

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI  
TRANSPLANTASYON İMMÜNOLOJİSİ YÜKSEK LİSANS  
PROGRAMI**

**ANTİKOR ARACILI REJEKSİYONU OLAN RENAL  
ALLOGREFTLERDE PROGRAMLANMIŞ ÖLÜM-LİGAND-1'İN  
(PD-L1) GRAFT SAĞKALIMI ÜZERİNE OLAN ETKİSİ**

**HAZIRLAYAN**

**BİNNAZ HANDAN ÖZDEMİR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA-2023**

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI  
TRANSPLANTASYON İMMÜNOLOJİSİ YÜKSEK LİSANS  
PROGRAMI**

**ANTİKOR ARACILI REJEKSİYONU OLAN RENAL  
ALLOGREFTLERDE PROGRAMLANMIŞ ÖLÜM-LİGAND-1'İN  
(PD-L1) GRAFT SAĞKALIMI ÜZERİNE OLAN ETKİSİ**

**HAZIRLAYAN  
BİNNAZ HANDAN ÖZDEMİR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. BİLKAY BAŞTÜRK**

**ANKARA-2023**

*Babam Prof. Dr. A. İlhan Özdemir'e ithaf ediyorum*

## TEŞEKKÜR

Tüm eğitim hayatım boyunca her zaman desteklerini yanımda hissettiğim babam Prof. Dr. A. İlhan Özdemir, annem Güray Özdemir ve başta Dr. Aydan Özdemir olmak üzere tüm kardeşlerime, akademik yükselişim sırasında hem yanımda olan ve transplantasyon eğitimim süresince hep bana destek olan Prof. Dr. Mehmet Haberal'a, Transplant İmmünolojisi yüksek lisans eğitimi süresince bana sağladığı değerli bilgiler ve deneyimler sayesinde mesleki gelişimime büyük katkılar sağlayan Prof. Dr. Bilkay Baştürk ve Doç. Dr. Özgür Kütük'e çok teşekkür ederim.

Sizlerin liderliğinde, transplantasyon alanında temel bilgilere ek olarak ileri düzey immünoloji konularını öğrenme fırsatı bulduğum için ve sadece akademik bilgi aktarımıyla kalmayıp, sizlerin tecrübeleriyle donatılmış olmam da benim için büyük bir ayrıcalık oldu.

Sizlerin bilgeliği ve liderliği sayesinde, tezimde elde ettiğim başarılarla gurur duyuyorum. Bana olan inancınız ve yönlendirmeleriniz olmadan bu noktaya gelemedim.

Sizinle çalışmak ve sizlerden öğrenmek benim için büyük bir onurdu.

Saygılarımla,

Dr. Binnaz Handan Özdemir

## ÖZET

**Dr. Binnaz Handan Özdemir**

**Antikor aracılı rejeksiyonu olan renal allogreftlerde programlanmış ölüm-ligand-1'in (PD-L1) graft sağkalımı üzerine olan etkisi**

**Başkent Üniversitesi**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Transplantasyon immunolojisi yüksek lisans programı, 2023**

**Giriş:** PD-L1'in T hücre biyolojisindeki kritik rolü ve solid organ nakillerindeki işlevi hakkındaki bilgiler artmasına rağmen, ABMR'deki rolü bilinmemektedir. PD-1/PD-L1 etkileşiminin graft toleransının sürdürülmesinde önemli olduğunu gösteren bazı çalışmalar olsa da ABMR'li renal allograftlarda PD-1/PD-L1 etkileşiminin bağışıklık hücreleri üzerinde farklı etkileri olabilir. Bağışıklık hücreleri ile hedef greft arasındaki ilk arayüz olduğu için, amacımız peritübüler kapillerlerde (PTK) endotel hücreleri ve bağışıklık hücreleri üzerinde PD-1/PD-L1 etkileşiminin durumunu anlamaktır.

**Materyal ve Yöntem:** 110 olgunun 68'inde saf ABMR (Grup 1) ve 42'sinde hem akut ABMR hem de akut TCMR bulunmaktadır (Grup 2). İlk belirti biyopsileri yeniden değerlendirildi ve glomerüler, PTK, interstisyel lökosit, makrofaj, CD4 ve CD8 pozitif lenfositlerin derecesi sınıflandırıldı. PTK, tübüler ve interstisyel lökositlerin HLA-DR ekspresyonu incelendi. PTK-DR ekspresyonunun kaybı, PTK yıkım olarak kabul edildi. Tübül, endotel ve inflamatuvar hücrelerde PD-1 ve PD-L1 ekspresyonu değerlendirildi. Ayrıca tübül ve interstisyel inflamatuvar hücrelerde CD80, CD86, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  ekspresyonları araştırıldı. Takip biyopsileri, diffüz interstisyel fibrozis (IF) gelişimi açısından değerlendirildi.

**Bulgular:** Grup 2 hastalarda, Grup 1'e göre endotel ve inflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 daha yüksek oranlarda ekspresyon gösterdi ( $p<0,001$ ). Endotel ve inflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 etkileşimi, interstisyel, glomerüler, PTK lökosit, makrofaj, CD4 ve CD8 pozitif lenfositlerin artmasıyla birlikte arttı ( $p<0,001$ ). PTK-DR ekspresyonu ile PD-1/PD-L1 etkileşimi arasında ters bir ilişki bulundu ve tübüler HLA-DR ifadesi ile pozitif bir ilişki saptandı ( $p<0,001$ ). Endotel PD-1/PD-L1 etkileşimi olan hastalarda IF gelişimi %52,3 iken, endotel PD-1/PD-

L1 etkileşimi olmayan hastalarda %12,1 idi ( $p<0,001$ ). Genel 10 yıllık sağkalım, endotel PD-1/PD-L1 etkileşimi olan hastalarda %27,3 iken, endotel PD-1/PD-L1 etkileşimi olmayan hastalarda %66,7 idi ( $p<0,001$ ). Benzer şekilde, genel 10 yıllık sağkalım, inflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 etkileşimi olan hastalarda %31,3 iken, inflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 etkileşimi olmayan hastalarda %66,1 idi ( $p<0,001$ ).

**Sonuç:** Sonuçlarımız, ABMR'nin yüksek immünolojik niteliğinin renal allograftlarda PD-L1'in beklenmedik işlevlerinin temelini oluşturabileceğini göstermektedir. Gerçekten de PD-1/PD-L1 yolunun koruyucu etkisini gösteren çoğu deneysel organ nakli çalışmasında, eşzamanlı immünsüpresyon nedeniyle, sınırlı T hücre reaktivitesi olan nakil modelleri kullanılmıştır. PD-1/PD-L1 yolunun inhibisyon fonksiyonlarının, ABMR gibi yüksek immünolojik kostimülatörle birlikte güçlü T aktivasyonu altında etkili olmayabileceğini öne sürdük.

**Anahtar kelimeler:** PD-L1, PD-1, Antikor aracılı rejeksiyon, T-hücre aracılı rejeksiyon, Greft yaşamı

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: KA22/402) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

## ABSTRACT

**Dr. Binnaz Handan Özdemir**

**The Effect of Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) on Graft Survival in Renal Allografts with Antibody-Mediated Rejection**

**Başkent University**

**Institute of Health Sciences**

**Transplantation immunology master's program, 2023**

**Introduction:** Despite the critical role of PD-L1 in T-cell biology and increasing knowledge of the function of PD-L1 in solid organ transplantation, its role in ABMR is unknown. Although some studies demonstrated that PD-1/PD-L1 interaction is essential for maintaining graft tolerance, PD-1/PD-L1 interaction in renal allografts with ABMR might exert different effects on immune cells. Since the vasculature is the first interface between the immune cells and the target graft, we aimed to understand the status of PD-1/PD-L1 interaction on endothelial cells and immune cells in peritubular capillaries (PTCs).

**Materials and Methods:** Pure ABMR was present in 68 out of 110 patients (Group 1), and both acute ABMR and acute TCMR were present in 42 patients (Group 2). Initial biopsy samples were re-evaluated, and the degree of glomerular, PTC, interstitial leukocyte, macrophage, CD4, and CD8 positive lymphocyte infiltration was classified. HLA-DR expression on PTCs, tubules, and interstitial leukocytes was examined. Loss of PTC-DR expression was considered PTC destruction. Expression of PD-1 and PD-L1 on tubular, endothelial, and inflammatory cells was evaluated. CD80, CD86, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  expressions were investigated in tubules and inflammatory cells. Follow-up biopsies were assessed for diffuse interstitial fibrosis (IF) development.

**Results:** In Group 2 patients, endothelial and inflammatory cell PD-1/PD-L1 showed higher expression rates compared to Group 1 ( $p<0.001$ ). The interaction of endothelial and inflammatory cell PD-1/PD-L1 increased along with the increase in interstitial, glomerular, PTC leukocytes, macrophages, CD4, and CD8 positive lymphocytes ( $p<0.001$ ). There was an inverse relationship between PTC-DR expression and PD-1/PD-L1 interaction and a positive relationship with tubular HLA-DR expression ( $p<0.001$ ). The development of IF

was 52.3% in patients with endothelial PD-1/PD-L1 interaction, while it was 12.1% in patients without endothelial PD-1/PD-L1 interaction ( $p<0.001$ ). The overall 10-year survival was 27.3% in patients with endothelial PD-1/PD-L1, whereas it was 66.7% in patients without endothelial PD-1/PD-L1 ( $p<0.001$ ). Similarly, the overall 10-year survival was 31.3% in patients with inflammatory cell PD-1/PD-L1, while it was 66.1% in patients without inflammatory cell PD-1/PD-L1 ( $p<0.001$ ).

**Conclusion:** Our findings demonstrate that the high immunological nature of ABMR may underlie the unexpected functions of PD-L1 in renal allografts. Indeed, most experimental organ transplantation studies demonstrating the protective effect of the PD-1/PD-L1 pathway have used transplantation models with limited T-cell reactivity due to concurrent immunosuppression. We suggest that the inhibitory functions of the PD-1/PD-L1 pathway may not be effective under strong T cell activation with high immunological costimulation such as ABMR.

**Keywords:** PD-L1, PD-1, Antibody-mediated rejection, T-cell mediated rejection, Graft survival

This study was approved by Baskent University Institutional Review Board (Project no: KA22/402) and supported by Baskent University Research Fund.

## ÖNSÖZ

Bu tez, renal allogreftlerde antikor aracılı rejeksiyonun geliştiği durumlarda, programlanmış ölüm ligand-1'in (PD-L1) greft sağkalımı üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla hazırlanmıştır. Bu çalışma, böbrek nakli olan hastalarda sıkça görülen bir komplikasyon olan rejeksiyon gelişimini anlamaya yönelik önemli bir adımdır.

Böbrek nakli, terminal böbrek yetmezliği olan hastaların hayatta kalma ve yaşam kalitesini artırma açısından önemli bir tedavi seçeneğidir. Bununla birlikte, bağışlanan böbreğin alıcı tarafından reddedilmesi, nakil sonrası dönemde karşılaşılan ciddi bir sorundur. Antikor aracılı rejeksiyon, alıcıya karşı oluşan antikorların greft dokusuna saldırması sonucunda meydana gelir ve greftin fonksiyon kaybına neden olabilir. Bu durum, hastaların sağkalımını olumsuz yönde etkileyebilir ve ikinci bir böbrek nakli gereksinimini artırabilir.

Bu tezde, programlanmış ölüm ligand-1'in (PD-L1), antikor aracılı rejeksiyonun önlenmesi veya tedavisi üzerindeki potansiyel etkisini araştırmayı hedeflemektedir. PD-L1, immün yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan bir ligand olarak bilinir ve bağışıklık sistemi tepkilerini baskılayabilir. Bu nedenle, PD-L1'in, antikor aracılı rejeksiyonu önlemede veya tedavi etmede potansiyel bir etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma, patolojik ve klinik verileri bir araya getirerek, PD-L1'in antikor aracılı rejeksiyon üzerindeki etkilerini değerlendirecektir. İnsan böbrek nakli modeli üzerinde yapılan deneyler ve hastaların klinik verilerinin analizi, bu tezin temelini oluşturacaktır. Sonuçlar, PD-L1'in rejeksiyonun önlenmesi veya tedavisinde potansiyel bir hedef olarak kullanılabilirliğini belirlemeye yönelik önemli bir adım olacaktır.

Bu tez çalışması, böbrek nakli alan hastaların sağlık ve yaşam kalitesini iyileştirmek amacıyla önemli bir bilimsel katkı sunmayı hedeflemektedir. Sonuçlar, transplantasyon immünolojisi alanındaki bilgimizi genişletebilir ve gelecekteki araştırmalara ışık tutabilir.

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                |      |
|--------------------------------------------------------------------------------|------|
| TEŞEKKÜR.....                                                                  | i    |
| ÖZET .....                                                                     | ii   |
| ABSTRACT .....                                                                 | iv   |
| ÖNSÖZ .....                                                                    | vi   |
| İÇİNDEKİLER.....                                                               | vii  |
| TABLolar LİSTESİ .....                                                         | ix   |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                                         | x    |
| RESİMLER LİSTESİ .....                                                         | xiii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....                                           | xv   |
| 1. GİRİŞ.....                                                                  | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                                         | 6    |
| 2.1. PD1 Ekspresyonu ve Regülasyonu .....                                      | 6    |
| 2.2. PD-L1 ve PD-L2 Ligandlarının Ekspresyonu ve Regülasyonu .....             | 8    |
| 2.3. PD-1/PD-L1 Etkileşimi .....                                               | 12   |
| 2.4. Non-sitomembran PD-1 ve PD-L1.....                                        | 14   |
| 2.5. Hücre Dışı PD-1 ve PD-L1 .....                                            | 15   |
| 2.6. Hücre İçi PD-1 VE PD-L1 .....                                             | 17   |
| 2.7. PD-L1 Ekspresyon Yolağı.....                                              | 18   |
| 2.8. PD-L1 Ekspresyonunu Etkileyen Proteinler .....                            | 20   |
| 2.8.1. İnterferon gama (IFN- $\gamma$ ) .....                                  | 20   |
| 2.8.2. Transformik growth faktör beta (TGF)- $\beta$ .....                     | 22   |
| 2.8.3. Tümör nekrozis faktör- alfa (TNF- $\alpha$ ) .....                      | 23   |
| 2.8.4. İnterlökin-12 (IL-12) .....                                             | 25   |
| 2.8.5. Diğer yaygın gama zinciri interlökinleri .....                          | 26   |
| 2.8.6. PD-L1 indüksiyonunun negatif düzenleyicileri .....                      | 27   |
| 2.9. PD-1/PD-L1 Aksının Fonksiyonları .....                                    | 28   |
| 2.9.1. T hücre fonksiyonunun PD-1/PD-L1 aksı ile düzenlenmesi.....             | 30   |
| 2.9.2. Makrofaj fonksiyonlarının PD-1/PD-L1 aksı tarafından düzenlenmesi ..... | 31   |
| 2.9.3. Epitel hücre fonksiyonlarının PD-1/PD-L1 aksı ile düzenlenmesi.....     | 33   |

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.9.4. Fibroblast fonksiyonlarının PD-1/PD-L1 aksı ile düzenlenmesi.....                             | 35 |
| 2.9.5. PD-1/PD-L1 aksının endotel hücre fonksiyonları üzerine etkisi.....                            | 36 |
| 2.10. PD1 ve PD-L1 Ekspresyonlarının Çevresel Faktörler ile İlişkisi .....                           | 39 |
| 2.10.1. Lenfosit farklılaşma aşamalarındaki PD1 ve PD-L1 ekspresyon farklılıklarına genel bakış..... | 40 |
| 2.10.2. PD-L1 ekspresyonu farklılaşmış lenfositlerin alt kümesine göre değişir .....                 | 40 |
| 2.10.3. PD-L1 ekspresyonunu etkileyen önemli çevresel faktörler .....                                | 41 |
| 2.11. Sağlıklı böbrekte PD-1 aksı.....                                                               | 45 |
| 2.12. Glomerulopati ve Tubulopatilerde PD-1 aksı.....                                                | 46 |
| 2.13. Fibrozis Gelişiminde PD-1/PD-L1 Aksının Rolü.....                                              | 48 |
| 2.14. Renal Fibrozis ve PD-1/PD-L1 Aksı .....                                                        | 49 |
| 2.15. Transplantasyon ve PD1/PDL1 Aksı .....                                                         | 52 |
| 2.16. Fetal In-Utero PD1/PDL1 Aksı.....                                                              | 58 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                                              | 60 |
| 3.1. Genel Hasta Bilgisi.....                                                                        | 60 |
| 3.2. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal İnceleme.....                                             | 63 |
| 3.2.1. Renal inflamasyonun immünohistokimyasal olarak incelenmesi.....                               | 64 |
| 3.2.2. Peritübüler kapillerlerin (PTK) immünohistokimyasal incelemesi.....                           | 66 |
| 3.2.3. Tübüllerin immünohistokimyasal incelemesi .....                                               | 69 |
| 3.2.3.1. Tübüler HLA-DR ekspresyonunun değerlendirilmesi .....                                       | 69 |
| 3.2.3.2. Tübüler TNF- $\alpha$ ekspresyonunun değerlendirilmesi.....                                 | 70 |
| 3.2.3.3. Tübüler IFN- $\gamma$ ekspresyonunun değerlendirilmesi .....                                | 71 |
| 3.2.3.4. Tübüler TGF- $\beta$ ekspresyonunun değerlendirilmesi.....                                  | 71 |
| 3.2.3.5. Tübüler CD80 ve CD86 ekspresyonunun değerlendirilmesi.....                                  | 71 |
| 3.3. İstatistiksel Analiz .....                                                                      | 71 |
| 3.4. Araştırma Kurulu Onayı ve Etik.....                                                             | 72 |
| 4. SONUÇLAR.....                                                                                     | 73 |
| 5. TARTIŞMA .....                                                                                    | 87 |
| KAYNAKLAR .....                                                                                      | 95 |

## TABLÖLER LİSTESİ

|                                                                                                  | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Tablo 2.1. PD-L1 ekspresyonunun düzenlenmesiyle ilgili faktörler .....                           | 29    |
| Tablo 3.1. Hastaların demografik ve klinik verilerinin dağılımı .....                            | 61    |
| Tablo 3.2. Hastaların demografik ve klinik verilerinin ortalama değerleri .....                  | 62    |
| Tablo 4.1. Tübüler protein ekspresyonlarının birbirleri ile korelasyonu .....                    | 76    |
| Tablo 4.2. Tübüler ve interstisyel protein ekspresyonlarının korelasyonu .....                   | 76    |
| Tablo 4.3. Tübüler ve interstisyel protein ekspresyonlarının IFTA gelişimi ile korelasyonu ..... | 78    |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                               | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1. Organlara göre PD-L1 mRNA ve protein ekspresyonu.....                                                                                                                                              | 9     |
| Şekil 2.2. PD-L1 ekspresyonunu düzenleyen mekanizmalara genel bakış .....                                                                                                                                     | 10    |
| Şekil 2.3. PD-1 ve PD-L1 arasındaki etkileşim.....                                                                                                                                                            | 13    |
| Şekil 2.4. PD-1 ve PD-L1'in dağılımı.....                                                                                                                                                                     | 14    |
| Şekil 2.5. PD-L1 ekspresyonunun interferonlar ve sitokinler yoluyla düzenlenmesi .....                                                                                                                        | 27    |
| Şekil 2.6. PD-1/PD-L1 aksının fonksiyonları.....                                                                                                                                                              | 30    |
| Şekil 2.7. PD-L1 aracılı blokaj yoluyla T-hücre fonksiyonunun inaktivasyonu .....                                                                                                                             | 32    |
| Şekil 2.8. PD-1/PD-L1 aksı ve makrofaj fonksiyonu.....                                                                                                                                                        | 34    |
| Şekil 2.9. Epitelyal-Mezenkimal transformasyon (EMT) ve İnterferon gama (IFN $\gamma$ ) ile indüklenen PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişkiye şematik genel bakış.....                                         | 35    |
| Şekil 2.10. TGF- $\beta$ tarafından indüklenen fibroblasttan miyofibroblastta transformasyon (FMT) sürecinin PD-L1 tarafından düzenlenmesi.....                                                               | 37    |
| Şekil 2.11. Endotel hücresi PD-L1 ekspresyonu .....                                                                                                                                                           | 39    |
| Şekil 2.12. Sağlıklı Jukstaglomerüler apparatus, glomerül, renal tübül ve perinefrik lenf düğümü .....                                                                                                        | 47    |
| Şekil 2.13. PD-1/PD-L1 aksının Idiopatik Pulmoner Fibrozis'deki (IPF) profibrotik rolü .                                                                                                                      | 50    |
| Şekil 4.1. Grup 2 ve Erken ABMR (eABMR) grubundaki hastalar Grup 1 ve geç ABMR (gABMR) grubundaki hastalara göre daha yüksek oranlarda endotelial ve inflamatuvar PD-1/PD-L1 ekspresyonu göstermektedir. .... | 74    |
| Şekil 4.2. Endotelial hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüler ve interstisyel lökosit infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (*p<0,001).....                                                           | 75    |
| Şekil 4.3. İnflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüler ve interstisyel lökosit infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (*p<0,001, **p=0,001).....                                              | 75    |

|                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.4. Endotelyal hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüler ve interstisyel makrofaj infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (*p<0,001) .....                                                                                             | 79 |
| Şekil 4.5. İnflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüler ve interstisyel makrofaj infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (*p<0,001, **p=0,001) .....                                                                                | 79 |
| Şekil 4.6. Endotelyal hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüler ve interstisyel CD8 pozitif T lenfosit infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (*p<0,001) .....                                                                               | 80 |
| Şekil 4.7. İnflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüler ve interstisyel CD8 pozitif T lenfosit infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (*p<0,001, **p=0,001) .....                                                                  | 80 |
| Şekil 4.8. Endotelyal hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüler ve interstisyel CD4 pozitif T lenfosit infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (*p<0,001) .....                                                                               | 81 |
| Şekil 4.9. İnflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüler ve interstisyel CD4 pozitif T lenfosit infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (*p<0,001) .....                                                                             | 81 |
| Şekil 4.10. Endotelyal hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüler ve interstisyel HLA-DR pozitif hücre infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (*p<0,001, **p=0,003) .....                                                                     | 82 |
| Şekil 4.11. İnflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüler ve interstisyel HLA-DR pozitif hücre infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (*p<0,001, **p=0,005) .....                                                                   | 82 |
| Şekil 4.12. Endotelyal hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, tübüler HLA-DR ekspresyonu, PTK destrüksiyonu ve C4d ekspresyonu ile pozitif bir ilişki göstermektedir. (*p<0,001, **p=0,003) .....                                                          | 83 |
| Şekil 4.13. İnflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, tübüler HLA-DR ekspresyonu, PTC destrüksiyonu ve C4d ekspresyonu ile pozitif bir ilişki göstermektedir. (*p<0,001) .                                                                       | 83 |
| Şekil 4.14. İnterstisyel infiltrasyon gösteren TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ve CD86 pozitif lökositlerin sayısı arttıkça endotelyal hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu da artış göstermektedir. (*p<0,001) .....                        | 84 |
| Şekil 4.15. İnterstisyel infiltrasyon gösteren TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ve CD86 pozitif lökositlerin sayısı arttıkça inflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu da artış göstermektedir. (*p<0,001 ** p=0.001, ¥p=0,002) ..... | 84 |

|                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.16. Tübüler TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ve CD86 ekspresyonları arttıkça endotelial hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu da artmaktadır. (* $p<0.001$ ** $p=0,001$ ).....                | 85 |
| Şekil 4.17. Tübüler TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ve CD86 ekspresyonları arttıkça inflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu da artmaktadır. (* $p<0.001$ ** $p=0,001$ ‡ $p=0,006$ ) ..... | 85 |
| Şekil 4.18. Grup 1 ve Grup 2 hastaların greft sağkalımı .....                                                                                                                                            | 86 |
| Şekil 4.19. Endotelial hücre PD1/PD-L1 ekspresyonu negatif ve pozitif hastaların greft sağkalımı.....                                                                                                    | 86 |
| Şekil 4.20. İnflamatuvar hücre PD1/PD-L1 ekspresyonu negatif ve pozitif hastaların greft sağkalımı.....                                                                                                  | 86 |

## RESİMLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Resim 2.1. Tubulointerstisyel nefrit ve granülomatöz vaskülit .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 52    |
| Resim 3.1. (A) PTKitis ve Glomerülitis; ABMR ile karakterize olarak glomerülde (beyaz ok) ve PTK'lerde (siyah ok) şiddetli mikrovasküler inflamasyon (H&E X100), (B) PTKitis, PTK lümeninde (ok) şiddetli derecede inflamasyon (PAS x400), (C) İmmüno Floresan incelemede glomerül kapillerlerinde ve PTK'lerde diffüz C4d ekspresyonu (x40), (D) PTK'lerde sirküler (ok) C4d ekspresyonu (x400), (E) PTK'lerde diffüz sirküler ve kuvvetli C4d ekspresyonu. Dilate görünümde PTK'lerin lümenlerinde orta-şiddetli derecelerde inflamasyon dikkati çekmektedir (x200). .... | 63    |
| Resim 3.2. İnterstisyel ve glomerüler immün hücrelerin dağılımı, (A) interstisyel (siyah ok) ve glomerüler (beyaz ok) CD3+ T-lenfositler, (B) interstisyel (siyah ok) ve glomerüler (beyaz ok) CD68+ makrofajlar, (C) interstisyel CD4+ T-lenfosit (ok) infiltrasyonu, (D) interstisyel CD8+ T-lenfosit (ok) infiltrasyonu, (x100). ....                                                                                                                                                                                                                                    | 65    |
| Resim 3.3. (A) Glomerülde CD68+ makrofaj (ok) infiltrasyonu (x400), (B) glomerülde CD3+ T-lenfosit (ok) infiltrasyonu (x400). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 66    |
| Resim 3.4. (A) İnterstisyel infiltrasyon gösteren inflamatuvar hücrelerde (ok) PD-1 ekspresyonu (x200), (B) İnterstisyel infiltrasyon gösteren inflamatuvar hücrelerde (ok) PD-L1 ekspresyonu (x200). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 67    |
| Resim 3.5. (A) PTK'lerde diffüz kuvvetli sirküler C4d ekspresyonu (ok) (x200), (B) Sirküler C4d ekspresyonu gösteren PTK'in lümeninde belirgin inflamasyon (ok) (x400). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 67    |
| Resim 3.6. Böbrekte HLA-DR ekspresyonu. Normal böbrekte glomerül (beyaz ok) ve PTK'lerin endoteli kuvvetli ve sirküler olarak HLA-DR ile pozitif boyanır (x200). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 68    |
| Resim 3.7. Endotelyal ve inflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu; (A) PTK endotel hücresinde (siyah ok) ve interstisyel immün hücrede (beyaz ok) PD-L1 ekspresyonu (x400), (B) PTK endotel hücresinde (siyah ok) ve interstisyel immün hücrede (beyaz ok) PD-1 ekspresyonu (x400). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 69    |
| Resim 3.8. Diffüz tübüler PD-L1 ekspresyonu (x200). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 70    |

