldı. Daha sonra otoklavlanarak sterilize edildi.

İnsülin Çözeltisi: İnsülin son konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde, RPMI 1640 ile çözüldü. 1.5 ml'lik tüplere 1'er ml alikotlanarak, -20°C'de saklandı.

Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) Çözeltisi: FBS içeren (%5 oranında) RPMI 1640 ile 20 µg/ml konsantrasyonunda EGF stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltisinden 500 µl alınarak, son konsantrasyonu 1 µg/ml olacak şekilde, RPMI 1640 ile 10 ml'ye tamamlandı. 1.5 ml'lik tüplere 1'er ml konularak, -80°C'de saklandı.

Tam RPMI Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin içeren RPMI 1640 üzerine son konsantrasyonu %10 olacak şekilde FBS, %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin eklendi. Hazırlanan tam RPMI hücre kültürü ortamı, 4°C'de saklandı.

Tam RPMI+İnsülin Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin içeren RPMI 1640 üzerine son konsantrasyonu %10 olacak şekilde FBS, %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin ve 0.01 µg/ml olacak şekilde insülin eklendi. Hazırlanan tam RPMI+insülin hücre kültürü ortamı, 4°C'de saklandı.

Tam DMEM Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin içermeyen DMEM üzerine son konsantrasyonu %10 olacak şekilde FBS, %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin ve L-glutamin eklendi. Hazırlanan tam DMEM hücre kültürü ortamı 4°C'de saklandı.

Tam DMEM-F12 Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin içermeyen DMEM üzerine son konsantrasyonu %10 olacak şekilde FBS, %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin, 1x MEM non esansiyel amino asit çözeltisi, son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde EGF, son konsantrasyonu 1 µg/ml olacak şekilde insülin, son konsantrasyonu 500 ng/mL olacak şekilde hidrokortizon eklendi. Hazırlanan tam DMEM-F12 hücre kültürü ortamı 4°C'de saklandı.

Tam McCoy's 5A Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin içermeyen McCoy's 5A üzerine son konsantrasyonu %10 olacak şekilde FBS, %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin ve L-glutamin eklendi. Hazırlanan tam McCoy's 5A hücre kültürü ortamı 4°C'de saklandı.

Anti-insan CD3 monoklonal antikor (Klon: HIT3a) Çözeltisi: Stok konsantrasyonu 1 mg/ml olan anti-CD3 mAb'u son konsantrasyonu 2 µg/ml olacak şekilde serum içermeyen hücre kültürü ortamında seyreltildi. 1.5 ml'lik tüplere alikotlanarak -20°C'de saklandı.

%1 Gluteraldehit-PBS Çözeltisi: PBS içerisinde hazır alınan %2'lik gluteraldehit çözeltisi PBS ile %1 olacak şekilde seyreltilti. Çözelti 0.2 µm birim filtreden süzülerek sterilize edildi.

3.3. Hücre Kültürü Deneyleri

3.3.1. Hücre Hatlarının Kültürü

MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 ve BT-474 hücreleri tam DMEM kültür ortamında; HCC38, ZR-75-1 ve KG-1 hücreleri tam RPMI kültür ortamında; T47D tam RPMI+insülin kültür ortamında; MCF-12A hücreleri tam DMEM-F12 kültür ortamında; SK-BR-3 hücreleri tam McCoy's 5A kültür ortamında büyütüldü. Hücre hatları ve özellikleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Hücre yoğunluğunun hücre kabının %80'ini doldurmasıyla (*sub-confluence*) hücreler pasajlanarak ilgili deneylerde kullanıldı. Haftada iki kez kültür ortamı yenilendi ve hücre kültürünün devamlılığı sağlandı. Hücreler 37°C'de nemli ve %5 CO₂ içeren inkübatörde muhafaza edildi.

Tablo 3.1. Meme kanseri hücre hatları ve özellikleri. (Driessens ve ark.(2)'den uyarlanmıştır.)

HÜCRE HATTI	ALT-TİPİ	ER	PR	HER 2	Kökeni
MCF-7	Lüminal	+	+	-	Met AC
BT-474	Lüminal	+	+	+	IDC
SK-BR-3	Lüminal	-	-	+	AC
T47D	Lüminal	+	+	-	IDC
ZR-75-1	Lüminal	+	-	-	IDC
HCC38	Bazal B	-	-	-	DC
MDA-MB-231	Bazal B	-	-	-	Met AC
MDA-MB-468	Bazal A	-	-	-	Met AC
MCF-12A	Bazal	-	-	-	Normal

Met AC: Metastatik Adenokarsinom, IDC: İnvaziv duktal karsinom, AC: Adenokarsinom, DC: Duktal karsinom

Meme kanseri hücre hatları transkripsiyonel profillerine göre lüminel ve bazal-benzeri (A ve B) olmak üzere alt-tiplere ayrılır. Lüminal hücre hatları ER imzası taşır ve Lüminal A/B moleküler profilini taşıyan tümörlerle benzerlik gösterir. Bazal A hücre hatları ETS (*E-Twenty six* transkripsiyon faktörü) sinyal yolağı ve BRCA1 mutasyonlarıyla ilişkilidir. Bu hücreler bazal-benzeri tümörlere benzer. Bazal B hücre hatları mezenkimal ve kök hücre karakterine sahiptir. Hücre hatları ile tümörler karşılaştırıldığında hücre hatlarının genetik olarak tümörlerden daha karmaşık yapıya sahip olduğu gösterilmiştir (2).

Aderan Hücrelerin Pasajlanması: Primer kültür ortamı uzaklaştırılıp hücrelerin yüzeyini örtecek miktarda 1xPBS ile hücreler birkaç kez yıkandı. Daha sonra, T25 kültür kabı için 200 µl, T75 kültür kabı için 600 µl tripsin-EDTA çözeltisi (Tripsin:EDTA, 1:250) ile hücrelerin yüzeyi kaplandı ve inkübatöre kaldırıldı. İnkübatörde 3 dk boyunca 37°C’de bekledikten sonra inkübatörden alınan kültür kabına avuç içiyle vurularak hücrelerin iyice sökülmesi sağlandı. *Inverted* mikroskop altında incelenerek tüm hücrelerin büyüme yüzeyinden ayrıldığından emin olundu. Daha sonra, tam hücre kültürü ortamı eklenerek tripsin inaktive edildi. Hücreler sayılarak yeni kültürler oluşturuldu.

Süspanse Hücrelerin Pasajlanması: Hücrelerin kültür ortamı içinde homojen dağılması sağlanacak şekilde pipetaj yapıldı. Kültür ortamının yarısı aspire edildi ve atıldı. Yeni hücre kültürü ortamı eklendi.

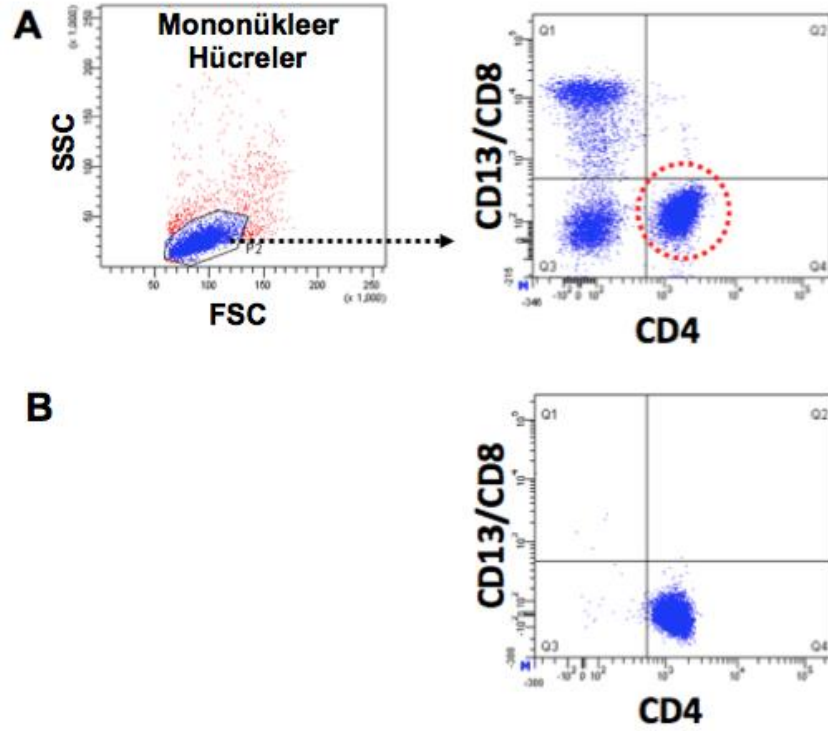
Hücre Sayımı: Tripsinizasyon işleminden sonra tam kültür ortamı içindeki hücreler pipetaj yapılarak süspanse hale getirildi. Süspansiyondan 10 µl alınarak 10 µl tripan mavisi ile karıştırıldı. Bu karışımı Thoma lamı üzerinde yaymak suretiyle hücre sayımı yapıldı. Her sayım için Thoma lamı üzerinden 4 alan seçildi ve aritmetik ortalaması alındı. Kullanılan Thoma lamının ölçüleri 0.1 mm x 0.1 mm olup lam ile lamel arasındaki uzaklık da 0.1 mm’dir. Bu nedenle hücrelerin sayıldığı her alan 0.001 mm³e (0.0001 ml’ye) karşılık geldiğinden sayılan hücrelerin aritmetik ortalaması 10 000 ile

çarpıldı. Elde edilen değer, hücre süspansiyonu tripan mavisi ile boyandığında 1:1 oranında seyreltiğinden, 2 ile çarpılarak ml başına düşen hücre sayısı hesaplandı.

3.3.2. CD4⁺ T Hücrelerin İzolasyonu

Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu: Sağlıklı bireylerden toplanan kan 1:1 oranında RPMI 1640 ile seyreltildi. İçerisinde 3 ml fikol (1.077 g/ml) bulunan 15 ml'lik falkon tüpüne sabit hızda ve dikkatlice seyreltilmiş kan eklendi, fikol ile karışmaması sağlandı. Daha sonra, 20°C, 400G'de 25 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra fikol ile plazma arasında kalan mononükleer hücreler pastör pipeti yardımıyla dikkatlice yeni bir tüp içerisine toplandı. PBS eklenerek 12 ml'ye tamamlandı. Daha sonra, 1800 rpm'de, 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve çöken hücrelerin 1 ml PBS içinde homojen olarak dağılması sağlandı. 20 µl FITC/PE-işaretli anti-CD4/CD8, ve 20µl PE-işaretli anti-CD13 monoklonal antikorları eklendi. Vortex ile kısaca karıştırıldı ve 15-20 dakika oda ısısında karanlıkta bekletildi.

FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) ile CD4⁺ T hücrelerin ayırımı: İşaretlenen mononükleer hücreler tam RPMI 1640 hücre kültürü ortamı ile yaklaşık 3 ml hacme tamamlandı. Ayrılacak olan CD4⁺ T hücreler için 15 ml'lik tüpe tam RPMI 1640 hücre kültürü ortamı eklendi. *Accudrop* işlemi yapıldıktan sonra CD13/CD8-negatif, CD4-pozitif hücreler seçilerek *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) (FACS Aria II, BD Biosciences, ABD) yöntemiyle CD4⁺ T hücrelerin ayırımı yapıldı (Şekil3.1). Ayrılan CD4⁺ T hücrelerin üzerine istenilen konsantrasyona göre tam RPMI 1640 hücre kültürü ortamı eklendi. İzole edilen T lenfositler kontrol edildiğinde %98'in üzerinde saflıkla başarılı kabul edildi.

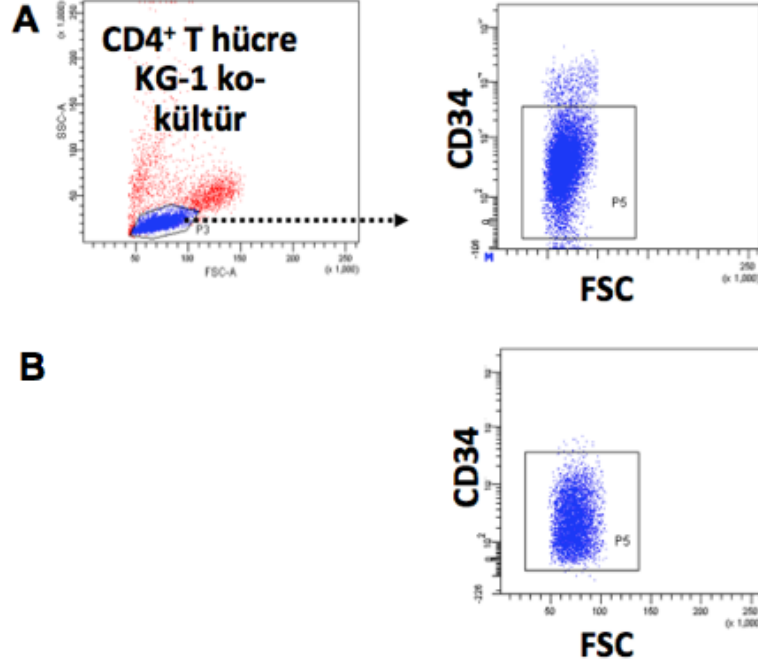


Şekil 3.1. A. $CD4^+$ T hücrelerin FACS yöntemiyle izole edilmesi. Granülaritelerine ve büyüklüklerine göre lenfoid hücreler seçildi, o hücreler arasında da CD13/CD8-negatif, CD4-pozitif T lenfositler toplandı B. Sort başarısı analizi.

3.3.3 Ko-kültür Deneyleri

T Hücrelerin Ön-uyarımı ve Geri Saflaştırılması: KG-1 AML hücrelerinin sayımı yapıldı. FACS yöntemi ile ayrılmış olan $CD4^+$ T hücreleri ile 0.5:1 (KG-1: $CD4^+$ T) oranında karıştırıldı. Son konsantrasyonu 25 ng/ml olacak şekilde anti-CD3 mAb (HIT3a) antikoruna eklendi. 15 ml'lik tüplere 2'şer ml olacak şekilde dağıtıldı. Tam RPMI 1640 içinde $37^{\circ}C$ 'de, 20 saat, %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra, bütün hücreler tek bir tüpe toplanarak 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpürnatı boşaltıldı ve hücreler 1.5 ml PBS ile yeniden süspansiyon haline getirildi. PE-işaretli anti-CD34 antikoruna 25 μ l eklendi ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra FACS yöntemi ile T lenfositlerin $CD34^+$ olan miyeloid kökenli KG-1 hücrelerinden ayrım yapıldı. Geri ayırım başarısı analizi.

İzole edilen T lenfositler kontrol edildiğinde %98'in üzerinde saflıkla başarılı kabul edildi (Şekil 3.2).



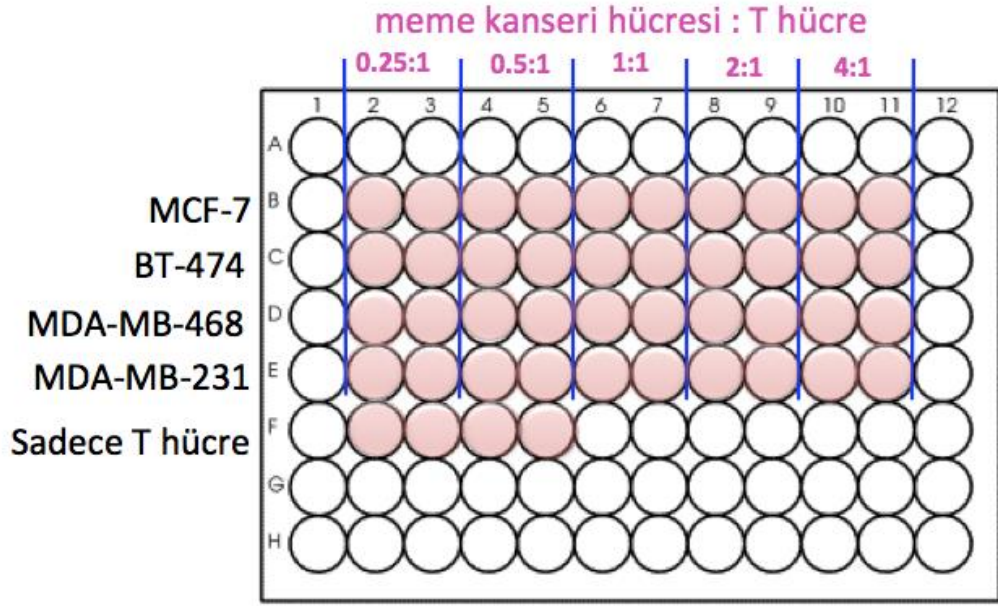
Şekil 3.2. A. CD4⁺ T hücrelerin geri saflaştırılması. Granülaritelerine ve büyüklüklerine göre lenfoid hücreler seçildi, daha sonra CD34-negatif olan T hücreler ayrımlandı. B. Geri ayırım başarısı analizi. İzole edilen T lenfositler kontrol edildiğinde %98'in üzerinde saflıkla başarılı kabul edildi.

Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) ile CD4⁺ T hücrelerin işaretlenmesi: CD4⁺ T hücreler izole edildikten sonra, 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve konsantrasyonu 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde RPMI 1640 eklenerek hücreler süspanse edildi. Kısa bir inkübasyonun (37°C, 5 dk) ardından, son konsantrasyonu 5 µM olacak şekilde (CFSE) eklendi, çok nazik bir şekilde karıştırıldıktan sonra, 15 dakika 37°C'de su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Yıkama için bol miktarda kültür ortamı eklendi. Beş dakika boyunca buz içerisinde gömülerek inkübe edildi. Santrifüj (4 °C, 1800 rpm'de 5 dakika) yapıldı. Yıkama işlemi bir kez

daha tekrarlandı. Süpernatant atıldı ve $2,5 \times 10^5$ hücre/ml olacak şekilde tam RPMI 1640 kültür ortamı eklendi.

Meme Kanseri ve CD4⁺ T Lenfosit Ko-kültürleri: Ko-kültürler için 2 lüminal, 2 bazal-benzeri özellikteki meme kanseri hücre hatları (MCF-7, BT-474, MDA-MB-468 ve MDA-MB-231) kullanıldı. Hücreler sayıldı ve 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde tam RPMI 1640 içinde süspanse edildi. 96 kuyucuklu kültür kabına (Şekil 3.3)'de gösterildiği gibi sırasıyla 0.25:1, 0.5:1, 1:1, 2:1, 4:1 oranlarında hücre ko-kültürleri için sırasıyla 6.25 µl, 12.5 µl, 25 µl, 50 µl, 100 µl hücre süspansiyonu konuldu, sonra üzerine sırasıyla 93.75 µl, 87.5 µl, 75 µl, 50 µl ve 0 µl tam RPMI hücre kültür ortamı eklendi. Her oran için 2 kuyuya ekim (duplike) yapıldı. Kontrol grubu olarak sadece T hücre ekimi yapıldı

Meme Kanseri Hücrelerinin Fiksasyonu: Meme kanseri hücrelerinin Şekil 3.3'de gösterildiği şekilde kültür kabına ekimleri yapıldıktan 20 saat sonra hücrelerin kaba tutunup tutunmadıkları *inverted* mikroskop altında kontrol edildi. Kültür kabındaki besi ortamı steril gazlı beze boşaltıldı. Her kuyucuğa 50 µl %1'lik gluteraldehit çözeltisi eklendi ve 15 dakika bekletildi. Daha sonra, gluteraldehit çözeltisi steril gazlı beze boşaltıldı ve her kuyucuğa 200 µl PBS eklendi. Karıştırıcı üzerinde (Heidolph, Titramax 1000, Almanya) hızı 750 rpm'de 1 dakika karıştırıldı ve PBS steril gazlı beze boşaltıldı. Bu işlem 2 defa tekrarlandı. En son yıkama tam RPMI 1640 kültür ortamı ile yapıldı böylece fiksatifin iyice temizlenmesi sağlandı. Her kuyucuğa 100 µl tam RPMI 1640 eklendi.



Şekil 3.3. Meme kanseri hücreleri ile CD4⁺ T hücrelerin 96 kuyucuklu kültür kabına ekim oranları. (1 = 2.5x10⁴ hücre)

T lenfositler, meme kanseri hücrelerinin ekiminden 20 saat sonra 2,5x10⁴ hücre/100  l olacak şekilde ko-kültür yapıldı. Meme kanseri hücreleri azalan ve artan oranlarda eklenirken T hücre oranları sabit tutuldu). Son konsantrasyonu 100ng/ml olacak şekilde T hücrelerin kültür ortamına anti-CD3 mAb (HIT3a) eklendi.