Resim 3.9. (A) Tübüler TGF- $\beta$  ekspresyonu, (B) Tübüler TNF- $\alpha$  ekspresyonu, (C)Tübüler IFN- $\gamma$  ekspresyonu, (D) Tübüler CD86 ekspresyonu ..... 70



## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

|                |                                                          |
|----------------|----------------------------------------------------------|
| ABMR           | antikor aracılı rejeksiyon “Antibody-Mediated Rejection” |
| APC            | antijen sunan hücreler “Antigen Presenting Cells”,       |
| AR             | akut Rejeksiyon                                          |
| BKİ            | bağışıklık kontrol noktası inhibitörü                    |
| cPD-L1         | cytoplasmic” PD-L1                                       |
| CTLA-4         | cytotoxic T-cell Antigen-4                               |
| DC             | centritik hücreler                                       |
| ERK            | extracellular-signal regulated kinase                    |
| GAF            | gamma-Activating Factor                                  |
| GAS            | gamma-Activated Sekans                                   |
| GM-CSF         | granülosit-makrofaj koloni-uyarıcı faktör                |
| H&E            | hematakosilen ve eozin                                   |
| HIF-1 $\alpha$ | hypoxia inducible factor 1-alfa                          |
| IF             | interstisyel fibrozis                                    |
| IFN            | interferon                                               |
| IFN- $\gamma$  | interferon gama                                          |
| IFTA           | interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi                  |
| IHK            | immünohistokimya                                         |
| IL             | interlökin                                               |
| IRF            | interferon regülatör faktör                              |
| ISGF3          | interferon stimulated gene factor 3                      |
| ISRE           | interferon stimulated response element                   |
| JAK            | janus kinaz                                              |
| Mdc            | myeloid dendritik hücreler                               |
| NK             | natural killer cells                                     |
| PD-1           | programlanmış hücre ölüm proteini-1                      |
| PD-L1          | programlanmış hücre ölüm proteini ligandı 1              |
| PI3K/AKT       | phosphoinositid 3-kinaz/serin-treonin kinaz 1            |
| PKC            | protein kinaz c                                          |
| PTK            | peritübüler kapillerler                                  |
| SOCS           | suppressor of cytokine signaling                         |
| STAT3          | signal transducer and activator of transcription 3       |
| TCR            | T-hücre Reseptörü “T-cell Receptor”                      |
| TCMR           | T-hücre aracılı rejeksiyon “T-cell mediated rejection”   |
| TEH            | tübül epitel hücreleri                                   |
| TFH            | T- foliküler yardımcı hücreler                           |
| TFR            | T- foliküler regülatör hücreler                          |
| TGF- $\beta$   | transforming growth factor-beta                          |
| TNF- $\alpha$  | tümör nekrozis faktör- alfa                              |
| Treg           | T regülatör hücreleri                                    |
| TYK            | tirozin kinaz                                            |
| ZAP70          | zeta zinciri ile ilişkili proteinkinaz                   |

# 1. GİRİŞ

İmmün sistem, çevremizde saldırmak için hazır bekleyen çok çeşitli sayıdaki organizma ve molekülleri tanıyan ve etkisiz hale getiren bir savunma mekanizmasıdır. Bağışıklığın temelini “kendinden olmayan” ile “kendinden olanın” ayırt edilmesi oluşturmaktadır. Bağışıklık sistemi, yabancı etkenlere karşı öldürmek, yok etmek ve izole etmek gibi birkaç savunma düzeneğine sahiptir ve olası aksiliklere karşı birbiriyle örtüşen yedek sistemler mevcuttur (1).

Yabancı bir antijenik uyarı durumunda, örneğin vücuda bir mikroorganizma (bakteri, virüs, mantar veya parazit gibi) girdiğinde ilk olarak doğuştan gelen (doğal) immün sistem mekanizması yabancı antijenleri ortadan kaldırmaya çalışır. Doğal immün sistem evrim sürecindeki en eski savunma sistemi olup, enfeksiyonların önlenmesi için patojenlere karşı verilen ilk bağışıklık yanıtıdır. Doğuştan gelen immün sistem patojenleri çok genel yapıları ile tanıyarak çok hızlı şekilde yanıt verir. Çok hızlı şekilde gerçekleşen immün yanıtlar doğal bağışıklığın genetik bilgilerinin hazır olarak kalıtımla geçişine bağlı olarak meydana gelir (1-3). Doğal bağışıklıkta görev alan savunma hücreleri, bireyin kendi hücreleri ile patojenleri birbirinden ayırt edebilir, böylece bireyin sağlıklı hücreleri zarar görmez.

Ancak doğal immün cevabın yeterli olamadığı durumlarda devreye daha spesifik ve etkili bir sistem olan kazanılmış (adaptif) immün sistem girer. Vücudun iki ana bağışıklık sisteminden birisi olan kazanılmış immün sistem, hüморal ve hücrel olmak üzere ikiye ayrılır (1-3).

Hüморal bağışıklık, hücre dışında bulunan patojenlere karşı antikorların kullanılması ile yapılan savunma sistemidir. Bu bağışıklıkta B hücreleri görev alır ve ürettikleri çeşitli antikorlar ile sistemi kontrol ederler. Antikorlar vücuda giren patojene karşı spesifik olarak üretilen proteinlerdir. Antikorların çok sayıda değişik şekillerde icra ettiği görevleri vardır. Antikorlardan bazıları bakterilerin antijenine tutunarak bunların fagosite edilmesini sağlarken bazı antikorlar da virüslerin antijenine tutunarak hücrelerin enfekte olmasını önler.

Hücrel bağışıklık ise virüsler tarafından enfekte edilmiş hücrelerin veya tümör hücrelerinin yok edilmesinden sorumludur. Bu bağışıklıkta T hücreleri görev alır ve T

hücreleri, sitotoksik (öldürücü) T hücreleri ve yardımcı (helper) T hücreleri olarak ikiye ayrılırlar. Sitotoksik T hücreleri, yüzeylerinde bulunan özel reseptörler sayesinde normalde bulunmaması gereken antijenleri tanırlar. Bu tanıma sonrasında, o antijeni bulunduran hücrenin ölümüne yol açan bazı mekanizmaları aktifleştirirler. Yardımcı T hücreleri ise yine yüzeylerinde bulunan özel reseptörler sayesinde antijenleri tanırlar ve makrofajları ve diğer lenfositleri uyaran kimyasallar salgırlar

Sonradan kazanılmış adaptif bağışıklık sistemi, bedenimizde gelişen neredeyse tüm tehditleri ortadan kaldıracak şekilde ileri derecede gelişmiş bir bağışıklık sistemidir. CD4+ T-helper hücrelerinin, CD8+ T-sitotoksik hücrelerinin ve B hücrelerinin birleşik efektör potansiyelleri sayesinde, kazanılmış bağışıklık sistemi zararlı istilacılara olağanüstü hasar verebilirler. Bununla birlikte, bağışıklık sistemi bunu sağlıklı hücreleri koruyarak ve self toleransın devamını sağlayarak yapmalıdır. Bu görev, merkezi lenfoid organlarda (santral tolerans) ve periferde (periferik tolerans) lenfosit gelişimi sırasında işlev gören bağışıklık tepkileri üzerindeki çoklu kontroller ve dengeler yoluyla gerçekleştirilir (3).

Bu sistemlerden en önemlilerinden biri de immün kontrol noktalarıdır. İmmün kontrol noktaları, immün yanıtları hassas şekilde ayarlamak için ortak uyarıcı yolları fizyolojik olarak dengeleyen inhibitör yollarlardır. Başka bir deyişle, bir immün yanıtı durdurabilen normal immün sinyalleridir (1-6). Bir immün kontrol noktasının iki bileşeni ile ilgili olarak, immün hücreler üzerinde eksprese edilen moleküller genellikle immün kontrol noktası reseptörleri olarak adlandırılırken, antijen sunan hücrelerde, tümör hücrelerinde veya diğer hücre tipleri üzerinde eksprese olan moleküller ise immün kontrol noktası ligandları adını alırlar. İnhibitör veya uyarıcı immün kontrol noktası molekülleri, farklı tümör tiplerinde tümör hücrelerinin oldukça büyük bir kısmı üzerinde eksprese edilir. Son yıllarda, tümör hücrelerinde immün kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonunun, tümör hücrelerinin biyolojisi üzerinde önemli sonuçları olduğu ortaya çıkmıştır (2).

T-hücresinin ilk antijen aracılı aktivasyonunu başlatan T-hücre reseptörü (TCR) ve MHC peptid bağlanması birkaç düzenleyici mekanizma ile indüklenmektedir. T hücreleri üzerindeki CD28 ile antijen sunan hücreler (“antigen-presenting cells”, APC) üzerindeki CD80 (B7.1) veya CD86 (B7.2) arasındaki etkileşimler gibi pozitif uyarıcı sinyaller devreye girer (3-5). T-hücre aktivasyonu sürecinin başlarında, aktivasyon programına karşı koymak için negatif düzenleyiciler de indüklenir. Sitotoksik T lenfosit antijeni 4 (“Cytotoxic T-cell

Antigen-4” CTLA-4, CD152) indüklenen ilk negatif düzenleyicilerden biridir. CTLA-4, CD80 ve CD86 ligandları için doğrudan CD28 ile rekabet etmektedir (4).

T hücre aktivasyonu sırasında programlanmış hücre ölüm proteini-1’de (PD1, PDCD1, CD279) hücre yüzeyinde ekspres olur ve PD1 kendi ligandları olan PDL-1 (CD274, B7-H1) veya PDL-2’yi (CD273, B7-DC) bağlayarak TCR ve CD28 aracılığıyla pozitif sinyallere direnç gösterirler (4-8).

İnhibe edici reseptörler, kazanılmış bağışıklık cevabından bir mola olarak işlev görür ve efektör T hücrelerinin tam işlevlerini yerine getirmek için geçmesi gereken bağışıklık kontrol noktaları (immune checkpoints) olarak hizmet ederler (6-8). İnhibitör nitelikteki sinyaller, bağışıklık sisteminde dengeyi korumak için birçok şekilde kullanılır. PD1 yolundaki sinyaller, T-hücresinin ilk aktivasyonunun düzenlenmesine, T-hücresinin kaderinin ve fonksiyonlarının ince ayarına, T-hücresinin tolerans ve bağışıklık homeostazına geri dönüşüne katkıda bulunur (4, 9-11).

PD/PD-L1 yolağının bozulması konak fizyolojisini derinden etkileyebilir. Genetik olarak Pdc1’in (PD1’i kodlayan gen) eksik olduğu farelerde, çok hızlı bir şekilde otoimmüitenin geliştiği gösterilmiştir (12,13). Bunun tam tersi, kronik enfeksiyon ve kanser vakalarında yaygın şekilde PD1 ve ligandlarının yüksek ve süreklilik gösteren ekspresyonu izlenebilmektedir. Bu hastalarda PD1 yolunu bloke etmek, T hücre fonksiyonlarını iyileştirebildiği gibi viral yükü ve tümör yükünü de azaltabilmektedir (14-17).

PD/PD-L1 yolağı, kalıcı antijen stimülasyonuna bağlı olarak T hücresinde tükenmeye yol açabilecek kanser ve kronik enfeksiyonlar gibi antijenik uyarı durumlarında T hücresi tepkilerini düzenlemedeki rolü nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Ancak PD1, akut T hücresi aktivasyonu sırasında tüm CD4+ T-hücreleri, CD8+ T-hücreleri ve hafıza T-hücreleri ile toleranslı T-hücrelerinin bazı alt grupları tarafından da eksprese edilmektedir (14,15,18).

PD1 ayrıca regülatör T-hücreleri (Treg), T- foliküler yardımcı hücreleri (TFH), T- foliküler düzenleyici hücreleri (TFR), B-hücreleri, doğal öldürücü hücreler (NK) ve bazı myeloid hücreler tarafından da eksprese edilmektedir. PD1’in bu hücre tiplerindeki çeşitli

rollerini hesaba katmak, kontrol noktası blokajının ardından meydana gelecek immünolojik değişiklikleri tahmin etmek için çok önemlidir (18).

PD-L1'in ekspresyonu ise genel olarak, T-lenfositler, B-lenfositler, antijen sunan hücreler ve bazı lenfoid olmayan dokularda gözlenir. Ayrıca PD-L1'in kalp endoteli, plasenta ve pankreatik adacıklarda saptanması, PD-L1'in immünolojik toleranstaki rolüne de işaret eder (9,19). Tolerans, bağışıklık sisteminin kendi hücrelerine zarar vermesini önleyen bir mekanizmadır. PD-1, aktivasyon sinyalleri ile T hücrelerinde ifade edilir ve PD-L1 ve PD-L2 adlı ligandları ile etkileşime girer. PD-L1, kendisine bağlanan PD1 reseptörünün inhibe edici sinyal yollarını aktive ederek, T hücrelerinin aktivasyonunu ve proliferasyonunu engeller. Bu, özellikle dokuların çevresinde, potansiyel olarak zararlı olan otoantijenlere maruz kalınan durumlarda önemlidir (9). Bu tolerans mekanizması, kanser hücrelerinin immün sistemin saldırısından kaçmasına yardımcı olur ve immün yanıtın aşırı aktivasyonunu önler. Ancak, bazı kanser hücreleri, PD-L1'in ifadesini artırarak ve PD1/PD-L1 yolağını manipüle ederek, immün tolerans mekanizmasından yararlanırlar ve bağışıklık sisteminden kaçarak büyümeye devam ederler (9,14,16,17). İmmünoterapi, PD-1/PD-L1 yolağını hedef alarak, kanser hücrelerine karşı immün yanıtı yeniden canlandırmayı ve kanser hücrelerinin immün tolerans mekanizmalarından kaçmasını önlemeyi amaçlar (16).

Özetlenecek olursa, PD1/PD-L1 yolağı, bağışıklık sisteminin kendini düzenleme mekanizmalarından biridir ve vücuttaki sağlıklı hücrelerin bağışıklık sistemi tarafından yanlışlıkla saldırılmasını önler. PD-1/PD-L1 yolağı, lenfositler üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. PD-1, bir tür T hücresi yüzey molekülüdür ve lenfositlerde yaygın olarak ifade edilir. PD-L1, ise bir tür hücre yüzey molekülüdür ve birçok farklı hücre tipi, özellikle tümör hücreleri, immün hücreleri ve bazı dokuların hücreleri tarafından ifade edilir. PD1/PD-L1 yolağı ayrıca diğer lenfositler üzerinde de etkilidir. Örneğin, bazı B hücreleri, PD-L1 ifade edebilir ve PD1/PD-L1 yolağı, B hücrelerinin antikor üretimini düzenleyebilir. Bu nedenle, PD1/PD-L1 yolağı, bağışıklık sistemi üzerinde geniş bir etki alanına sahip olan önemli bir immünolojik yolağıdır.

İmmün hücrelerde eksprese edilen CTLA4 ve PD-1 gibi tüm bu immünosüpresif moleküller, kazanılmış immün yanıtı düzenlemek için fren görevi görmektedirler. Bugüne kadar, bu baskılayıcı sinyaller, bağışıklık sisteminin dengesini korumak için çeşitli şekillerde kullanılmıştır. Bunların en başında kanser tedavisi gelmekte olup, son yıllarda anti-PD1,

anti-CTLA4 ve anti-PD-L1 antikorlarının çeşitli kanser türlerinde yaygın olarak kullanıldığına tanık olunmuştur (16, 19-22). Tedavi amaçla kullanıma sokulan bu moleküllerin kanser tedavilerindeki başarısı PD1/PD-L1 yolunun diğer hastalıklar ve transplantasyondaki rolüne de dikkat çekmiştir (20, 23-26). Bu veriler, kanserdeki rollerinin ötesinde, PD1/PD-L1 yolağının transplantasyonlarda rejeksiyon tedavisi için iyi bir aday olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu hedeflemenin başarılı olup olamayacağının daha fazla araştırılması gerekmektedir. Bundan dolayı, solid organ transplantasyonunda PD1/PDL1 yolağının etkileri hakkında net bir bilgi olmaması nedeniyle böbrek transplantasyonlarında rejeksiyon gelişimi ve renal allograft sağkalımında PD1/PDL-1 yolağının rolünü ve mekanizmalarını araştırmayı hedefledik



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. PD1 Ekspresyonu ve Regülasyonu

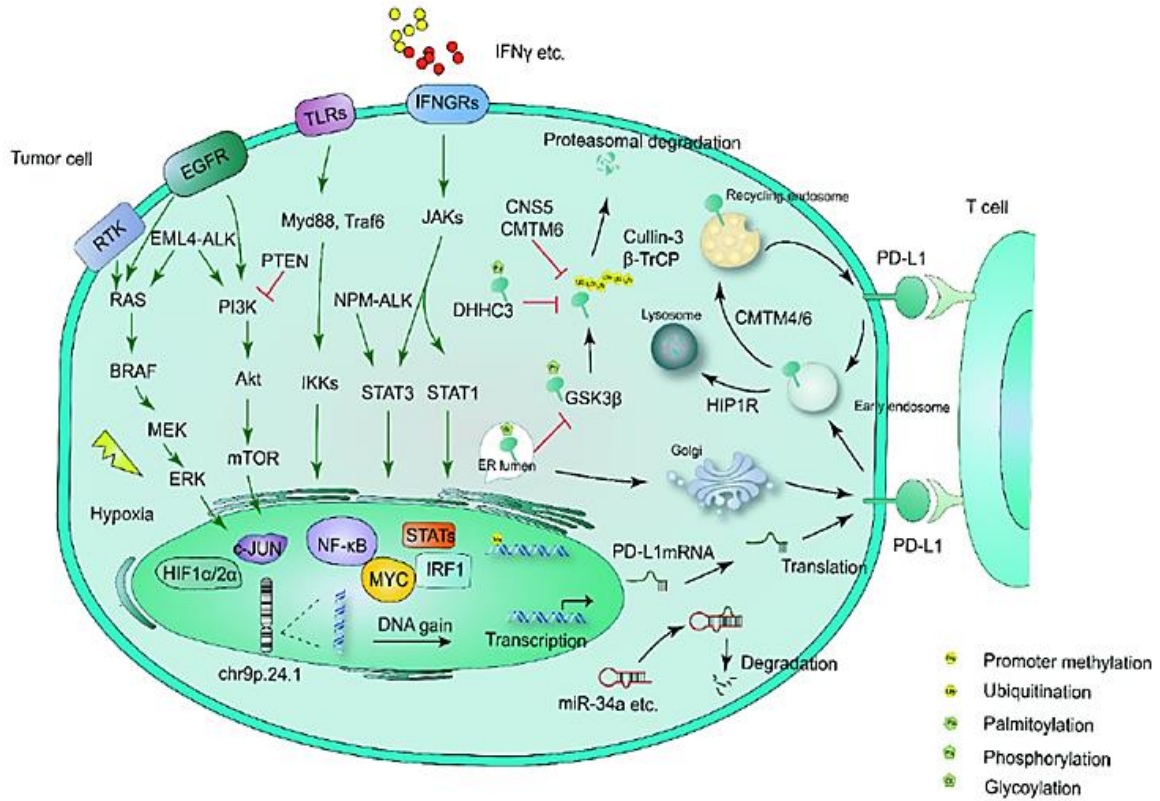
PD1 reseptörü ve ligandları, PDL1 (B7-H1) ve PDL2 (B7-DC) yakın zamanda karakterize edilmiştir. Farklılaşma kümesi 279 olarak da bilinen PD1 (CD279) immünoglobulin gen süper ailesine ait bir hücre yüzeyi reseptörü olup, ilk olarak 1992'de interlökin-3 (IL-3) yoksun LyD9 (murin hematopoietik progenitör) ve 2B4-11 (murin T-hücresi hibridom) hücre dizilerinde keşfedildi. Başlangıçta, PD1'in daha çok apoptotik hücrelerde eksprese edildiği düşünülüyordu. Ancak daha sonra bunun aslında T ve B hücrelerinin antijen tepkilerinin eşiğini düzenleyen kritik bir bağışıklık kontrol noktası olduğu anlaşıldı (1-4, 6-8).

PD1, CD28'in amino asit sekansına %15, CTLA-4'e %20 ve indüklenmiş T-hücre ko-









**Şekil 2.2.** PD-L1 ekspresyonunu düzenleyen mekanizmalara genel bakış

PD-L1 ekspresyonu primer olarak (1) genomik sapmalardan (2) mikro RNA bazlı kontrollerden (3) onkojenik transkripsiyon faktörlerinden (4) posttranslasyonel modülasyonlardan etkilenmektedir. RAS/MEK/ERK yolu, PI3K/Akt/mTOR yolu, JAK/STAT sinyali ve TLR'ler/IKK'ler, PD-L1 ekspresyonunu düzenleyen ana yollardır. PD-L1'in IFN gama gibi sitokinler tarafından uyarılması, ikincil mekanizma olarak kabul edilmektedir. (Ai et al. 2020)<sup>42</sup>.

PD1/PDL-1 etkileşimi T hücresi proliferasyonunun baskıladığı gibi sitokin üretimini de baskılar (6). Yüksek konsantrasyonlarda anti-CD3 antikorları ile aktive olarak artan TCR uyarıcı sinyalleri ve T-hücre proliferasyonu, takip eden PD1/PD-L1 etkileşimi sonucu azalır. Hem sayıca azalan T-hücreleri nedeniyle hem de mevcut T-hücrelerinden salgılanan sitokinleri seviyesinin düşmesi nedeni ile T-hücrelerinden salgılanan sitokin seviyeleri önemli ölçüde düşer. IFN seviyesi önemli ölçüde düşerken, IL-10 ve hatta IL-2 için sitokin seviyesi tespit edilebilir eşiğin çok altında kalır (6).

Değişken konsantrasyonlarda agonistik bir anti-CD28 antikorunun eklenmesi, kostimülasyon sağlayarak, PD-L1 tarafından proliferasyon üzerindeki inhibe edici etkiyi azaltır. Yüksek konsantrasyonlardaki anti-CD28 antikoru ile PD-L1 tarafından gerçekleştirilen inhibisyonun seviyesinin azaltılabilesinden dolayı PDL-1'i inhibisyon

etkisinin TCR ve CD28 sinyallerinin gücüne bağlı olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, T hücre çoğalması optimal bir anti-CD3 stimülasyonu ile temin edildiğinde, PD-L1'in baskılayıcı etkisi, yalnızca ko-stimülasyonun tamamen yokluğunda elde edilebilmiştir (6). Bu veriler ışığında görülüyor ki, güçlü bir TCR stimülasyonu sonucu sitokin üretimi PD-L1 yoluyla azalır, ancak T-hücre proliferasyonu inhibe olmaz. Proliferasyonu baskılayan mekanizmanın, apoptozdan ziyade hücre siklusunun PD-L1 tarafından G0/G1 fazında durdurulmasıdır (7).

PD1 yolağının asıl hedefi hücrenin sağkalımı, büyüme ve çoğalmasında görev alan PI3K-Akt-mTOR yolağıdır. Normalde Protein tirozin fosfataz ve tensin homologu (PTEN) fosforile olarak inaktifleşirken defosforile olduğunda aktifleşerek PI3K-Akt-mTOR yolağını inhibe eder. PD1 bu yolda aynı zamanda PTEN'in stabilizasyonunu bozar ve fosfataz aktivitesini artırır. PD1'in hedef aldığı ikinci önemli yolak Ras-MEK-ERK yolağıdır. Hücre çoğalması, hücre döngüsü ilerlemesi, hücre bölünmesi ve farklılaşmayı etkileyen ve IL-2 salınımını sağlayan bu yolağı inhibe eder. Bu yollardaki inhibisyon etkisinin aksine BATF ve p38'in oluşumunu aktive ederek apoptozis, otofajiyi indükler ve diferansiasyonu engeller (1-3). PD-L1 ayrıca, CD28'e kıyasla CD80'e daha yüksek bir afinite göstererek direkt olarak bağlanabilir. Bu durum CD80 heterodimerinin bozulmasına yol açarak potansiyel CD80 bağlanma ortaklarının spektrumunu düşürür (31). CD80-PD-L1 etkileşimi, CD80-CD28 sinyalini sağlam tutarken, CD80 homodimer oluşumunu önleyerek, PD1/PDL-1 yolağının kısmi inhibisyonunun yanı sıra CTLA-4 aracılı CD80 tükenmesine neden olabilmektedir (32) (Şekil 1). PD-L1-CD80 etkileşimini bloke eden antikorların, PD1/PD-L1-etkileşimini eski haline getirerek otoimmüniteyi hafiflettiği gösterilmiştir (33).

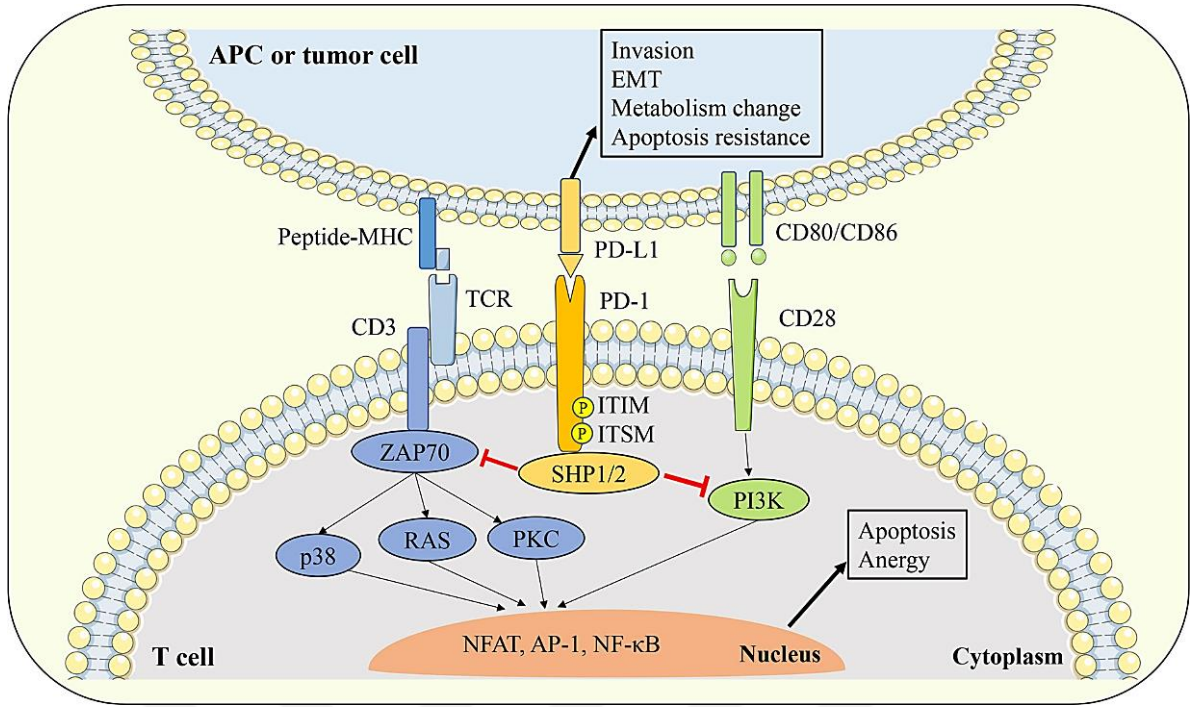
PD-L1 aracılı adaptif bağışıklık direnci ilk önce melanomda tarif edilmiştir. Bu mekanizmada, gözetleyici T hücreleri, tümör neoantijenlerini yabancı olarak tanır ve aktif hale gelirler, PD1'i düzenler ve interferon gama (IFN- $\gamma$ ) salgırlar. IFN- $\gamma$ 'ye cevap olarak, tümör mikroçevresindeki tümör hücreleri ve immün hücreler PD-L1'i eksprese eder. PDL1 daha sonra PD1'i bağlayarak gözetleyici T hücrelerini bloke ederler (33). PD1/PD-L1 immün kontrol noktası yolunun antikorlar kullanılarak hedeflenmesi, kanser tedavisi denemelerinden çok önemli sonuçlar elde edilmiştir (16, 22, 23, 29-31).

PD1, metabolik yeniden programlama, T hücre farklılaşması ve fonksiyonu üzerinde büyük etkiye sahiptir. Aktive T hücreleri aerobik glikoliz yoluyla metabolizmasını idame

ettirir. Glutaminin geri alımı ve metabolizması, efektör ve bellek T hücreleri için çok önemlidir. PD1, oksijen tüketimini baskılar ve aktive olmuş T hücrelerinin glikoliz ve glutaminolizis yapma kabiliyetini bozarak beta oksidasyon ile yağ asitlerinin kullanımını teşvik eder. Ayrıca çoklu doymamış yağ asitlerinin hücre içinde birikmesine neden olarak T hücre fonksiyonlarını bozar. Sonuçta T hücre farklılaşmasını engellemiş olur (28,34,35).

### 2.3. PD-1/PD-L1 Etkileşimi

T hücrelerinin yüzeyindeki PD-1 reseptörünün, antijen sunan hücrelerinin veya tümör hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen PD-L1 ligandlarına bağlanması, PD-1'in konformasyonel değişikliğine neden olarak, PD-1'in hücre içi alanındaki ITIM ve ITSM sinyal motiflerinde tirozinin fosforilasyonuna yol açar (**Şekil 2.3**). Fosforile edilmiş PD1, fosfataz 1/2 (SHP1/2) ve SHP1/2 içeren Src homoloji bölgesi 2 alanı gibi protein tirozin fosfatazları alır ve zeta zinciri ile ilişkili proteinkinaz (ZAP70) ve fosfoinositid 3-kinaz/serin-treonin kinaz 1 (PI3K/AKT) gibi TCR ve CD28 aşağı akış sinyal kinazlarının fosforilasyonunu indükler (43-45). Buna karşılık, protein kinaz C (PKC), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK), fosfolipaz Cy (PLCy) ve RAS gibi ZAP70 ve PKC'nin aracılık ettiği T hücresi aktivasyon sinyalleri bloke edecektir. Sonuç olarak, yukarıdaki sinyal kaskadı, T hücresi aktivasyonuna ve proliferasyon inhibisyonuna, tükenmeye, Treg hücre farklılaşmasına, apoptoz başlangıcına, sitokin üretiminin azalmasına ve metabolik değişikliklere yol açar (43,44). Bazı araştırmalar, TCR sinyali ile karşılaştırıldığında, PD-1 yolunun, esas olarak CD28 eş uyarıcı sinyaline müdahale ederek T hücresi aktivasyonunu etkileyebileceğini göstermiştir.



**Şekil 2.3.** PD-1 ve PD-L1 arasındaki etkileşim

T hücrelerinin yüzeyindeki PD-1 reseptörünün, APC'lerin veya tümör hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen PD-L1 ligandlarına bağlanması, PD-1'in konformasyonel değişikliğine neden olarak PD-1'in hücre içi alanındaki ITIM ve ITSM sinyal motiflerinde tirozinin fosforilasyonuna yol açar. Fosforile olan PD-1, SHP1/2 gibi protein tirozin fosfatazları toplar ve bu topladığı SHP1/2'ler aşağı akış TCR ve CD28 sinyal dizisini inhibe eder. Böylece T hücrelerinin aktivasyonunu ve proliferasyonunu inhibe eder. Ayrıca T hücrelerinde tükenmeye, Treg hücrelerinde farklılaşmaya, apoptozin başlamasına, sitokin üretiminin azalmasına ve metabolik değişikliklere yol açar. Öte yandan PD-L1, biyolojik sinyalleri PD-L1 eksprese eden hücrelere iletebilir ve tümör hücresi invazyonunu, EMT'yi ve apoptoz direncini etkileyebilir. (Zhao, Y et al. 2023)<sup>45</sup>

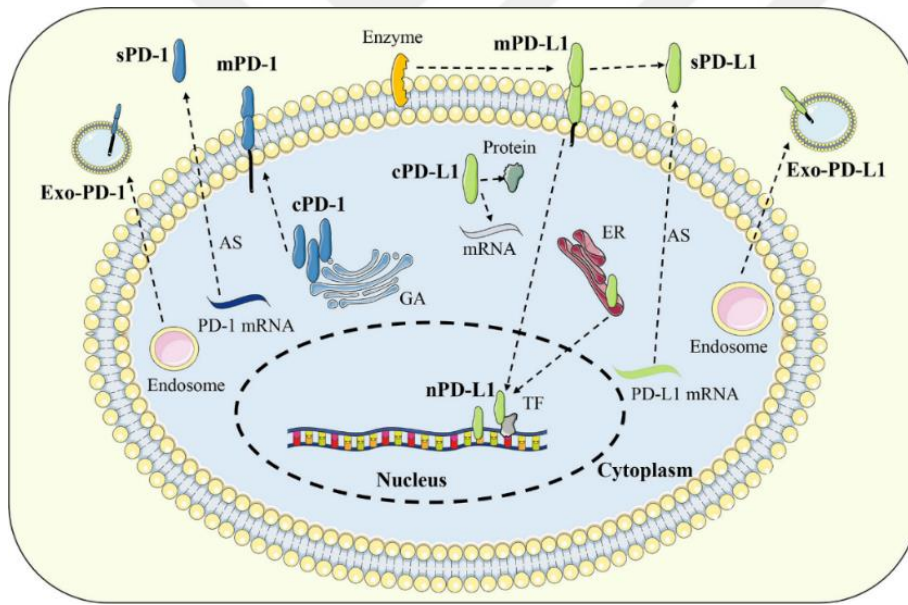
*APC, antijen presente eden hücre; EMT, epitelyal-mezenkimal transformasyon; TCR, T hücre reseptörü; ZAP70, zeta zinciri ile ilişkili protein kinaz; PKC, protein kinaz C; SHP1/2, Src homoloji bölgesi 2 alanı içeren fosfataz 1/2; ITIM, immünoresptör tirozin bazlı inhibitör motif; ITSM, immünoresptör tirozin bazlı anahtar motifi; PI3K, fosfoinositid 3-kinaz/serin-treonin kinaz 1; NFAT, aktifleştirilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü; AP-1, aktivator protein 1; NF-κB, aktif B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir arttırıcısı.*

PD-L1 proteininin hücre içi alanında klasik sinyal motiflerinin bulunmaması nedeniyle, PD-1/PD-L1 etkileşiminin incelenmesi genellikle PD-1 ifade eden hücrelerdeki sinyal iletim sürecine odaklanır, ancak PD-L1'in aracılık ettiği hücre içi sinyallemeye daha az dikkat edilir. Bununla birlikte, PD-1 ve PDL1'in bağlanmasının, biyolojik sinyalleri PD-L1 eksprese eden hücrelere de iletebileceği ve bunların fonksiyonlarını da etkileyebileceği gösterilmiştir. Örneğin, tümör hücrelerinin PD-1 rekombinant proteinlerle uyarılması, PD-L1 sinyalini etkinleştirebilir ve tümör hücrelerinin apoptoz direncini artırabilir (46). T hücreleri olmayan bir in vitro modelde, tümör hücrelerinde PD-L1 sinyalini PD-L1 antikoru

ile bloke etmek, glikoz metabolik aktivitelerini önemli ölçüde etkileyerek hücre canlılığını inhibe eder.

#### 2.4. Non-sitomembran PD-1 ve PD-L1

Daha önce bahsedildiği gibi, PD-1 ve PD-L1, plazma zarı üzerinde yer alan tipik transmembran proteinlerdir ve bunların protein yapıları, hücre dışı alanı (ekstrasellüler), zar-ötesi alanı (transmembran) ve hücre içi alanı (intraseküller) içerir. PD-1 ve PD-L1'in bağlanması, çeşitli hücre içi sinyal iletim yollarını aktive ederek çeşitli hücresel fonksiyonları düzenler. Klasik zara bağlı olan formuna ek olarak, çalışmalar PD-1 ve PD-L1'in hücre dışı veya hücre içi bölgelerde zara bağlı olmayan bir biçimde de dağılabileceğini göstermiştir (47).



**Şekil 2.4.** PD-1 ve PD-L1'in dağılımı

Klasik membrana bağlı forma ek olarak, PD-1 ve PD-L1, membrana bağlı olmayan bir biçimde hücre dışı veya hücre içi bölgelerde de izlenebilmektedir. Hücre dışı PD-1 ve PD-L1 çözünür formda veya ekzozom yüzeyinde bulunur. Hücre içi PD-L1, sitoplazmada veya çekirdekte izlenebilirken, PD-1 yalnızca sitoplazmada bulunmaktadır. (Zhao, Y et al. 2023)<sup>45</sup>

*Ekzo-PD-1/PD-L1, ekzozomal PD-1/PD-L1; sPD-1/PD-L1, çözünür PD-1/PD-L1; mPD-1/PD-L1, membran PD-1/PD-L1; cPD-1/PD-L1, sitoplazmik PD-1/PD-L1; nPD-L1, nükleer PD-L1; AS, alternatif splicing; GA, golgi aygıtı; ER, endoplazmik retikulum; TF, transkripsiyon faktörü.*

Hücre dışı PD-1 ve PD-L1, esas olarak çeşitli vücut sıvılarında çözünür formda bulunur veya eksozom zarının yüzeyinde bulunur. Çözünür PD-1 (sPD-1) veya çözünür PD-L1 (sPD-L1), mRNA'nın veya zar proteini proteolizinin alternatif eklenmesiyle üretilirken, ekzozomal PD-1 (Ekzo-PD-1) veya ekzozomal PD-L1 (Ekzo) -PD-L1), multiveziküler cisimlerin hücre zarı ile füzyonu ile salınır (**Şekil 2.4**). Hücre içi PD-L1, sitoplazmada veya çekirdekte dağılabilir ve farklı mekanizmalara bağlı olarak benzersiz sinyal iletim işlevleri sergileyebilir (48). Bununla birlikte, hücre içi PD-1 ile ilgili araştırma eksikliği vardır.

## 2.5. Hücre Dışı PD-1 ve PD-L1

Hücre dışı PD-1 ve PD-L1, esas olarak kan dolaşımı ile vücutta dağılabilen serbest çözünür formları veya ekzozomal zara bağlı formları içerir. Çalışmalar, PD-1 ve PD-L1'in bazı çözünür ve ekzozomal formlarının, intakt bağışıklık aktivitesini koruduğunu ve immünomodülatör fonksiyonlar sergilemek için hücre zarı reseptörlerine/ligandlarına bağlanabileceğini göstermiştir (49). İmmün kontrol noktası blokaj tedavisinde, hücre dışı PD-1 ve PD-L1, terapötik antikorlara spesifik olarak bağlanmak için moleküler tuzaklar olarak hareket edebilir ve böylece etkinliği etkilerler. Ek olarak, hücre dışı çözünür ve ekzozomal PD-1 ve PD-L1'in geniş dağılımı ve kolay tespiti nedeniyle, hastalık teşhisi veya prognoz değerlendirmesi için biyobelirteçler olarak büyük değere sahiptirler (50). Ekstraselüler PD-1 ve PDL1'in immünomodülatör yeteneği, bunların gelecekte terapötik hedefler haline gelebileceğini de düşündürmektedir.

sPD-1 ve sPD-L1, hücre zarı PD-1 ve PD-L1'in transkripsiyonu veya proteolizi sırasında mRNA'nın alternatif olarak eklenmesiyle üretilir ve tipik transmembran alanlarından yoksundur (51,52). PDCD1 geni, PD-1 proteininin hücre dışı, transmembran ve hücre içi yapılarını kodlamaktan sorumlu beş ekzon içerir. Bunların arasında, PD-1'in transmembran alanı, ekson 3 tarafından kodlanır ve seçici silinmesi, sPD-1'in üretimine yol açar. Yalnızca ekson 3 eksik olduğunda, sPD-1 sağlam bir hücre dışı alana sahiptir ve spesifik olarak PD-L1 ligandına bağlanabilir (53). PD-L1 için, PDCDL1 geninin intronunda endojen retroelement LINE-2A'nın amplifikasyonu, PD-L1 proteininin transmembran ve sinyal alanlarının silinmesine yol açacak ve böylece sPD-L1 üretimini indükleyecektir.

Ayrıca, bu tip sPD-L1, PD-1 sinyalini aktive edemez, bunun yerine membran PD-L1'in immünoşüpresif aktivitesini antagonize etmek için moleküler bir tuzak görevi görür (54). Diğer çalışmalar, çeşitli endojen metalloproteinazların, membran PD-L1'in proteolizine dahil olduğunu ve bunun da sPD-L1 üretimiyle sonuçlandığını bildirmiştir. Örneğin, matriks metalloproteinaz 9 (MMP9) ve MMP13, fibroblastların yüzeyinde PD-L1 ve PD-L2'nin bozulmasını katalize ederek sPD-L1 üretimini indükler ve fibroblastların PD-1 sinyal yolunu aktive etme yeteneğini azaltır. Böylece dolaylı olarak T hücresi bağışıklığını destekler (55). Bu nedenle, sPD-1 ve sPD-L1'in sahip olduğu biyolojik aktivite, nasıl üretildiğine bağlıdır.

İntakt bir hücre dışı alan içerdiklerinde, bağışıklık düzenlemesine aracılık etmek için karşılık gelen reseptöre veya liganda spesifik olarak bağlanabilirler. Bunlar arasında, sPD-L1'in işlevi, PD-1'e bağlanarak inhibitör bağışıklık sinyallerini aktive eden, zara bağlı PD-L1'inkine benzerdir. sPD-L1, T hücrelerinin efektör fonksiyonunu inhibe etmek için çeşitli PD-L1-pozitif tümör hücreleri tarafından salınabilir. Kanser hastalarının serumunda sPD-L1 seviyelerinin önemli ölçüde arttığı bulgusu göz önüne alındığında, sPD-L1'in tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışı için önemli bir görev aldığını gösterebilir.

PD-L1 aracılı immünoşüpresif etki ile karşılaştırıldığında, sPD-1, PD-1 sinyalinin aktivasyonunu PD-L1'e bağlanmada rekabet göstererek önleyebilir ve dolaylı olarak anti-tümör immün etkisini artırabilir (56). Melanomda, PD-1'in hücre dışı alanını kodlayan intravenöz plazmid enjeksiyonunun, PD-1/PD-L1 sinyal yolunu bloke edebildiği ve akciğer metastazını ve tümör hücrelerinin ilaç direncini önleyebildiği gösterilmiştir (57). Sonuç olarak, sPD-1 ve sPD-L1'in çok çeşitli kaynakları ve çeşitli işlevleri vardır ve bunların immünomodülatör mekanizmaları ve klinik uygulama değerlerinin daha çok araştırılmaya ihtiyacı vardır.

Exo-PD-1 ve Exo-PD-L1, eksozom zarı üzerinde lokalizedir, hücre zarı formuyla aynı protein yapısını korur ve eksozomların salınmasıyla hücre dışına salgılanır (58). Akciğer kanseri, prostat kanseri, meme kanseri ve melanom dahil olmak üzere birçok tümör hücresi, PD-1'e bağlanarak efektör T hücrelerinin aktivasyonunu önleyen ve baskılayıcı bir tümör immün mikro ortamının oluşumunu destekleyen PD-L1 eksprese eden eksozomları serbest bırakabilir (48). N-SMase2 ve Rab27a gibi eksozom sentezi ve salınımı ile ilgili genlerin inhibisyonu, eksozom salınımını bloke ederek eksozom PD-L1 seviyesini azaltabilir ve anti-PD-L1 immünoterapisinin etkinliğini önemli ölçüde artırmaktadır (59).

Exo-PD-L1 seviyesi, IFN- $\gamma$  gibi enflamatuar faktörlerin uyarılmasına yanıt olarak önemli ölçüde artabilir (58). Bu nedenle, bağışıklık kontrol noktası inhibitörü tedavisinin yanıt oranını ve etkinliğini değerlendirmek için kullanılabilir. Tedaviden önce hastaların periferik kanındaki yüksek Exo-PD-L1 seviyesi, T hücrelerinin şiddetli tükenmesini yansıtabilir, bu da bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin etkinliğini sağlamanın zor olduğunu düşündürür. Tedaviden sonra hastaların periferik kanındaki Exo-PD-L1 seviyesi yükselirse, bu genellikle T hücresi immün yanıtının düzeldiğini ve anti-tümör immünitesinin yeniden başladığını gösterir (60).

sPD-L1 ile karşılaştırıldığında Exo-PD-L1, MHC molekülleri ile birlikte eksprese edilebilir ve bu nedenle daha önemli bir immünosupresif yeteneğe sahiptir (61). Eksozomların kararlılığı nedeniyle, Exo-PD-L1 yalnızca yerel bağışıklık mikroçevresini düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda sistemik bağışıklık homeostazını koordine etmek için kan dolaşımına da girer (62). PD-L1'in aksine, Exo-PD-1 yalnızca T hücre kaynaklı eksozomlarda tanımlanmıştır. Aktive edilmiş T hücreleri, hücre yüzeyine veya eksozomal PD-L1'e bir molekül tuzağı olarak bağlanabilen ve klatrin aracılı endositoz yoluyla PD-L1 içselleştirmesini indükleyebilen PD-1 taşıyan eksozomları serbest bırakabilir, böylece PD-1 sinyalinin aktivasyonunu ve dolaylı olarak PD-L1 aracılı immünosupresyonu inhibe eder (63). Sonuç olarak, Exo-PD-1 ve Exo-PD-L1 sadece terapötik hedefler olarak kullanılmaz, aynı zamanda immün kontrol noktası blokajının klinik yanıt oranını ve etkinliğini değerlendirmek için de kullanılabilir.

## 2.6. Hücre İçi PD-1 VE PD-L1

Hücre içi PD-L1, sitoplazmada veya çekirdekte bulunabilir. Nükleer PD-L1 (nPD-L1), doğrudan DNA'ya veya transkripsiyon faktörlerine bağlanarak transkripsiyon prosedürünü düzenleyebilir ve ardından hücre aktivitelerini etkileyebilir (64). Şu anda, nPD-L1 ekspresyonu birçok tümör hücresi tipinde bulunmuştur. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde, nPD-L1 doğrudan SP1 transkripsiyon faktörüne bağlanabilir ve growth arrest-specific 6 'nın (GAS6) ekspresyonunu artırabilir. GAS6, aşağı akış MerTK sinyal yolu aracılığı ile tümör hücresi proliferasyonunu artırmaktadır (65). Ek olarak, nPD-L1 ayrıca enflamatuar yolları aktive edebilir ve tümör antijenlerinin sunumunu destekleyebilir; bu,

yüksek düzeyde PD-L1'e sahip tümörlerde PD-1/PD-L1 blokajının yüksek yanıt oranıyla ilişkili olabilir.

Günümüzde halen nPD-L1'in oluşum mekanizması net değildir. İlk başta, membran PD-L1'in endositozundan kaynaklandığı düşünülüyordu. Bununla birlikte, sonraki araştırmalar, nPD-L1'in membran PD-L1'den daha karmaşık glikosilasyon grupları içerdiğini göstermiştir; bu, PD-L1'in bir kısmının, endoplazmik retikulum ve Golgi aparatında translasyondan sonra yüksek oranda glikosile edilmiş reaksiyonlara maruz kalabileceğini ve daha sonra doğrudan çekirdeğe taşınabileceğini düşündürmektedir (66). Sitoplazmik PD-L1'in (cPD-L1) akciğer, böbrek ve pankreas gibi tümör hücrelerinin yanı sıra makrofajlar, fibroblastlar ve epitel hücreleri gibi tümör olmayan hücrelerde de var olduğu doğrulanmıştır (67). Tümör hücrelerinde PD-L1, sitoplazmada birikmek için sinyal transdüsörüne ve transkripsiyon 3 (STAT3) sinyal yolunun aktivatörlerini kullanmaktadır (45-48).

PD-L1 ile karşılaştırıldığında, hücre içi PD-1 ile ilgili araştırma çok fazla yoktur. T hücreleriyle ilgili yalnızca birkaç araştırma, hücre içi PD-1'in varlığını doğrulamıştır. Araştırmalar, PD-1'in T hücrelerindeki lokalizasyonunun fenotipik switching ile değiştiğini göstermiştir. Örneğin, T hücresi aktivasyonu sırasında PD-1 ekspresyonu artarak hücre yüzeyine dağılırken, dinlenme halindeki Treg hücrelerinde PD-1 ekspresyonu esas olarak hücre içinde lokalizedir. Treg hücrelerinin TCR sinyali aktive edildiğinde, hücre içi PD-1 hücre zarına yer değiştirebilir ve böylece bağışıklık düzenlemesine aracılık eder (68). Ek olarak, aktive edilmiş T hücrelerinde, PD-1 Golgi aparatının yakınında da mevcuttur. Ancak PD-1 sentezinin hücre içi trafiğinde görevi olan endozomlar ve lizozomlarda izlenmez (69). İlerlemiş melanomlu hastaların periferik kanında, PD-1 dolaşımdaki T lenfositlerin sitoplazmasında birikir, bu da T hücre zarındaki PD-1 kaybını tamamlayarak T hücre fonksiyonunu etkiler ve tümör immün kaçışına aracılık eder (70).

## **2.7. PD-L1 Ekspresyon Yolağı**

PD-L1 kodlayan CD274 geninin klasik olarak ekspresyonu, inflamasyonu tetikleyen sitokinler tarafından uyarılan Janus Kinaz (JAK)/Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörleri (STAT) yolunun aktiflenmesi ile meydana gelmektedir (71). Bu modülatörler

özellikle interferonları (IFN'ler) içerir ve aktive edilmiş bağışıklık hücreleri tarafından salınırlar (71). IFN-IFN-reseptör etkileşiminden kaynaklanan sinyal, hücre içinde Tirozin Kinaz (TYK) 2/JAK1 ve JAK1/JAK2 yoluyla aktarılır ve farklı STAT üyelerinin fosforilasyonuna ve ardından birkaç kompleksin oluşumuna yol açar (72).