CD4⁺ T hücrelerin aktivasyonunu analiz etmek için 96 kuyucuklu kültür kabında meme kanseri hücreleri ile  n-uyarımı yapılmış ve  n-uyarımı yapılmamış CD4⁺ T hücrelerin meme kanseri hücrelerine oranı 1:2 olacak şekilde ko-kültürleri yapıldı. T hücreler üzerindeki aktivasyon belirteçleri 20 saat sonra analiz edildi (Bkz. Bölüm 3.4.).

CD4⁺ T hücrelerin proliferasyonunu analiz etmek için, 96 kuyucuklu kültür kabında meme kanseri hücreleri ile 37 C'de 96 saat inkübasyona bırakıldı.  n-uyarım yapılmış CFSE-  aretli CD4⁺ T (Bkz. Bölüm 3.3.3) hücreler ve  n-uyarım yapılmamış CFSE-  aretli CD4⁺ T hücreler ile iki farklı ko-kültür koşulu gerçekleştirildi. Daha sonra, akım sitometride T hücre proliferasyon analizleri yapıldı (Bkz. Bölüm 3.4.).

Fikse meme kanseri hücreleri ile KG-1 hücreleri varlığında üçlü ko-kültürler gerçekleştirildi. CFSE-işaretli $CD4^+$ T hücreler KG-1 hücreleri ile 1:0.125 oranında karıştırıldı. Son konsantrasyonu 100 ng/ml olacak şekilde anti-CD3 mAb (HIT3a) eklendi. T hücre ve KG-1 karışımı fikse edilmiş meme kanseri hücreleri üzerine bir önceki bölümde anlatıldığı şekilde eklenerek ko-kültürleri yapıldı. Ayrıca, fikse edilmemiş meme kanseri hücreleri ile de üçlü ko-kültürler yapıldı. İnkübatöre kaldırılan ko-kültürler, 96 saat $37^{\circ}C$ 'de %5 CO_2 'li koşulda inkübe edildi. $CD4^+$ T hücrelerin proliferasyon analizleri akım sitometri ile yapıldı.

3.4. Akım Sitometri Analizleri

İmmünfenotip Analizi: MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 ve BT-474, HCC38, ZR-75-1, T-47D, MCF-12A ve SK-BR-3 hücre hatlarında anti-B7-H1, anti-B7-H2 ve anti-B7-DC yüzey belirteçleri; FITC-işaretli B7-H1, PE-işaretli B7-H2, PE-işaretli B7-DC ve izotipik kontrol antikorları kullanılarak analiz edildi. Deneylerde kullanılan antikorlar, Tablo 3.2' de belirtildiği şekildedir. Akım sitometri analizinden 2 gün önce meme kanseri hücreleri tripsin-EDTA çözeltisiyle hücre kaplarından söküldü (Bkz. Bölüm 3.3.1) ve 4×10^5 hücre/7 ml olacak şekilde 3 ayrı T25 hücre kabına yeniden ekildi. Ertesi gün kaplardan bir tanesi kontrol grubu olarak ayrıldı. İkinci kaba konsantrasyonu 1 ug/ml olacak şekilde LPS ekledi, üçüncü kaba ise son konsantrasyonu 200 U/ml olacak şekilde rekombinant IFN- γ eklendi. İnkübasyonun ardından (20 saat, $37^{\circ}C$) akım sitometri analizi için hücreler, hücre kazıyıcı (*cell scraper*) kullanılarak kültür yüzeylerinden toplandı. Böylelikle, tripsin enziminin yüzey moleküllerine zarar vermemesi sağlandı. Sökülen hücreler 40 μm açıklığa sahip süzgeçten geçirilerek tek hücre süspansiyonları elde edildi. Hücreler santrifüj (5 dk, 1800 rpm, $4^{\circ}C$) edildi, sonra 400 μl 1xPBS içerisinde süspanse edildi. Akım sitometri tüplerine 100'er μl dağıtılarak anti-B7-H1, anti-B7-H2, anti-B7-DC ve izotipik kontrol antikorları ile işaretlendi. 30 dakika boyunca $4^{\circ}C$ 'de inkübe edildi.

Tablo 3.2. Akım sitometride kullanılan antikorlar

Antikor	Klon	Firma	Florokrom	Son Konsantrasyon/100 ul
CD4/CD8	SK1,SK3	BD, ABD	FITC/PE	2 ul
CD13	L138	BD, ABD	PE	2 ul
CD 34	8G12	BD, ABD	PE	2 ul
B7-H1	9.00E+32	USBiological, ABD	FITC	4.5 ul
B7-H2	MIH12	eBioscience, ABD	PE	4.5 ul
B7-DC	24F.10C12	BioLegend, ABD	PE	15 ul
CD25	2A3	BD, ABD	FITC	10 ul
CD69	L78	BD, ABD	FITC	10 ul
CD 154	TRAP1	BD, ABD	FITC	10 ul

Meme kanseri hücreleriyle ko-kültürü yapılan CD4⁺T hücreleri 20 saat inkübasyondan sonra ko-kültür kabından toplandı. 400 µl 1xPBS içinde süspanse edildi ve 4 adet *flow* tüpüne 100 µl şeklinde dağıtıldı. Hücreler izotipik kontrol, anti-CD154, anti-CD25 ve anti-CD69 antikorları ile işaretlendi. 30 dakika 4°C’de inkübe edildi.

İnkübasyon süresinin sonunda bağlanmayan antikorlar *cell wash* (BD Biosciences, ABD) çözeltisi ile yıkandı. Santrifüj sonrasında tüplere 200 µl *cell wash* eklendi ve FACS Aria II akım sitometri cihazında değerlendirildi.

Akım Sitometrik Proliferasyon Analizi: Meme kanseri hücreleriyle ko-kültürü yapılan CFSE ile işaretlenmiş CD4⁺ T hücreleri 96 saat inkübasyondan sonra ko-kültür kabından toplanarak, CFSE boyasının floresan yoğunluğundaki değişiklik FACS Aria II akım sitometri cihazında değerlendirildi.

3.5. Moleküler Teknikler

3.5.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu QIAmp® RNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Maryland, MD, ABD) ile yapıldı. Kullanılacak malzeme dietilpirokarbonat (DEPC) ile önceden muamele edilerek RNaz aktivitesi engellendi.

Hücreler kültür kabında 1xPBS ile yıkandı. 400 µl merkaptotanol eklenmiş RLT tamponu konuldu. Vortex ile hücrelerin tamamen parçalanması sağlandı. 400 µl %70'lik etanol eklendi ve bütün kap içine yayıldı, pipetlendi ve "beyaz kolon" içine aktarıldı. 4°C, 10000 rpm'de 20 saniye santrifüj yapıldı. Kolon üzerine 350 µl Tampon RW1 eklendi, 4°C, 10000 rpm'de 20 saniye santrifüj yapıldı. Bu sırada, genomik DNA'nın RNA içerisindeki varlığını temizlemek amacıyla 70 µl Tampon RDD, 10 µl DNazI ile karıştırıldı. Toplam 80 µl karışım kolon membranı üzerine dikkatlice bırakıldı ve oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edildi. 350 µl Tampon RW1 eklendi ve 4°C, 10000 rpm'de 20 saniye santrifüj yapıldı. Kolonun bulunduğu toplama tüpü değiştirildi. 500 µl Tampon RPE eklendi. 4°C, 10000 rpm'de 20 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpleri boşaltıldı. Tekrar 500 µl Tampon RPE eklendi. 4°C, 13000 rpm'de 4 dakika santrifüj yapıldı. Kolon yeni biriktirme tüpüne takıldı ve membranın kurutulması için 4°C, 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolon, 1.5 ml'lik yeni tüplere takıldı, 30 µl RNaz içermeyen distile su membran üzerine dikkatlice eklendi. 4°C, 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı ve kolon atıldı. Total RNA -80°C'de kullanılıncaya kadar saklandı.

3.5.2. İzole Edilen RNA'nın Safılık ve Kalite Analizi

İzole edilen RNA'lardaki genomik DNA'ların temizlenmesi amacıyla, total RNA doğrudan kalıp olarak kullanıldı ve β-aktin geni PCR ile çoğaltılmaya çalışıldı. PCR sonucunda bant gözlenen (DNA varlığı saptanan) örnekler; RNaz içermeyen DNaz enzimiyle muamele edildi (DNA-free™ Kit, Ambion, ABD) ve genomik DNA örneklerden uzaklaştırıldı. Kısaca, 20 µl RNA üzerine 2 µl 10x DNaseI tamponu ve 2.2 µl rekombinant DNaseI (2 µl/µl) eklenerek 37°C'de 45 dakika inkübe edildi. Daha sonra, 0.2 hacim DNaz

inaktivasyon reaktifi eklenip 2 dakika oda sıcaklığında tutuldu ve DNaz inaktivasyonu sağlandı. 1.5 dakika, 4°C, 13000 rpm'de santrifüj sonrasında RNA'yı barındırmakta olan süpernatant fraksiyonu temiz bir tüpe aktarıldı ve -80 °C'de saklandı.

RNA Miktarının Spektrofotometrik Ölçümü: İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve kalitesi spektrofotometrik (Nanodrop, ABD) olarak 260 nm ve 280 nm dalga boylarının kullanıldığı, optik yoğunluk (OD) ölçümleri sonucunda belirlendi. RNA kalitesi, A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranlarına göre değerlendirildi. Her iki absorbans oranı için normal sınırlar 1,8 – 2,0 olarak kabul edildi.

3.5.3. cDNA Sentezi

Total RNA'dan Tablo 3.3.'de son konsantrasyonları verilmiş bileşenleri içeren ve ters (*reverse*) transkriptaz enziminin katalizlenen tepkime sonucunda mRNA kaynaklı tek iplikçikli, komplementer DNA (cDNA) molekülü sentezlendi. Standart cDNA sentez tepkimesinin yanı sıra, örnek RNA içermeyen, yerine su eklenmiş, negatif kontrol tepkimesi de hazırlandı. cDNA sentezi, Fermentas RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Litvanya) kullanılarak, üretici firmanın kullanım talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. cDNA -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.3. cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri ve koşullar

Bileşen	Miktar	Son Konsantrasyon
RNA	890 ug	0.1 ug/ul
OligodT Primer (10 uM)	1 ul	0.5 uM
dH ₂ O	12 ul'ye tamamlanır.	
<i>Inkübasyon :</i>		65°C, 5 dk.
dNTPmix (10mM)	2 ul	1 mM
RNaz inhibitör (20u/ul)	1 ul	1 u/ul
RT Tampon (5x)	4 ul	1x
Reverse Transkriptaz (200u/ul)	1 ul	10u
<i>Inkübasyon</i>		42°C, 60 dk. & 25°C, 5 dk. & 70°C, 10 dk.
Son Hacim	20 ul	

3.5.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

Genel olarak kullanılan PCR koşulları Tablo 3.4.'de verilmiştir. 10mM stok dNTP mix çözeltisi, 2 mM konsantrasyonuna seyreltilerek kullanıldı. Özgül genlerin amplifikasyonunu dağlayacak tepkimelerin yanında, kalıp DNA içermeyen yerine su eklenmiş negatif kontrol tepkimesi de hazırlandı. Öncelikle su, primerler, tampon, dNTP *mix*, magnezyum klorür (MgCl₂) çözeltisi ve *Taq* DNA polimeraz enzimi 1.5 ml'lik mikrofüj tüplerine koyuldu, iyice pioetlenerek karışması sağlandı. Tepkimenin gerçekleştirileceği 200 µl'lik mikrofüj tüplerine dağıtılan karışıma kalıp DNA eklendi.

Tablo 3.4. Standart PCR bileşen miktarları ve son konsantrasyonları.

Bileşen	Miktar	Son Konsantrasyon
Taq Tamponu (10x)	5 ul	1x
dNTP mix (2mM)	5 ul	0.2 mM
MgCl₂ (25mM)	5 ul	2.5 mM
Primer F (10 pmol/ul)	1 ul	0.1 uM
Primer R (10 pmol/ul)	1 ul	0.1 uM
dH₂O	31.7 ul	
Taq DNA Polimeraz (5u/ul)	0.3 ul	1.5u
Kalıp DNA	1 ul	
Son Hacim	50 ul	

Tüpler, kapak ısısı önceden 94°C'ye çıkarılmış, *thermal cyclers* üzerine yerleştirildi ve toplam 35 döngülük tepkime (Tablo 3.5.) gerçekleştirildi. Reaksiyonun tamamlanmasıyla ürünler 4°C'ye alındı.

B7-1 molekülünün optimizasyonu için “*primer hot-start*” uygulandı. Hazırlanan PCR tüpleri önceden 94°C'de, 1 dakika boyunca inkübe edildikten sonra Taq DNA polimeraz enzimi eklendi ve standart PCR koşulları ile devam edildi.

Tablo 3.5. Standart PCR *thermal cyclers* koşulları.

İlk denatürasyon <i>initial denaturation</i>	94°C	30sn	} 35 Döngü
Denatürasyon <i>denaturation</i>	94°C	30sn	
Bağlanma <i>annealing</i>	60°C	30sn	
Uzama <i>extension</i>	72°C	20sn	
Son Uzama <i>final extension</i>	72°C	5 dk	

İlgili DNA dizisini çoğaltmak amacıyla tasarlanan primer dizileri, ürün boyutları ve gen bankası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) erişim numaraları Tablo 3.6'da verilmiştir.

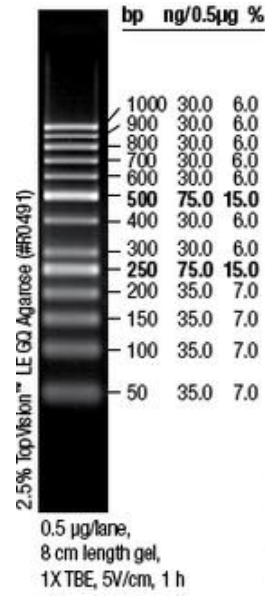
Tablo 3.6. Gen ekspresyon analizlerinde kullanılan primer dizileri.

	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Ürün	Gen Bank No.
B7-1	tcttcagctcttggtgctg	gtccgggtctgtactcgggcca	217 bp	NM_005191.3
B7-2	ctatacacggttaccagaacct	acagacaagctgatgaaacgtc	139 bp	NM_001206924.1
B7-H1	gacatgtcaggctgagggt	tgattctcagtgctggtcaca	140 bp	NM_014143.3
B7-H2	aggaagtcagagcgatggtag	tggtaggtcaccacggtttcg	130bp	NM_015259.4
B7-H3	tcggaatggcacctacagct	tctccagcacacgaaagcca	140 bp	NM_025240.2
B7-H4	accatgaaggtgtgtctgtgc	agaagtgccagctgatggca	200 bp	NM_001253850.1
B7-H6	tcaagtgggttctaccagagg	tggtagacagtcaccagggtcttc	188 bp	NM_001202439.1
B7-DC	tgaggtagagctcacctgcca	acacagctgaagttctgccag	168 bp	NM_025239.3
β-aktin	ctggaacgggtgaaggtgaca	aagggaactctgttaacaatgca	139 bp	BC013835

(bp: baz çifti)

3.5.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz tartılarak bir erlen içerisinde üzerine 1xTBE tampon çözeltisi %2'lik (w/v) agaroz jel hazırlandı. Mikrodalga fırında 200 ml TBE içerisinde 4g agaroz eritildi. Yaklaşık 55°C'ye soğuması beklendikten sonra içerisine son konsantrasyonu 60 µl/ml olacak şekilde etidyum bromür (10 mg/ml) eklenerek karıştırıldı ve jel kalıbına döküldü. Donmasının ardından tarak çıkartılıp elektroforez tankına alınan jel, üzerini örtecek hacimde 1xTBE tamponu eklendi. 20 µl hacimdeki PCR ürünleri 6x DNA yükleme tamponu (4µl) ile karıştırılarak (son konsantrasyon 1x) kuyucuklara yüklendi. DNA boyutunu belirleyen *marker*'den (DNA *ladder*) kuyucukların başına 2µl koyuldu. Şekil 3.4'de kullanılan DNA *marker*'ına ait bantların baz çifti (bp) olarak büyüklükleri gösterimiştir. Ürünler sabit 120 V elektrik akımı altında yürütüldü.



Şekil 3.4. 50 bp DNA *ladder* (MBI Fermentas, Litvanya)

Elektroforez işlemi sonucunda DNA ürünleri UV ışığı altında Kodak Gel Logic 1500 görüntüleme sistemi (Carestream Health, Rochester, NY, ABD) ile görüntülendi.

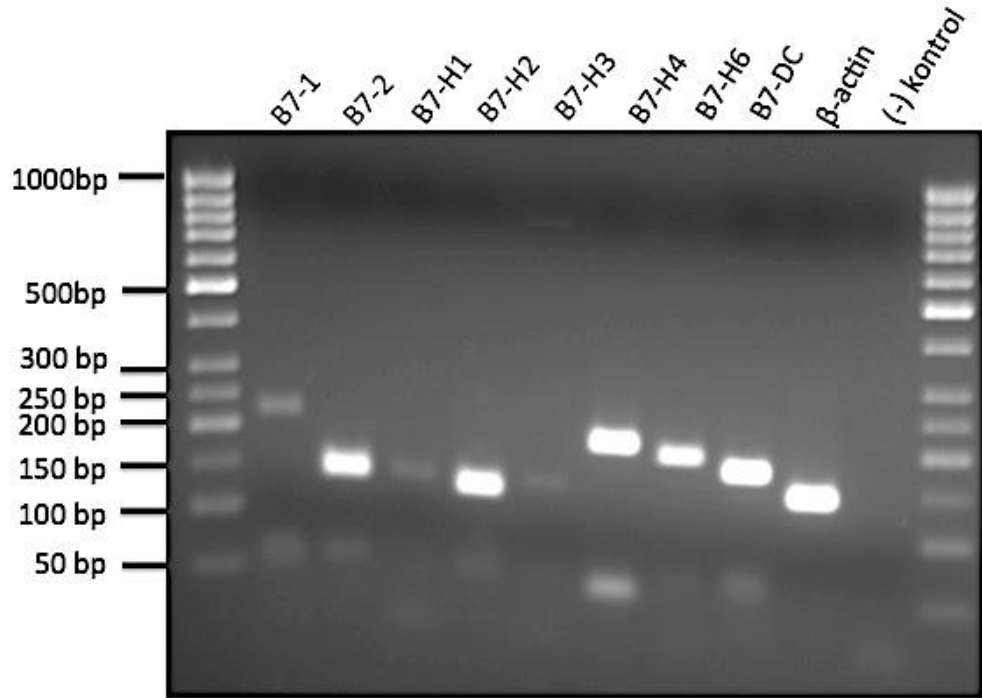
3.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin eldesi için en az 3 bağımsız deney yapılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel analizinde, Student's t-testi kullanılmıştır. Analiz sonucunda $P \leq 0.05$ olarak hesaplanan sonuçlar, istatistiksel anlamlı kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

4.1. Meme Kanseri Hücre Hatlarında B7 Ligand Gen Ekspresyonunun Araştırılması

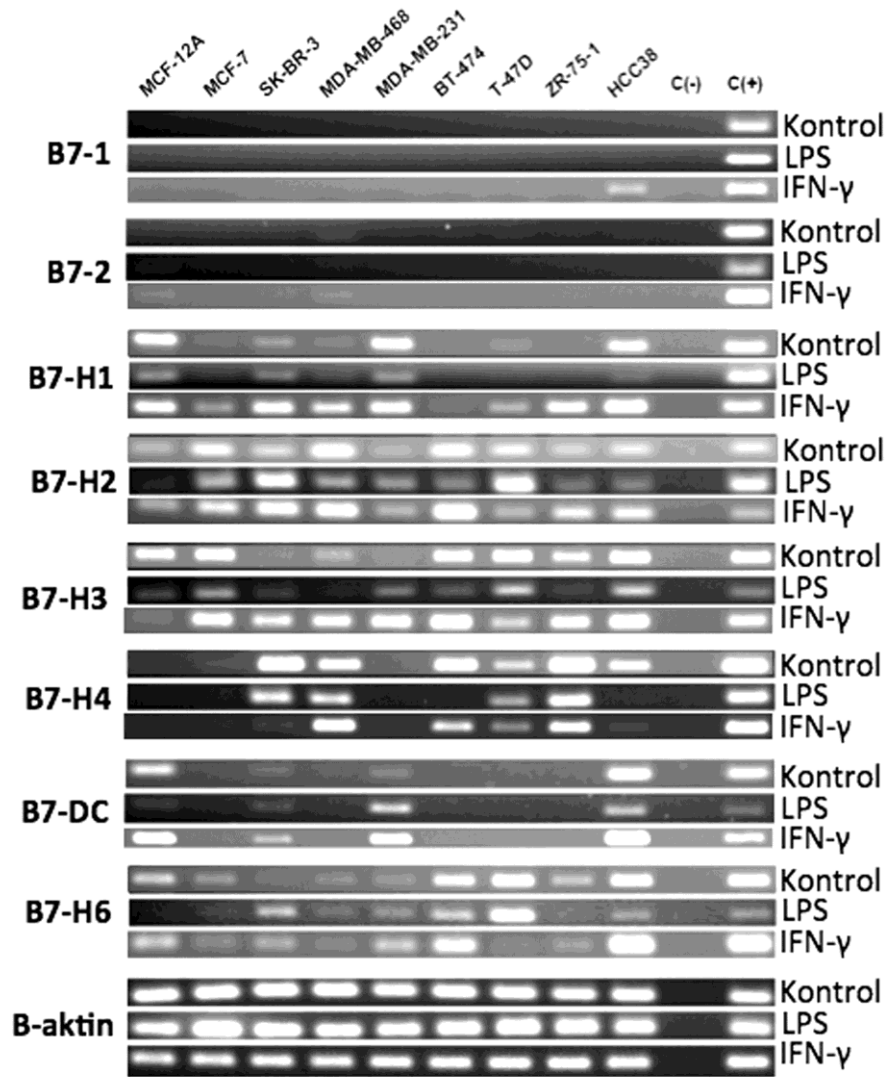
B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6 ve B7-DC moleküllerinin gen ekspresyon analizinde, optimizasyon için genellikle LPS ile uyarılmış periferik kandan ve akut miyeloid lösemi (AML) hücre hatları olan K562, HL-60'dan elde edilmiş cDNA örnekleri pozitif kontrol olarak kullanıldı. Pozitif kontrol örneklerine ait, optimize edilmiş RT-PCR sonuçları Şekil 4.1' de görülebilir.