En çok STAT1, STAT2 ve STAT3 olmak üzere farklı STAT faktörleri bu süreçte rol oynar. Interferon regülatör faktörler ("Interferon Regulatory Factors" IRF) 1 ve IRF9 bu modülatörlere aracılık ederler (Şekil 2). Tüm bu transkripsiyon faktörlerinin, pozitif bir geri besleme döngüsünde IFN stimülasyonundan sonra yukarı doğru düzenlendiği bulunmuştur (72). Oluşan komplekslerin en dikkate değer olanı, STAT1/STAT2/IRF9'dan oluşan "IFN-Stimulated Gene Factor 3" (ISGF3) kompleksi ve fosforile edilmiş bir STAT1 dimerinden oluşan "Gamma-Activating Factor" (GAF) kompleksidir. Her iki kompleks de daha sonra çekirdeğe doğru yer değiştirir ve IRF1 üzerindeki Gamma-Activated Sekans (GAS) üzerinde transkripsiyon faktörleri olarak hareket ederler. Bununla birlikte, ISGF3 kompleksi ayrıca interferon ile uyarılan tepki elemanı ("Interferon Stimulated Response Element" ISRE) aktivitesini indüklemeye yeteneğine de sahiptir. Bu süreç, interferonun aktiflediği birçok genin indüklenmesine yol açarken, GAS etkileşimi daha sonra PD-L1 promotoruna bağlanabilen ve onun transkripsiyonunu sağlayan IRF1 ekspresyonunu başlatır (72-74). PD-L1 ekspresyonunun gelişiminde IRF1 bağlanma bölgelerinin önemi Lee ve diğerleri tarafından gösterilmiştir (75)

Bunlara ek olarak diğer birçok ek yolunda PD-L1 ekspresyonu için önemli olduğu bildirilmiştir. Monosit türevli dendritik hücrelerde (moDC'ler) çok önemli olan MEK/ERK yolu (76) ve PI3K-AKT ve MAPK-ERK yolu PD-L1 ekspresyonunu artırmaktadır (Şekil 2, 3). PD-1 sinyalinin bu iki yolu aşağı doğru düzenleme yeteneği hem ligandı hem de reseptörü eksprese eden hücrelerde negatif bir geri besleme döngüsü oluşturmaktadır (77,78). PI3K yolunun inhibisyonu, sitokinle uyarılan moDC'lerde PD-L1 ekspresyonunu azaltır. Bununla birlikte, MAP kinaz üyesi olan p38'in azalması benzer bir etki göstermemektedir. Sitokin kaynaklı PD-L1 artışı için hem ERK hem de p38 aktivasyonu gerekli olduğundan, myeloid DC'lerde (mDC'ler) p38'in daha belirgin bir etkisi olduğu saptanmıştır. Ayrıca yeni izole edilmiş plazmasitoid DC'lerdeki (pDC'ler) ekspresyon artışı da daha çok p38 yolağına bağımlıdır (76). Kısacası, IFN yoluyla başlatılan JAK/STAT yolu, PD-L1 ekspresyonunu başlatmak için ana ve klasik yoldur ve diğer yollar belirli koşullar altında önem teşkil etmektedir.

## 2.8. PD-L1 Ekspresyonunu Etkileyen Proteinler

PD-L1 ekspresyonu IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , VEGF, granülosit-makrofaj koloni-uyarıcı faktör (GM-CSF) ve IL-10 gibi çeşitli pro-inflamatuar sitokinler tarafından indüklenebilir (**Şekil 2.5**). PD-L1 ayrıca Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), IRF1, STAT1, STAT3 ve “hypoxia inducible factor 1-alfa” (HIF-1 $\alpha$ ) ile de indüklenebilmektedir (1, 3, 7, 29, 74, 76).

### 2.8.1. İnterferon gama (IFN- $\gamma$ )

IFN- $\gamma$ , PD-L1 ekspresyonunun en güçlü indükleyicilerinden biri olarak kabul edilmektedir. IFN- $\gamma$ , CD8+ T hücreleri, NK hücreleri ve CD4+ T hücreleri tarafından üretilen bir sitokin olup, enfeksiyonlar ve kanser gibi durumlarda immün yanıtı artırır. IFN- $\gamma$  özellikle enfeksiyonlarla mücadele eden T hücreleri tarafından salgılanır. IFN- $\gamma$ , hücreler arasında iletişim kurarak immün yanıtın düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. IFN- $\gamma$  üretimi, bir enfeksiyon veya diğer uyarıcı bir sinyal tarafından tetiklenebilir (79). Örneğin, enfekte olmuş hücreler tarafından üretilen antijenler, T hücrelerinin aktivasyonunu başlatır (80,81) ve IFN- $\gamma$  üretimini artırabilir. Benzer şekilde, doğal öldürücü hücreler de enfekte olmuş hücrelere karşı yanıt verirler ve IFN- $\gamma$  üretirler. IFN- $\gamma$  üretimi ayrıca diğer sitokinler veya moleküller tarafından da uyarılabilir. Örneğin, makrofajlar gibi immün hücrelerin IFN- $\gamma$ 'ye maruz kalması, kendi IFN- $\gamma$  üretimlerini artırabilmektedir (79, 80). IFN- $\gamma$  üretimi, ayrıca bazı virüslerin veya bakterilerin doğrudan enfekte ettiği hücreler tarafından da uyarılabilir.

Bu hücreler, enfeksiyonu algıladığında IFN- $\gamma$  üretimi başlatabilirler ve enfeksiyonu sınırlamak veya ortadan kaldırmak için immün yanıtın başlatılmasına katkıda bulunabilirler (80). Ayrıca IFN- $\gamma$  üretimi bazı durumlarda yapay olarak da indüklenmektedir. Örneğin, bazı kanser türleri veya bazı enfeksiyon ve hastalıklarda kullanılan IFN- $\gamma$  tedavisi gibi durumlarda IFN- $\gamma$  seviyesi yapay olarak artış gösterir (21, 80, 82). IFN- $\gamma$  üretimi, birçok farklı mekanizmaya bağlıdır ve bu mekanizmalar, farklı durumlar veya uyarıcılara bağlı olarak değişebilir. IFN- $\gamma$  üretiminin indüklenmesi, bağışıklık sistemi yanıtını güçlendirmek ve enfeksiyonlara karşı korunmak için önemlidir. IFN- $\gamma$ , virüsler, intrasellüler bakteriler ve tümörlere karşı immün yanıtın önemli bir bileşenidir. IFN- $\gamma$ , makrofajları aktive eder ve mikropları yutarak ve sindirerek yok etme yeteneklerini artırır (81). Ayrıca makrofajların nitrik oksit üretimini artırarak birçok enfeksiyona karşı etkili bir antimikrobiyal ortam

oluşturur. IFN- $\gamma$ , Th1 hücrelerinin gelişimini teşvik ederek bu hücrelerden sitokinler üreterek hücrel immüniteyi artırır (79, 80). IFN- $\gamma$ , ayrıca inflamasyonun düzenlenmesinde, hücre büyümesinde ve hücre farklılaşmasında da önemli rol oynarken hücrelerde apoptozu (programlı hücre ölümü) uyararak, zararlı hücrelerin ölümünü de teşvik edebilmektedir (79-82). Bununla birlikte, IFN- $\gamma$  üretimi bazı durumlarda zararlı olabilir ve otoimmün bozukluklar gibi bazı patolojik durumlara yol açabilir. Bu nedenle, IFN- $\gamma$  üretimini kontrol etmek ve düzenlemek önemlidir.

IFN- $\gamma$ , PD-L1 ekspresyonunu düzenlemek için önemli bir sinyal molekülüdür (71, 72, 74, 76, 83, 84). IFN- $\gamma$ , PD-L1 ekspresyonunu arttırabilir veya azaltabilir (84-86). IFN- $\gamma$ , PD-L1 ekspresyonunu arttırarak, hücrelerin immün yanıtı karşı direncini arttırabilir. Bu nedenle, PD-L1'in IFN- $\gamma$  tarafından düzenlenmesi, immün yanıtın düzenlenmesinde önemli bir mekanizmadır. IFN- $\gamma$ , PD-L1 ekspresyonunu arttırarak, immün yanıtın baskılanmasına neden olarak immün sistemin kanser hücrelerine veya enfekte olmuş hücrelere karşı saldırmasını engelleyebilir (83-86). Bu nedenle, PD-L1 ve IFN- $\gamma$  arasındaki etkileşim, kanser tedavisi ve immün terapi stratejilerinde önemlidir. PD-L1 ekspresyonunun IFN- $\gamma$  tarafından düzenlenmesi, tümör ve bağışıklık hücrelerinde farklılıklar gösterir. Örneğin, IFN- $\gamma$  blokajlı bir fare sarkom modelinde, PD-L1'in ekspresyonu tümör hücrelerinde büyük ölçüde azalır, ancak tümörle ilişkili makrofajlarda (TAM) PD-L1 ekspresyonundaki azalma kısmen olur (87). Bu örnekten anlaşılacağı üzere IFN- $\gamma$ , TAM'ler üzerindeki PD-L1 ekspresyonunu sadece kısmen düzenleyebilmektedir (88). Bazı tümör hücreleri, IFN- $\gamma$ 'ya maruz kaldıklarında bile PD-L1 ekspresyonunu artırabilirler. Bu, tümör hücrelerinin immün sisteme karşı dirençlerini artırmasına ve immün yanıtın baskılanmasına neden olabilir (87, 89). Ayrıca, bazı tümör hücreleri, PD-L1 ekspresyonunu arttırmak için alternatif mekanizmalar kullanabilirler (84, 87). Bağışıklık hücreleri ise genellikle IFN- $\gamma$ 'ya maruz kaldıklarında PD-L1 ekspresyonunu artırır (1, 9, 72, 73). Bu, bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu sınırlandıran bir negatif geri besleme mekanizmasıdır. Ancak bazı bağışıklık hücreleri de PD-L1 ekspresyonunu arttırmak yerine, IFN- $\gamma$ 'nın varlığına karşı koymak için alternatif yollar kullanabilirler.

### 2.8.2. Transformik growth faktör beta (TGF)- $\beta$

TGF- $\beta$ , hücre büyüme, bölünme, farklılaşma ve hücre hareketleri üzerinde etkili olan bir protein ailesidir. TGF- $\beta$  ailesi, hücrelerin hayatta kalması, dokuların yenilenmesi ve bağışıklık sistemi fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi birçok süreci kontrol eder. TGF- $\beta$ , hücreler arasındaki iletişimi sağlar ve hücre çevresindeki değişikliklere tepki verir. TGF- $\beta$ , hücrelerin çoğalmasını ve hareketini inhibe edebilir, yani hücreleri büyümeye veya göç etmeye zorlayan diğer sinyallerin etkisini azaltabilir. Ayrıca TGF- $\beta$ , hücrelerin farklılaşmasını ve apoptoz (programlı hücre ölümü) gibi hücresel işlevleri kontrol edebilir (90).

TGF- $\beta$ , immün sistem üzerinde de önemli bir etkiye sahiptir. Bu protein, bağışıklık sisteminin çeşitli hücreleri tarafından üretilir ve bağışıklık sistemi hücrelerinin çoğunun büyümesi ve aktivasyonu üzerinde inhibe edici bir etkiye sahiptir. Bu nedenle, TGF- $\beta$  genellikle bağışıklık sisteminin aşırı aktivasyonunu ve otoimmünite gibi hastalıkların oluşumunu önlemek için kullanılır (90-92). Ancak, bazı durumlarda TGF- $\beta$ 'nın immünite üzerindeki inhibe edici etkisi, kanser ve enfeksiyonların bağışıklık sistemince tanınmasını ve yok edilmesini zorlaştırabilir. Kanser hücrelerinin büyümesi, invazyonu ve metastazı üzerinde etkisi olur. Bu nedenle, bazı kanserlerde TGF- $\beta$ 'nın hedeflenmesi, immünoterapinin etkinliğini arttırmak için kullanılabilir (91, 92).

TGF- $\beta$  yüksek seviyelerde salgılandığında, PD-L1 ekspresyonunu da artırdığı ve bağışıklık sistemi hücrelerinin tümör hücrelerini yok etmesini daha da zorlaştırdığı saptanmıştır (93). TGF- $\beta$ , PD-L1'in transkripsiyonel aktivasyonunu artıran bazı sinyal yollarını etkileyerek etkili olmaktadır. Örneğin, TGF- $\beta$ , Smad sinyal yolağı aracılığıyla PD-L1 ekspresyonunu artırmaktadır. Smad sinyal yolağı, TGF- $\beta$  'nın hücrelerdeki etkilerini ileten bir sinyal yoludur ve bazı kanser türlerinde aşırı aktive olabilir. TGF- $\beta$ , aktif bir TGF- $\beta$  reseptör kompleksi oluşturur ve bu kompleks Smad2 ve Smad3 adlı iki protein kompleksinin fosforilasyonunu tetikler. Fosforilasyon, Smad2 ve Smad3'ün hücre çekirdeğine hareket etmesine ve hedef genlere bağlanmasına neden olur. Smad kompleksleri, hedef genlerin transkripsiyonunu etkiler ve TGF- $\beta$ 'nın hücreler üzerindeki çeşitli etkilerine yol açar. Smad sinyal yolu, hücre farklılaşması, hücre büyümesi, hücre ölümü, immünite ve tümör sürecinde önemli bir rol oynar. TGF- $\beta$ 'nın Smad sinyal yolağı aracılığıyla hücrelerdeki etkileri, hücre tipine, TGF- $\beta$  konsantrasyonuna ve diğer sinyal yollarına bağlı olarak

değişebilir. Bu nedenle, TGF- $\beta$ 'nın Smad sinyal yolu aracılığıyla etkilerinin daha iyi anlaşılması, bu molekülün çeşitli hastalıkların patogenezindeki rolünün daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabilir (94, 95).

Spesifik olarak monositlerin ve tübül epitel hücrelerinin in vitro olarak TGF- $\beta$  ile muamele edilmesi sonrasında PD-L1 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (96). Örneğin, bir çalışmada insan monositlerinin TGF- $\beta$  ile stimülasyonu sonrasında PD-L1 ekspresyonunun arttığı ve bu artışın Smad2/3 sinyal yolağı aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir (97). Ayrıca, tübül epitel hücreleri üzerinde yapılan bir başka çalışmada TGF- $\beta$ 'nin bu hücrelerde PD-L1 ekspresyonunu arttırdığı ve bu artışın Smad3 aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir (98). Bir pankreatik adacık transplantasyon modelinde, monosit ve epitel hücreleri üzerinde PD-L1'in sürekli ekspresyonu için TGF- $\beta$ 'nin gerekli olduğu gösterilmiştir (99).

### **2.8.3. Tümör nekrozis faktör- alfa (TNF- $\alpha$ )**

TNF- $\alpha$ , immün yanıtın bir parçası olarak enfeksiyonlar ve inflamasyonlarda önemli bir rol oynar. TNF- $\alpha$  ekspresyonu, hücrelerin uyarılmasıyla başlar. Örneğin, enfeksiyon veya yaralanma gibi çeşitli uyarıcılara maruz kalındığında, immün hücreler TNF- $\alpha$  üretmek için genetik bilgiyi aktive edebilirler (100). TNF- $\alpha$  ekspresyonu, immün yanıtın düzenlenmesinde kritik bir faktördür (100, 101). Farklı hücre tipleri, farklı durumlarda farklı seviyelerde TNF- $\alpha$  üretebilirler. TNF-alfa, özellikle T lenfositler ve makrofajlar gibi immün hücreler tarafından üretilir ve salgılanır. TNF- $\alpha$  ayrıca, hücreler arasında iletişim sağlayarak immün hücrelerin aktivasyonunu, göçünü ve diğer fonksiyonlarını modüle eder (101).

TNF- $\alpha$ , inflamasyon ve enfeksiyonlarla mücadelede önemli bir rol oynar. İmmün hücreler tarafından salgılanan TNF- $\alpha$  hedef hücrelerin ölümüne apoptozuna neden olabilir. Bu özellikleri sayesinde, TNF- $\alpha$ , enfeksiyonlar, tümöral hücreler, bakteriler ve diğer yabancı maddelerle mücadelede etkili bir araçtır (101, 102). Kanser hücrelerinin ölümüne ve tümör büyümesinin kontrol altına alınmasında etkisi büyüktür. TNF- $\alpha$  ayrıca, enfeksiyonların ilk savunma hattı olan inflamasyonu başlatmak için de kullanılır. Bu, vücudun enfeksiyonla savaşmak için gerekli olan immün hücreleri bölgeye çekmesine ve enfeksiyonu sınırlamak ve yok etmek için gerekli koşulları yaratmasına yardımcı olur. TNF- $\alpha$ , ek olarak damarların

geçirgenliğini artırarak, immün hücrelerin enfeksiyonun olduğu bölgeye daha hızlı ulaşmasını sağlar (100).

Ancak TNF- $\alpha$  aşırı üretildiğinde, otoimmün hastalıklar gibi hastalıklara ve sistemik enflamatuvar yanıt sendromuna (SIRS) neden olabilir. TNF- $\alpha$ , romatoid artrit, Crohn hastalığı, psoriasis ve ankilozan spondilit gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisinde hedeflenen bir moleküldür (101-103). TNF- $\alpha$ , immün hücrelerin aktivasyonunu artırarak bağışıklık yanıtını da güçlendirir. Bu nedenle, bazı immün yetmezlik hastalıklarında, TNF- $\alpha$ 'nın sentetik versiyonları kullanılarak immün yanıtı artırmak mümkündür (102) .

TNF- $\alpha$ 'nın PD-L1 ekspresyonu üzerindeki etkisi, farklı çalışmalarla farklı sonuçlar göstermiştir (104-106). Bazı çalışmalar, TNF- $\alpha$ 'nın PD-L1 ekspresyonunu artırabileceğini gösterirken (105), diğerleri ise TNF- $\alpha$ 'nın PD-L1 ekspresyonunu azaltabileceğini göstermektedir (106). Bu nedenle, TNF- $\alpha$ 'nın PD-L1 ekspresyonu üzerindeki etkisi net olarak belirlenmemiştir. Örneğin, TNF- $\alpha$ 'nın yüksek seviyeleri, PD-L1'in ifadesini artırarak, immün hücrelerinin kanser hücrelerine saldırmasını engelleyebilir. Ancak diğer durumlarda, TNF- $\alpha$ , PD-L1 ifadesini azaltarak, immün hücrelerinin kanser hücrelerine saldırmasına izin verebilir (105, 106).

TNF- $\alpha$ 'nın PD-L1 ekspresyonunu indüklediği hücreler arasında dendritik hücreler, monositler, endotel hücreleri ve kanser hücreleri (meme kanseri, akciğer kanseri, prostat kanseri, renal hücreli karsinom, kolon kanseri) yer alır (104-106). Ek olarak, miyelodisplastik sendromun blastik hücrelerinde ve prostat hücrelerinde TNF- $\alpha$ 'nın PD-L1 ekspresyonunu indüklediğine dair de bazı çalışmalar mevcuttur (104, 105).

Dendritik hücreler ve monositler immün yanıtı başlatan ve düzenleyen önemli hücrelerdir. TNF- $\alpha$ 'nın dendritik hücrelerde ve monositlerde PD-L1 ekspresyonunu artırması, immün yanıtı baskılayacaktır (107). TNF- $\alpha$ 'nın endotel hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunu artırması, inflamasyonu azaltarak, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde potansiyel bir rol oynamasına yol açmaktadır.

Bununla birlikte TNF- $\alpha$ 'nın PD-L1 ekspresyonunu inhibe ettiği hücreler hakkında bilgiler halen çelişkilidir. Bazı çalışmalar TNF- $\alpha$ 'nın PD-L1 ekspresyonunu düşürdüğünü öne sürmektedir. Örneğin, akciğer kanseri hücrelerinde TNF- $\alpha$ , PD-L1 ekspresyonunu

azaltarak immün yanıtı artırabilir (106). Ayrıca, TNF- $\alpha$ 'nın IFN- $\gamma$  ile kullanımı, melanom hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunu azaltabilir (108). Bununla birlikte, TNF- $\alpha$ 'nın PD-L1 ekspresyonunu inhibe ettiği hücrelerin tam olarak hangileri olduğu ve mekanizması hala araştırma konusudur.

#### **2.8.4. İnterlökin-12 (IL-12)**

IL-12, bağışıklık sistemi tarafından üretilen bir sitokindir. Bu sitokin, T hücrelerinin etkinleştirilmesi ve farklılaşması gibi birçok immünolojik işlevde önemli bir rol oynar. Özellikle, Th1 hücrelerinin gelişimini uyarmak için gerekli olan sinyalleri sağlar. Bu, enfekte hücrelere veya kanser hücrelerine karşı etkili bir immün yanıtın oluşturulmasına yardımcı olur. Ayrıca, doğal öldürücü (NK) hücrelerinin etkinleştirilmesinde ve IFN- $\gamma$  üretiminde de rol oynar. IL-12, IFN- $\gamma$  üretimini uyarak immün sistemin diğer hücreleri ile iletişim kurmasına yardımcı olur (109, 110). IFN- $\gamma$ , immün sistemin antiviral ve antitümör yanıtını güçlendirir ve iltihaplanmaya karşı savunmaya katkıda bulunur. IL-12, özellikle virüs, bakteri ve parazitlerin neden olduğu enfeksiyonların kontrol altına alınması ve immün cevabın uygun bir şekilde düzenlenmesi için önemlidir. Bunun yanı sıra, IL-12 otoimmün hastalıklar ve kanser tedavisi gibi diğer klinik durumlarda da önemlidir (110, 111).

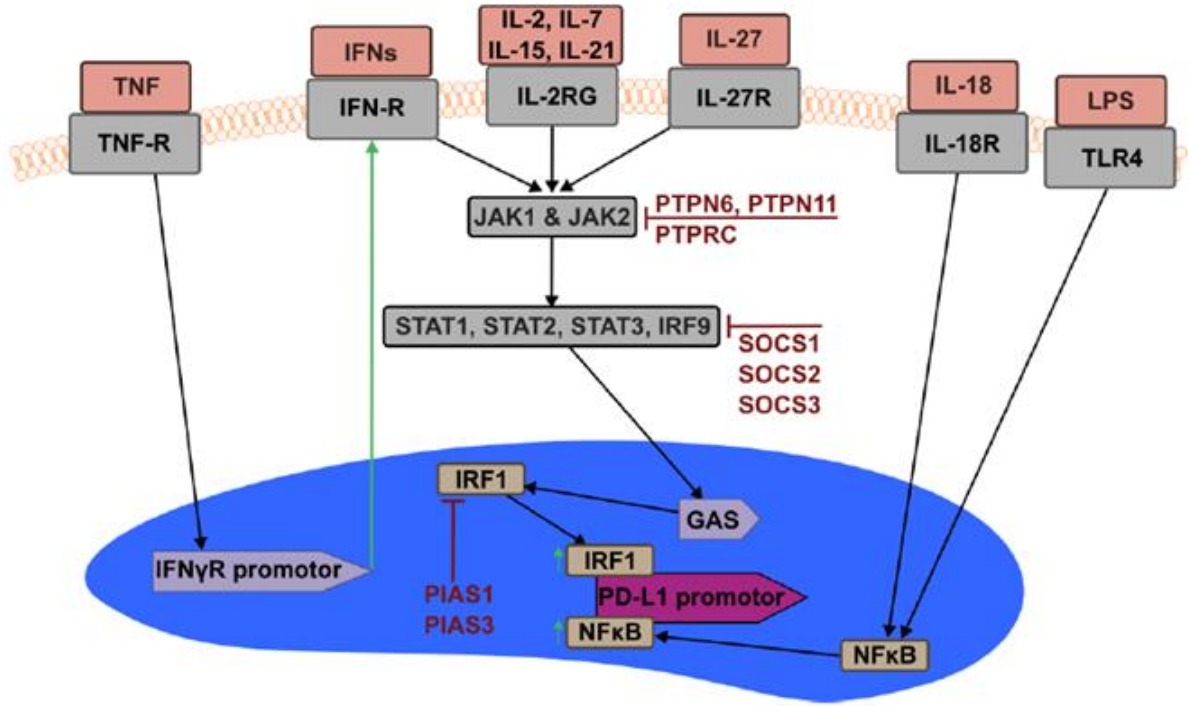
IL-12, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak hücre içi sinyalleri başlatır ve immün hücrelerinin etkinleştirilmesine, çoğalmasına ve farklılaşmasına yardımcı olur. Bunun sonucunda, T hücreleri etkin hale gelir ve enfekte hücreleri tanıyarak yok eder. NK hücreleri de IL-12 ile etkinleştirilerek enfekte hücreleri doğrudan öldürebilir veya virüs ve bakterilerin çoğalmasını engelleyebilir (109, 110).

IL-12'nin PD-L1 ekspresyonunu nasıl etkilediği konusunda çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Yapılan bazı çalışmalar, IL-12'nin, endotel hücreleri ve bazı monosit türevli makrofajlarda PD-L1 ekspresyonunu arttırdığını göstermektedir. Bununla birlikte, diğer çalışmalar, IL-12'nin THP-1 hücre grubundan türetilmiş makrofajlarda PD-L1 seviyelerini negatif olarak düzenlediğini göstermektedir (112). Bu çelişkili sonuçların nedenleri arasında kullanılan hücre tipleri, farklı dozlar veya sürelerde IL-12 maruziyeti, araştırma koşulları ve metodolojileri gibi faktörler yer alabilir. Ayrıca, IL-12'nin PD-L1 üzerindeki etkisi, farklı hücre tiplerinde farklı olabilir ve bu hücre tipleri arasında ciddi farklılıklar olabilir.

Bununla birlikte, bazı araştırmalar, IL-12'nin, özellikle tümör hücreleri ve kanserle ilişkili hücrelerde PD-L1 ekspresyonunu uyardığını göstermektedir (113, 114). Bu durum, tümör hücrelerinin, PD-L1 aracılığıyla immün sistemin saldırısından kaçınmalarına yardımcı olur. IL-12 ayrıca, PD-L1'in etkinliğini artırarak, immün sistemin kanser hücrelerine karşı daha az etkili olmasına neden olabilir. Bu nedenle, bazı kanser tedavilerinde, PD-L1 ve IL-12 düzeyleri birlikte değerlendirilir ve PD-L1'in aşırı ifadesinin IL-12 ile ilişkisi araştırılır. Ancak, IL-12'nin PD-L1 ekspresyonu üzerindeki etkisi, araştırma konusu olmaya devam etmektedir ve tam olarak anlaşılamamıştır

#### **2.8.5. Diğer yaygın gama zinciri interlökinleri**

IFN sinyalinin yanı sıra, sitokin reseptörü ortak alt birimi gama (“cytokine receptor common subunit gamma” IL2RG) aracılığıyla sinyal veren interlökinler (IL-2, IL-7, IL-15 ve IL-21) STAT1 ve STAT3'ü aktifleyebildiği gibi PD-L1 ekspresyonu da indükleyebilmektedir (115). Bu sitokinlerin çoğu, T hücreleri üzerindeki PD-L1 ekspresyonunu indükleme yeteneğine sahipken, IL-21'in bu etkiyi göstermediği saptanmıştır. Bununla birlikte, B hücrelerinde protein ekspresyonunu stimüle edebildiği gösterilmiştir [36]. Ayrıca immünsupresif nitelikteki sitokin IL-27'nin STAT1 aktivasyonu yoluyla PD-L1 ekspresyonunu indüklediği bildirilmiştir (116). Farklı bir sinyal yolağına sahip başka bir önemli proinflamatuvar sitokin olan TNF, IFN reseptörlerinin ekspresyonunu artırarak PD-L1'in yukarı regülasyonunda IFN ile sinerji oluşturmaktadır (117). IL-17 ise nitrik okside bağımlı bir mekanizma yoluyla bu indüksiyonu daha da artırma yeteneğine sahiptir (118).



**Şekil 2.5.** PD-L1 ekspresyonunun interferonlar ve sitokinler yoluyla düzenlenmesi

PD-L1 ekspresyonu, çok farklı sinyal yolları ile başlatılabilir. Bunların arasındaki en önemli yolak IFN sinyalidir. STAT faktörlerinin fosforilasyonu ve ardından çekirdeğe sinyal iletimi, IRF1'in ekspresyonunu tetikler ve bu da PD-L1 promotorunu aktive eder. TLR4 sinyali veya IL-18 aracılığıyla etkinleştirilen NFκB, PD-L1 promotorunu doğrudan etkinleştirebilir. TNF, IFN reseptörünü indükleyerek IFN ile sinerjistik olarak etki eder. PD-L1 ekspresyonu, çeşitli sinyal adımlarına müdahale edebilen farklı inhibitör nitelikteki faktörleri ile zayıflatılabilmektedir. Farklı modülatörlerin önemi hücre tipine göre değişiklik göstermektedir. (Beenen et al)<sup>123</sup>

Ek olarak, IL-10'un monositlerde (119) PD-L1 ekspresyonunu STAT3'e bağımlı bir şekilde (120) uyarabildiği bulunmuştur. Bununla birlikte, IL-10 hücre tipine bağlı olarak zıt etkiler gösterebilir. Kanser hücresi çalışmalarında bu hücrelerdeki daha yüksek IL-10 seviyelerine bağlı olarak IL-10 MAPK yolunu inhibe ederek PD-L1 ekspresyonlarında azalmaya yol açmıştır (121)

#### 2.8.6. PD-L1 indüksiyonunun negatif düzenleyicileri

Sinyal kaskadı boyunca birkaç adımı modüle edebilen çok sayıda inhibe edici faktör tanımlanmıştır. Tirozin-protein fosfataz non-reseptör tip ("tyrosine-protein phosphatase non-receptor type" PTPN)11, PTPN6 ve Protein Tirozin Fosfataz Reseptör tip C (PTPRC) gibi

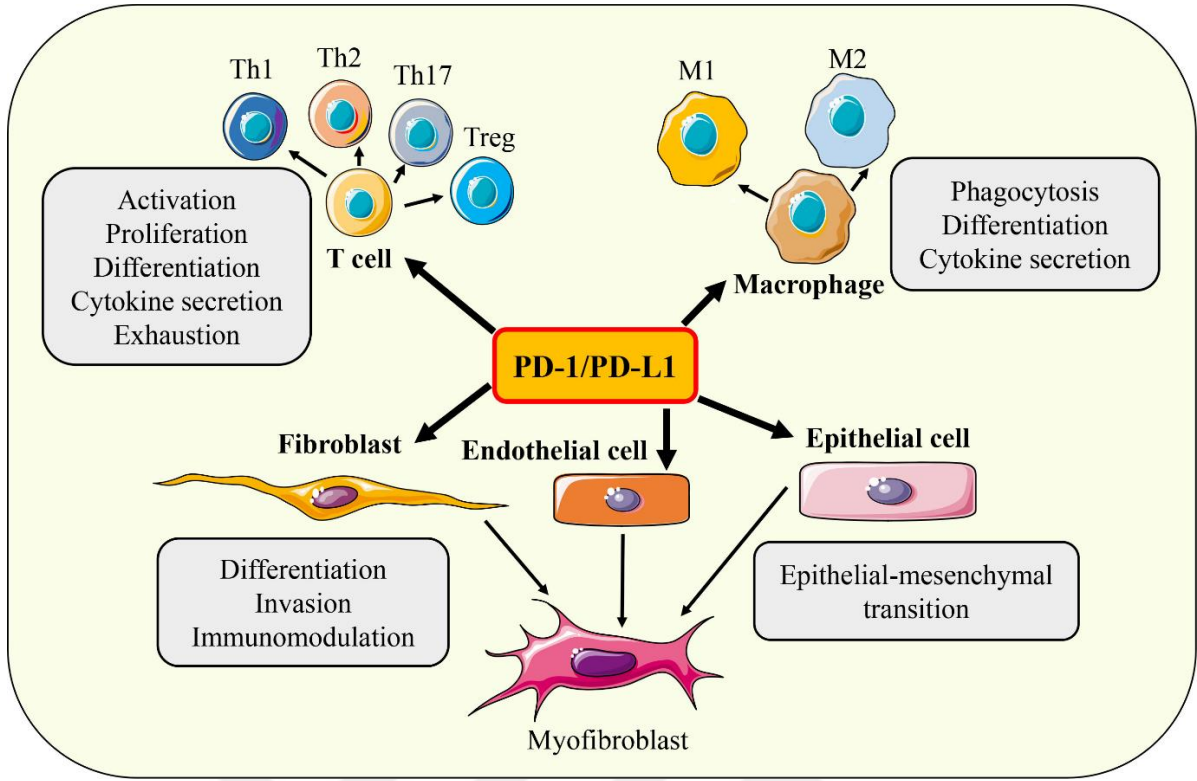
yukarı akış faktörleri JAK1 fosforilasyonunu inhibe ederler (**Şekil 2.5**). Sitokin Sinyalinin Bastırıcısı (“Suppressor Of Cytokine Signaling” SOCS) 1, SOCS2 ve SOCS3, STAT faktörleri üzerinde daha da fazla inhibisyon uygular. Fosforile STAT faktörleri ve eşlik eden interferon düzenleyici faktörlerin oluşturduğu kompleksler, Aktifleştirilmiş STAT1 Protein İnhibitörü (“Protein Inhibitor of Activated STAT1” PIAS)1 ve PIAS3 tarafından inhibe edilebilmektedir (122). Bu sonuçlar, PD-L1 ekspresyon düzenleyicilerindeki çeşitliliği ve çeşitli hücre tipleri arasındaki farklılıkları gösterir. Tüm bu düzenleyiciler arasında IFN ana indükleyicidir. Çeşitli sitokinlerin ve transkripsiyon faktörlerinin etkisine genel bir bakış Tablo 2.1’de verilmiş olup, bunların etkileşimi Şekil 2.5’te ayrıntılı olarak görselleştirilmiştir.

## 2.9. PD-1/PD-L1 Aksının Fonksiyonları

PD-1/PD-L1 ekseninin temel işlevi, bağışıklık toleransını korumak, inflamatuvar yanıtları ortadan kaldırmak ve doku hasarını önlemek için T hücrelerinin aşırı aktivasyonunu sınırlamaktır. T hücresinin proliferasyonu, farklılaşması, sitokin salgılaması, efektör işlevi, bağışıklık belleği, apoptoz ve tükenme biyolojik süreçlerinin tümü PD-1/PD-L1 sinyali ile düzenlenmektedir (**Şekil 2.6**). Ayrıca çeşitli immün hücrelerin (B hücreleri, makrofajlar, DC, NK hücreleri gibi) ve immün olmayan hücrelerin (fibroblastlar, epitel hücreleri, çeşitli tümör hücreleri) aktivasyonu, fagositozu, migrasyonu, invazyonu ve EMT’si gibi çeşitli hücrelerel aktiviteleri de PD-1/PDL1 aksı tarafından düzenlenmektedir (3, 7, 9, 11, 18, 23, 25).

**Tablo 2.1.** PD-L1 ekspresyonunun düzenlenmesiyle ilgili faktörler

| Molekül                        | PD-L1 İfadesi Üzerindeki Ana Etki                                                                               | Referans      |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>JAK1 &amp; JAK 2</b>        | Yukarı akış kinazı: Her biri PD-L1 ekspresyonu için gereklidir<br>Her biri olmadığında PD-L1 mRNA azalır        | 122           |
| <b>TYK2</b>                    | Yukarı akış kinazı: PD-L1 ekspresyonu için gereklidir                                                           | 122           |
| <b>IRF1</b>                    | PD-L1 promotor işlevi için temel faktör: PD-L1 ekspresyonu için gereklidir; yokluğunda PD-L1 ekspresyonu azalır | 122           |
| <b>IRF9</b>                    | Aşağı akış kinazı: PD-L1 ekspresyonu için gereklidir                                                            | 122           |
| <b>STAT1, STAT2, STAT3</b>     | İnhibe olduklarında PD-L1 ekspresyonundaki etkileri azdır<br>PD-L1 ifadesi için STAT3 gereklidir                | 122           |
| <b>PTPN11, PTPN6, PTPRC</b>    | JAK1 aktivasyonunun negatif düzenleyicileridir                                                                  | 122           |
| <b>SOCS1, SOCS2, SOCS3</b>     | STAT faktörlerinin inhibitörleri                                                                                | 122           |
| <b>IFN-<math>\alpha</math></b> | PD-L1 ekspresyonunu uyarır; DC'lerde PD-L1'i artırır                                                            | 117           |
| <b>IFN-<math>\beta</math></b>  | PD-L1 ekspresyonunu uyarır                                                                                      | 124           |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | PD-L1 ifadesinin başlıca indükleyicisidir; TNF ile birlikte daha yüksek PD-L1 mRNA ekspresyonuna neden olur     | 118, 125, 126 |
| <b>IL-2</b>                    | PD-L1 ekspresyonunu uyarır                                                                                      | 115           |
| <b>IL-7</b>                    | PD-L1 ekspresyonunu uyarır                                                                                      | 115           |
| <b>IL-10</b>                   | Monositlerde PD-L1'i uyarır; kanser hücrelerinde ise PD-L1 ekspresyonunu azaltır                                | 126           |
| <b>IL-15</b>                   | PD-L1 ekspresyonunu uyarır                                                                                      | 115           |
| <b>IL-17</b>                   | PD-L1 ekspresyonunu uyarır; IFN ve TNF ile kombinasyon halinde PD-L1 ekspresyonu daha fazla uyarır              | 118, 126      |
| <b>IL-18</b>                   | Breg'de PD-L1 ifadesini artırır                                                                                 | 115           |
| <b>IL-21</b>                   | PD-L1 ekspresyonu üzerinde stimüle edici etki                                                                   | 126           |
| <b>IL-27</b>                   | PD-L1 ekspresyonunu uyarır                                                                                      | 116           |
| <b>TNF</b>                     | PD-L1 ekspresyonunu uyarır; IFN ile kombinasyonunda PD-L1'in ekspresyonunu artırır                              | 118, 126      |
| <b>LPS</b>                     | İnsan monositlerinde PD-L1 mRNA'nın yukarı regülasyonu;<br>Kolorektal kanser hücrelerinde ekspresyon artışı     | 125           |



**Şekil 2.6.** PD-1/PD-L1 aksamının fonksiyonları

Farklı koşullar altında, PD-1/ PD-L1 aksı sırasıyla T hücrelerinin, makrofajların, fibroblastların, epitel hücrelerinin ve endotel hücrelerinin aktivasyonunu, çoğalmasını, farklılaşmasını, sitokin salgılanmasını, tükenmesini, fagositozunu, invazyonunu, göçünü ve EMT'sini düzenleyebilmektedir. (Zhao, Y et al. 2023)<sup>45</sup>

### 2.9.1. T hücre fonksiyonunun PD-1/PD-L1 aksı ile düzenlenmesi

T hücrelerinin aktivasyonu, iki sinyalin sinerjisine bağlıdır. İlk sinyal, APC'nin yüzeyindeki antijen peptit-MHC molekülü kompleksinin T hücresi reseptörüne bağlanması ile meydana gelir. İkinci sinyal, APC üzerindeki CD80 (B7.1) ve CD86 (B7.2) yardımcı uyarıcı moleküllerin T hücresi uyarıcı bağışıklık kontrol noktası CD28'e bağlanması sonucu gerçekleşir (**Şekil 2.7**). İkinci sinyalin yokluğunda, T hücreleri tam olarak aktive olmaz ve bu durumda T hücreleri anejik veya toleranslı bir duruma girer ve bağışıklık sisteminde yetmezlik gelişir (127).

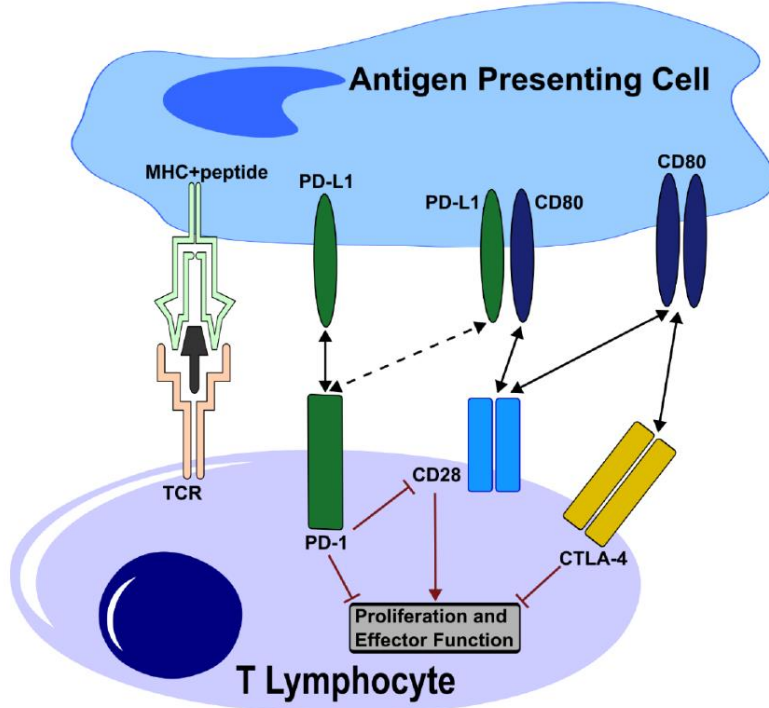
T hücresi aktivasyonunun erken aşamasında, bağışıklık kontrol noktası molekülleri olarak adlandırılan T hücrelerinin aşırı aktivasyonunu sınırlamak için çok sayıda negatif düzenleyici faktör indüklenir. CTLA-4, CD28 sinyalini inhibe etmek için APC'nin yüzeyindeki yardımcı uyarıcı molekülleri (CD80 ve CD86) rekabetçi bir şekilde bağlayarak T hücresi aktivasyonunu sınırlayan ilk tanımlanmış bağışıklık kontrol noktasıdır (2, 10, 25,

128). PD-1, aktive edilmiş T hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen bir başka önemli inhibe edici bağışıklık kontrol noktasıdır (1, 3, 11, 16). PD-1, ligandları PD-L1 ve PD-L2 ile birleşerek, TCR ve CD28 gibi T hücresi aktivasyon sinyallerini antagonize eder (**Şekil 2.7**). PD-1/PD-L1 yolu, T hücresi aktivasyonu, farklılaşması, çoğalması, sitokin salgılanması ve apoptozun biyolojik süreçlerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve T hücresi toleransı ve homeostazı korumak için anahtar bir sinyaldir. Bu nedenle, PD-1/PD-L1 sinyalinin kaybı, otoimmün hastalığa neden olurken, hiperaktif PD-1 sinyali, azalmış immün sürveyansa yol açar (1, 3, 12-15, 28). Tümör mikroçevresinde, tümör hücreleri, PD-L1'in ekspresyonunu artırır ve T hücrelerinin yüzeyinde PD-1 ile birleşir, ayrıca CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin tükenmesine neden olur ve bağışıklık kaçışını sağlamak için tümör öldürme yeteneklerini zayıflatır (14, 16, 22). Sonraki klinik deneyler, PD-1/PD-L1 sinyal yolunun hedeflenen inhibisyonunun, anti-tümör bağışıklık tepkisini sürekli olarak aktive edebildiğini, tümör büyümesini inhibe edebildiğini ve hastaların hastalık yükünü azaltabildiğini doğrulamıştır (17, 19, 22).

Sonuç olarak, PD-1/PD-L1 aksı, T hücresi bağışıklığının ana düzenleyicisidir. PD-1/PD-L1 sinyal yolunun hedeflenen inhibisyonu veya aktivasyonu, T hücrelerine bağlı adaptif bağışıklığın işlev bozukluğunu iyileştirebilir, bağışıklık homeostazını eski haline getirebilir ve böylece bağışıklıkla ilgili hastalıkları tedavi edebilir.

### **2.9.2. Makrofaj fonksiyonlarının PD-1/PD-L1 aksı tarafından düzenlenmesi**

Makrofajlar, oldukça esnek ve çok yönlü immünomodülatör yetenekleri sayesinde çok farklı, karmaşık fizyolojik ve patolojik immün yanıtlarda yer alırlar. Tümör mikroçevresindeki tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'ler), T hücrelerinin antitümör efektör fonksiyonunu inhibe ederek PD-1/PD-L1 sinyal yolunu ele geçirir ve tümör hücrelerinin bağışıklıktan kaçış yeteneğini geliştirirler. Öte yandan, TAM'lerin fenotipik özellikleri ve işlevleri de PD-1/PD-L1 sinyali ile düzenlenmektedir (129). PD-1/PD-L1 sinyali, makrofaj fagositozu, sitokin üretimi ve polarizasyonun kontrol edilmesi gibi birçok yolla makrofajların immün yanıtlarını düzenlemektedir. Fagositoz, makrofajların efektör işlevleri arasındaki en önemli fonksiyondur (129, 130).



**Şekil 2.7.** PD-L1 aracılı blokaj yoluyla T-hücre fonksiyonunun inaktivasyonu

TCR'nin aktivasyonuna paralel olarak, PD-L1, T hücrelerine inhibe edici bir sinyal ileten PD-1 ile birleşir. PD-L1 ayrıca CD80'i bağlayarak bir heterodimer oluşturabilir ve CD80 homodimerini çözer. Bu durum, CD28'in bağlama yeteneğini korurken CD80-CTLA-4 etkileşimini önler. PD-1-PD-L1 etkileşimi, PD-1'i aktive ederek CD28'in fosforilasyonuna yol açar ve CD28 yoluyla T-hücresinin ko-stimülasyonunu önler. Siyah oklar, proteinler arasındaki bir etkileşimi gösterirken, kırmızı çekiçler ve oklar, sırasıyla bir inhibe edici ve aktive edici bir etkiyi gösterir. (Beenen et al)<sup>123</sup>

TAM'lerde PD-1'in ekspresyonu belirgin şekilde yüksektir ve yüksek oranda PD-1 ekspresyonu olan TAM'ler köpük hücreleri olarak ortamda izlenir. Ayrıca bazı çalışmalar, PD-1 pozitif TAM'lerin fagositoz yeteneğinin önemli ölçüde azaldığını bildirmiştir. Bundan dolayı, PD-1/PD-L1 sinyalini bloke edilmesi sonucu makrofajların tümör hücrelerini fagosit etmesi artar ve böylece makrofaj ilişkili anti-tümör bağışıklık tepkisinde artırılmış olur (129, 130). Sitokinlerin salgılanması, makrofajların immünomodülatör etkiler gösterdiği mekanizmalardan biridir. Kronik hepatit C virüsü enfeksiyonu olanlarda, PD-1/PD-L1 sinyali STAT1 yolağını etkileyerek IL-12 ekspresyonunu azaltabilmektedir (131,132).

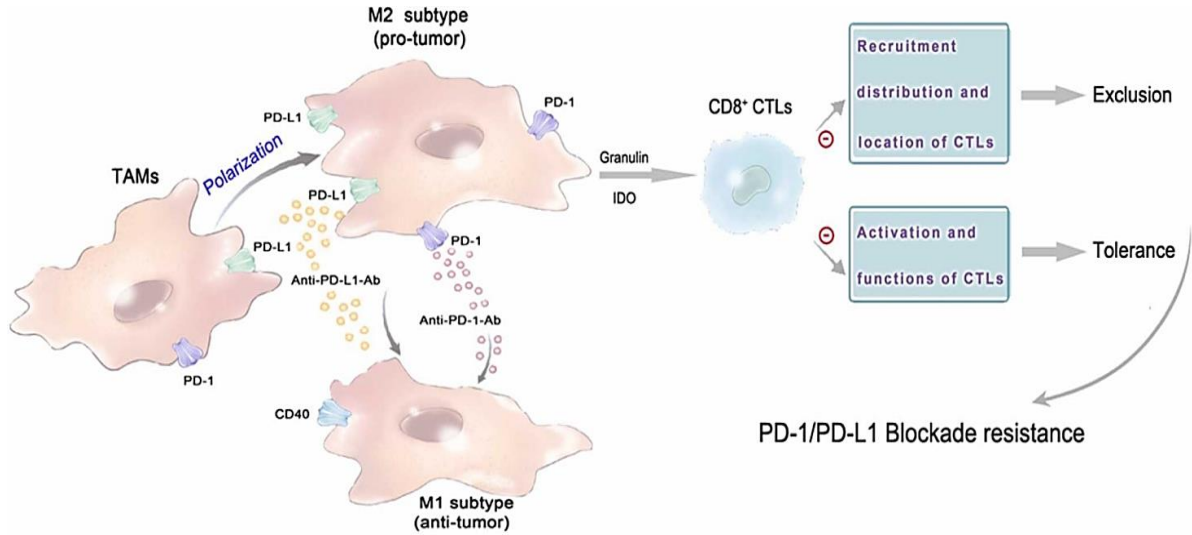
Makrofajların fonksiyonları, fenotipik geçişleriyle değişiklik gösterir. Örneğin, M1 makrofajları esas olarak proinflamatuvar bir rol oynarken, M2 makrofajları esas olarak immünosüpresif bir işlev görür. TAM'ler genellikle yüksek PD-1 ekspresyonu ile CD206 ve

CD11c gibi M2 makrofajla ilişkili belirteçleri de yüksek oranda eksprese etmektedir (129). Bu durum PD-1/PD-L1 sinyalinin M2 makrofaj polarizasyonuna dahil olduğunu göstermektedir (**Şekil 2.8**). PD-1 spesifik olarak devre dışı bırakıldığında, makrofajların M1 tipine aktive olduğu ve çeşitli proinflatuar faktörleri salgıladığı izlenmiştir. Ayrıca, PD-1/PD-L1 sinyali, aktif hale gelmiş makrofajların yüzeyindeki CD80 ve CD86 ve MHC moleküllerinin ekspresyonunu inhibe ederek makrofajların adaptif bağışıklık hücrelerine aracılık etme yeteneklerine de müdahale edebilmektedir (131). Sonuç olarak, PD-1/PDL1 sinyali, immün homeostazı korumak için makrofaj fonksiyonunu çoklu yollarla düzenleyebilmektedir.

### **2.9.3. Epitel hücre fonksiyonlarının PD-1/PD-L1 aksı ile düzenlenmesi**

Epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere (“Epithelial to Mesenchymal Transition”- EMT) geçişi, fibrotik yanıtta önemli bir hücresel olaydır. EMT oluşumunun tümör invazyonu ve metastazı ile olan yakın ilişkisi bilinmektedir (**Şekil 2.9**) (133, 134). Ek olarak, PD-L1 ve EMT arasındaki yakın ilişki, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, meme kanseri, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom gibi çeşitli tümörlerde gösterilmiştir (134,135). Çok farklı tümör dokularında PD-L1 stromal hücrelerde yüksek oranda eksprese edilirken, epitel hücrelerinde düşük düzeyde eksprese olmaktadır. PD-L1 ekspresyon derecesi, Snail, ZEB1, Vimentin ve N-cadherin gibi EMT belirteçlerinin ekspresyonları ile pozitif korelasyon gösterirken, epitelyal bir işaretleyici olan E-kadherin ekspresyonu ile negatif korelasyon göstermektedir (136,137). Crk proteini, EMT’nin belirteçleri olan ZEB1 ve N-cadherin ekspresyonunu desteklemede oldukça önemli bir rol oynar. Crk proteini spesifik olarak devre dışı bırakıldığında, PD-L1’in ekspresyonu da önemli ölçüde inhibe olmaktadır (138).

Ek olarak, MUC1, NF- $\kappa$ B/ZEB1 yolunu aktive ederek EMT’yi indükleyebilmektedir. NF- $\kappa$ B’nin p65 alt birimi transkripsiyonunu desteklemek için doğrudan PD-L1 promotörüne bağlanmaktadır (139). EMT’nin ana indükleyicisi olan TGF- $\beta$  de, PI3K/AKT ve MEK/ERK sinyal yollarını aktive ederek, PD-L1’in ekspresyonunu düzenleyebilmektedir (140, 141).