Şekil 4.1. Optimize edilen RT-PCR koşulları ile elde edilmiş ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucu. İlk ve son sırada 50 bp DNA ladder yüklenmiştir. (bp; baz çifti)

LPS ve IFN- γ ile 20 saat boyunca uyarılan meme kanseri hücrelerinin (MCF-12A, MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-468, MDA-MB-231, BT-474, T-47D, ZR-75-1, HCC38) yanı sıra, kontrol hücrelerin de cDNA örneklerinde B7

ligandlarına ait gen ekspresyonu araştırıldı. Dahili (*internal*) kontrol olarak β -aktin (*house keeping*) geni kullanıldı (Şekil4.2). β -aktin geninin, *house keeping* gen olarak bütün hücrelerde ekspresyonunun belirgin ve eşit seviyede olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.2. Meme kanseri hücre hatlarında B7 ligandlarının gen ekspresyon RT-PCR analizi sonuçları. Her B7 ligand geni için üstte kontrol, altta LPS ve IFN- γ ile uyarılmış örnekler ile elde edilen sonuçlar görülmektedir. C(-); negatif kontrol, C(+); pozitif kontrolü göstermektedir.* ile işaretlenen hücre hatları bazal-benzeri, diğerleri lüminal alt-tiptedir.

B7-1 ve B7-2 moleküllerinin meme kanseri hücre hatlarında ekspresyonu belirlenmedi. Ancak, pozitif kontrol örnekleri ile elde edilen sonuçlar ile PCR deneylerinin çalıştığı anlaşıldı. LPS ve IFN- γ uyarımlarıyla beraber bu iki molekülün ekspresyonlarında bir farklılık gözlenmedi. Sadece HCC38 hücrelerinde IFN- γ , B7-1 ekspresyonu biraz belirginleştirdi.

B7-H1 molekülünün ekspresyonunun bazal-benzeri özelliklere sahip MCF-12A, MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38 hücrelerinde daha belirgin olduğu dikkat çekti. Ayrıca lüminal özellikteki SK-BR-3 hücrelerinde de ekspresyon belirlendi. LPS ile uyarım bir fark oluşturmadı ancak IFN- γ ile uyarım BT-474 hücreleri dışında B7-H1 ekspresyonunu artış yönünde değiştirdiği gözlemlendi.

B7-H2 molekülünün ekspresyonu MCF-12A dışındaki hücrelerde gözlenirken özellikle lüminal alt-tip özelliğine sahip olan MCF-7, SK-BR-3, BT-474, T-47D ve ZR-75-1 hücrelerinde daha belirgin olduğu saptandı. LPS ve IFN- γ ile uyarım B7-H2 molekülünün mRNA düzeyindeki ekspresyonuna bir etki etmediği belirlendi.

B7-H3 molekülünün MDA-MB-468 dışındaki bütün hücrelerde eksprese olduğu gözlemlendi. LPS ile uyarımda MCF-7, BT-474 ve ZR-75-1 hücrelerinde ekspresyonun azalma yönünde değiştiği gözlemlendi. IFN- γ ile uyarımda ise MCF-12A dışında bütün hücrelerde ekspresyonun artış yönünde değiştiği belirlendi.

B7-H4 molekülünün ekspresyonu SK-BR-3, MDA-MB-468, BT-474, T-47D, ZR-75-1 ve HCC38 hücrelerinde tespit edildi ancak LPS ile uyarımda BT-474 ve HCC38 hücrelerinde ekspresyonun azalma yönünde değiştiği belirlendi. IFN- γ ile uyarımda ise SK-BR-3 ve HCC38 hücrelerinde ekspresyonun azalma yönünde değiştiği gözlemlendi.

B7-DC molekülünün en çok bazal-benzeri özellikteki MCF-12A, MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38 hücrelerinde eksprese olduğu gözlemlendi, lüminal özellikteki SK-BR-3 hücrelerinde de hafif ekspresyon vardı. LPS ile uyarımın bu molekülün ekspresyonunda değişikliğe yol açmadığı tespit edildi. Ancak IFN- γ ile uyarımda aynı hücrelerde ekspresyonun artış yönünde değiştiği belirlendi.

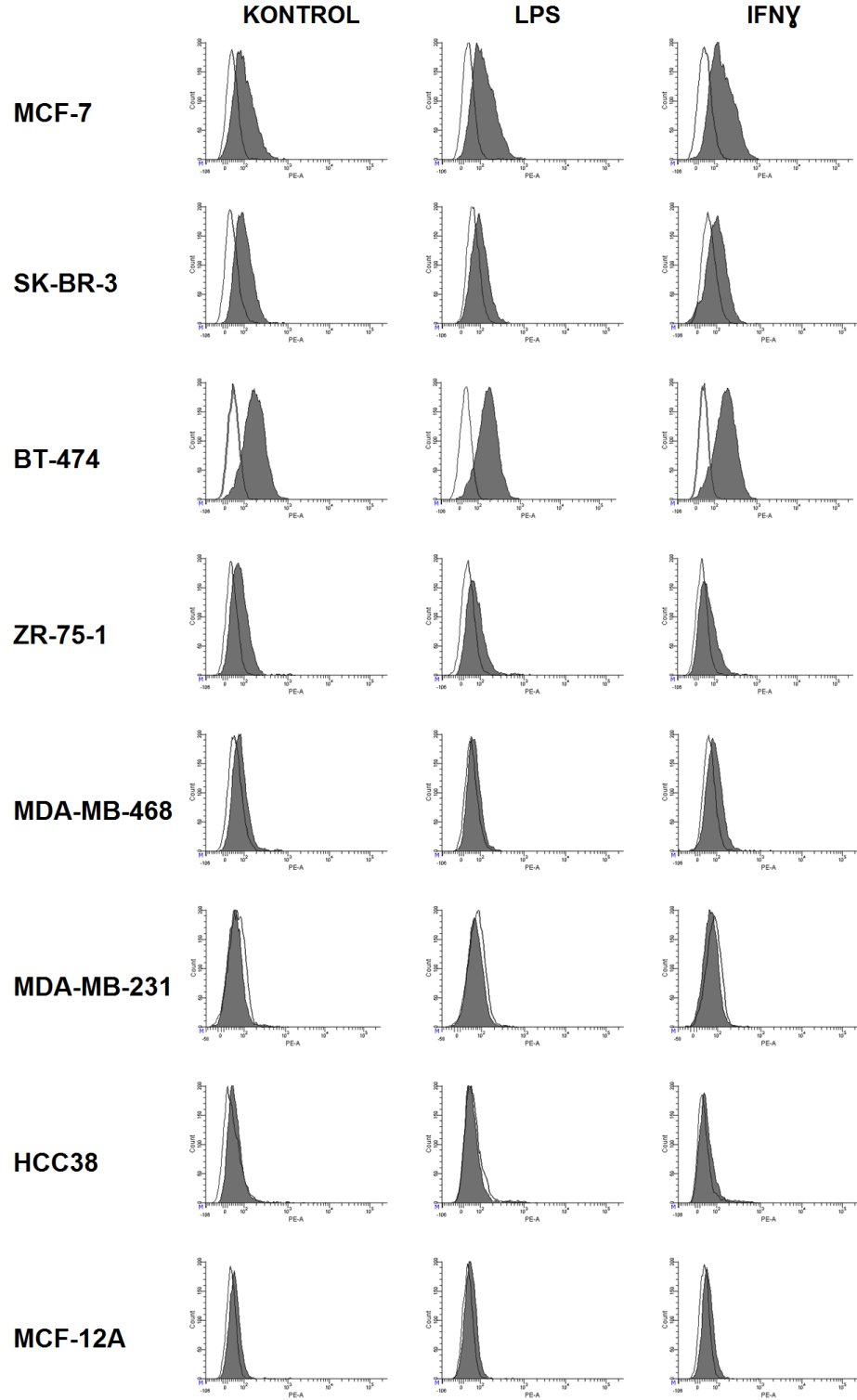
B7-H6 molekülünün ekspresyonu bütün hücrelerde gözlemlendi. LPS ile uyarımda ise MCF-12A, ZR-75-1 ve HCC38 hücrelerindeki B7-H6 ekspresyonu azalma yönünde değişiklik gösterdi. IFN- γ ile uyarımda ise T-47D hücrelerinde ekspresyonun azalma yönünde değiştiği gözlemlendi.

Bu bilgiler ışığında, özellikle lüminal hücrelerde ekspresyonunu gözlemlediğimiz B7-H2 molekülünün ve bazal-benzeri hücrelerde ekspresyonları belirgin olan B7-H1 ve B7-DC moleküllerinin yüzey protein ekspresyonu düzeyinde araştırılmasına karar verildi.

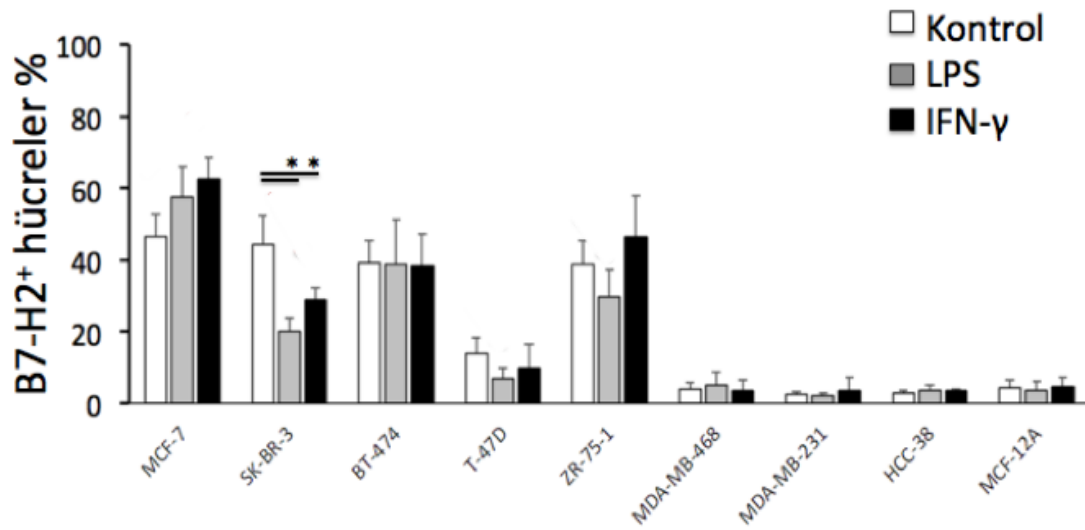
4.2. Meme Kanseri Hücre Hatlarında B7-H2, B7-H1 ve B7-DC Moleküllerinin Yüzey Proteini Düzeyinde Araştırılması

LPS veya IFN- γ ile uyarılan ve kontrol grubu meme kanseri hücre hatlarında, yüzey molekülleri B7-H2, B7-H1 ve B7-DC'nin hücre yüzeyindeki varlığı 20 saatlik inkübasyonun ardından akım sitometri ile analiz edildi.

Lüminal alt-tipteki hücre hatlarında B7-H2 ekspresyonu daha belirgin olarak bulundu. B7-H2 molekülünün ekspresyonu lüminal meme kanseri hücre hatları olan MCF-7 (kontrol %46.6 $\pm$ 6, LPS %57.3 $\pm$ 8.7, IFN- γ %62.5 $\pm$ 5.8), SK-BR-3 (kontrol %44.4 $\pm$ 7.9, LPS %20.1 $\pm$ 3.6, IFN- γ %28.4 $\pm$ 3.2), BT-474 (kontrol %39.05 $\pm$ 6.1, LPS %38.63 $\pm$ 12.5, IFN- γ %38.35 $\pm$ 8.7), T-47D (kontrol %13.77 $\pm$ 4.3, LPS %6.69 $\pm$ 3, IFN- γ %9.8 $\pm$ 6.7) ve ZR-75-1 (kontrol %38.83 $\pm$ 6.4, LPS %29.66 $\pm$ 7.7, IFN- γ %46.3 $\pm$ 11.4)'de daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bazal-benzeri özellik gösteren hücre hatları MDA-MB-468, MDA-MB-231, HCC38 ve MCF-12A'da ise ekspresyon yüzdeleri (%2.1-5.1 arasında) çok düşük olarak belirlendi (Şekil 4.3 ve 4.4). IFN- γ ile uyarımın kontrol grubun yüzdelerine göre belirgin bir fark oluşturmadığı saptandı. Lüminal alt-tipteki hücreler olan SK-BR-3, T-47D ve ZR-75-1 hücrelerinde genel olarak LPS ile uyarıldıklarında azalma yönünde değişim gözlemlendi fakat, sadece SK-BR-3 hücrelerindeki ekspresyon azalması anlamlı düzeydedir. MCF-7 ve BT-474 hücrelerindeki B7-H2 ekspresyonunda LPS ile uyarımla bir fark oluşmamıştır.

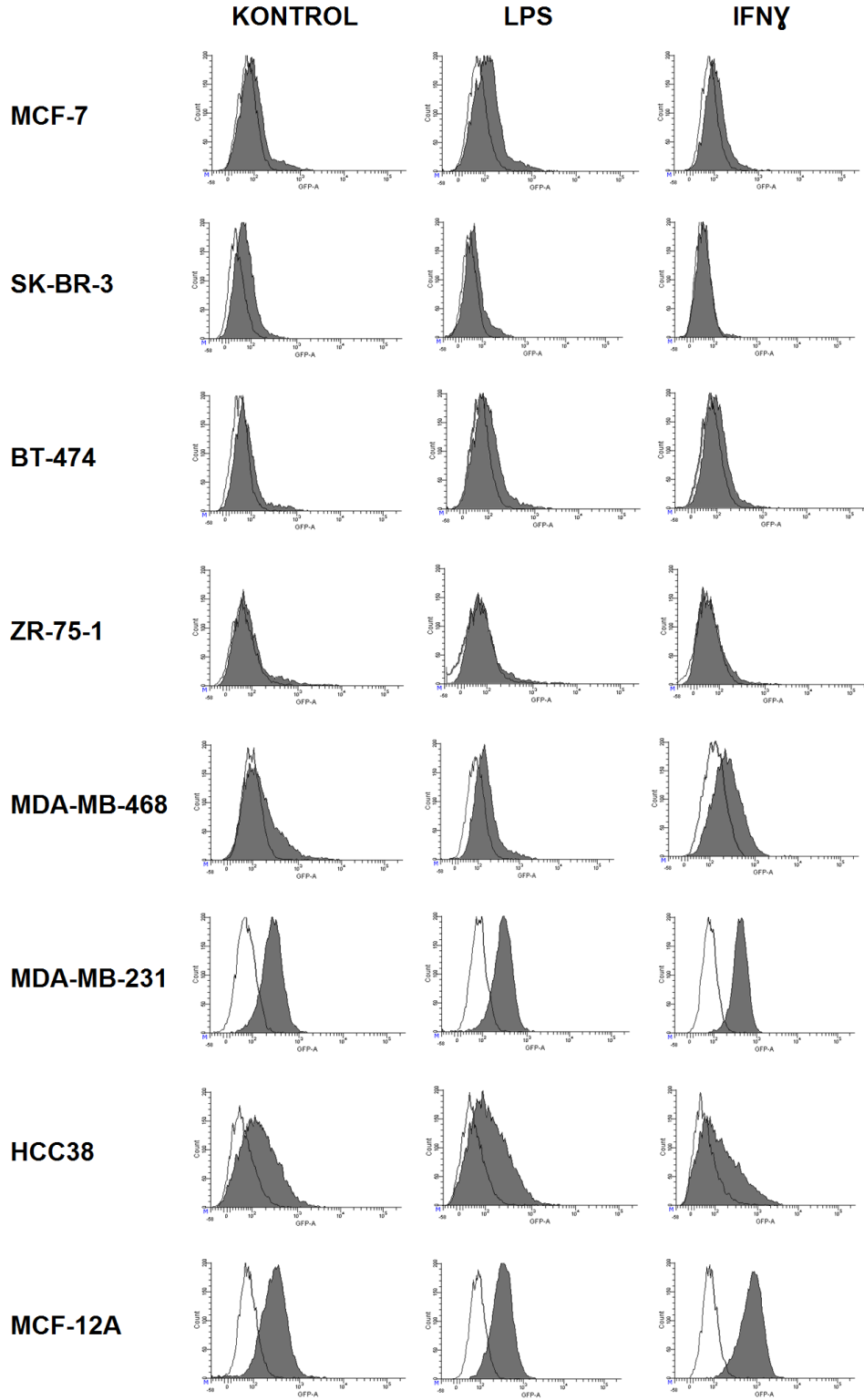


Şekil 4.3. B7-H2 molekülünün temsili akım sitometri histogramları. Şeffaf histogramlar izotipik kontrolü, gri histogramlar B7-H2 boyamasını göstermektedir.

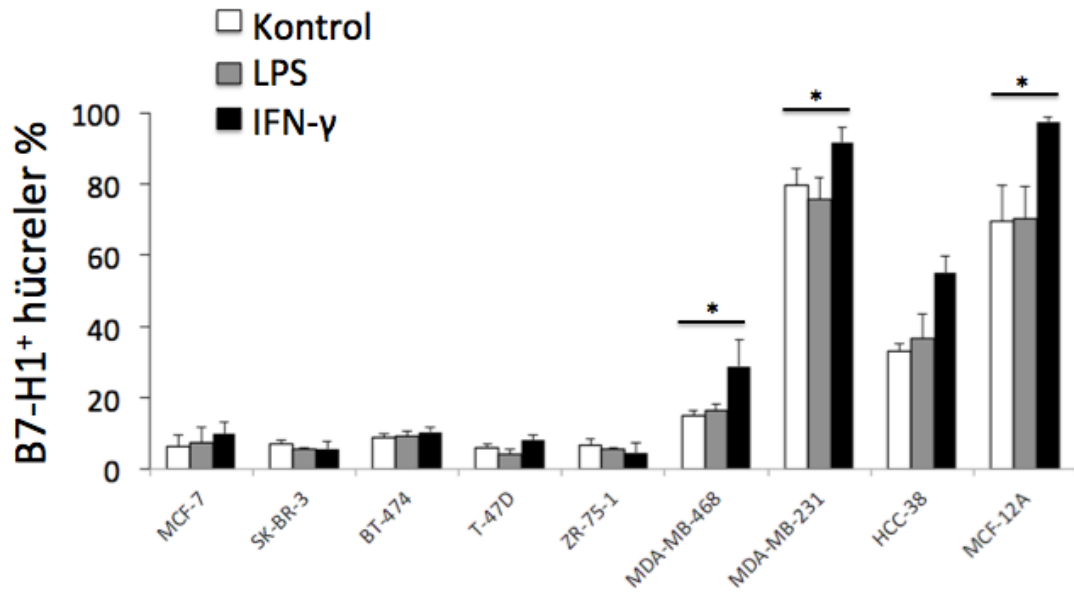


Şekil 4.4. B7-H2 pozitifliği gösteren meme kanseri hücrelerinin yüzdeleri. Beyaz barlar kontrol grubunu, gri barlar LPS ile uyarılmış grubu ve siyah barlar ise IFN-γ ile uyarılmış grupları temsil etmektedir (**P<0.01).