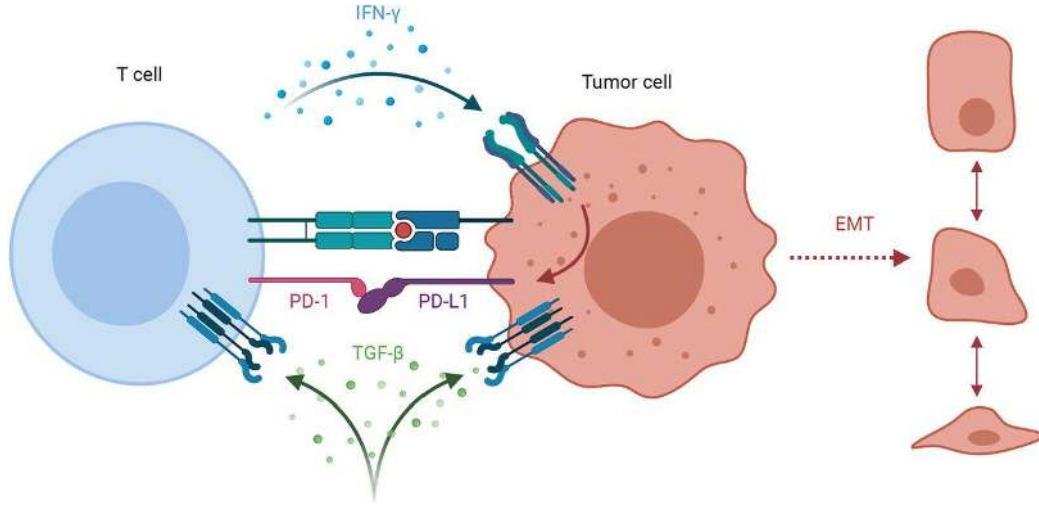


**Şekil 2.8.** PD-1/PD-L1 aksı ve makrofaj fonksiyonu

PD-L1'in yüksek ekspresyonu ile TAM'lerin M2 polarizasyonu arasında önemli ölçüde ilişki mevcuttur. TAM'lerdeki PD-L1 ekspresyonu TAM'lerin M2 polarizasyonunu modüle eden kritik sinyal yollarıyla ilişkilidir. PD-L1'in insan tümörlerinde TAM'lerin aktivasyonuna ve M2 polarizasyonuna katkıda bulunabileceğini gösterilmiştir. Büyük miktarlarda PD-L1 taşıyan eksozomlar, M2 makrofaj polarizasyonuna yol açarlar ve TAM ile ilişkili PD-1/PD-L1 blokaj direncini indüklerler. M2 polarize TAM'ler, granülin gibi biyoaktif moleküller salgılayarak CD8<sup>+</sup> CTL'lerin toplanmasını, dağılımını ve lokalizasyonunu engelleyebilirler. Öte yandan, M2 TAM'den türetilen IDO, CD8<sup>+</sup> CTL'lerin aktivasyonunu ve fonksiyonlarını bozabilir, bu da tümöral antijenlere karşı patolojik immün toleransla sonuçlanır. M2-polarize TAM'ler tarafından ortaya çıkan hem T-hücre dışlaması hem de tolerans, PD-1/PD-L1 blokaj direncine katkıda bulunur.

*PD-1, programlanmış hücre ölümü proteini 1; PD-L1, programlanmış hücre ölümü ligandı 1; TAM, tümörle ilişkili makrofajlar; CTL, sitotoksik T hücreleri; IDO, indoleamin 2,3-dioksijenaz.*

Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, EMT'yi düzenleyen anahtar sinyallerin aynı anda PD-L1 ifadesini de etkileyebileceğini göstermektedir. Ek olarak, PD-L1 ekspresyonunun artışı da EMT'yi indükleyebilmektedir. Glioblastomalı vakalarda, PD-L1'in Slug ve  $\beta$ -katenin'i aktive ederek EMT belirteçleri olan N-cadherin ve vimentin'in ekspresyonlarını artırdığı gösterilmiştir (142). Ayrıca PD-L1 ekspresyonunun renal hücreli kanser hücrelerinin göçünde rolü olduğu gösterilmiş olup, PD-L1'in inhibe edilmesi sonucu EMT belirteçleri olan vimentin ve F-aktin ekspresyonlarının da belirgin şekilde azaldığı izlenmiştir. PD-L1'in aşırı ekspresyonu, transkripsiyon faktörü sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1'i ("Transcription factor sterol-regulatory element binding protein 1" SREBP1) aktive ederek EMT'yi indüklemektedir (143). Sonuç olarak, PD-L1'in ekspresyonu, EMT gelişimi ile yakından ilişkilidir. EMT gelişimini başlatan çoklu sinyaller, PD-L1'in ekspresyonunu artırabilirken, artmış PD-L1 ekspresyonu da EMT sürecini indükleyebilmektedir.



**Şekil 2.9.** Epitelyal-Mezenkimal transformasyon (EMT) ve İnterferon gama (IFN $\gamma$ ) ile indüklenen PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişkiye şematik genel bakış

IFN $\gamma$  kaynaklı PD-L1 ekspresyonu, EMT oluşumunu teşvik eder. Ayrıca, TGF $\beta$  tarafından indüklenen EMT, PD-L1 ekspresyon seviyelerini artırarak tümör immünoinvazyonunu kolaylaştırır. (Alsuliman et al.)<sup>141</sup>

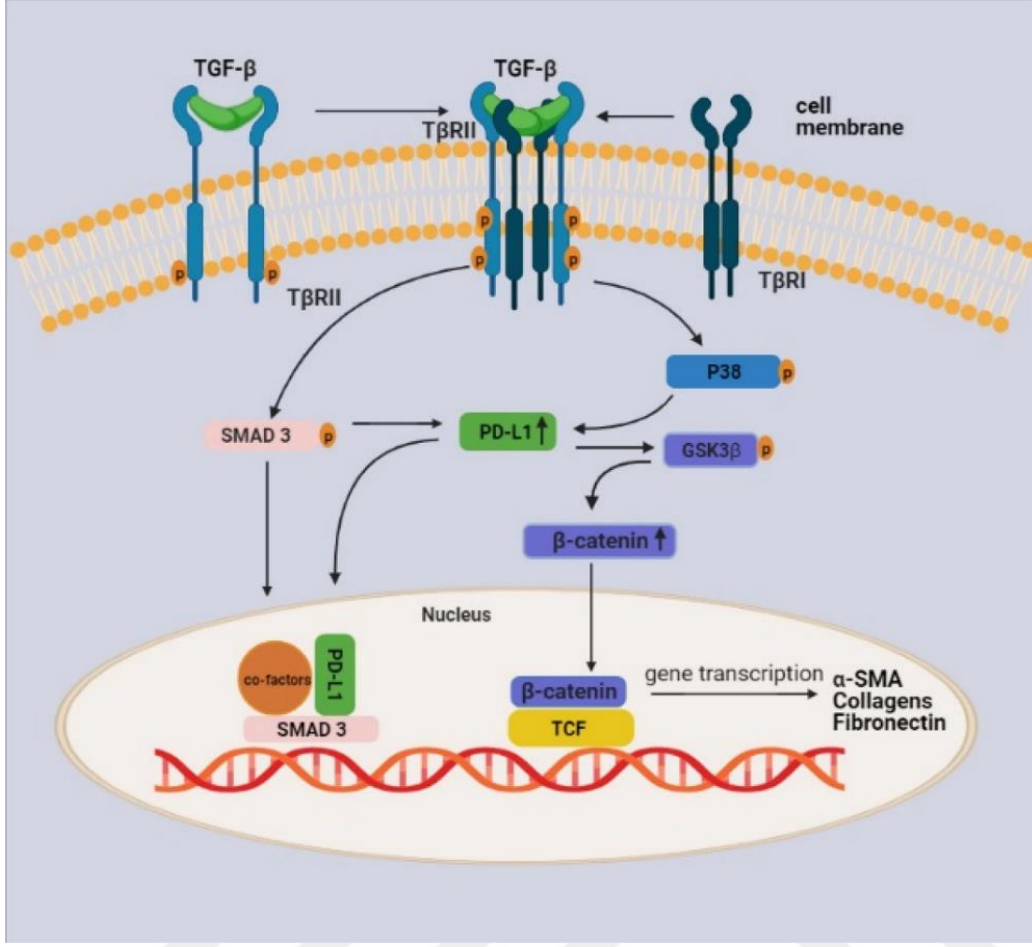
#### 2.9.4. Fibroblast fonksiyonlarının PD-1/PD-L1 aksı ile düzenlenmesi

Fibrotik yanıtta, fibroblastlar, miyofibroblastların ana kaynağıdır. Fibroblastların aktivasyonu, istilası ve immün düzenleyici işlevleri de PD-1/PD-L1 sinyal yolu tarafından düzenlenebilmektedir. TGF- $\beta$ , fibroblastların miyofibroblastlara transdiferansiyasyonunu indükleyen en önemli büyüme faktörüdür (90-92). Birçok çalışma, fibroblastların aktivasyonu sırasında TGF- $\beta$ 'nın PD-L1'in ekspresyonunu artırdığını göstermiştir (93-96). Ayrıca PD-L1 aracılı sinyal, fibroblast aktivasyonu için de gereklidir (**Şekil 2.10**). Primer insan akciğer fibroblastlarında TGF- $\beta$ , PD-L1 ekspresyonunu indükler ve SMAD3, p38 ve PDZ-bağlama motifi (YAP/TAZ) sinyallemesine sahip yes-ilişkili protein/transkripsiyonel ko-aktivatöre bağlı olarak transdiferansiyasyonu teşvik eder. PD-L1'in siRNA tarafından susturulmasından sonra, fibroblastlardaki alpha-SMA, kollajen I ve fibronektin ekspresyon seviyeleri önemli ölçüde azalmaktadır (144). Mekanik olarak, PD-L1 bir kofaktör görevi görür ve bir protein kompleksi oluşturmak için anahtar transdiferansiyasyon transkripsiyon faktörü SMAD3'e bağlanır ve ardından  $\alpha$ -SMA gibi transdiferansiyasyon genlerinin transkripsiyonunu doğrudan aktive eder. Öte yandan, PD-L1, fibroblastların aktivasyonunu dolaylı olarak teşvik etmek için GSK3 $\beta$ / $\beta$ -katenin sinyalinin transdüksiyonuna da aracılık eder. PD-L1'in, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla otofajiyi bozarak TGF- $\beta$  ile indüklenen fibroblast transdiferansiyasyonunu desteklediği de gösterilmiştir (95, 144). Monoklonal antikor kullanılarak PD-L1 inhibe edildiğinde, otofaji aktivitesi eski

haline gelirken fibroblast aktivasyonu ise önlenmektedir (145). Bu nedenle, PD-L1, fibroblastların aktivasyonunu düzenlemek için transdiferansiyasyonla ilgili çoklu sinyal yollarının aktivitelerini koordine etmek için bir ara ürün olarak hareket etmektedir. Ek olarak, PD-L1, fibroblastların invaziv fenotipinin devamlılığında da önemli bir faktördür. İdiyopatik pulmoner fibrozisli (IPF) hastaların akciğer dokusunda yüksek PD-L1 ekspresyonu gösteren invaziv fibroblastlar, pulmoner fibrozisin ilerlemesi ile yakından ilişkilidir. Yüksek derecede PD-L1 ekspresyonu gösteren normal fibroblastların invazyon ve göç yeteneklerinin arttığı saptanmıştır. İnvaziv fibroblastların immün yetmezliği olan farelere enjeksiyonu sonucu bu farelerde belirgin olarak pulmoner fibrozisin indüklendiği izlenmiştir (146). Ayrıca PD-L1 eksprese eden fibroblastlar, T-hücresi ilişkili bağışıklık yanıtlarını da düzenleme kabiliyetleri vardır. In vitro çalışmalarda TGF- $\beta$ 'nın fibroblastların aktivasyonu sırasında hücre zarı üzerinde PD-L1 ekspresyonunu arttırdığı ve fibroblastları PD-L1 içeren eksozomlar salgılamaya teşvik ettiği gösterilmiştir (147). Bu salgılanan PD-L1 pozitif eksozomların ise T hücrelerinin çoğalmasını engelleyebildiği bildirilmiştir. İn vivo çalışmalar ise PD-L1'in fibrotik akciğerdeki fibroblastlar üzerindeki yukarı regülasyonunun, T hücrelerinin tükenmesine neden olabileceğini ve immünoşüpresif mikroçevre oluşumunu destekleyebileceğini göstermiştir (148). Sonuç olarak, PD-1/PD-L1 sinyali, fibroblastların aktivasyonunu ve immünomodülatör kapasitelerini düzenleyerek fibrotik cevaba doğrudan veya dolaylı olarak katılabilmektedir.

#### **2.9.5. PD-1/PD-L1 aksının endotel hücre fonksiyonları üzerine etkisi**

Endotel hücreleri, lökosit fonksiyonunu inhibe eden immün kontrol noktaları ve immün hücrelerin apoptozunu indükleyen PD-L1 molekülleri eksprese ederler (**Şekil 2.11**). Ayrıca epitel hücreleri gibi, endotel hücreleri de belirli uyarılar altında doğrudan miyofibroblastlara dönüşebilir veya bağışıklık tepkilerini modüle ederek fibrozise katılabilirler (149). Bununla birlikte, sadece az sayıdaki çalışma endotel hücre aracılı PD-1/PD-L1 sinyalinin fibrozisdeki rolüne odaklanmıştır (149-152). Radyasyon tedavisinin neden olduğu pulmoner fibroziste, PD-L1 pozitif endotel hücreleri TGF- $\beta$ 'yı birlikte eksprese eder (150). PD-L1 ve TGF- $\beta$ 'nın inhibitörü olan Bintrafusp alfa adlı ilacın, radyasyon tedavisinin neden olduğu pulmoner fibrozisi önemli ölçüde iyileştirdiği izlenmiştir (150).



**Şekil 2.10.** TGF-β tarafından indüklenen fibroblasttan miyofibroblasta transformasyon (FMT) sürecinin PD-L1 tarafından düzenlenmesi

Aktif TGF-β'nın hücre yüzeyi reseptörleri (TGF reseptörü I ve II, TβRI ve TβRII) ile bağlanması, Smad3'ü daha fazla fosforile eden ve ortamda artışını sağlayan reseptör kinazı aktive eder. Aktiflenen Smad3 daha sonra, FMT ile ilgili genlerin transkripsiyonunu aktive etmek için diğer yardımcı faktörlerle bağlandığı çekirdeğe doğru geçer. PD-L1, TGF-β'nın aşağı regülasyonundaki Smad3 ve p38 yolları ile artırılabilir. Artan PD-L1, Smad3'e daha fazla bağlanır ve α-SMA dahil olmak üzere FMT genlerinin transkripsiyon aktivasyonunu artırır. Ek olarak, PD-L1 ayrıca Ser9'da GSK3β fosforilasyonunu kolaylaştırır ve böylece β-katenin'in GSK3β'ya bağlı azalmasını inhibe eder. Artan β-katenin, transkripsiyon faktörü T hücre faktörü (TCF) ile bağlanarak TGF-β ile indüklenen FMT gen ekspresyonuna da katkıda bulunabilir.

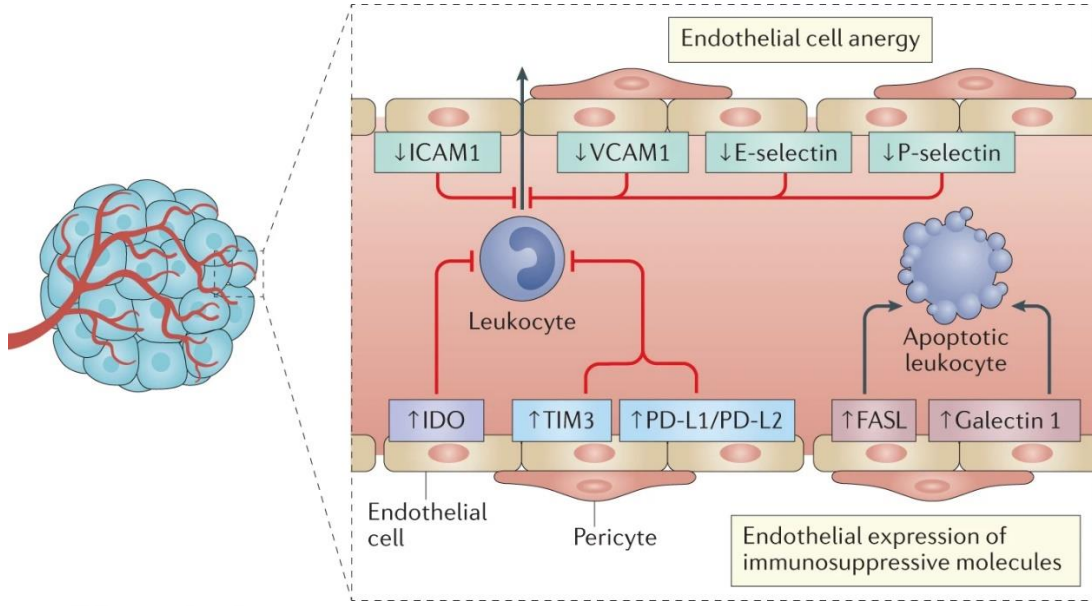
Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde görülüyorki, endotel hücre aracılı PD-L1 sinyali profibrotik niteliğe sahiptir. Artmış endotel PD-L1 ve TGF-β ekspresyonu bir profibrotik yanıtı doğrudan aktive ederken, bağışıklığı baskılayıcı bir mikro ortamın da gelişmesine neden olabilmektedir. Bununla birlikte, pulmoner arteriyel hipertansiyon ile ilişkili fibrozisde, sağ ventrikül vasküler endotel hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunun Treg tarafından sürdürülmesi, fibrozisin inhibisyonu için önemlidir. Treg tükendiğinde, endotel hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonun azaldığı ve bunun sonucu olarak sağ ventrikülde

inflamasyonun ve fibrozisin önemli ölçüde şiddetlendiği saptanmıştır (153). Bu bulgu, Treg'in endotel hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunu indükleyerek inflamasyonu ve fibrozisi baskılayabildiğini düşündürmektedir.

İlginç bir şekilde, murin vasküler endotel hücreleri, PD-L1 ilişkili bir şekilde allojenik Treg oluşumunu indükleyebilir ve bu indüklenen Treg'ler, alloreaktif T hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edebilirler (154). Birçok durumda, Treg'ler, IL-10 ve TGF- $\beta$  gibi immünosupresif ve profibrotik faktörleri serbest bırakarak fibrozisin ilerlemesini teşvik eder. Bu durum, endotel hücrelerinin, PD-L1 sinyali yoluyla Treg aktivasyonunu indükleyerek fibrozisi dolaylı olarak desteklediğini düşündürmektedir.

Bir murin kalp allograft modelinde, “Lymphotoxin-Beta” reseptörünün blokajı, vasküler endotel hücrelerde PD-L1 ekspresyonunda azalmaya neden olarak kardiyak inflamasyon ve fibrozis gelişiminde indüksiyona neden olmuştur (155). Ek olarak, PD-L1'in endotel hücrelerinde ekspresyonu, immün toleransın korunması için de önemlidir. SARSCoV-2'nin neden olduğu akciğer hasarının erken evresinde, pulmoner venüller ve kılcal damarların endotel hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunda önemli bir artışla izlenirken, damarlarda belirgin şekilde proliferasyon, dilatasyon ve distorsiyon saptanmıştır. Enfeksiyonun şiddetlenmesiyle birlikte, akciğer hasarı kademeli olarak fibroze dönüşürken, endotel hücrelerde devamlılık gösteren yüksek seviyelerde PD-L1 ekspresyonu gösterilmiştir (156).

Sonuç olarak tüm bu bulgular endotel hücrelerindeki PD-L1 sinyalinin fibrojenin önemli bir düzenleyicisi olduğunu göstermektedir.



**Şekil 2.11.** Endotel hücresi PD-L1 ekspresyonu

Endotel hücreleri, lökosit fonksiyonunu inhibe eden immün kontrol noktaları ve immün hücrelerin apoptozunu indükleyen PD-L1 molekülünü eksprese ederler. Pro-anjiyojenik faktörlerin bağışıklık hücreleri üzerindeki doğrudan inhibe edici etkisi ve hipoksik ortam durumları da endotel aracılı anergi oluşumuna neden olabilmektedir. (Huinen et al)<sup>152</sup>

## 2.10. PD1 ve PD-L1 Ekspresyonlarının Çevresel Faktörler ile İlişkisi

PD1/PD-L1 yolağının işleyişi, çevresel faktörlerden etkilenebilir. Zamanlama, konum, T-lenfosit farklılaşma durumu, antijen yükü, inflamasyonun derecesi, sitokin yükü, metabolik durum ve diğer faktörlerin tümü, PD1'in ligandlara bağlanmasının fonksiyonel sonucunu etkiler (1,6,9). Örneğin, inflamatuvar bir ortam, yani yüksek sitokin düzeylerinin olduğu bir ortam, T hücre aktivasyonunu artırır ve bu da PD1/PD-L1 yolağı aktivitesinin azalmasına neden olabilir. Bu durum, T hücrelerinin aşırı aktive olmasına ve immün sistemde aşırı aktivasyona neden olabilir ve otoimmün hastalıklar gibi durumlara yol açabilir (9). Ayrıca, kanser hücreleri de bu yoldan bağışıklık sisteminden kaçabilirler (19,21). Bununla birlikte, immünosupresif bir ortamda, yani düşük sitokin düzeylerinin olduğu bir ortamda, PD-L1/PD-1 yolağı daha aktif hale gelebilir ve T hücre aktivasyonunu baskılayabilir. Bu durum, bağışıklık sistemi tarafından kabul edilemeyen yabancı maddelerin (örneğin, organ transplantı gibi) reddedilmesine karşı önlem olarak kullanılabilir (9,20,21). Ancak PD1/PD-L1 yolağındaki bu aktivasyon tümörlerin bu durumdan faydalanmasına neden olarak tümörün yok edilmesini önler (19,21). Bu nedenle, tümörün

eradike edilmesini sağlayabilmek için bağışıklık sistemini harekete geçirmek ve immünoterapi gibi tedaviler ile sitokin düzeylerini artırmak önemli bir strateji olacaktır.

T-lenfositler, farklılaşma aşamalarında PD1 ve PD-L1 ifade edebilirler. Özellikle farklılaşmanın ileri aşamalarında, PD1 ifadesi artar ve lenfositlerin aktivitesini düzenler. PD-L1 ise, lenfositlerin aktivitesini baskılayabilir. Bu nedenle, T-lenfositlerin farklılaşma durumu, PD1/PD-L1 yolağının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (1, 11, 18, 25).

#### **2.10.1. Lenfosit farklılaşma aşamalarındaki PD1 ve PD-L1 ekspresyon farklılıklarına genel bakış**

- **Naif (düşük aktivasyonlu) lenfositler:** Naif lenfositler genellikle PD1 ve PD-L1 ekspresyonu düşüktür. Bu nedenle, bağışıklık sisteminin normal işlevi sırasında, naif lenfositlerin aktivitesi PD1/PD-L1 yolağı tarafından düzenlenmez.

- **Aktive edilmiş (T-hücresi reseptörü stimülasyonu sonrası) lenfositler:** Aktive edilmiş lenfositler genellikle PD1 ekspresyonu artar ve PD-L1 ekspresyonu da artabilir. Bu, lenfositlerin aktivitesinin düzenlenmesine ve bağışıklık yanıtının kontrol edilmesine katkıda bulunur.

- **Farklılaşmış (effektor) lenfositler:** Farklılaşmış lenfositler genellikle PD1 ekspresyonu yüksektir. Bu, lenfositlerin aktivitesinin düzenlenmesine ve bağışıklık yanıtının kontrol edilmesine katkıda bulunur.

#### **2.10.2. PD-L1 ekspresyonu farklılaşmış lenfositlerin alt kümesine göre değişir**

- **CD8+ T hücreleri:** CD8+ T hücreleri, sitotoksik T hücreleri olarak da bilinirler ve enfekte hücreleri tanıyıp öldürerek bağışıklık yanıtına katkıda bulunurlar. CD8+ T hücreleri, bazı durumlarda PD-L1 ekspresyonu artırabilirler. Örneğin, virüs enfeksiyonları sırasında, virüs tarafından enfekte edilen hücreler PD-L1 ekspresyonu artırarak CD8+ T hücrelerinin aktivasyonunu kontrol edebilir.

- **T regulator hücreleri:** T regulator hücreleri, bağışıklık sistemi yanıtını inhibe eden hücrelerdir ve otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılan immünsupresif ilaçların hedefi olabilirler. T regulator hücreleri, bazı durumlarda yüksek seviyelerde PD-L1 ekspresyonu gösterebilirler. Bu, lenfosit aktivitesini baskılayarak bağışıklık yanıtını düzenlemeye katkıda bulunabilir.

- **B hücreleri:** B hücreleri, bazı durumlarda PD-L1 ekspresyonu gösterebilirler. Örneğin, yüksek PD-L1 ekspresyonu gösteren B hücreleri, lenfoma gibi kanserlerde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir.

Yukarıdaki örnekler, farklılaşmış lenfositlerin alt tiplerine göre PD-L1 ekspresyonunun değişebileceğini göstermektedir. Ancak, bu durum her zaman aynı olmayabilir ve PD-L1 ekspresyonu, lenfositlerin aktivasyon durumu, çevresel faktörler ve hastalık durumuna göre değişebilir (1, 11, 18, 25, 157).

### 2.10.3. PD-L1 ekspresyonunu etkileyen önemli çevresel faktörler

Antijen yükü, PD1 ve PD-L1 ekspresyonunu etkileyerek bağışıklık yanıtının düzenlenmesine katkıda bulunan diğer önemli bir faktördür. Antijen yükü, bir organizmada bulunan antijen miktarını ifade eder. Antijen yükü yüksek olan durumlarda, PD1 ve PD-L1 ekspresyonu genellikle artar (158, 159). Bu, lenfositlerin aktivasyonunun kontrol edilmesine yardımcı olabilir ve aşırı bağışıklık yanıtının önlenmesine katkıda bulunabilir. Örneğin, kanser hücreleri yüksek bir antijen yüküne sahip olabilirler ve PD-L1 ekspresyonu artarak, bağışıklık yanıtını baskılayarak tümörlerin kaçmasına yardımcı olabilirler. Ancak, immünoterapi gibi tedaviler, PD1 ve PD-L1 yolağını hedef alarak, lenfosit aktivasyonunu artırabilir ve tümörlere karşı bağışıklık yanıtını teşvik edebilir (159). Benzer şekilde, virüs enfeksiyonları sırasında, virüs yükü yüksek olduğunda, virüs enfekte hücrelerde PD-L1 ekspresyonu artabilir ve virüse karşı bağışıklık yanıtının baskılanmasına yardımcı olabilir (158). Ancak, virüse karşı immün yanıtı artıran tedaviler, PD1 ve PD-L1 yolağını hedef alarak, enfeksiyonla mücadele edebilir.