Bazal-benzeri alt-tipteki hücre hatlarında B7-H1 ekspresyonu daha belirgin olarak bulundu. B7-H1 molekülünün ekspresyonu lüminal alt-tipteki hücreler; MCF-7, SK-BR-3, BT-474, T-47D ve ZR-75-1'de düşük düzeyde (%4.2-10.4 aralığında), bazal-benzeri alt-tipteki hücrelerde ise MDA-MB-468 (kontrol %15.1±1.8, LPS %16.3±3.5, IFN-γ %28.8±2.7), MDA-MB-231 (kontrol %79.6±4.6, LPS %75.6±6.2, IFN-γ %91.7±4.3), HCC38 (kontrol %33.2±2, LPS %36.7±6.9, IFN-γ %55.06±4.6) ve MCF-12A (kontrol %69.4±10.2, LPS %70.2±8.8, IFN-γ %97.4±1.5) daha yüksek düzeyde olduğu gözlemlendi. Bazal-benzeri hücrelerde en düşük B7-H1 ekspresyonu MDA-MB-468 hücrelerinde saptandı. LPS ile uyarımın ekspresyonda bir fark oluşturmadığı ancak IFN-γ ile uyarımın B7-H1 ekspresyonunda özellikle bazal-benzeri hücreler (MDA-MB-468, MDA-MB-231, HCC38 ve MCF-12A) üzerinde artışa yol açtığı tespit edildi (Şekil 4.5 ve 4.6).

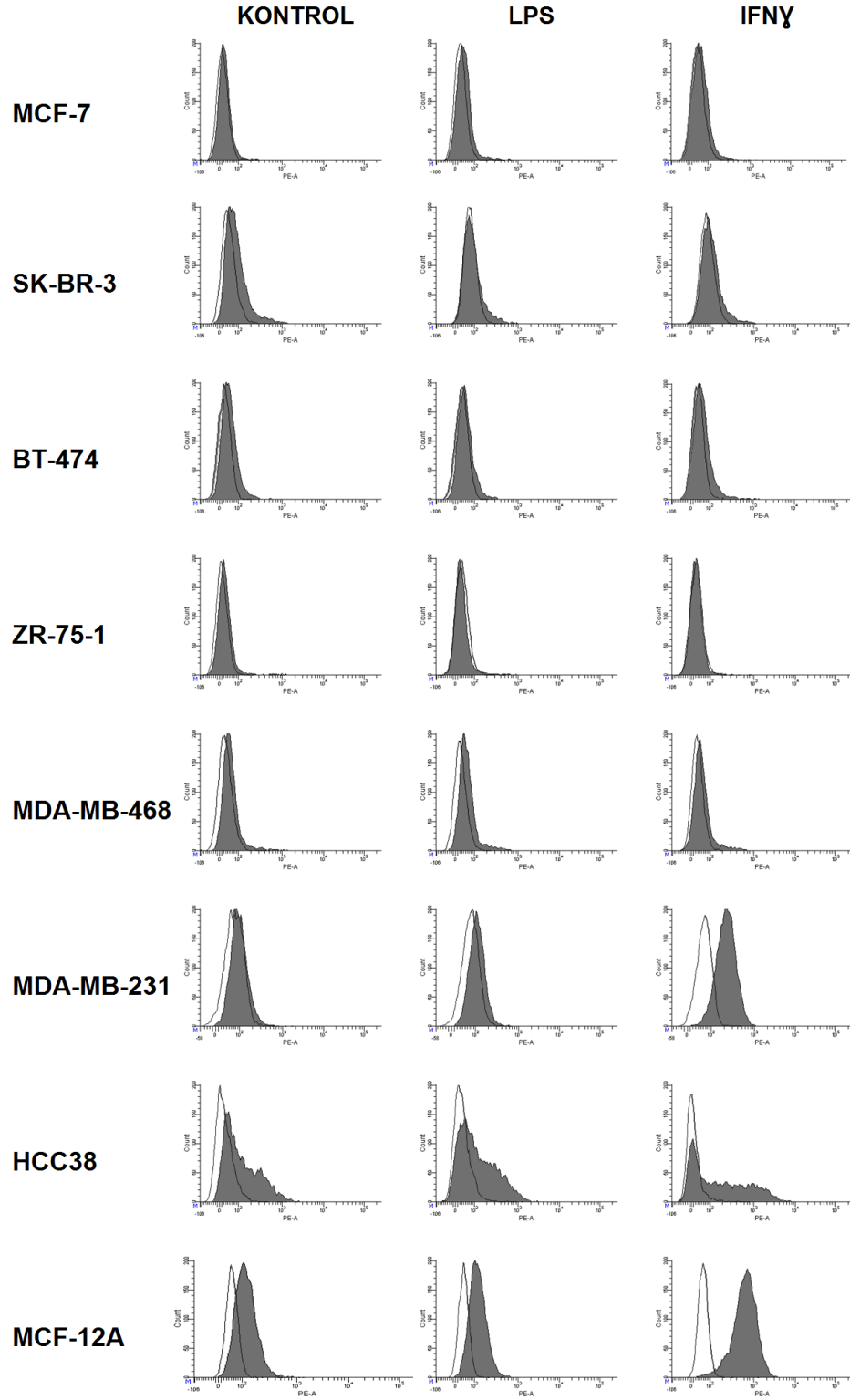


Şekil 4.5. B7-H1 molekülünün temsili akım sitometri histogramları. Şeffaf histogramlar izotipik kontrolü, gri histogramlar B7-H1 boyamasını göstermektedir.

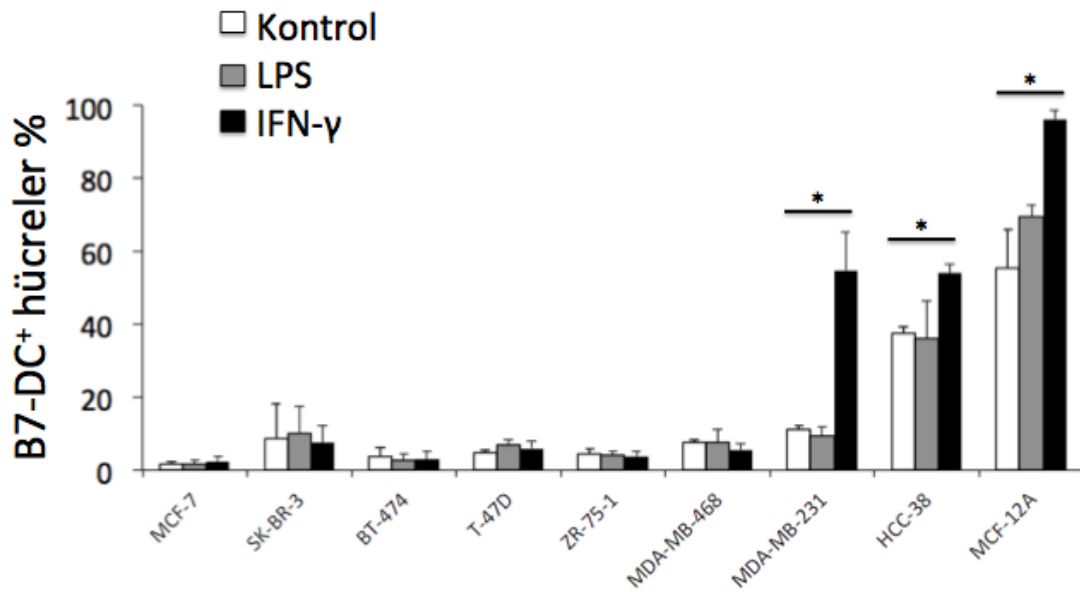


Şekil 4.6. B7-H1 pozitifliği gösteren hücrelerin yüzdeleri. Beyaz barlar kontrol grubunu, gri barlar LPS ile uyarılmış grubu ve siyah barlar IFN-γ ile uyarılmış grupları temsil etmektedir (*P<0.05).

B7-DC molekülünün ekspresyonu lüminal alt-tipteki; MCF-7, BT-474, T-47D ve ZR-75-1 hücrelerinde düşük (%1.5-6.9 aralığında) düzeyde bulundu. Fakat SK-BR-3 hücrelerinde B7-DC ekspresyonu daha yüksekti (kontrol %8.5±9.6, LPS %10.0±7.3, IFN-γ %7.5±4.6). Bazal-benzeri alt-tip özelliği gösteren MDA-MB-468 (kontrol %7.6±0.6, LPS %7.7±3.4, IFN-γ %5.5±1.8), MDA-MB-231 (kontrol %11.2±1, LPS %9.4±2.5, IFN-γ %54.8±10.6), HCC38 (kontrol %37.6±1.8, LPS %36±10.1, IFN-γ %53.9±2.4) ve MCF-12A (kontrol %55.6±10.3, LPS %69.5±3, IFN-γ %96.2±2.2) hücrelerinde ise daha yüksek düzeyde olduğu gözlemlendi. LPS ile uyarımın ekspresyonda bir fark oluşturmadığı ancak IFN-γ ile uyarımın B7-DC ekspresyonunu bazal-benzeri hücre hatlarında anlamlı derecede artışa yol açtığı tespit edildi (Şekil 4.7 ve 4.8). B7-DC ekspresyonu, bazal-benzeri hücreler arasında MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 hücrelerinde düşük düzeydeydi ancak IFN-γ ile uyarım sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinde belirgin bir artış tespit edildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. B7-DC molekülünün temsili akım sitometri histogramları. Şeffaf histogramlar izotipik kontrolü, gri histogramlar B7-DC boyamasını göstermektedir.



Şekil 4.8. B7-DC pozitifliği gösteren meme kanseri hücrelerinin yüzdeleri. Beyaz barlar kontrol grubunu, gri barlar LPS ile uyarılmış grubu ve siyah barlar IFN-γ ile uyarılmış grupları temsil etmektedir (*P<0.05).

Sonuç olarak B7-H2 molekülünün ekspresyonunun lüminal hücrelerde, B7-H1 ve B7-DC moleküllerinin ise bazal-benzeri hücre tiplerinde yaygın olduğu belirlendi. LPS ile uyarımın bu moleküllerin ekspresyonunda belirgin bir etkisi yokken IFN-γ ile uyarımın B7-H1 ve B7-DC moleküllerinin ekspresyonlarını bazal-benzeri hücre tiplerinde artırdığı tespit edildi.

4.3. Lüminal ve Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücre Hatlarının CD4⁺ T Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

4.3.1 Miyeloid Kökenli KG-1 Hücreleri ile T Hücre Proliferasyonunun Uyarımı

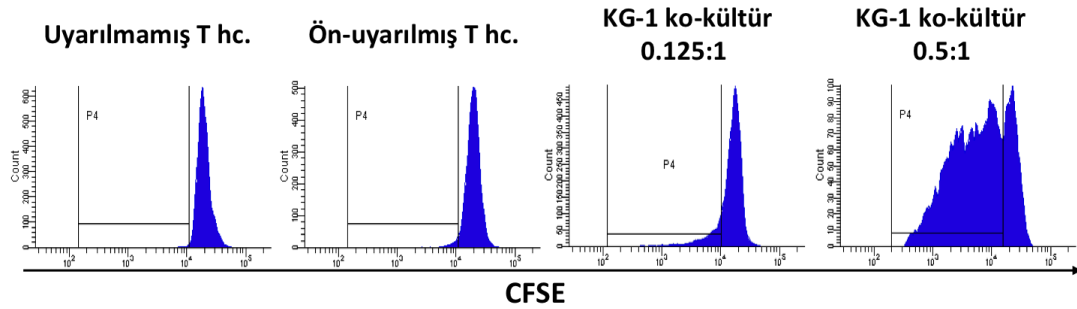
Meme kanseri hücrelerinin T hücre proliferasyonu üzerine etkisini belirleyebilmek için, daha önceden uyarıcı etkisi olduğu bilinen miyeloid

kökenli KG-1 hücre hattı ile CD4⁺ T hücrelerin anti-CD3 mAb varlığında ko-kültür yapıldı.

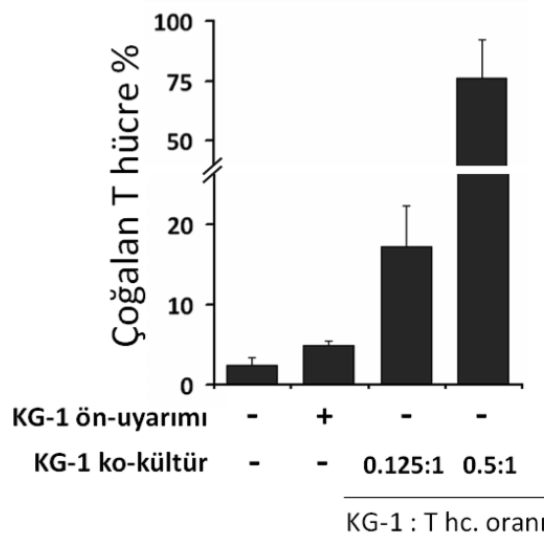
Ön-uyarım için KG-1 hücreleri ile CD4⁺ T hücreleri 0.5:1 oranında karıştırıldı. Son konsantrasyonu 25 ng/ml olacak şekilde anti-CD3 mAb (HIT3a) antikorı eklendi. 20 saatlik inkübasyondan sonra T hücreler, KG-1 hücrelerinden geri saflaştırıldı ve CFSE ile işaretlendi. 96 saat boyunca 100 ng/ml anti-CD3 mAb varlığında inkübe edilen ön-uyarılmış T hücrelerin kontrol hücrelere göre proliferasyonun daha fazla olduğu gözlemlendi. Ön-uyarımı yapılmamış T hücrelerin proliferasyon yüzdesi %2.4 iken ön-uyarım yapıldığı zaman proliferasyon yüzdesi iki katına çıkarak %4.87 olarak belirlendi (Şekil 4.9).

Yapılan ko-kültürlerde KG-1 hücreleri ile beraber CD4⁺ T hücrelerin 96 saat boyunca ko-kültürü devam ettirildiğinde ise, T hücre proliferasyonunun çok daha yüksek oranda arttığı tespit edildi. Bu deneyler için iki farklı ko-kültür oranı kullanıldı. İlk koşulda KG-1: CD4⁺ T hücre oranı 0.125:1 olarak uygulandı. İkinci koşulda ise KG-1:CD4⁺ T hücre oranı 0.5:1 olarak uygulandı. Birinci koşulda 0.125:1 oranında yapılan ko-kültür sonucunda T hücre proliferasyonu %17.22; 0.5:1 oranında yapılan ko-kültür sonucunda ise T hücre proliferasyonu %76.3'e yükseldiği tespit edildi (Şekil 4.9).

A



B

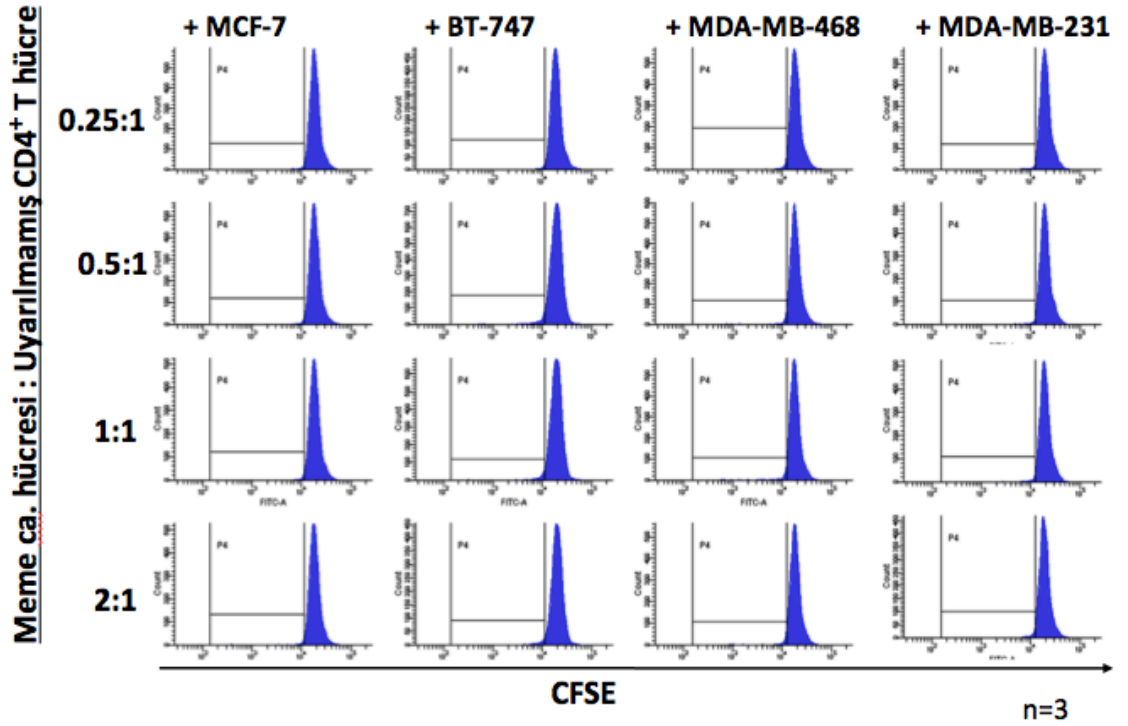


Şekil 4.9. A. $CD4^+$ T hücrelerin miyeloid kökenli KG-1 hücreleri ile uyarımı gerçekleştirilen CFSE analizine ait temsili akım sitometri grafikleri. B. $CD4^+$ T hücrelerin miyeloid kökenli KG-1 hücreleri ile yapılan ko-kültür ve ön-uyarımda T hücrelerin proliferasyon yüzde değerleri.

4.3.2. Meme Kanseri Hücreleriyle Ko-kültürü Yapılan Naif veya Ön-Uyarımı Yapılmış T Hücrelerin Proliferasyonu

Ko-kültürler için 2 lüminal (MCF-7, BT-474) ve 2 bazal-benzeri (MDA-MB-468, MDA-MB-231) özellikteki meme kanseri hücre hattı artan oranlarda (0.25:1, 0.5:1, 1:1, 2:1) ekildi ve anti-CD3 mAb varlığında T hücrelerle ko-kültür yapıldı. Naif T hücrelerle yapılan ko-kültürlerde T hücre proliferasyonunda belirgin bir değişim olmadığı tespit edildi (Şekil 4.10 ve

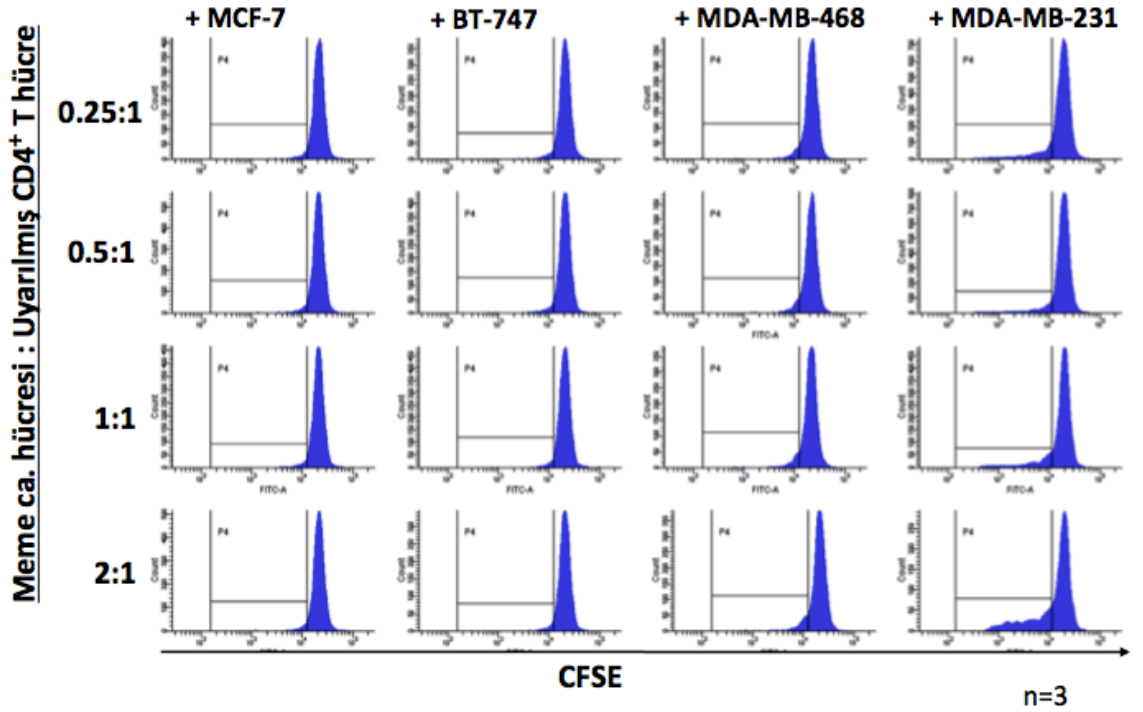
4.12). Meme kanseri hücrelerinin oranları artmasına rağmen T hücre proliferasyon yüzdeleri MCF-7 ile ko-kültürde %1-1.8 arasında, BT-474 ile ko-kültürde %1.6-2.5 arasında, MDA-MB-468 ile ko-kültürde %1.7-4.4 arasında, MDA-MB-231 ile ko-kültürde %2.9-5.2 arasında olduğu belirlendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.10. Naif CD4⁺ T hücreler ile iki lüminal (MCF-7, BT-474) ve iki bazal-benzeri (MDA-MB-468, MDA-MB-231) özellikteki meme kanseri hücrelerinin ko-kültüründen 96 saat sonra, T hücre proliferasyonunun temsili akım sitometri histogramları.

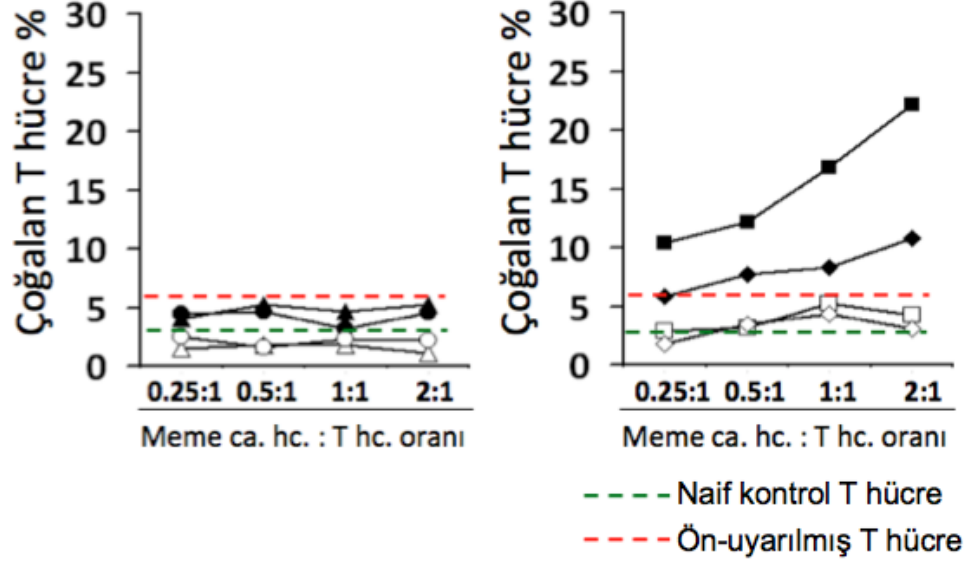
Ön-uyarımı yapılmış CD4⁺ T hücrelerle meme kanseri hücreleriyle yapılan ko-kültürlerde ise lüminal benzeri hücrelerin T hücre proliferasyonu üzerinde bir etkisi olmadığı tespit edildi. T hücre proliferasyon yüzdeleri MCF-7 ile ko-kültürde %4.03-5.2 arasında, BT-474 ile ko-kültürde %3.2-4.6 arasında olduğu belirlendi.

Bazal-benzeri hücrelerle yapılan ko-kültürlerde ise T hücre proliferasyonunun belirgin düzeyde arttığı gözlemlendi. MDA-MB-468 ile ko-kültürde (0.25:1 oranında, %5.8; 0.5:1 oranında, %7.7; 1:1 oranında, %8.3 ve 2:1 oranında, %10.7), MDA-MB-231 ile ko-kültürde (0.25:1 oranında, %10.4; 0.5:1 oranında, %12.2; 1:1 oranında, %16.8 ve 2:1 oranında, %22.2) (Şekil 4.11 ve 4.12). Meme kanseri hücrelerinin oranı arttıkça T hücre proliferasyon yüzdesinin de arttığı gözlemlendi. En yüksek proliferasyonun 2:1 oranındaki ko-kültürlerde olduğu saptandı (Şekil 4.12).



Şekil 4.11. Ön-uyarılmış CD4⁺ T hücreler ile iki lüminal (MCF-7, BT-474) ve iki bazal-benzeri (MDA-MB-468, MDA-MB-231) özellikteki meme kanseri hücrelerinin ko-kültüründen 96 saat sonra, T hücre proliferasyonunun temsili akım sitometri histogramları.

Uyarılmamış(Naif) CD4⁺ T hücre ile ko-kültür: △ MCF-7 ○ BT-747 ◇ MDA-MB-468 □ MDA-MB-231
UyarılmışCD4⁺ T hücre ile ko-kültür: ▲ MCF-7 ● BT-747 ◆ MDA-MB-468 ■ MDA-MB-231

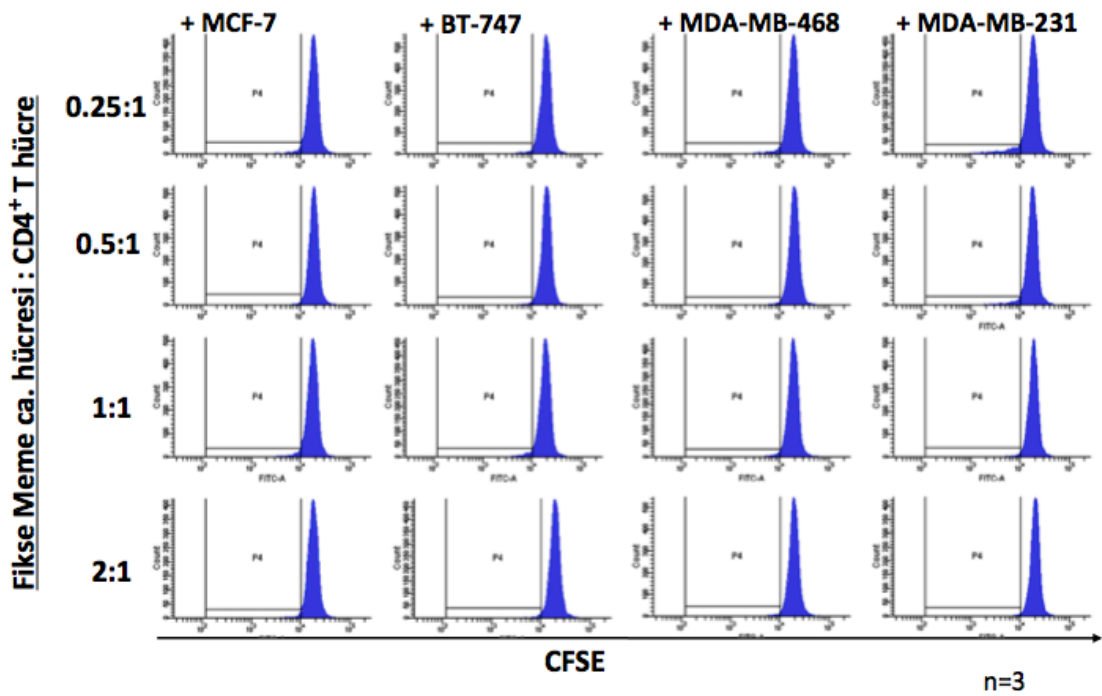


Şekil 4.12. Lüminal ve bazal-benzeri hücreler ile ön-uyarımı yapılmış veya yapılmamış T hücreler anti-CD3 mAb varlığında 96 saat boyunca yapılan ko-kültürlerde, T hücre proliferasyonu yüzdeleri. Şekildeki kırmızı kesik çizgiler ön-uyarımı yapılmış kontrol T hücrelerin düzeyini, yeşil kesik çizgiler ise uyarılmamış naif T hücrelerin proliferasyon yüzdelerini göstermektedir. Solda lüminal (MCF-7 ve BT-474) hücrelerle, sağda bazal-benzeri (MDA-MB-468 ve MDA-MB-231) hücrelerle yapılan ko-kültürlerin proliferasyon yüzdeleri gösterilmektedir.

Bazal-benzeri alt-tipteki hücreler T hücre proliferasyonunda daha uyarıcıdır ve T hücre proliferasyonu için ön-uyarım gereklidir.

4.3.3. CD4⁺ T Hücrelerin, KG-1 ve Fikse veya Kontrol Meme Kanseri Hücreleri Varlığında Proliferasyonu

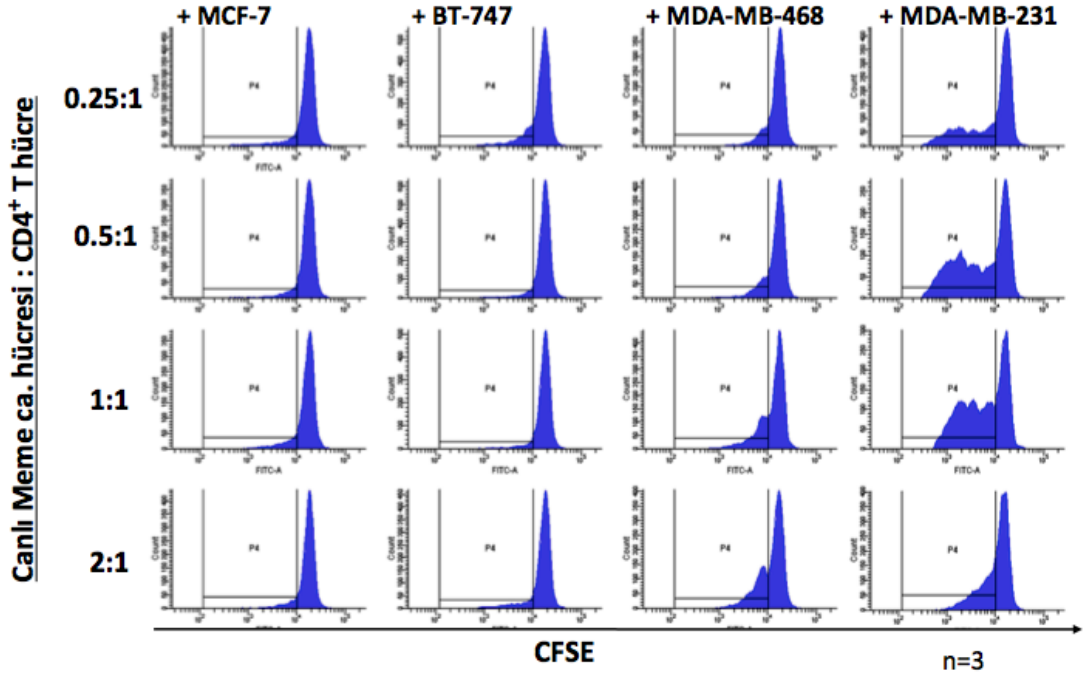
Bazal-benzeri hücrelerle yapılan ko-kültürlerdeki T hücrelerin proliferasyon artışının salgılan faktörlerden mi yoksa yüzey moleküllerinden mi kaynaklı olduğunu belirlemek amacıyla, meme kanseri hücreleri ko-kültür kabına ekildikten 20 saat sonra fikse edildi. Bu hücrelerin üzerine 0.125:1 oranında KG-1 ve T hücreler eklendi. Fikse edilen meme kanseri hücreleriyle yapılan ko-kültürler sonucunda proliferasyonda inhibisyon tespit edildi (Şekil 4.13 ve 4.15). Yalnızca KG-1 ve T hücrelerin ko-kültüründe proliferasyon yüzdesi %2.4 idi (Bkz. Şekil 4.8) Buna göre lüminal hücrelerle (MCF-7 ile ko-kültürde 0.25:1 oranında, %15.85; 0.5:1 oranında, %6; 1:1 oranında, %4.75 ve 2:1 oranında, %3.5, BT-474 ile ko-kültürde 0.25:1 oranında, %18.85; 0.5:1 oranında, %13.2; 1:1 oranında, %8.1 ve 2:1 oranında, %4.1) ve bazal-benzeri hücrelerle yapılan ko-kültürlerde (MDA-MB-468 ile ko-kültürde, 0.25:1 oranında, %13; 0.5:1 oranında, %8.65; 1:1 oranında, %5.35 ve 2:1 oranında, %3.9, MDA-MB-231 ile ko-kültürde, 0.25:1 oranında, %14.8; 0.5:1 oranında, %13.65; 1:1 oranında, %9.4 ve 2:1 oranında, %5.7) artan meme kanseri hücre oranına bağımlı olarak T hücre proliferasyonunda azalma saptandı (Şekil 4.14) .



Şekil 4.13. Fikse edilmiş meme kanseri hücreleriyle beraber T ve KG-1 hücrelerinin ko-kültürlerinde T hücre proliferasyonunun temsili akım sitometri grafikleri.

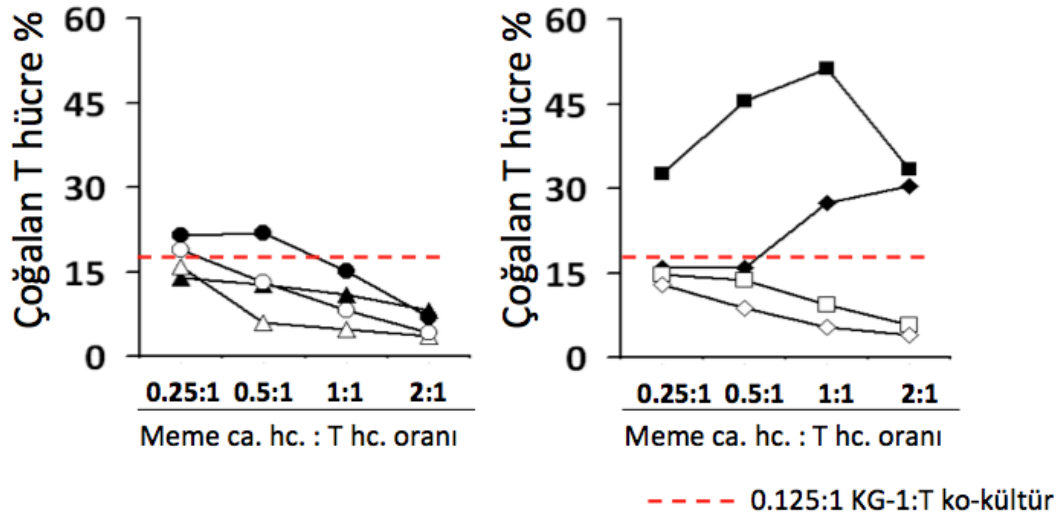
Fikse edilmemiş (kontrol) meme kanseri hücreleriyle yapılan ko-kültürlerde ise özellikle bazal-benzeri hücrelerde belirgin bir proliferasyon artışı gözlemlendi (Şekil 4.14 ve 4.15). Lüminal hücrelerle yapılan üçlü ko-kültür yüzdeleri MCF-7 ile ko-kültürde 0.25:1 oranında, %13.9; 0.5:1 oranında, %12.7; 1:1 oranında, %10.8 ve 2:1 oranında, %8.2, BT-474 ile ko-kültürde 0.25:1 oranında, %21.4; 0.5:1 oranında, %21.8; 1:1 oranında, %15.06 ve 2:1 oranında, %6.9 olarak saptandı. Bu değerler tek başına KG-1 ve T hücrelerin proliferasyon yüzdesine göre değerlendirildiğinde proliferasyon artışının olmadığı hatta meme kanseri hücrelerinin oran artışına bağlı olarak proliferasyonda azalma olduğu belirlendi (Şekil 4.14). Bazal-benzeri hücrelerle yapılan üçlü ko-kültür yüzdeleri MDA-MB-468 ile ko-kültürde, 0.25:1 oranında, %15.9; 0.5:1 oranında, %15.9; 1:1 oranında, %27.4 ve 2:1 oranında, %30.4, MDA-MB-231 ile ko-kültürde 0.25:1 oranında, %32.5; 0.5:1 oranında, %45.4, 1:1 oranında, %51.2 ve 2:1 oranında, %33.4 olarak saptandı. Bu değerler tek başına KG-1 ve T

hücrelerin proliferasyon yüzdesine göre değerlendirildiğinde T hücre proliferasyonunda belirgin bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.15). Fikse edilmeyen bazal-benzeri MDA-MB-231 kanser hücreleriyle T hücrelerinin ko-kültüründe 1:1 oranındayken %51.2 olan proliferasyon yüzdesi, 2:1 oranına çıkarıldığında %33.4 olarak saptandı.



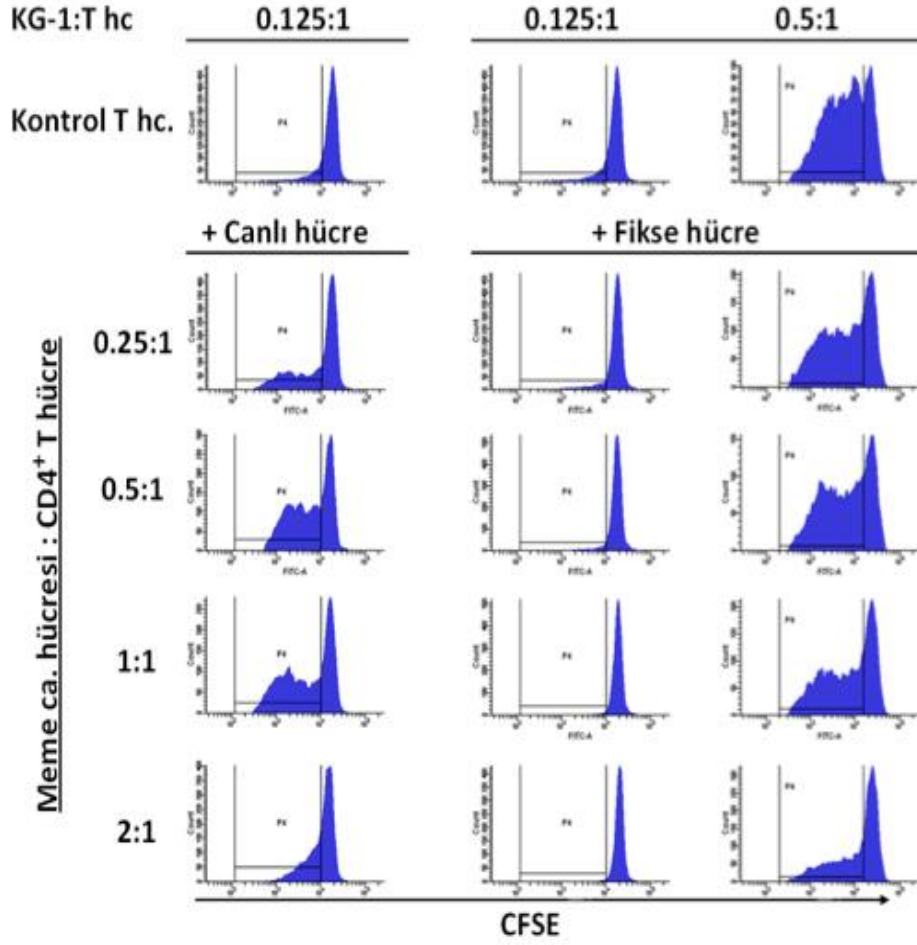
Şekil 4.14. Fikse edilmemiş (kontrol) meme kanseri hücreleriyle beraber T ve KG-1 hücrelerinin ko-kültürlerinde T hücre proliferasyonunun temsili akım sitometri grafikleri.

Meme kanseri hücreleri: Fikse $\triangle$ MCF-7 $\circ$ BT-747 $\diamond$ MDA-MB-468 $\square$ MDA-MB-231
Canlı $\blacktriangle$ MCF-7 $\bullet$ BT-747 $\blacklozenge$ MDA-MB-468 $\blacksquare$ MDA-MB-231



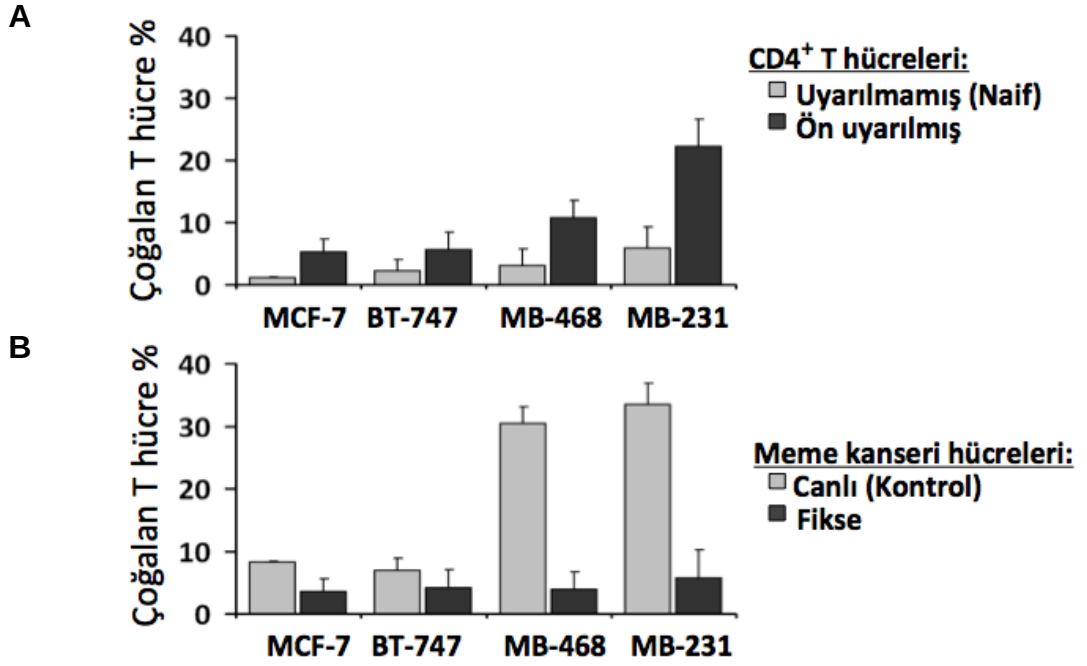
Şekil 4.15. Fikse edilmiş ve edilmemiş (kontrol) meme kanseri hücreleriyle beraber T hücre ve KG-1 hücrelerinin üçlü ko-kültürlerinde anti-CD3 mAb varlığında T hücrelerinin proliferasyon yüzdeleri. Solda fikse edilen ve edilmeyen lüminal tipteki hücrelerle (MCF-7, BT-474); sağda fikse edilen ve edilmeyen bazal-benzeri tipteki hücrelerle (MDA-MB-468, MDA-MB-231) yapılan ko-kültürlerdeki T hücrelerin proliferasyon yüzdeleri gösterilmektedir. Kesik çizgiler KG-1 ile T hücrelerin ikili ko-kültüründeki proliferasyon yüzdesini vermektedir.