Metabolik durum, hücrelerin enerji üretimi ve tüketimi ile ilgili faktörlerin tümünü ifade eder. Son zamanlarda yapılan araştırmalar, metabolik durumun PD1 ve PD-L1

ekspresyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (160, 161). Özellikle, T hücrelerinin PD1 ve PD-L1 ekspresyonu, metabolik durumlarına bağlı olarak değişebilir. T hücreleri, aktivasyonları sırasında enerji gerektirirler ve bu enerjiyi anaerobik veya aerobik yolla üretebilirler. Aerobik metabolizma, daha fazla enerji sağlarken, anaerobik metabolizma daha hızlı bir şekilde enerji sağlar. Aerobik metabolizma sırasında, T hücrelerinde PD1 ve PD-L1 ekspresyonu genellikle azalırken, anaerobik metabolizma sırasında artar (161). Bu, aerobik metabolizmanın T hücrelerinde bağışıklık yanıtının artmasına, anaerobik metabolizmanın ise bağışıklık yanıtının baskılanmasına neden olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, metabolik durumun etkisi, T hücreleri ve kanser hücreleri arasındaki etkileşimde de gözlemlenebilir. Kanser hücreleri, daha az aerobik metabolizma yoluyla enerji üretirler ve bu nedenle T hücrelerinin aerobik metabolizma yolunu engelleyerek, PD1 ve PD-L1 ekspresyonunu artırarak bağışıklık yanıtını baskılayabilirler (161, 162). Sonuç olarak, metabolik durumun PD1 ve PD-L1 ekspresyonu üzerinde önemli bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Aerobik metabolizmanın T hücre aktivasyonunu artırarak, bağışıklık yanıtını teşvik edebileceği ve anaerobik metabolizmanın ise bağışıklık yanıtını baskılayabileceği düşünülmektedir.

T hücrelerinin aktivasyonu ve PD1/PD-L1 yolağı arasındaki etkileşim, lenfoid dokuların yapısal özelliklerine de bağlıdır. Örneğin, lenfoid dokuların daha yoğun bir şekilde organize olduğu bir ortamda, PD1/PD-L1 yolağı daha etkin bir şekilde işlev görebilir (1,9, 163-164). Lenfoid dokular, belirli hücrelerin bir araya gelerek bağışıklık sisteminin aktif olduğu alanlardır. Bu alanlar, hücreler arasındaki sinyalleme için yapısal olarak özelleşmiştir. Bu özellikler, PD-1/PD-L1 yolağı üzerindeki etkilerini de belirler. Bu, lenfositlerin daha yoğun bir şekilde var olduğu lenfoid dokularda, PD-L1/PD-1 sinyallesinin daha etkili bir şekilde gerçekleşebileceği anlamına gelir. Bunun nedeni, daha yoğun lenfosit varlığı, PD-1/PD-L1 sinyallesinin hedeflerinin daha fazla var olmasıdır. Örneğin, lenfoid dokulardaki T hücreleri, PD-L1 ekspresyonunu uyararak özgül hedeflere doğru yönlendirilir. Bu, lenfoid dokuların özelleşmiş yapısı sayesinde gerçekleşir. T hücreleri, özellikle lenfoid dokulardaki T foliküler yardımcı hücreler, PD-L1 ekspresyonunu yükselterek B hücrelerinin antikorlarını üretmelerine yardımcı olurlar (163). Böylece, lenfoid dokulardaki T hücreleri, PD-1/PD-L1 yolağı aracılığıyla B hücre yanıtını düzenleyebilirler. Ancak, lenfoid dokuların yapısal özellikleri değiştirildiğinde, PD-1/PD-L1 yolağı üzerindeki etkileri de değişebilir. Örneğin, HIV enfeksiyonu lenfoid dokuların yapısını bozabilir ve T hücreleri arasındaki etkileşimi engelleyebilir (164, 166). Bu, PD-

1/PD-L1 yolağı aracılığıyla HIV enfeksiyonuna karşı immün yanıtın etkililiğini azaltabilir. Ayrıca, diğer bir çevresel faktör olan iskemi de PD-1/PD-L1 yolağının lenfoid dokulardaki etkinliğini etkileyebilmektedir (164). İskemi, dokularda oksijen ve besin maddeleri eksikliği nedeniyle hasara neden olabilir. Bu nedenle, iskemi durumunda lenfoid dokuların organizasyonu bozulabilir ve lenfosit sayısı azalabilir. Bu durumda, PD-1/PD-L1 sinyallemesi daha az etkili olabilir ve immün yanıtın yetersiz olmasına neden olabilir.

Sonuç olarak, lenfoid dokuların yapısal özellikleri, PD-1/PD-L1 yolağı ve immün yanıt arasındaki etkileşimi belirleyebilir. Bu nedenle, lenfoid dokuların yapısal özelliklerinin korunması ve gerektiğinde yeniden yapılandırılması, etkili immün yanıtların geliştirilmesi açısından önemlidir.

Lenfoid dokuların yapısal özelliklerini bozarak PD1 ve PD-L1 ekspresyonunu etkilediğini gösterilen iskemi (doku hasarı nedeniyle dokuya yeterli oksijen ve besin maddesi sağlanamaması) aynı zamanda tüm diğer dokularda da PD1 ve PD-L1 ekspresyonu üzerinden çeşitli koşullar altında immün yanıtı etkileyebilmektedir (164). İskemi, hücrelerde hipoksi (oksijen yetersizliği) ile sonuçlanır ve hücrelerin metabolik durumunu değiştirir. PD1 ve PD-L1 ekspresyonu, bu değişikliklere yanıt olarak artabilir veya azalabilir.

İskemi, T hücrelerinde PD1 ekspresyonunu artırabilir. Bunun nedeni, T hücrelerinin iskemiye maruz kalması durumunda, bu hücrelerin aktif hale gelmesi ve PD1 ekspresyonunu artırmasıdır (167, 168). Ayrıca, PD-L1 ekspresyonu da iskemi ile artabilir (168). İskemi nedeniyle, hasarlı dokudaki hücrelerin PD-L1 ekspresyonu artabilir. Bu, hasarlı dokunun T hücrelerinin saldırısından kaçınmasına yardımcı olabilir. Bununla birlikte, bazı çalışmalar iskemi ile PD1 ve PD-L1 ekspresyonunun azaldığını göstermiştir. Örneğin, iskeminin etkilerine maruz kalan kanser hücreleri, PD-L1 ekspresyonunu azaltabilirler (168). Bu, kanser hücrelerinin bağışıklık sistemine karşı savunmasız hale gelmesine ve immünoterapinin etkinliğinin artmasına neden olabilir.

Sonuçta, iskeminin PD1 ve PD-L1 ekspresyonu üzerindeki etkisi, koşullara bağlı olarak değişebilir. İskemi, T hücrelerinde PD1 ve PD-L1 ekspresyonunu artırabilir veya azaltabilir. Benzer şekilde, kanser hücrelerinde de PD-L1 ekspresyonu, iskeminin etkileri nedeniyle azalabilir veya artabilir.

PD1/PD-L1 ekspresyonu, hipoksik koşullarda HIF1-alfa (Hipoksi İndüktif Faktör 1-alfa) sinyal yolunun etkisi altında olabilir. HIF1-alfa, hipoksik koşullar altında hücrelerde oksijen duyarlı bir transkripsiyon faktörüdür (169, 170). HIF1-alfa'nın etkinliği, oksijen seviyelerinin düşüklüğüne bağlı olarak artar. HIF1-alfa, hücrelerde birçok genin transkripsiyonunu artırarak, hipoksik koşullarda hücrelerin metabolik durumunu değiştirir ve hücrelerin hayatta kalmasını sağlar. PD1/PD-L1 ekspresyonu, HIF1-alfa sinyal yolunun etkisi altında artabilir (170-172). Örneğin, bir çalışmada, CD8+ T hücrelerinde PD1 ekspresyonunun, hipoksik koşullarda HIF1-alfa sinyal yolunun etkisi altında arttığı gösterilmiştir (171). Ayrıca, bir başka çalışmada, melanom hücrelerinde HIF1-alfa sinyal yolunun aktive edilmesi, PD-L1 ekspresyonunu artırmıştır (172). Bu nedenle, HIF1-alfa sinyal yolunun PD1/PD-L1 ekspresyonu üzerindeki etkisi, immünoterapi stratejilerinin geliştirilmesinde önemlidir. HIF1-alfa sinyal yolunun inhibe edilmesi, PD1/PD-L1 ekspresyonunun azaltılmasına ve immünoterapinin etkinliğinin artırılmasına neden olabilir.

İskemi şartlarında hücrelerdeki oksijen seviyesi düştüğünde, HIF1-alfa hücrenin sağkalımı için gerekli olan biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan angienez sürecini başlatır (170-172). Ayrıca glukoz metabolizması ve hücrenin hayatta kalması ile ilgili genleri etkinleştirir (171).

Anjiyenez yeni kan damarlarının oluşumu sürecidir ve birçok farklı faktör tarafından kontrol edilir. HIF1-alfa, bu faktörlerden biridir ve düşük oksijen seviyelerinde, HIF1-alfa, hücrelerin oksijen ihtiyacını karşılamak için yeni kan damarları oluşturulmasını tetikleyen diğer faktörlerin üretimini artırır (170-172). PD-L1 ekspresyonu ve angiogenesis, kanser hücrelerinin büyümesi ve metastazı için birbirleriyle etkileşim halindedirler. Örneğin, PD-L1 ekspresyonu yüksek olan kanser hücreleri, immün sistem tarafından tespit edilmesini önlerler ve böylece çoğalmaları için gerekli olan besin ve oksijenin sağlanmasını kolaylaştıran angiogenesis sürecini destekleyebilirler. Bu nedenle, PD-L1 ve angiogenesis, kanser tedavisi için birlikte hedeflenmesi gereken konulardır. Yapılan araştırmalar, bu konuda yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesine yardımcı olmaktadır.

## 2.11. Sağlıklı böbrekte PD-1 aksı

Renal interstisyumdaki yerleşik doğal immün hücreler arasında makrofajlar, dendritik hücreler ve mast hücreleri bulunur (173-175). Küçük immün komplekslerin intravenöz enjeksiyonu ile karakterize fare modelinde, peritübüler kapillerlerin (PTK) çevresinde lokalize olan makrofajların, FcγRIV gibi Fc reseptörleri (FcR'ler) yoluyla immün kompleksleri tanıdığı izlenirken, albüminin transendotelyal yol ile interstisyuma geçişini de kontrol ettiği gösterilmiştir (174). PD-1 veya ligandları PD-L1 ve PD-L2'nin sağlıklı dokudaki bu tanımlanan makrofajlar üzerindeki ekspresyonu henüz tam olarak bilinmemektedir.

PD-L1 ve PD-L2, murin interstisyel dentritik hücrelerde ve düşük moleküler ağırlıklı antijenleri ve peptitleri yakalayan, böbrek drenajını yapan lenf içindeki dentritik hücrelerde saptanmıştır (176). Ayrıca, böbrek lenf nodlarındaki PD-L1+ dentritik hücreler, drenaj lenfindeki sitotoksik T hücrelerinde eksprese edilen PD-1 ile bağlanarak toleransı artırırlar (177). Mast hücreleri in vivo olarak kan damarlarına, epitel dokularına ve nöral bağ dokusuna lokalizedir (175). In vitro olarak, kemik iliği kaynaklı mast hücrelerinde PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonu mevcuttur (178). Bu nedenle PD-1 immünoterapileri, sağlıklı böbrekteki çeşitli bağışıklık hücreleri üzerindeki PD-1 ve ligandlarının ekspresyonlarını ve fonksiyonlarını değiştirebilir.

İnsanda renal proksimal tübül epitel hücrelerinde PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonu hem in-vivo hem de in vitro olarak gösterilmiştir. Renal allogreftleri olan hastaların biyopsilerinde, PD-L1 ve PD-L2 mRNA seviyelerinin artış gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca bu allogreftlerde tubulointerstisyel alanda infiltrasyon gösteren hücrelerde ve tübül epitelyal hücrelerinde de PD-L1'in ekspresyonu izlenmiştir.

Ayrıca, CD4+ ve CD8+ T hücreleri üzerindeki PD-1 ile tübül epitelleri üzerindeki PD-L1'in bağlanması in vitro blokajı, alloreaktif T hücre proliferasyonunu ve sitokin üretimini azaltır. Bu da PD-L1'in tübül epitel hücreleri üzerinde koruyucu bir etkisi olduğunu düşündürür (Şekil 12).

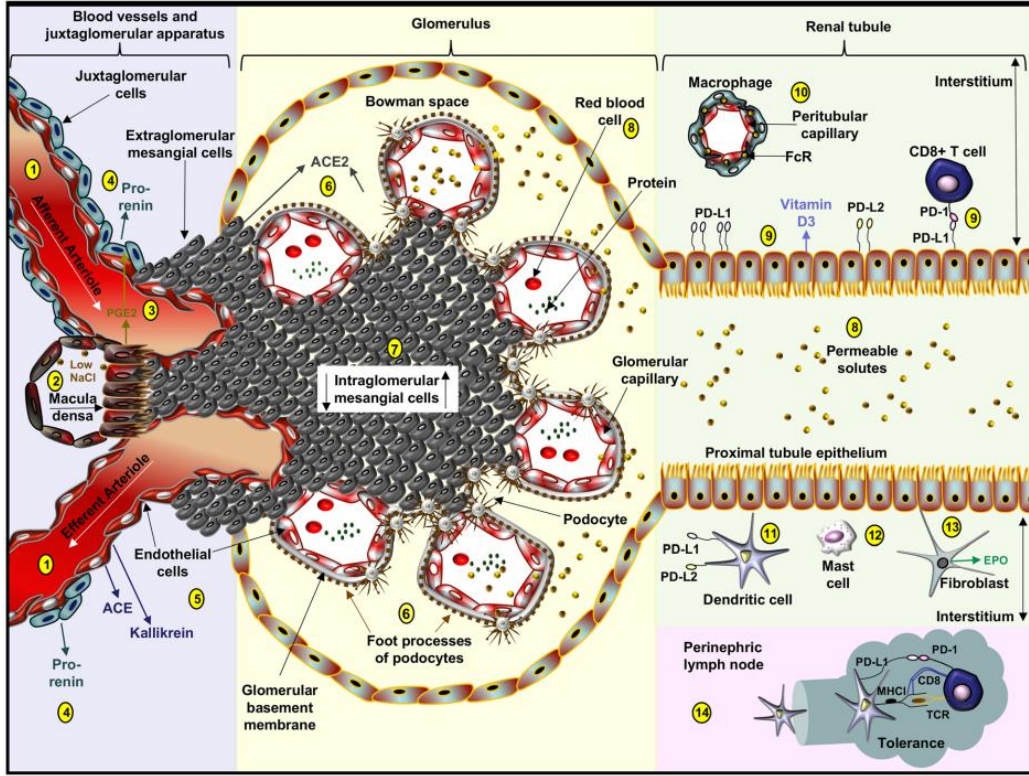
PD-L1, böbrek dışı diğer dokulardaki fibroblastlarda ve endotelyal hücrelerde eksprese edilmesine rağmen, bu molekülün böbrekteki bu hücreler üzerindeki varlığı henüz

değerlendirilmemiştir (179). Podositler ve mezangiyal hücrelerde MHC-II ekspresyonu olduğu için bu hücrelerinde antijen sunan hücreler gibi MHC moleküllerine ek olarak kontrol noktası moleküllerini de eksprese edebileceğini düşündürmektedir (**Şekil 2.12**).

## **2.12. Glomerulopati ve Tubulopatilerde PD-1 aksı**

Glomerulopatiler hem inflamatuvar olmayan (nefrotik) hem de inflamatuvar (nefritik) olan glomerüler hasarlanmalar ile karakterizedir (180). Hem nefrotik hem de nefritik sendromlar, anti-PD1 tedavisi ile ilişkilendirilmiştir (181-189). Glomerulopatilerin patofizyolojisi çok çeşitlidir. Tanımlanan faktörler arasında viral enfeksiyonlar (Sitomegalovirüs, Epstein-Barr virüsü, hepatit C virüsü, herpes simpleks virüsü), otoimmün bozukluklar (sistemik lupus eritematozus, goodpasture sendromu, poliarteritis), belirli ilaçlar (antibiyotikler, diüretikler, kemoterapötikler) genetik mutasyonlar (Apolipoprotein L1) ve idiyopatik hastalıklar (minimal değişiklik hastalığı) vardır (190-192).

PD-1 immünoterapisine sekonder gelişen glomerulopatiler gün geçtikçe sayısı artan karmaşık bir patolojidir. Proton pompası inhibitörü, sitotoksik T-lenfosit ile ilişkili protein 4 (CTLA-4) antikoru veya nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç (NSAID) kullanan hastalarda PD-1 immünoterapisine sekonder nefrotoksite daha çok gelişmektedir. Özellikle bir aydan uzun süre PD-1 immünoterapisi alan hastalarda bu risk daha fazladır (193,194). PD-1 immünoterapisi ile ilişkili nefrotik sendromlar arasında minimal değişiklik hastalığı (MCD) ve fokal segmental glomerüloskleroz (FSGS) yer alır.



**Şekil 2.12.** Sağlıklı Jukstaglomerüler apparatus, glomerül, renal tübül ve perinefrik lenf düğümü

(1) Glomerüler kapiller ağ, afferent arteriyol tarafından beslenir ve efferent arteriyol tarafından boşaltılır. (2) Makula densadaki özelleşmiş epitel hücreleri distal tübüldeki NaCl konsantrasyonlarını algılar. (3) Düşük NaCl konsantrasyonu makula densadaki hücrelerden prostaglandin (PGE2) salgılamasına neden olur ve bu da afferent arteriyollerde dilatasyona neden olur. (4) PGE2 afferent arteriyolün çevresindeki jukstaglomerüler hücrelerden pro-renin salınımını uyarır. (5) Pro-renin, endotelial hücre kallikreini tarafından renine ayrılır ve hem renin hem de anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE), renin anjiyotensin sistemindeki (RAS) anahtar enzimlerdir. (6) Glomerüler kapiller damar duvarlarındaki endotel, glomerüler bazal membran ve podositin ayaklı uzantıları bir trilaminer yapı meydana getirerek makromoleküllerin plazmadan üriner boşluğa geçişini düzenler. Bu yapı hem boyut seçici hem de yük seçici bir filtre sağlar. Podositler ACE2 üretebilmektedir. (7) Ekstraglomerüler ve intraglomerüler hücreler yapısal destek sağlarlarken çok çeşitli sitokin ve ACE2 üretebilirler. (8) Geçirgen olmayan proteinler ve kan hücreleri kapiller damarlarda kalır, ancak geçirgen çözünen maddeler (örneğin NaCl, glikoz), küçük moleküller ve birçok protein Bowman aralığına geçer. (9) Proksimal tübül epitel hücreleri, D3 vitamini üretir. Aynı zamanda hem PD-L1 hem de PDL2 eksprese ederler. PD-L1, CD8 T hücresi toleransında önemlidir. (10) Fc reseptörlerini eksprese eden makrofajlar, peritübüler kapillerleri çevreler ve moleküllerin renal interstisyuma trans-endotelial olarak taşınmasını düzenlerler. (11) İntertisyel dendritik hücreler PD-L1 ve PD-L2'yi eksprese ederler. (12) Mast hücreleri sağlıklı interstisyumda izlenir (13) Fibroblastlar eritropoietin (EPO) üretir. (14) Dendritik hücreler, böbrek lenfindeki CD8+ T hücrelerine zararsız peptitler sunarak PD1/PD-L1 aksı üzerinden toleransı düzenlerler. (Curran et al)<sup>151</sup>

PD-1 moleküllerinin HIV-1 (195), sitomegalovirüs (196) ve Epstein-Barr virüsündeki (197) etkileri gösterilmiştir. Bu nedenle PD-1 immünoterapileri, altta yatan tanımlanmış genlerin veya patojenlerin aktivitesini değiştirerek nefrotik sendromları indükleyebilmektedir. Nefritik sendromlar çoğunlukla otoantikörlerin oluşumuna veya düzensiz bir kompleman sistemine yanıt olarak ortaya çıkar. Komplemanlar ve PD-1 molekülleri arasında parakrin bir aktivite gelişebileceği gösterilmiştir (198). Tubulointerstisyel inflamasyon ve hasar, ilerleyici glomerüler bozukluklarda yaygındır ve interstisyel böbrek hastalığını tanımlayan özelliklerdir (190,191). Çok merkezli retrospektif bir analizde, PD1/PD-L1 immünoterapisinin yanısıra proton pompası inhibitörü veya bir CTLA-4 inhibitörü alan hastaların %93'ünde tubulointerstisyel nefrit gelişmiştir (193). Anti-PD-1 immünoterapisinin neden olduğu glomerülopatilerin ve tubulopatilerin tanısı için böbrek biyopsisi gereklidir.

Anti-PD-1 immünoterapisine sekonder akut böbrek hasarı gelişen hastaların böbrek biyopsilerinde akut interstisyel nefrit bulgularının yanı sıra tübül epitel hücrelerinde de artmış PD-L1 ekspresyonu izlenmiştir (199). Bu hastalarda izlenen tübüler PD-L1 ekspresyonu sadece akut tübüler nekrozu olan kontrol hastaları ile karşılaştırıldığında, bunlarda tübüler PD-L1 ekspresyonu çok daha fazla olarak saptanmıştır (199).

### **2.13. Fibrozis Gelişiminde PD-1/PD-L1 Aksının Rolü**

Fibroz, bağışıklık sistemi tarafından ince bir şekilde düzenlenen patolojik bir yanıttır ve oluşumu ve gelişimi, çeşitli bağışıklık hücrelerinin ve çeşitli bağışıklık düzenleyici faktörlerin katılımını içerir. PD-1/PD-L1 aksı, T hücresi bağışıklığını, fibroblast aktivasyonunu ve epitelyal EMT'yi düzenleyerek fibrotik sürece aracılık etmektedir. Genel olarak, PD-1/PD-L1 aksı esas olarak pro-fibrotiktir, ancak belirli mekanizmalar yoluyla fibrozisin ilerlemesini de önleyebilmektedir (45, 134-137, 140-148).

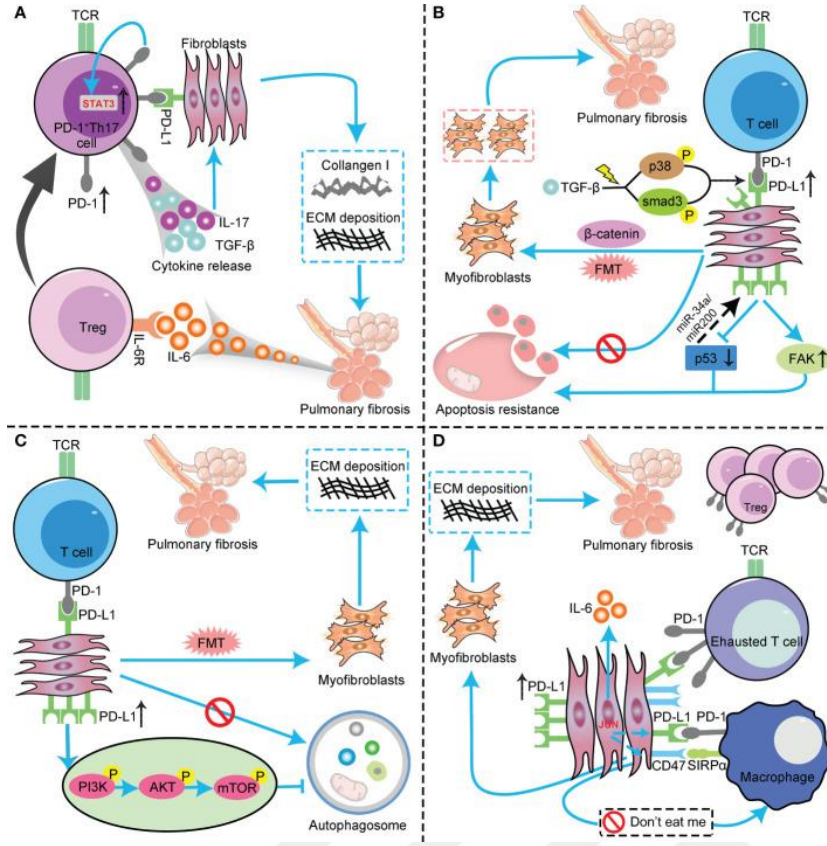
PD-1/PD-L1 aksının farklı faktörlerin neden olduğu pulmoner fibrozisin (144-146) patogeneğinde önemli bir düzenleyici olduğu bildirilmiştir (**Şekil 2.13**). PD-1/PD-L1 aksı ayrıca karaciğer fibrogenesisinde ve siroza bağlı fibrozis gelişiminde de rol oynamaktadır. Hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonunun neden olduğu karaciğer fibrozisinde, karaciğerde PD-1 ve PD-L1'in ekspresyonu önemli ölçüde artış gösterir (45). PD1 ve PD-L1

ekspresyonunun artışı ile CTLA-4, T hücresi immünoglobulini ve müsin alanı içeren protein3 (“Mucin domain-containing protein3” TIM-3) ve lenfosit aktivasyon geni 3 (LAG3) gibi diğer bağışıklık kontrol noktası molekülleri de artış göstermektedir (200). Tüm bu bağışıklık kontrol noktası molekülleri hep birlikte karaciğerde bir bağışıklık bastırıcı mikro-ortamın oluşumunu da teşvik ederler. Ayrıca, PD-1 ve PD-L1 seviyeleri ile karaciğer fibrozisin şiddeti arasında pozitif bir korelasyon mevcuttur. Bu bulgular, PD-1/PD-L1 sinyalinin karaciğer fibrozisinin patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Özellikle, PD-1/PD-L1 eksenini aracılı immünomodülasyon, karaciğer makrofajları, DC ve T hücrelerinin işlevini yeniden programlayarak karaciğer fibrozisinin gelişimini düzenleyebilir (201).

Ancak fibrotik hastalıklarda PD-1/PD-L1 aksına ait klinik ve deneysel veriler halen çok sınırlıdır ve PD-1/PD-L1 aksının fibrogenesis senaryolarındaki benzersiz rolü daha fazla araştırılmalıdır.