Fikse edilmiş meme kanseri hücreleri ile yapılan üçlü ko-kültürlerdeki T hücre proliferasyonundaki inhibisyonun doğrulanması amacıyla, ko-kültürlerdeki KG-1 hücrelerinin oranı artırıldı. Böylelikle, T hücrelerin proliferasyon düzeyi yükseltildi (KG-1 : T hücre oranı 0.5 :1). Fikse edilmil bazal-benzeri MDA-MB-231 hücreleriyle yapılan ko-kültürlerde, meme kanseri hücrelerinin oran artışına bağımlı olarak inhibisyon etkisinin de arttığı doğrulandı (Şekil 4.15).



Şekil 4.16. Kontrol (fikse edilmemiş) MDA-MB-231 hücreleri ile T hücre ve KG-1 hücrelerinin üçlü ko-kültür sonuçlarının temsili akım sitometri histogramları (KG-1 : T oranı ; 0.125 : 1) sol kenardaki histogramlarda gösterilmiştir. Fikse edilmiş MDA-MB-231 hücreleri ile T hücre ve KG-1 hücrelerinin üçlü ko-kültür sonuçlarının temsili akım sitometri histogramları (KG-1: T oranı ; 0.125 : 1'dir) ikinci sütunda gösterilmiştir. Fikse edilmiş MDA-MB-231 hücreleri ile T hücre + KG-1 hücrelerinin ko-kültür sonuçlarının temsili akım sitometri histogramları (KG-1: T oranı ; 0.5 : 1'dir) sağ kenardaki histogramlarda gösterilmiştir. Üst kısımda T hücre ve KG-1 hücrelerinin ikili ko-kültür sonuçlarının temsili akım sitometri histogramları (KG-1 : T oranı ; 0.125 : 1 iken T hücre proliferasyonu %17.22; KG-1: T oranı ; 0.5 : 1 iken T hücre proliferasyonu %76.3'dür) gösterilmiştir.

Gerçekleştirilen T hücre proliferasyon deneyleri sonucunda T hücrelerin uyarımı için 2:1 T hücre : meme kanseri ko-kültür oranının optimum olduğu görüldü. Bu oranda elde edilen lüminal ve bazal benzeri meme kanseri hücreleri ile yapılan ko-kültürlerdeki sonuçlar karşılaştırılmalı olarak Şekil 4.17’de verilmiştir.



Şekil 4.17 A. Naif ve ön-uyarımı yapılmış T hücrelerle meme kanseri hücrelerinin ikili ko-kültürü ile elde edilen T hücre proliferasyon değerleri

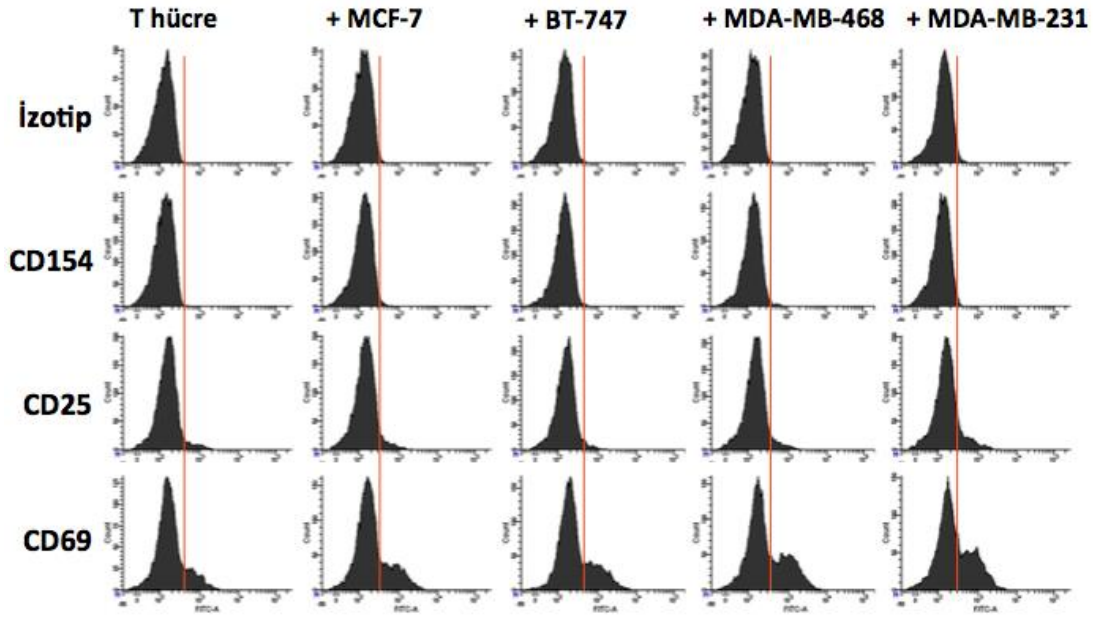
B. KG-1, T hücre ve fikse edilen veya fikse edilmeyen (kontrol) meme kanseri hücreleriyle yapılan üçlü ko-kültürlerde (0.125:1:1) T hücre proliferasyon değerleri gösterilmiştir.

Bazal-benzeri hücreler tarafından salgılanan faktörlerin T hücre proliferasyonunda etkisi olabilir. Meme kanseri hücreleri tarafından salgılanan faktörlerin yokluğunda yüzey moleküllerinin inhibe edici etkisi vardır.

4.4. Meme Kanseri Hücreleri ile Ko-Kültürü Yapılan CD4⁺ T Hücrelerde Aktivasyon Belirteçlerinin Analizi

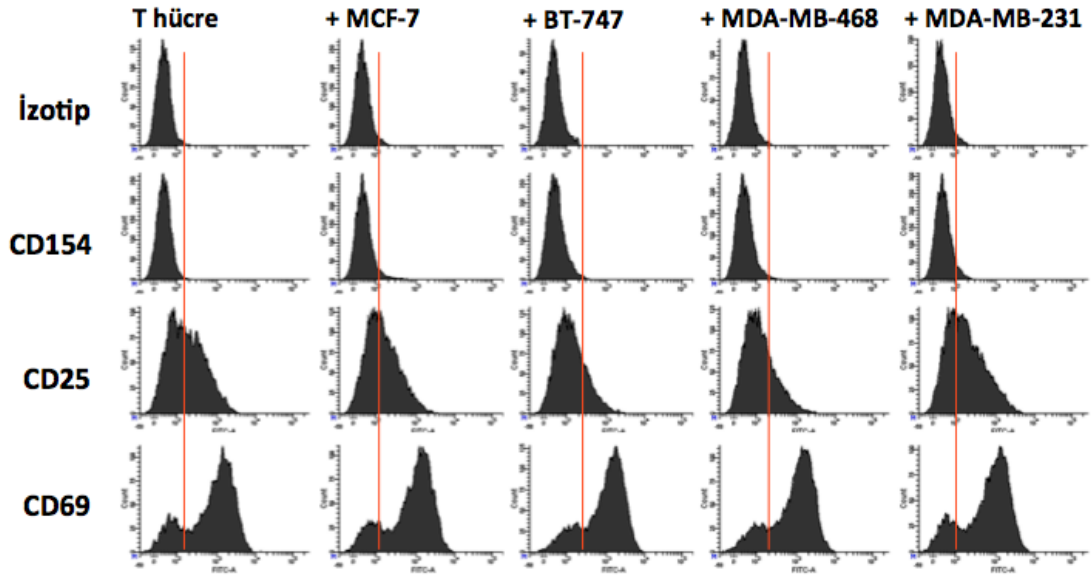
MCF-7, BT-474, MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 ile naif veya ön-uyarımı yapılmış T hücreleri anti-CD3 mAb varlığında 20 saat boyunca 2:1 oranında ko-kültür yapıldı.

CD25, CD69 ve CD154 aktivasyon belirteçlerinin T hücreler yüzeyindeki varlığı akım sitometri ile analiz edildi. Naif T hücrelerle yapılan ko-kültürlerde: MCF-7 ile yapılan ko-kültür sonucunda T hücreler üzerindeki CD154 %2.8, CD25 %7.2, CD69 %27.5; BT-474 ile yapılan ko-kültür sonucunda T hücreler üzerindeki CD154 %2.2, CD25 %5.6, CD69 %31.4; MDA-MB-468 ile yapılan ko-kültür sonucunda T hücreler üzerindeki CD154 %2.8, CD25 %9.4, CD69 %39.5; MDA-MB-231 ile yapılan ko-kültür sonucunda T hücreler üzerindeki CD154 %1.5, CD25 %14.2, CD69 %43.4 olarak tespit edildi. Ko-kültür sonuçları, kontrol T hücre ile yapılan analizlerle (CD154 %1.8, CD25 %11.2, CD69 %24.05) karşılaştırıldığında CD25'te lüminal hücrelerde azalma yönünde değişiklik olduğu, CD154 ekspresyonlarında bir fark olmadığı ancak CD69 ekspresyonunun bazal-benzeri hücreler olan MDA-MB-468 ve MDA-MB-231'de daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 4.18 ve 4.20).

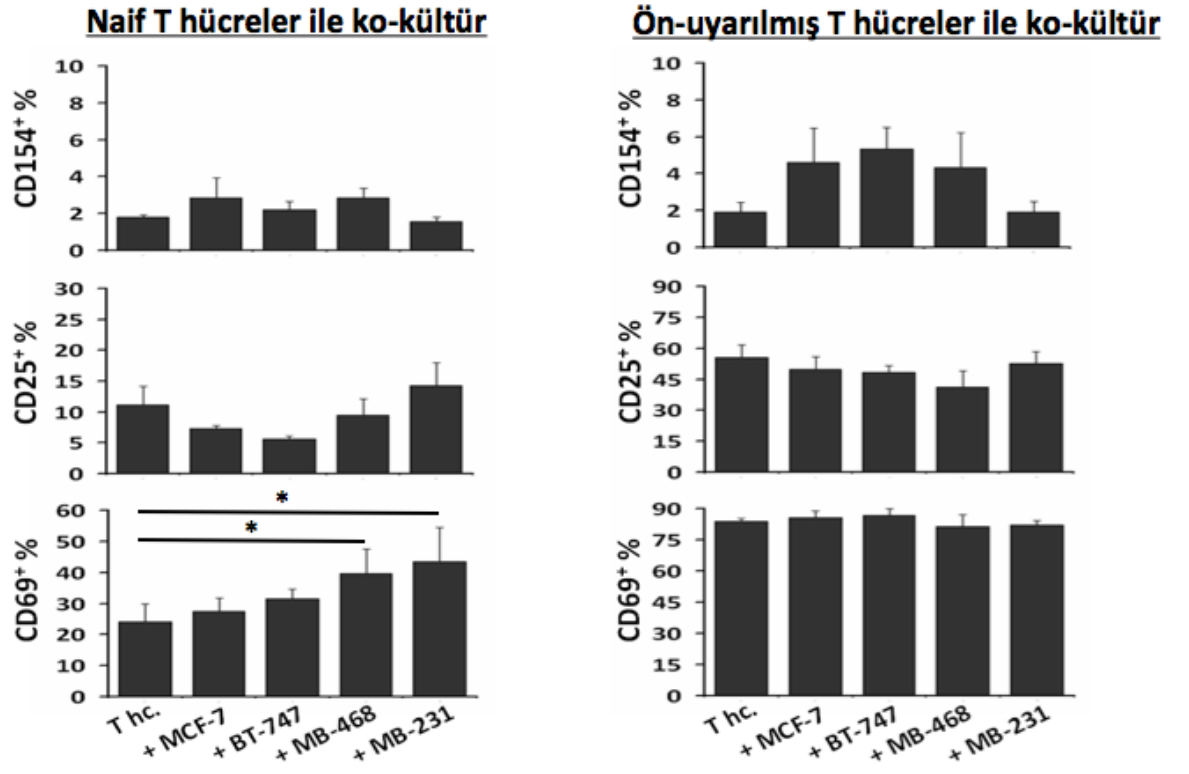


Şekil 4.18 Naif T hücreler ile meme kanseri hücrelerinin (MCF-7, BT-474, MDA-MB-468 ve MDA-MB-231) 20 saat ko-kültüründen sonra T hücre aktivasyon belirteçleri CD25, CD69 ve CD154 ekspresyonlarının temsili akım sitometri histogramları.

Ön-uyarımı yapılmış T hücreler ile yapılan ko-kültürlerde: MCF-7 ile yapılan ko-kültür sonucunda T hücreler üzerindeki CD154 %4.6, CD25 %49.9, CD69 %85.6; BT-474 ile yapılan ko-kültür sonucunda T hücreler üzerindeki CD154 %5.3, CD25 %48.3, CD69 %86.6; MDA-MB-468 ile yapılan ko-kültür sonucunda T hücreler üzerindeki CD154 %4.3, CD25 %41.3, CD69 %81.6; MDA-MB-231 ile yapılan ko-kültür sonucunda T hücreler üzerindeki CD154 %1.9, CD25 %52.6, CD69 %82.1 olarak tespit edildi. Ko-kültür sonuçları, kontrol ön-uyarımı yapılmış T hücre ile yapılan analizlerle (CD154 %1.9, CD25 %55.4, CD69 %83.9) karşılaştırıldığında üç molekülün de ekspresyonunda bir fark olmadığı tespit edildi.



Şekil 4.19 Ön-uyarımı yapılmış T hücreler ile meme kanseri hücrelerinin (MCF-7, BT-474, MDA-MB-468 ve MDA-MB-231) 20 saat ko-kültüründen sonra T hücre aktivasyon belirteçleri CD25, CD69 ve CD154 ekspresyonlarının temsili akım sitometri histogramları.



Şekil 4.20 Naif ve Ön-uyarımı yapılmış T hücreler ile meme kanseri hücrelerinin (MCF-7, BT-474, MDA-MB-468 ve MDA-MB-231) 20 saat ko-kültüründen sonra aktivasyon belirteçleri CD25, CD69 ve CD154 ekspresyonlarının karşılaştırmalı grafikleri (*P<0.05).

5. TARTIŞMA

Kanser hücreleri immün keşif sırasında, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla konağın immün sisteminden saklanırlar veya immün baskılayıcı moleküller üretirler. Bu nedenle, immün sistem tümör hücrelerini tanımakta zorlanır ve yeterince aktive olamaz. Bu sayede, tümör hücreleri konakta çoğalarak yaşamlarına devam ederler. Tümör antijenlerinin immün sistem tarafından tanınması özgül anti-tümör yanıtların gelişiminde en önemli aşamalardan birini oluşturur (2). T hücre aracılı anti-tümör immünite için, kanser ilişkili antijenlerin MHC molekülleri tarafından sunulmasının yanında ko-stimülatör ikincil sinyallerin diğer immün (özellikle profesyonel ASH'ler), stromal veya tümör hücrelerinden alınması gerekir. Kostimülasyon mekanizmasındaki düzensizlikler anti-tümör immünitesinin başarısızlığıyla ilişkili olabilir. B7 ligand ailesi aracılığı ile sağlanan kostimülatör sinyaller immün sistemin gücü, baskılanması ve otoimmünite arasındaki dengenin sağlanması için en önemli mekanizmalardan birisidir (75).

Meme kanseri heterojen bir yapıya ve moleküler profile sahiptir. Diğer epitelyal kanserlere göre heterojenlik açısından daha çok hematolojik malinitelerle benzerlik göstermektedir. Meme kanseri progresyonunda, kolon kanseri veya pankreatik kanserlerde olduğu gibi belirgin bir yolak veya histolojik gösterge belirlenmemiştir (76). İmmün hücrelere normal meme stromasında sık rastlanmaz. Ancak, karsinogenez sürecinde edinsel ve doğal immün sistem hücreleri meme dokusunda belirgin artış gösterir. İmmün hücre infiltrasyonları hem *in situ* hem de invaziv karsinomlarda gözlenmektedir (19). İmmün hücre infiltrasyonunun artışı, meme tümörigenezinin artışıyla paralellik gösterir (77). Bazal-benzeri alt-tipteki meme kanseri daha agresif seyirlidir ve sıklıkla CD4⁺ T lenfositler tarafından infiltre edilir (77).

Sekonder lenfoid organlardan ayrılarak periferik dokulara yerleşen T lenfositlerin canlılığını, aktivasyonunu ve hatta proliferatif aktivitesini sürdürebilmesi için ek uyaranlara ihtiyacı vardır. İnflamatuvar sitokinler ve kostimülatör moleküller bu uyaranların başlıcalarıdır. Meme kanseri

tümörlerinde yaygın T lenfosit infiltrasyonunun bulunması, bu mikroçevrede kostimülatör moleküller tarafından sağlanan aktivatör, inhibitör veya düzenleyici uyarıların bulunabileceğini düşündürmektedir.

Meme kanserinde B7-H1 molekülü başta olmak üzere B7-H3 ve B7-H4 molekülleriyle yapılan bazı çalışmalar bulunmaktadır. Ghebeh ve arkadaşları, invaziv duktal karsinom hastalarının %50'sinde B7-H1 molekülünün ekspresyonunu, ayrıca B7-H1 ekspresyonunun, evre III, ER ve PR negatifliği ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (78). Primer duktal ve lobüler meme kanseri hastalarında yapılan bir çalışmada alınan örneklerin %90.6'sında B7-H3 molekülünün ekspresyonunu gözlemlemişlerdir (72). Tringler ve arkadaşları, immünohistokimyasal olarak belirlenen %95 primer meme kanserinde ve %98 metastatik meme kanserinde (invaziv duktal ve invaziv lobüler) B7-H4 pozitifliği belirlenmiştir (5). Faget ve arkadaşları meme kanserinde infiltratör ICOS⁺ T hücrelerle ilgili yaptıkları çalışmada; ICOS⁺ hücrelerin lenfoid agregatlarda yüksek sayıda bulunduğunu, bu infiltrasyonun lüminal A/B moleküler alt-tiplerle, negatif ER ve HER2/neu aşırı ekspresyonu ve üçlü negatiflik durumuyla ilişkili olduğunu, ancak ICOS Ligandı B7-H2'yi hem hücre hatlarında hem de meme kanseri dokularında gösteremediklerini belirtmişlerdir (69). Diğer B7 ailesi ligandlarının meme kanseri hücreleri üzerinde bulunduğuna ilişkin öne çıkan önemli bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, lüminal ve bazal-benzeri moleküler alt-tiplere sahip meme kanseri hücre hatlarında B7-1, B7-2, B7-H1, B7-DC, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6 moleküllerinin varlığı ve inflamatuvar uyarılar altında ekspresyonlarının değişimi araştırılmıştır. Meme kanserinin moleküler tipleri arasında ekspresyon farklılığı saptanan B7 ligandlarının değişimi araştırılmıştır. CD4⁺ T hücre aktivasyonu ve çoğalmasına olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

İlk olarak bazal-benzeri ve lüminal alt-tipteki hücre hatlarında B7 moleküllerinin gen ekspresyonları ve inflamatuvar uyarılar altında bu genlerin ekspresyonlarının değişimi değerlendirildi. Antitümör immün yanıtlar ve tümör mikroçevresinde kritik öneme sahip olan sitokinlerin başlıcaları IFN- γ ve TNF- α 'dır. Her sitokin de kostimülatör molekül ekspresyonu üzerine

etkisi olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada inflamatuvar uyaranlar olarak rekombinant IFN- γ (rIFN- γ) ve LPS kullanıldı. TNF- α ile benzer yolları (NF- κ B ve MAPK aktivasyonu) uyarması nedeniyle LPS uyarımı TNF- α 'ya alternatif yolak olarak seçildi (79, 80). LPS güçlü immün yanıtların tetiklenmesini sağlayan bir mikrobiyal ajandır (81). LPS ile uyarılan hücrelerden TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinler salgılanır. LPS, toll benzeri reseptör 4 (TLR4) aracılığıyla hücrelere etki eder. Bu çalışmada kullanılan MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 (82-84) hücre hatlarında TLR4'ün eksprese olduğu bilinmektedir. Ancak, bu çalışmada kullanılan meme kanseri hücre hatlarında gerek TLR4, gerekse LPS tanınmasında rol oynayan diğer moleküllerin varlığı araştırılmamıştır. IFN- γ ise antijen sunumunu artırıcı, hücre büyümesini ve çoğalmasını inhibe edici; aynı zamanda MHC ve B7 kostimülatör moleküllerinin ekspresyonunu uyarıcı etkilere sahiptir. IFN reseptörleri IFNAR1/2'nin ekspresyonu stromal ve parenkimal pek çok hücrede oldukça yaygındır (85, 86).

B7-1 ve B7-2, genellikle hematopoetik hücrelerde ekspresyonu bulunmaktadır (87). B7-2 ekspresyonu ise daha nadir bulunur (68). Langerhans hücrelerinin, LPS ve IFN- γ ile uyarıldıkları zaman üzerinde bulunan B7-1 ve B7-2 moleküllerinin ekspresyonlarında artış olduğu gösterilmiştir. Dendritik hücrelerle yapılan bir çalışmada, 40 saatlik LPS uyarımıyla B7-1 ekspresyonunun %7.8; 20 saatlik uyarımda B7-2 ekspresyonunun ise %22.7 oranında arttığı gösterilmiştir (87, 88). Gerek kontrol, gerekse LPS veya IFN- γ ile uyarıldığında meme kanseri hücre hatlarında B7-1 ve B7-2 moleküllerinin belirgin düzeyde ekspresyonuna rastlanmamıştır. Bu moleküllerin hematopoetik kökenli hücrelerde ekspresyonunun daha yaygın olduğu bilinmektedir. B7-1 ve B7-2'nin epitelyal kökenli hücrelerde ise nadiren indüklendiğine dair bilgiler mevcuttur. Meme kanseri hücre hatlarındaki bulgularımız da bunu desteklemektedir. Bu moleküller, profesyonel antijen sunumu yapılan sekonder lenfoid organlardaki en kritik aktivatör moleküllerdir. Bu moleküllerin sekonder lenfoid organlar dışında eksprese olmaması, immün reaksiyonların kontrol altında tutulabilmesini sağlayan bir emniyet mekanizması olabilir.

Perifer dokuda gelişen inflamatuvar yanıtların sonlandırılması inhibitör özellikteki kostimülatör sinyalleri ile sağlanır. Aktive T lenfositler üzerinde PD-1 reseptörü eksprese olur (54). PD-1 sinyalleri, immün yanıtların sonlandırılmasında önemli bir regülatuvar mekanizmadır. B7-H1 ve B7-DC moleküllerinin inflamatuvar koşullar altında gerek perifer dokuda, gerekse sekonder lenfoid organlarda immün yanıtların kontrol edilmesi sağlanır. PD-1 ligandları, özellikle B7-H1 pek çok kanserde eksprese olur ve anti-tümör immün yanıtlardan bir kaçış mekanizması olarak kullanıldığı gösterilmiştir (89). İnvaziv duktal karsinom hastalarında belirlenen B7-H1 molekülünün evre III ve hormon reseptörlerindeki negatiflik ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (78). Ayrıca, MDA-MB-231 hücre hattında immünhistokimyasal boyama ile B7-H1 ekspresyonu belirlenmiştir (55). B7-H1 bazal-benzeri MCF-12A, MDA-MB-231 ve HCC38'lerde yüksek düzeyde gen ekspresyonu ve yüzey proteini düzeyinde gözlemlendi. MDA-MB-468 hücrelerinde ise kontrol koşulları altında mRNA ekspresyonunun diğer bazal-benzeri hücre hatlarına kıyasla oldukça düşük olduğu gözlemlendi. Lüminal hücre hatlarında B7-H1 ekspresyonuna rastlanmazken ER⁻ PR⁻ HER2⁺ olan SK-BR-3 hücrelerinde B7-H1 gen ekspresyonunun belirgin olduğu gözlemlendi. SK-BR-3 hücreleri imünhistokimyasal profillerine göre ER negatifliğinden dolayı bazal-benzeri gruba yakınlık gösteren bir hücre hattıdır. Hücre hattı sınıflamasında lüminal gruba dahil edilse de hastalarda yapılan sınıflandırmaya göre HER2-pozitif alt-tipteki meme kanserileri grubuna dahil olabilir. LPS ile uyarımın bu hücre hatlarında herhangi bir etkisi olmazken; IFN- γ , MDA-MB-468 dahil tüm bazal-benzeri hücrelerde B7-H1 protein ekspresyonunu artırmıştır. Lüminal hücrelerde ise B7-H1'in protein düzeyinde bir değişiklik olmazken, mRNA düzeyinde (özellikle SK-BR-3 hücrelerinde) BT-474 hariç IFN- γ 'nın uyarıcı etkisi gözlemlendi. Bao ve arkadaşları, LPS'in miyeloma hücreleri üzerindeki B7-H1 ekspresyonunu artırdığını göstermişlerdir (90). LPS'nin bazı hücre hatlarında etkisinin olmamasını, hücrelerde TLR4'ün bulunmamasına bağlayabiliriz. Meme kanserinde ise LPS'in belirli bir etkisini bulamadık. Liang ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda MCF-7 ve MDA-MB-468 hücrelerinde IFN- γ ile uyarımda B7-H1 ekspresyonunun artışını doz artışına

bağımlı olarak göstermişlerdir (91). Özellikle IFN- γ uyarımını takiben MCF-7 hücrelerinde mRNA düzeyinde B7-H1 ekspresyonunu bulmamız literatürü destekler niteliktedir. Ancak, B7-H1'in lüminal hücrelerde protein düzeyinde de ekspresyonunun uyarılması için IFN- γ ile daha uzun süre inkübasyon veya daha yüksek konsantrasyonda IFN- γ kullanılması gerekli olabilir. Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinde ise B7-H1'in sürekli ekspresyon olduğu belirlenmiştir ve IFN- γ ile protein düzeyi kısa sürede artış gösterir.

B7-DC ekspresyonu meme kanserinde daha önce çalışılmamıştır. MDA-MB-468 hücreleri hariç tüm bazal-benzeri hücrelerde ekspresyonuna rastlanmıştır. IFN- γ , MDA-MB-468 hücreleri hariç diğer bazal-benzeri hücrelerde artmasını sağlamıştır. MDA-MB-468 hücre hattı bazal A moleküler alt-tipe sahiptir (92). Bazal A tipteki hücreler, lüminal tipteki hücrelerinki ile yakın özelliklere sahiptir (92). Lüminal tipteki meme kanseri hücrelerinde B7-DC molekülünün ekspresyonu gözlenmemiştir. Sadece, SK-BR-3 hücrelerinde gen ve düşük bir oranda protein ekspresyonu belirlenebilmiştir. Bunun sebebi de B7-H1'de de gözleendiği gibi SK-BR-3 hücrelerinin bazal-benzeri alt-tipteki hücrelere yakın özellikler göstermesi olabilir. Özellikle bazal-benzeri hücre hatları B7-H1 ve B7-DC ligandlarını IFN- γ gibi antitümör immün yanıtlarda kritik rol oynayan bir molekül varlığında araştırılarak bir immün kaçış mekanizması olarak kullanabileceği yönünde bilgiler elde edildi. IFN- γ , naif T hücrelerin Th1 hücrelerine farklılaşmasında rol oynar. Th1 hücresi geliştikten sonra sürekli olarak IFN- γ salgılamaya başlar (97). IFN- γ 'nın da B7-H1 ve B7-DC ekspresyonunu indüklemesi T hücrelerin baskılanmasına sebep olur. Bu durum, bazal-benzeri alt-tipteki kanserlerin daha agresif olmasının sebebi olabilir.

B7-H2 gen ekspresyonu düzeyinde lenfoid dokular başta olmak üzere böbrek, karaciğer ve akciğer gibi dokularda da belirlenmiştir. Meme kanseri dokularıyla yapılan bir çalışmada B7-H2 ekspresyonuna rastlanmamıştır (69). IFN- γ ile uyarıldığında fibroblastlar, endotel ve epitel hücrelerinde B7-H2 ekspresyonu gözlenmiştir. B7-H2 ekspresyonu NF- κ B bağımlı değildir (68). Bu nedenle, LPS ile uyarım sonucunda B7-H2 ekspresyonunda bir artış beklenmemektedir. Lüminal özellikteki hücrelerde daha belirgin olmak üzere,

B7-H2 ekspresyonu tüm meme kanseri hücre hatlarında mevcuttu. Genel olarak LPS uyarımında mRNA ekspresyon düzeyinde bir artış gözlenmedi fakat, IFN- γ mRNA düzeyinde B7-H2 ekspresyonunu uyarmaktaydı. Protein düzeyinde B7-H2 ekspresyonu en düşük SK-BR-3 ve T-47D hücrelerinde gözlemlendi. LPS ile uyarıldığı zaman protein düzeyinde B7-H2 ekspresyonunun bazı hücre hatlarında azaldığı fakat sadece SK-BR-3 hücrelerinde bu azalmanın anlamlı düzeyde olduğu belirlendi. Bunun sebebinin de daha önce belirtildiği gibi SK-BR-3 hücrelerinin immünhüstokimyasal profili olabilir. Ayrıca Dölen ve Esendağlı'nın AML hücreleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada B7-H2 molekülünün uyarılmış T lenfositler ile ko-kültürlerde azaldığını göstermişlerdir (93). B7-H2 molekülünün bazal-benzeri hücrelerde ekspresyonu belirlenmemiştir. Ancak, MDA-MB-468 hücrelerinde mRNA düzeyinde yüksek ekspresyon belirlenmesinin nedeni de, bu hücrelerin Bazal A alt tipinde olması olabilir. Lüminal meme kanseri hücrelerinde, T hücre aktivasyonunu uyarıcı B7-H2 molekülünün ekspresyonu olmasına rağmen T hücreler üzerinde uyarıcı etkileri gözlenmemiştir. Bu hücrelerin başka bir baskılama mekanizmasına sahip olduğunu söyleyebiliriz.

B7-H3 küçük hücreli-dışı akciğer ve prostat kanserlerinde belirlenmiştir. Primer duktal ve lobüler meme kanseri hastalarında yapılan bir çalışmada alınan örneklerin neredeyse tamamında B7-H3 molekülünün ekspresyonu gözlemlenmiştir (72). Hematopoetik hücreler LPS ve IFN- γ ile uyarıldıklarında B7-H3 gen ekspresyonunun uyarıldığı gösterilmiştir (94). Bizim çalışmamızda, B7-H3 ekspresyonu SK-BR-3, MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 hücreleri dışındaki hücrelerde tespit edildi. LPS uyarımı bu molekülün mRNA ekspresyonunda bir farklılık oluşturmazken IFN- γ 'nın ekspresyonunu artırdığı yönünde bulgular elde edildi. B7-H4 mRNA'sı pek çok dokuda yaygın olarak bulunmaktadır. Fakat, yüzey molekülü olarak akciğer ve ovaryum kanserlerinde belirlenmiştir (68). Primer meme kanserinde ve metastatik meme kanserinde (invaziv duktal ve invaziv lobüler) B7-H4 pozitifliği oldukça sık rastlanır (5). Ancak, meme kanseri hücre hatlarının bazılarında çok belirgin bazı hatlarda ise hiç ekspresyon belirlenmedi. B7-H6 yüzey molekülünün ekspresyonuna fizyolojik koşullar altında rastlanmazken

tümör dokularında eksprese olduğu bildirilmektedir (95). Meme kanseri hücrelerinin de hepsinde mRNA düzeyinde B7-H6 ekspresyonu bulunmuştur. B7-H3, B7-H4 ve B7-H6 moleküllerine ait mRNA ekspresyonlarında kullanılan meme kanseri hücrelerinin moleküler alt-tiplerine göre belirgin bir fark gözlenmemiştir. Bu nedenle, bu moleküllerin protein düzeyinde ekspresyon analizi gerçekleştirilmemiştir.

Anti-tümör immün yanıtların en etkin hücreleri sitotoksik T lenfositler olarak görülür. Naif $CD8^+$ T hücrelerin uyarılarak çoğalması ve aktif CTL'lere farklılaşması için yalnızca antijenin (MHC sınıf I ilişkili peptit) tanınması yeterli değildir, bunun yanında yardımcı T hücrelerin fonksiyonlarına da ihtiyacı vardır (97). Yardımcı T lenfositler aktive olmak için MHC sınıf II ile sunulan antijenlere ve kostimülasyon sinyallere gereksinim duyar. Ayrıca, $CD4^+$ T hücreler salgıladıkları sitokinlerle T hücre çoğalması ve makrofajların aktivasyonu gibi pek çok sürece de katkıda bulunurlar. Tip 1 yardımcı T lenfosit desteği olmaksızın CTL veya diğer anti-tümör immün yanıtlar başarıya ulaşamaz. Meme kanseri yüksek düzeyde immün hücre infiltrasyonu ile karakterizedir (19). ER-negatifliği ve tümörün agresifliği ile $CD4^+$ T hücrelerin infiltrasyonu korelasyon gösterir (96). Tümör mikroçevresinde bulunan $CD4^+$ T hücreler PD-1 reseptörü taşırlar. PD-1, bazal-benzeri meme kanseri hücreleri üzerinde sürekli ekspresyonunu gördüğümüz B7-H1 (PD-L1) ve B7-DC (PD-L2) molekülleri ile bağlanır. PD-1 tarafından iletilen sinyaller $CD4^+$ T hücrelerin aktivasyonunu baskılar ve apoptoza gitmesine sebep olur. B7-H2 molekülüne ise aktive olmuş $CD4^+$ T hücreler üzerinde eksprese olan ICOS'un ligandıdır. Uyarılması sonucunda T hücrelere aktivasyonlarını destekleyici sinyaller gönderirler ve canlılığını devam ettirir.

Lüminal ve bazal benzeri meme kanseri hücreleri üzerinde farklı ekspresyon dağılımı gösteren B7-H1, B7-H2 ve B7-DC moleküllerinin yardımcı T hücre yanıtları üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla ko-kültür deneyleri yapıldı. Bu amaçla B7-H2 ekspresyonu yüksek; B7-H1 ve B7-DC ekspresyonları düşük olan MCF-7 ve BT-474 lüminal meme kanseri hücre hatları temsili olarak seçildi. B7-H2 ekspresyonu düşük; B7-H1 ve B7-DC

ekspresyonları daha belirgin olan MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 ise temsili bazal-benzeri hücre hatları olarak kullanıldı. B7-H2 reseptörü ICOS ve B7-H1/B7-DC reseptörü PD-1 uyarılmış T lenfositler üzerinde bulunur. T hücrelerin aktivasyonunu sağlayan en önemli hücreler ise profesyonel ASH'lerdir. Bu hücreler sınıf II MHC molekülleri varlığında T hücre reseptörünü uyarırlar ve özellikle CD28 üzerinden kostimülasyon sağlarlar. CD4⁺ T hücrelerin uyarılması için MHC sınıf II molekülünün hücrelerde ekspresyonu gereklidir ancak meme epitelinde bu moleküllerin ekspresyonu bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda HLA-DR ve B7-2 eksprese ettiği bilinen miyeloid kökenli hücreler (KG-1 hücre hattı) varlığında allojenik CD4⁺ T hücrelerin, anti-CD3 monoklonal antikoru ile ön uyarımı gerçekleştirilmiştir. KG-1 hücrelerinin yardımcı T hücreleri kısa sürede etkin şekilde uyarabildiği bilinmektedir (93). Özetle, KG-1 hücreleri ile uyarımı yapılan T lenfositlerin ICOS ve/veya PD-1 eksprese ederek kostimülatör sinyallere açık hale gelmesi sağlandı.

Hem lüminal hem de bazal-benzeri alt-tiplerle yapılan ko-kültürlerde ön-uyarım yapılmış T hücrelerin proliferasyon artışı uyarımı yapılmamışlara oranla daha yüksek seviyede bulundu. Lüminal hücrelerin T hücre proliferasyonuna bir etkisi olmadığı saptandı. Ancak, bazal-benzeri alt-tipteki hücrelerin oransal artışına bağlı olarak T hücre proliferasyonunda belirgin düzeyde artış tespit edildi. Bunun sebebi, ön-uyarım sayesinde T hücrelerin üzerindeki CD25 (IL-2R α) gibi canlılığı destekleyen veya inflamatuvar sinyalleri algılayabilen moleküllerin ekspresyonlarındaki artış olabilir. T hücrelerde otokrin olarak salgılanan IL-2, CD25'e bağlanarak T hücrelerin büyümesini indükler. Bazal benzeri hücrelerin T hücre proliferasyonunu artırmasının altında yatan sebep bazal-benzeri hücrelerden salgılanan birtakım faktörler olabilir. Ancak, böyle bir moleküle dair bilgi bulunmamaktadır. Lüminal meme kanseri hücrelerinde ise ko-aktivatör molekül B7-H2 molekülünün ekspresyonu olmasına rağmen T hücre proliferasyonunda artış olmaması bu sinyallerin T hücre üzerine etki edecek güçte olmadığını veya üstün bir baskılama mekanizması olabileceğine işaret etmektedir. Bazal-benzeri hücre hatlarında ise yüksek seviyede ko-inhibitör

moleküllerin ekspresyonuna rağmen T hücre proliferasyonunun yüksek olması, bu hücrelerle ko-kültür yapılan T hücrelerin PD-1 aracılı inhibitör sinyallere duyarlılığının araştırılmasını gerektirir.

Bazal-benzeri hücrelerdeki proliferasyon artışının salgılanan faktörlerden kaynaklı olup olmadığını belirlemek ve PD-1 ligandlarının etkinliğini bu faktörler yokluğunda test edebilmek amacıyla meme kanseri hücreleri fikse edildi. Daha güçlü uyarım yapabilmesi için T hücrelerin doğrudan KG-1 ve fikse MDA-MB-231 hücreleri ile üçlü ko-kültürleri yapıldı. Meme kanseri hücrelerinin fiksasyonu ile yapılan ko-kültürlerin sonucunda T hücrelerin proliferasyonunda gözlenen düşüş baştaki proliferasyon artışının salgılanan faktör kaynaklı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, proliferasyondaki düşüş bu hücreler üzerindeki inhibe edici B7-H1 ve B7-DC moleküllerinden de kaynaklanıyor olabilir. Bazal-benzeri hücreler salgılanan faktörler aracılığıyla uyarılmış T hücrelerin aktivasyonunun sürekliliğini sağlar. Aktive T hücreler PD-1 ve IFN- γ eksprese eder. IFN- γ bazal-benzeri hücreler üzerindeki B7-H1 ve B7-DC moleküllerinin ekspresyonunu uyarır ve T hücrelerin baskılanması sağlanır.

Ko-kültürler sonrasında T hücreler üzerinde CD25, CD69 ve CD154 aktivasyon belirteçlerine bakıldığında ön-uyarımlı hücrelerde CD69 ve CD25 molekülleri oldukça belirgin düzeyde fakat CD154 çok düşük düzeyde tespit edildi. Lüminal ve bazal-benzeri hücrelerde bu moleküllerin ekspresyon seviyeleri arasında hiç bir fark saptanmadı. Bunun sebebi ön-uyarımın etkisiyle baştan bu moleküllerin eksprese olmuş olması olabilir. Naif T hücrelerle yapılan ko-kültürlerde CD154 ekspresyonu bütün hücrelerde çok düşük seviyede, CD25 ekspresyonu lüminal hücre ko-kültürlerinde azalmış seviyede ve CD69 ise bazal-benzeri hücrelerde anlamlı olarak artmış düzeyde bulunmuştur. CD154 erken aktivasyon molekülüdür ve aktivasyondan çok kısa süre sonra hücre yüzeyinde downregüle olur (93). Ön-uyarımlı hücrelerde bu molekülün gözlenmemesinin sebebi bu durum olabilir. Ancak naif T hücrelerde de CD154 gözlenmediği için bu molekülün ekspresyonu için gerekli sinyallerin yeterince oluşmadığı da söylenebilir.

Sonuç olarak, Bazal-benzeri ve lüminal alt-tipteki meme kanserlerinin immün sistemde, özellikle yardımcı T lenfosit yanıtlarını farklı kostimülatör mekanizmalar üzerinden etkileyerek anti-tümör immün yanıtlarla ba a çıktığını işaret eder.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada,

1. Meme kanseri hücre hatlarında B7-1 ve B7-2 moleküllerinin ekspresyonlarına rastlanmadı

2. B7-H1 molekülünün bazal-benzeri hücrelerde ekspresyonu belirlendi. IFN- γ ile ekspresyonlarında artış saptandı. Lüminal hücrelerde ekspresyonu gözlenmedi

3. B7-H2 molekülünün ekspresyonu lüminal tipteki hücrelerde tespit edildi. LPS ve IFN- γ 'nın mRNA ekspresyonu düzeyinde gösterilmezken LPS'in Protein düzeyinde bu molekülün ekspresyonunda azalma yönünde bir etkisi olduğu gösterildi.

4. B7-H3 molekülünün genel olarak bütün hücrelerde eksprese olduğu gözlemlendi. LPS ile uyarımda bazı hücrelerde ekspresyon azalma yönünde değiştiği gözlemlendi. IFN- γ ile uyarımda ise genel olarak B7-H3'ün ekspresyonunun artış yönünde değiştiği belirlendi.

5. B7-H4 ekspresyonu SK-BR-3, MDA-MB-468, BT-474, T-47D, ZR-75-1 ve HCC38 hücrelerinde tespit edildi ancak LPS ile uyarımda BT-474 ve HCC38 hücrelerinde ekspresyonun azalma yönünde değiştiği belirlendi. IFN- γ ile uyarım da ise SK-BR-3 ve HCC38 hücrelerinde ekspresyonun azalma yönünde değiştiği gözlemlendi.

6. B7-DC molekülünün bazal-benzeri hücrelerde ekspresyonu belirlendi. LPS ile uyarımın bu molekülün ekspresyonunda değişikliğe yol açmadığı tespit edildi. Ancak IFN- γ ile uyarımda aynı hücrelerde ekspresyonun artış yönünde değiştiği belirlendi.

7. B7-H6 molekülünün ekspresyonu bütün hücrelerde gözlemlendi. LPS ile uyarımda bazı hücrelerdeki B7-H6 ekspresyonu azalma yönünde değişiklik gösterildi. IFN- γ ile uyarımda ise T-47D hücrelerinde ekspresyonun azalma yönünde değiştiği gözlemlendi.

8. Bazal-benzeri hücrelerin ön-uyarımlı T hücrelerin proliferasyonunu ve canlılığının sürekliliğini sağladığı belirlendi.

9. T hücrelerin proliferasyonunda bazal-benzeri hücrelerden salgılanan faktörlerin etkili olduğu gözlemlendi.

10. Meme kanseri hücrelerinin fikse edilmesi ile yüzey moleküllerinin T hücreler üzerinde baskılayıcı etkisi olduğu belirlendi.

11. Aktivasyon belirteçlerinin analizi ile lüminal hücrelerin T hücreleri baskılayıcı bir etkisi olduğu ya da aktivasyonu uyaramadığı belirlendi.

Bu bilgiler ışığında önerilerimiz:

12. Lüminal özellikteki hücrelerde IFN- γ uyarımının dozu ve süresi artırılarak B7-H1 ve B7-DC moleküllerinin ekspresyonları değerlendirilerek lüminal hücrelerde de bu kaçış mekanizmasının kullanımı yönünde bulgu elde edilebilir.

13. Bazal-benzeri ve lüminal hücreler arasında gen ekspresyon farkının real time PCR ile gösterilmesi sayesinde B7-H1, B7-H2 ve B7-DC moleküllerinin ekspresyon düzeyleri arasındaki net fark ortaya çıkarılabilir.

14. Planlanacak yeni çalışma ile lüminal ve bazal-benzeri alt-tip özelliği gösteren insan meme kanseri dokularında B7-H1, B7-H2 ve B7-DC'nin gösterilerek bulgularımızın *in vivo* geçerliliği hakkında bilgi edinilebilir.

15. Ko-kültür yapılan T lenfositlerin yüzeyinde de ICOS ve PD-1 reseptörlerinin varlığının belirlenmesi T hücrelerin bu sinyallere ne kadar açık olduğu konusunda bilgi verebilir.

16. T hücrelerin farklılaşma düzeyleri ve salgıladıkları sitokinlerin değişimleri incelenebilir.

17. PD-1 ligandlarının ve B7-H2'nin sinyallerinin bloklayıcı antikorlar veya rekombinant protein varlığında doğrudan etkisinin araştırılması bu moleküllerin etkisi hakkında özgül mekanizma bilgisi verebilir.

18. Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinin salgıladığı ve T hücre yanıtlarını destekleyen faktörlerin bulunması amacıyla çeşitli protein dizin analizleri yapılabilir.

KAYNAKLAR

1. Valentin, M.D., ve ark., *Molecular insights on basal-like breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2012. 134(1): p. 21-30.
2. Driessens, G., J. Kline, and T.F. Gajewski, *Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity*. Immunol Rev, 2009. 229(1): p. 126-44.
3. Ghebeh, H., ve ark., *Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67-expressing tumor cells*. Int J Cancer, 2007. 121(4): p. 751-8.
4. Yi, K.H. and L. Chen, *Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4*. Immunol Rev, 2009. 229(1): p. 145-51.
5. Tringler, B., ve ark., *B7-h4 is highly expressed in ductal and lobular breast cancer*. Clin Cancer Res, 2005. 11(5): p. 1842-8.
6. Arigami, T., ve ark., *B7-h3 ligand expression by primary breast cancer and associated with regional nodal metastasis*. Ann Surg, 2010. 252(6): p. 1044-51.
7. Haupt, B., J.Y. Ro, and M.R. Schwartz, *Basal-like breast carcinoma: a phenotypically distinct entity*. Arch Pathol Lab Med, 2010. 134(1): p. 130-3.
8. Smalley, M. and A. Ashworth, *Stem cells and breast cancer: A field in transit*. Nat Rev Cancer, 2003. 3(11): p. 832-44.
9. Perou, C.M., ve ark., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. 406(6797): p. 747-52.
10. Irvin, W.J., Jr. and L.A. Carey, *What is triple-negative breast cancer?* Eur J Cancer, 2008. 44(18): p. 2799-805.
11. Eroles, P., ve ark., *Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways*. Cancer Treat Rev, 2012. 38(6): p. 698-707.
12. Tran, B. and P.L. Bedard, *Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets*. Breast Cancer Res, 2011. 13(6): p. 221.

13. Loi, S., ve ark., *Gene expression profiling identifies activated growth factor signaling in poor prognosis (Luminal-B) estrogen receptor positive breast cancer*. BMC Med Genomics, 2009. 2: p. 37.
14. Creighton, C.J., ve ark., *Proteomic and transcriptomic profiling reveals a link between the PI3K pathway and lower estrogen-receptor (ER) levels and activity in ER+ breast cancer*. Breast Cancer Res, 2010. 12(3): p. R40.
15. Yarden, Y. and G. Pines, *The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology*. Nat Rev Cancer, 2012. 12(8): p. 553-63.
16. Khramtsov, A.I., ve ark., *Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome*. Am J Pathol, 2010. 176(6): p. 2911-20.
17. Turashvili, G., ve ark., *Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis*. Pathobiology, 2006. 73(5): p. 213-23.
18. Lavasani, M.A. and F. Moinfar, *Molecular classification of breast carcinomas with particular emphasis on "basal-like" carcinoma: a critical review*. J Biophotonics, 2012. 5(4): p. 345-66.
19. DeNardo, D.G. and L.M. Coussens, *Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression*. Breast Cancer Res, 2007. 9(4): p. 212.
20. Mantovani, A., ve ark., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. 454(7203): p. 436-44.
21. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. 420(6917): p. 860-7.
22. Sica, A., ve ark., *Macrophage polarization in tumour progression*. Semin Cancer Biol, 2008. 18(5): p. 349-55.
23. Allavena, P., ve ark., *The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages*. Crit Rev Oncol Hematol, 2008. 66(1): p. 1-9.

24. Chaput, N., ve ark., *The Janus face of dendritic cells in cancer*. *Oncogene*, 2008. 27(45): p. 5920-31.
25. de Visser, K.E., L.V. Korets, and L.M. Coussens, *De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent*. *Cancer Cell*, 2005. 7(5): p. 411-23.
26. Johansson, M., D.G. Denardo, and L.M. Coussens, *Polarized immune responses differentially regulate cancer development*. *Immunol Rev*, 2008. 222: p. 145-54.
27. Weaver, C.T., ve ark., *Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties*. *Immunity*, 2006. 24(6): p. 677-88.
28. Dunn, G.P., ve ark., *A critical function for type I interferons in cancer immunoediting*. *Nat Immunol*, 2005. 6(7): p. 722-9.
29. Lighvani, A.A., ve ark., *T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(26): p. 15137-42.
30. Disis, M.L., *Immune regulation of cancer*. *J Clin Oncol*, 2010. 28(29): p. 4531-8.
31. Aspod, C., ve ark., *Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development*. *J Exp Med*, 2007. 204(5): p. 1037-47.
32. Pedroza-Gonzalez, A., ve ark., *Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation*. *J Exp Med*, 2011. 208(3): p. 479-90.
33. Sakai, Y., ve ark., *Vaccination by genetically modified dendritic cells expressing a truncated neu oncogene prevents development of breast cancer in transgenic mice*. *Cancer Res*, 2004. 64(21): p. 8022-8.
34. Hanahan, D. and L.M. Coussens, *Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment*. *Cancer Cell*, 2012. 21(3): p. 309-22.
35. DeNardo, D.G., ve ark., *CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages*. *Cancer Cell*, 2009. 16(2): p. 91-102.

36. Coussens, L.M., L. Zitvogel, and A.K. Palucka, *Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet?* Science, 2013. 339(6117): p. 286-91.
37. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?* Immunity, 2009. 30(5): p. 626-35.
38. Disis, M.L., *Enhancing cancer vaccine efficacy via modulation of the tumor microenvironment.* Clin Cancer Res, 2009. 15(21): p. 6476-8.
39. Zou, W., *Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance.* Nat Rev Cancer, 2005. 5(4): p. 263-74.
40. Colombo, M.P. and S. Picconese, *Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy.* Nat Rev Cancer, 2007. 7(11): p. 880-7.
41. Bates, G.J., ve ark., *Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse.* J Clin Oncol, 2006. 24(34): p. 5373-80.
42. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work.* Nat Rev Immunol, 2008. 8(7): p. 523-32.
43. Bettelli, E., ve ark., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.* Nature, 2006. 441(7090): p. 235-8.
44. Kryczek, I., ve ark., *Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments.* Blood, 2009. 114(6): p. 1141-9.
45. Chen, L. and D.B. Flies, *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition.* Nat Rev Immunol, 2013. 13(4): p. 227-42.
46. Collins, M., V. Ling, and B.M. Carreno, *The B7 family of immune-regulatory ligands.* Genome Biol, 2005. 6(6): p. 223.
47. Schwartz, J.C., ve ark., *Structural mechanisms of costimulation.* Nat Immunol, 2002. 3(5): p. 427-34.

48. Zou, W. and L. Chen, *Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment*. Nat Rev Immunol, 2008. 8(6): p. 467-77.
49. Rudd, C.E., A. Taylor, and H. Schneider, *CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction*. Immunol Rev, 2009. 229(1): p. 12-26.
50. Butte, M.J., ve ark., *Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses*. Immunity, 2007. 27(1): p. 111-22.
51. Park, J.J., ve ark., *B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance*. Blood, 2010. 116(8): p. 1291-8.
52. Boomer, J.S. and J.M. Green, *An enigmatic tail of CD28 signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. 2(8): p. a002436.
53. Simpson, T.R., S.A. Quezada, and J.P. Allison, *Regulation of CD4 T cell activation and effector function by inducible costimulator (ICOS)*. Curr Opin Immunol, 2010. 22(3): p. 326-32.
54. Sakthivel, P., M. Gereke, and D. Bruder, *Therapeutic intervention in cancer and chronic viral infections: antibody mediated manipulation of PD-1/PD-L1 interaction*. Rev Recent Clin Trials, 2012. 7(1): p. 10-23.
55. Hasan, A., ve ark., *Therapeutic targeting of B7-H1 in breast cancer*. Expert Opin Ther Targets, 2011. 15(10): p. 1211-25.
56. Ghebeh, H., ve ark., *Doxorubicin downregulates cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule*. Breast Cancer Res, 2010. 12(4): p. R48.
57. Hua, Z., ve ark., *PD-1 polymorphisms are associated with sporadic breast cancer in Chinese Han population of Northeast China*. Breast Cancer Res Treat, 2011. 129(1): p. 195-201.
58. Ghebeh, H., ve ark., *FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy*. BMC Cancer, 2008. 8: p. 57.

59. Dong, H., ve ark., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med, 2002. 8(8): p. 793-800.
60. Brown, J.A., ve ark., *Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production*. J Immunol, 2003. 170(3): p. 1257-66.
61. Keir, M.E., ve ark., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2008. 26: p. 677-704.
62. Azuma, T., ve ark., *B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells*. Blood, 2008. 111(7): p. 3635-43.
63. Yao, S., ve ark., *B7-h2 is a costimulatory ligand for CD28 in human*. Immunity, 2011. 34(5): p. 729-40.
64. Choi, Y.S., ve ark., *ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6*. Immunity, 2011. 34(6): p. 932-46.
65. McAdam, A.J., ve ark., *Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4⁺ T cells*. J Immunol, 2000. 165(9): p. 5035-40.
66. Wallin, J.J., ve ark., *Enhancement of CD8⁺ T cell responses by ICOS/B7h costimulation*. J Immunol, 2001. 167(1): p. 132-9.
67. Wang, F., ve ark., *The expression analysis of ICOS-L on activated T cells and immature dendritic cells as well as malignant B cells and Grave's-disease-derived thyroid tissues by two novel mAbs against human ICOS-L*. Tissue Antigens, 2007. 69(1): p. 62-72.
68. Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe, *The B7 family revisited*. Annu Rev Immunol, 2005. 23: p. 515-48.
69. Faget, J., ve ark., *ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4⁺ T cells*. Cancer Res, 2012. 72(23): p. 6130-41.

70. Ueno, T., ve ark., *Intact B7-H3 signaling promotes allograft prolongation through preferential suppression of Th1 effector responses*. Eur J Immunol, 2012. 42(9): p. 2343-53.
71. Zhang, G., ve ark., *B7-H3 augments the inflammatory response and is associated with human sepsis*. J Immunol, 2010. 185(6): p. 3677-84.
72. Liu, C., ve ark., *B7-H3 expression in ductal and lobular breast cancer and its association with IL-10*. Mol Med Rep, 2012.
73. Kryczek, I., ve ark., *B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma*. J Exp Med, 2006. 203(4): p. 871-81.
74. Brandt, C.S., ve ark., *The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans*. J Exp Med, 2009. 206(7): p. 1495-503.
75. Greaves, P. and J.G. Gribben, *The role of B7 family molecules in hematologic malignancy*. Blood, 2013. 121(5): p. 734-44.
76. Stingl, J. and C. Caldas, *Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis*. Nat Rev Cancer, 2007. 7(10): p. 791-9.
77. Adams, S.F., ve ark., *Intraepithelial T cells and tumor proliferation: impact on the benefit from surgical cytoreduction in advanced serous ovarian cancer*. Cancer, 2009. 115(13): p. 2891-902.
78. Ghebeh, H., ve ark., *The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors*. Neoplasia, 2006. 8(3): p. 190-8.
79. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. 104(4): p. 487-501.
80. Netea, M.G., ve ark., *Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors?* Trends Immunol, 2002. 23(3): p. 135-9.

81. Lin, W.J. and W.C. Yeh, *Implication of Toll-like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock*. Shock, 2005. 24(3): p. 206-9.
82. Noh, K.T., ve ark., *GSK-3beta-induced ASK1 stabilization is crucial in LPS-induced endotoxin shock*. Exp Cell Res, 2011. 317(12): p. 1663-8.
83. Yang, H., ve ark., *Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion*. J Exp Clin Cancer Res, 2010. 29: p. 92.
84. Zhao, Y., ve ark., *Metadherin mediates lipopolysaccharide-induced migration and invasion of breast cancer cells*. PLoS One, 2011. 6(12): p. e29363.
85. Chill, J.H., ve ark., *The human type I interferon receptor: NMR structure reveals the molecular basis of ligand binding*. Structure, 2003. 11(7): p. 791-802.
86. Uze, G., ve ark., *The receptor of the type I interferon family*. Curr Top Microbiol Immunol, 2007. 316: p. 71-95.
87. Yokozeki, H., ve ark., *Interferon-gamma differentially regulates CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2/B70) expression on human Langerhans cells*. Br J Dermatol, 1997. 136(6): p. 831-7.
88. van Berkel, M.E., ve ark., *A critical contribution of both CD28 and ICOS in the adjuvant activity of Neisseria meningitidis H44/76 LPS and lpxL1 LPS*. Vaccine, 2007. 25(24): p. 4681-8.
89. Topalian, S.L., C.G. Drake, and D.M. Pardoll, *Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity*. Curr Opin Immunol, 2012. 24(2): p. 207-12.
90. Bao, H., ve ark., *Triggering of toll-like receptor-4 in human multiple myeloma cells promotes proliferation and alters cell responses to immune and chemotherapy drug attack*. Cancer Biol Ther, 2011. 11(1): p. 58-67.
91. Liang, M., H. Yang, and J. Fu, *Nimesulide inhibits IFN-gamma-induced programmed death-1-ligand 1 surface expression in breast*

- cancer cells by COX-2 and PGE2 independent mechanisms. Cancer Lett, 2009. 276(1): p. 47-52.*
92. Kao, J., ve ark., *Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. PLoS One, 2009. 4(7): p. e6146.*
 93. Dolen, Y. and G. Esendagli, *Myeloid leukemia cells with a B7-2(+) subpopulation provoke Th-cell responses and become immuno-suppressive through the modulation of B7 ligands. Eur J Immunol, 2013. 43(3): p. 747-57.*
 94. Suh, W.K., ve ark., *The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. Nat Immunol, 2003. 4(9): p. 899-906.*
 95. Flajnik, M.F., ve ark., *Evolution of the B7 family: co-evolution of B7H6 and NKp30, identification of a new B7 family member, B7H7, and of B7's historical relationship with the MHC. Immunogenetics, 2012. 64(8): p. 571-90.*
 96. Matkowski, R., ve ark., *The prognostic role of tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer. Anticancer Res, 2009. 29(7): p. 2445-51.*
 97. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., (2011), *Cellular and Molecular Immunology, Elsevier Saunders*

EKLER

EK-I: Etik Kurul İzni

 **HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 - Faks: 0 (312) 310 0580
E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.07.00 / 961

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 28 KASIM 2012 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2012/11
Proje No : LUT 12/153 (Değerlendirme Tarihi 28.11.2012)
Karar No : LUT 12/153 - 35

Üniversitemiz Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Güneş Esendağlı'nın sorumlu araştırmacı olduğu Uzm. Biol. Gürcan Tunalı ile birlikte çalışacakları Biol. Pınar Karasar'ın tezi olan LUT 12/153 kayıt numaralı ve "**Meme Kanseri Hücrelerinde Kostimulatör B7 Ailesi Ligandlarının Ekspresyonu ve Yardımcı T Hücre Yanıtları Üzerine Etkisi**" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan)	9 Prof. Dr. Songül Vaizoglu (Üye)
2. Prof. Dr. Nüket Örnek Bukun (Üye)	10. Prof. Dr. Melahat Görduysus (Üye)
İZİNLİ	11. Doç. Dr. R. Köksal Özgül (Üye)
3. Prof. Dr. Hakan S. Örer (Üye)	12. Doç. Dr. Cansın Saçkesen (Üye)
4. Prof. Dr. Sevdâ F. Müftüoğlu (Üye)	13. Doç. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye)
5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye)	14. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye)
6. Prof. Dr. Kafiye Eroğlu (Üye)	15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye)
İZİNLİ	GÖREVLİ
7. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye)	16. Av. Meltem Onurlu (Üye)
GÖREVLİ	
8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye)	

EK-II: Çalışmanın sunulduğu bilimsel toplantılar.**Sözlü Bildiri**

Karaşar P., Esendağlı G. (2013) Meme kanseri hücrelerinde B7 kostimülatör ailesi moleküllerinin ekspresyonu ve yardımcı T hücre yanıtlarına etkisi. **22. Ulusal İmmünoloji Kongresi**, Çeşme, S-015.

Poster Bildirisi

Karaşar P., Esendağlı G. (2013) Meme kanseri hücrelerinde B7 kostimülatör molekül ailesinin ekspresyonu. **20. Ulusal Kanser Kongresi**, Antalya, P-717.