#### **2.14. Renal Fibrozis ve PD-1/PD-L1 Aksı**

Tubulointerstisyel nefrit (TIN), akut böbrek hasarının başlıca nedenlerinden biridir ve sonunda renal fibroze neden olarak kronik böbrek yetmezliği ile sonuçlanır (190,191). Çok yaygın olmamakla birlikte, çeşitli kanserlerin tedavisi sırasında kullanılan PD-1 veya PD-L1 inhibitörlerinin TIN ve renal fibrozis gelişimini indüklediği gösterilmiştir (185-189, 192-194). Nüks mide kanserinin tedavisinde kullanılan Nivolumab tedavisi sonrasında bir hastada akut granülomatöz TIN gelişimi bildirilmiştir (**Resim 2.1**) (203). Bu vakada hem granülomatöz lezyondaki makrofajlarda hem de dejenere renal tübüler epitel hücrelerinde yüksek oranda PD-L1 ekspresyonu izlenmiştir. CTLA-4 ve PD-1 inhibitörleri ile tedavi edilen metastatik malign melanomlu hastalarda da TIN gelişimi bildirilmiştir (186,188). Bu vakaların histopatolojik değerlendirmelerinde renal interstisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem ve fibrozis saptanmıştır.



**Şekil 2.13.** PD-1/PD-L1 aksının Idiopatik Pulmoner Fibrozis'deki (IPF) profibrotik rolü

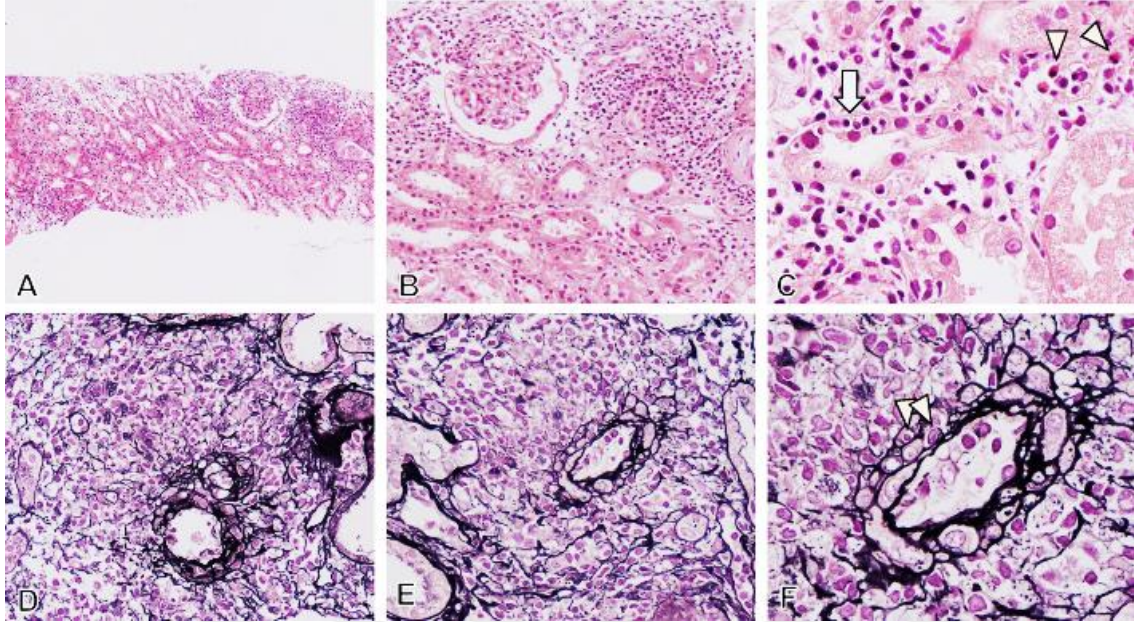
(A) Th17 T hücreleri üzerindeki PD-L1 yukarı regülasyonu, STAT3 aracılı IL-17 ve TGF-β üretimini artırarak pulmoner fibrozisi indükler; (B) Akciğer fibroblastları üzerindeki PD-L1'in yukarı regülasyonu, p53, FAK, Smad3 ve β-katenin sinyal yolları aracılığıyla pulmoner fibrozisi indükler. Öte yandan, akciğer fibroblastları üzerindeki PD-L1 ekspresyonu, p53 yolunu inhibe ederek ve FAK yolunu aktive ederek, sonuçta IPF'yi tetiklemek için miyofibroblastların aşırı çoğalmasına yol açarak, miyofibroblastların makrofajlar yoluyla apoptoz direncine ve fagositozu kaçırmasına neden olabilir. Bir yandan, akciğer fibroblastları üzerindeki PD-L1 yukarı regülasyonu, p53 yolunu inhibe ederek ve FAK yolunu aktive ederek miyofibroblastların apoptozise direnç göstermesine ve makrofajların fagositozundan kaçmasına neden olabilir. Sonuç olarak IPF'yi tetikleyecek olan miyofibroblastların aşırı şekilde çoğalmasına yol açar. Ayrıca, PD-L1, Smad3 ve β-katenin sinyal yolları aracılığıyla akciğer fibroblastlarının miyofibroblastlara transforme (FMT) olmasını sağlayarak pulmoner fibrozis gelişmesini destekler; (C) Akciğer fibroblastları üzerindeki PD-L1'in yukarı regülasyonu, otofajiyi inhibe ederek miyofibroblast proliferasyonunu ve ECM birikimini indükleyebilir ve sonunda pulmoner fibrozisi indükler; (D) Akciğer fibroblastları üzerindeki PD-L1'in yukarı regülasyonu, adaptif bağışıklığı inhibe ederek pulmoner fibrozisi teşvik eder. JUN, fibroblastlarda ve hareketsiz makrofajlarda PD-L1 ve CD47'nin ekspresyon seviyelerini artırır. Sonuç olarak, bu hücreler tükenmiş T hücrelerine ve hareketsiz makrofajlara evrilir. Bu bağlamda, miyofibroblastlar, bağışıklık temizliğinden kaçabilir ve makrofajın neden olduğu fagositoza direnebilirler. Ek olarak JUN, IL-6'yı kromatin seviyesinde doğrudan da düzenleyerek, başlıca T hücresi tükenmesi ve aktiveleştirilmiş Treg'lerin yukarı regülasyonu gibi inhibitör adaptif bağışıklık tepkilerine yol açar. (Jiang et al)<sup>202</sup>

İnterstisyel infiltrat içinde PD-1 negatif ve PD-L1 pozitif olan çok sayıda CD3+ T hücreleri ve CD163+ makrofajları izlenmiştir (186). Bu, T hücrelerinin ve makrofajların, PD-1/PD-L1 sinyal dengesizliğinin neden olduğu renal fibrozisde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bunlara ek olarak, metastatik renal hücreli karsinomun atezolizumab ile tedavisi sonrasında hem CD4+ hem de CD8+ T hücreleri TIN patogenezinde anahtar oyuncular olarak tabloya hâkim olmuşlardır (204).

Tüm bu klinik veriler, PD-1/PD-L1 aksının TIN ve renal fibrozis gelişimi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Renal tübüler epitel hücreleri (TEH), bazı koşullar altında yapısal olarak MHC-II moleküllerini ve fizyolojik olarak PD-L1'i zayıf bir şekilde eksprese edebilen böbrekteki özel bir APC tipidir (205, 206). IFN- $\gamma$  gibi proinflamatuvar faktörler tarafından uyarıldığında, TEH'de PD-L1'in ekspresyonu doza bağımlı şekilde artış göstermektedir. Ayrıca, IFN- $\gamma$  ile aktive olan TEH ve T hücresi ortak ortamında PD-1/PD-L1 sinyalini bloke etmek, TEH'nin Th1 ve Th2 sitokin üretimi üzerindeki inhibe edici etkisini azaltabilmektedir (205). İlginç bir şekilde, çok önemli bir profibrotik faktör olan TGF- $\beta$ , TEH'de PD-L1 ekspresyonunu azaltırken, CD8+ T hücrelerini aktive etme yeteneklerini arttırmaktadır (98). Tüm bu veriler, TGF- $\beta$ 'nın TEH ve T hücreleri arasındaki etkileşimi düzenleyerek TIN oluşumunu destekleyebileceğini ve ardından renal fibrozisi indükleyebileceğini düşündürmektedir.

Mekanik olarak, PD-1/PD-L1 aksının bazı yönlerden TIN ve renal fibroze aracılık ettiği varsayılmaktadır. Birincisi, bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin kullanımı sırasında özellikle T hücreleri aşırı şekilde aktive olur ve bunun sonucu inflamatuvar yanıt başlar. Bu nedenle, PD-1 veya PD-L1 inhibitörleri tarafından indüklenen TIN ve hatta renal fibrozis, aslında bir otoimmün yanıtı temsil edebilir. İkincisi, renal tübüler epitel hücrelerinde PD-L1'in fizyolojik ekspresyonu, renal interstisyumda immün toleransın korunması için önemlidir. PD-1 veya PD-L1 inhibitörlerinin uygulanması sonucu renal interstisyel immün homeostaz bozulur, bu da T hücresinin aşırı aktivasyonuna ve nihayetinde TIN'e yol açar (45). Renal tübüler epitel hücreleri ile T lenfositleri arasındaki etkileşimde TEH, T hücresi aktivasyonunu başlatmak için antiijenler sunabilirken, diğer yandan yüzeyindeki PD-L1'i T hücresindeki PD-1 reseptörüne bağlayarak T hücresi aktivasyonunu inhibe edebilir. Üçüncüsü, PD-1 veya PD-L1 inhibitörleri tarafından indüklenen TIN'de, bazı hastaların immün kontrol noktası inhibitörü tedavisi almadan önce proton pompası inhibitörleri ve non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar gibi nefrotoksisiteye

sahip bazı ilaçlara da maruz kaldıklarını belirtmekte fayda vardır (45). Bu durum, PD-1 veya PD-L1 inhibitörlerinin, dinlenme durumunda ilaca özgü efektör T hücreleri klonlarını yeniden etkinleştirmiş olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, PD-1/PD-L1 aksı renal fibrozis patogeneğinde önemli bir role sahiptir.



**Resim 2.1.** Tubulointerstiyel nefrit ve granümatöz vaskülit

(A) Tubulointerstiyumda yaygın inflamasyon izlenmektedir. (B) Glomerüller intakttır. (C) Eozinofil (ok başı) içeren mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu ve hafif tübülit (ok) (D, E) Arterde non-nekrotizan granümatöz vaskülit varlığı (F) Granümatöz arterit ile uyumlu intima, media (ok başı) ve adventisyada inflamatuvar hücre infiltrasyonu. (Tominaga et al)<sup>203</sup>

## 2.15. Transplantasyon ve PD1/PDL1 Aksı

PD1'in PD-L1 ile etkileşiminin, T-hücre proliferasyonunu ve T hücrelerinin hayatta kalmasını azalttığı ve otoimmün hastalıkların ve transplantasyonun deneysel modellerinde inhibitör fonksiyonlar uyguladığı düşünülmektedir. Periferik dokulardaki ekspresyonları nedeniyle, PD-1:PD-L1/PD-L2 aksı allogreftlerde kendi kendine toleransın korunması, doku inflamasyonunun düzenlenmesi ve immün yanıtların modülasyonu için özel bir role sahiptir. Alloantijenin T hücre tanınması, greft yetmezliğinin efektör mekanizmalarına başka birkaç faktör de katkıda bulunabilmesine rağmen, sonuçta greft reddine yol açan merkezi ve birincil olaydır (6, 9, 10, 24-27). T hücreleri, tam aktivasyon için iki farklı sinyal gerektirir. İlki, TCR'nin APC'ler üzerindeki MHC artı peptit kompleksi ile birleşmesi ile sağlanır ve bu,

yanıtın Ag özgüllüğünü belirler. İkinci pozitif birlikte uyarıcı sinyal, APC'ler üzerindeki spesifik ligandları ile bir veya daha fazla T hücresi yüzey reseptörünün bağlanmasıyla sağlanır. En iyi karakterize edilmiş ve belki de en önemli birlikte uyarıcı yol, CD28/CTLA4:B7-1/B7-2 yoludur (6, 10, 27). T hücrelerinde yapısal olarak eksprese edilen CD28'in APC'lerde eksprese edilen B7-1 ve B7-2 ile etkileşimi, sitokin üretimi, klonal genişleme ve anerjinin önlenmesi ve T hücrelerinin hayatta kalması dahil olmak üzere tam T hücresi aktivasyonu ile sonuçlanan ikinci bir pozitif sinyal sağlar (27). CD28'in B7-1 veya B7-2 ile ligasyonu, bir IgG H zinciri kuyruğuna kaynaşmış CTLA4'ün hücre dışı alanını içeren bir rekombinant füzyon proteini olan CTLA4Ig tarafından bloke edilir.

Çalışmalar, CD28-B7 blokajının akut allograft reddini önlediğini ve çeşitli deneysel hayvan modellerinde donöre özel toleransı gelişmesini sağladığını göstermiştir (24-26). Preklinik çalışmalar, primat renal ve adacık transplantasyon modellerinde CTLA4 Ig tarafından B7 blokajının etkinliğini göstermektedir (24-27). Renal transplant alıcılarında CTLA4Ig'nin mutant bir formu olan Belatacept (LEA29Y) ile yakın zamanda yapılan bir klinik çalışma, akut rejeksiyonu önlemenin bir yolu olarak siklosporin kadar etkili olduğunu ve glomerüler filtrasyon hızını koruyabileceğini ve CAN'ı azaltabileceğini düşündürmektedir (20). Sub-maksimal TCR veya pozitif birlikte uyarıcı sinyal blokajı bağlamında, PD1 sinyallemesinin allograft reddini engelleyebileceği ve in vivo T ve B hücresine bağlı patolojik bağışıklık tepkilerini modüle edebileceği yakın zamanda gösterilmiştir (25-27). Bir adacık transplantasyon modelinde PDL-1.Ig'nin, adacık allograftlarının uzun süreli sağkalımını indüklemek için anti-CD154 mAb ile sinerji oluşturduğu saptanmıştır (24).

Konak antijenleri tarafından aktive edilen “carboxyfluorescein succinimidyl ester” (CFSE) etiketli donör hücrelerin kaderinin incelenebildiği bir fare graft versus host hastalığı (GVHD) modeli kullanılarak, PD-L1 ve PD-L2'nin T hücre alloaktivasyonunda oynadığı değişken roller incelenmiştir. CD28 aracılı kostimülasyon varlığından bağımsız olarak, bir mAb ile PD-L1 blokajının, CD4+ veya CD8+ T hücrelerinin proliferasyonunu etkilemediği izlenmiştir. Ancak aynı şekilde PD-L2'nin bloke edilmesi sonucunda alloreaktif CD8+ T hücrelerinin proliferasyonunda çok fazla bir artış olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte alloreaktif CD4+ T hücrelerinin proliferasyonu bu hayvanlarda önemli ölçüde farklılık göstermemiştir (211). Ayrıca aynı çalışma, PD-L2 blokajının CD8+ T-hücresi proliferasyonu üzerindeki etkisinin, özellikle CD4+ T hücrelerinin veya CD28-aracılı kostimülasyonun

yokluğunda belirgin olduğunu göstermişlerdir. Özet olarak, bu bulgular, PD-1/PD-L1 ve PD-1/PD-L2 yollarının, alloimmün T hücre yanıtlarının düzenlenmesinde farklı işlevlere sahip olduğunu ve PD-L2'nin CD8<sup>+</sup> T-hücre proliferasyonunun baskın düzenleyicisi olduğunu göstermektedir. Başka bir çalışma ise farklı ortamlarda Treg'ler için PD-1/PD-L1 aksının önemini araştırmıştır. Monoklonal anti-PD-L1 mAb kullanarak in-vitro şekilde PD-L1 bloke edildiğinde, Treg'lerin CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki düzenleyici etkisinin inhibe olduğu izlenmiştir (212).

PD-L1 ekspresyonunun greft içindeki koruyucu etkileri birçok çalışmada vurgulanmıştır. Kardiyak transplantasyonun murin MHC sınıf I ve II uyuşmazlık modellerinde, wild tip ve PD-L1<sup>-/-</sup> greft alıcıları arasında greft sağkalımı açısından hiçbir fark gözlenmemiştir. Ancak PD-L1<sup>-/-</sup> donörlerinden alınan greftler, çok hızlı şekilde rejeksiyon gerçekleştirirken, PD-L2<sup>-/-</sup> donörlerden alınan greftlerde bu izlenmemiştir (207). Bu nedenle, intragraft PD-L1 ekspresyonu, MHC sınıf I ve II antijenlerine karşı alloimmün yanıtları düzenliyor gibi görünmektedir ve greft içindeki negatif yardımcı uyarıcı moleküllerin uyarılması, donör dokusunu yıkıcı alloimmün yanıtlardan korumak için etkili bir yaklaşımı temsil edebilir. PD-L1-immünoglobulin geninin aktarıldığı F344 farelerinden kardiyak greftler alan Lewis farelerinde de benzer fayda gözlenmiştir (213).

Ayrıca başka bir fare kalp nakil modelinde “inducible costimulator” (ICOS)–B7H1 yolunun bir anti-ICOS antikoru ile bloke edilmesi ile, alloantijene özgü PD-1 ekprese eden CD8<sup>+</sup> regülatör T hücrelerinin üretildiği gösterilmiştir (214). Bu regülatör T hücreleri, aynı allo-spesifiteye sahip allograft alıcılarına transfer edildiğinde, CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin yokluğunda greft sağkalımını önemli ölçüde uzattığı izlenmiştir. Bu durum bu regülatör T-hücrelerinin CD4<sup>+</sup> alloreaktif T hücrelerini inhibe etme yeteneklerini göstermiştir. PD-1'in mAb ile bloke edilmesi, PD-1'in aslında düzenleyici özellikler için fonksiyonel molekül olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Anti-PDL1 mAb uygulamasıyla sonuçlanan PDL1 blokajı sonrası kardiyak allograft rejeksiyonunun ve özellikle kronik kardiyak rejeksiyonun olmazsa olmazı olan allograft vaskülopatisinin hızlandığı da gösterilmiştir (207-209). Bununla birlikte Koga ve arkadaşları (210) daha önce anti-PDL1 ile tedavi edilen kalp allograft alıcılarında greft arter hastalığının şiddetinde artış olduğunu ancak arter hastalığının gelişiminde hızlanma olmadığını

bildirmişlerdir. Bu farklı sonuçların olası nedeni, her iki çalışmada kullanılan anti-PDL1 antikorlarının dozlarının farklılıkları ile açıklamaya çalışmışlardır.

“Fully mismatch” bir kalp allogreft modelinde, erken ve gecikmiş PD-L1 blokajının (ancak PD-L2 blokajının değil) CTLA4-immünoglobulin aracılı periferik toleransı ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte bu bulguların aksine, PD-L1/PD-L2 blokajı, kemik iliği transferini takiben karışık allojenik kimerizm tarafından indüklenen merkezi toleransı ortadan kaldırmamıştır. PD-L1<sup>-/-</sup> donörlerden alınan greftler, CTLA4-immünoglobulin ile tedavi edilen alıcılara nakledilmiş. Wild tip hayvanlardan alınan greftler ile karşılaştırıldığında PD-L1<sup>-/-</sup> donörlerden alınan greftlerde çok ciddi kronik vaskülopati gelişimi saptanmıştır (215). Benzer şekilde, Wang ve arkadaşları (216) tamamen uyumsuz (fully mismatch) bir kardiyak transplantasyon modelinde donöre spesifik antijen (DSA) veya CTLA4-immünoglobulin ile kombinasyon halinde anti-CD154 mAb ile pozitif kostimülasyonun blokajının, intakt bir PD-1/PD-L1 aksının yokluğunda, toleransın indüklenmesinde etkisiz olduğunu göstermiştir. PD-1 ekspresyonu olmayan alloreaktif T hücrelerinin artmış proliferasyon ve sitokin üretimine sahip olduğu ve PD-1 eksikliği olan CD4<sup>+</sup> hücrelerde anerji indüksiyonunun mümkün olmadığı saptanmıştır.

Tüm bu veriler eşliğinde düşünüldüğünde PDL1’in kardiyak allogreftlerde CD4 T-hücre aracılı alloimmün tepkileri düzenlemede önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Profesyonel APC'ler üzerine yapılan araştırmalar, apoptotik hücreler tarafından indüklenebilen tolerojenik DC'lerin, konakçı ve graft toleransının indüklenmesi üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Özellikle olgunlaşmamış DC'ler, Th17 hücrelerinin potansiyel indüksiyonu yoluyla doku sağkalımını uzatma yeteneğine sahiptir.

Liu ve arkadaşları (217), olgunlaşmamış DC'leri PD-L1 ile kaplamak için bir PD-L1-Ig füzyon proteini kullanmışlardır. Bu DC'ler, T-hücre proliferasyonunu uyarmak için önemli ölçüde azaltılmış bir yeteneğe sahip olup, Th2 sitokinlerini arttırırken, Th1 sitokin salgılanmasını azaltmışlardır. İn vivo olarak, bu DC'ler ayrıca greftin hayatta kalmasını uzatma ve Treg'leri indükleme yeteneğine de sahiptirler.

Geng ve arkadaşları (218) mikofenolik asidin dendritik hücrelerde in vitro olarak PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonunu arttırdığını bildirmiştir. Bu etkinin ek olarak dendritik hücrelerde eş zamanlı olarak gözlenen bozulmuş allostimülator kapasiteye de katkıda

bulunabileceği öne sürülmüştür. Bununla birlikte, aynı zamanda MHC ve hatta CD80/CD86 ekspresyonları da azalma göstermektedir.

PD-L1 sadece PD-1 ile değil, aynı zamanda pozitif kostimülatör olan CD28/B7 yolunun bir bileşeni olan B7-1 (CD80) ile de etkileşime girmektedir (218). Bu etkileşim, T hücresi inhibisyonuna, T hücresi proliferasyonunun azalmasına, aktivasyon yüzey belirteçlerinin azalmasına ve sitokin üretiminin azalmasına aracılık eder. Bu moleküllerin iyi karakterize edilmiş reseptörlerine sahip olmayan farelerde B7-1-kaplı veya PD-L1-kaplı boncukların kullanımı, inhibe edici sinyalin çift yönlü olduğunu göstermiştir (219). Bu bulgular, PD-L1 ilişkili bağışıklığın düzenlenmesinin çok karmaşık ve/veya hiyerarşik bir fonksiyona sahip olduğunu düşündürmektedir. Bu saptanan karmaşık ilişkinin transplantasyondaki rolü araştırılmaktadır.

PD-L1'in T-hücre biyolojisindeki kritik rolüne ve solid organ transplantasyonunda PD-L1'in işlevi hakkındaki artan bilgiye rağmen, böbrek transplantasyonundaki rolü net olarak bilinmemektedir. Bazı çalışmalar PD1/PD-L1 etkileşiminin greft toleransının korunması için gerekli olduğunu gösterse de akut rejeksiyon (AR) ile renal allograftlarda PD-1/PD-L1 etkileşimi immün hücreler üzerinde farklı etkiler gösterebileceği düşünülmektedir. Vasküler endotelial hücreler immün hücreler ile hedef greft arasındaki ilk arayüz olduğundan, peritübüler kapillerlerde (PTK) endotel hücreleri ve immün hücreler üzerindeki PD-1/PD-L1 etkileşiminin durumunu anlamak özellikle akut antikor aracılı rejeksiyonlarda ("antibody-mediated rejection" ABMR) önemlidir.

AR'lar, böbrek fonksiyonlarında ilerleyici bir düşüşle birlikte kronik allogreft hasarına yatkınlık oluşturdıklarından dolayı uzun vadeli allogreft sağkalımı için önemli bir risk faktörüdür. İnterstisyel fibrozis ve tübüler atrofi (IFTA) ile sonuçlanan kronik allograft nefropatisinin çok farklı hasar sebepleri arasında en başı akut rejeksiyonlar almaktadır.

Renal proksimal TEH'ler epitel hücreleri tübülointerstisyel hasara neden olan alloreaktif CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin ana hedefidir. Lokal inflamasyon, donör TEH'lerinde MHC sınıf I ve sınıf II ekspresyonunu indükleyerek, alıcı T hücreleri tarafından allojenik MHC'nin tanınmasına olanak tanır (220). Ko-stimülatör ve ko-inhibitör moleküllerin TEH'ler üzerindeki ekspresyon profili sınırlıdır (221). TEH'ler, ko-stimülatör moleküllerden olan B7.1 ve B7.2'yi tipik olarak eksprese etmese de ko-stimülatör bir

molekül olan CD40'ı eksprese ederler (98, 221-223). PD-L1, TEH'ler üzerindeki en belirgin ko-inhibitör moleküldür (98). Böbrek nakilli farelerin rejeksiyonlarında PD-L1'in tübüllerde güçlü bir şekilde eksprese edildiği bildirilmiştir. Fare TEH kültürleri inflamatuvar sitokinler ile muamele edildiğinde TEH'lerinde PD-L1 ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir (205, 224). Ayrıca, TEH'lerinde izlenen yüksek PD-L1 ekspresyonu, antijene özgü CD4+ ve CD8+ T hücre yanıtlarını bozmaktadır (205, 221).

Starke ve arkadaşları (225), insan renal TEH'lerinde eksprese edilen ko-inhibitör molekül PD-L1'in insan alloreaktif T-hücre yanıtlarını baskıladığını ve akut böbrek allograft reddi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Daha önceki çalışmalar, CD4+ T hücrelerinin, IFN- $\gamma$  ile önceden muamele edilmiş allojenik TEH'lerine yanıt vermediğini göstermiştir. Bu kısmen kostimülasyon eksikliğinden, özellikle de TEH'lerinde B7.1 moleküllerinin bulunmamasından kaynaklanmaktadır (222, 226). Bununla birlikte, Starke ve arkadaşlarının (225) çalışması, PD-1/PD-L1 ko-inhibitör yolunun varlığının, alloreaktif T hücrelerinin renal TEH'lere yanıt vermemesinde çok önemli bir rolü olduğunu ortaya koymuştur. Çünkü TEH'leri üzerindeki PD-L1 inhibisyonu, CD4+ ve CD8+ T-hücre yanıtlarını güçlü bir şekilde artırmıştır. Artış gösteren bir alloreaktif CD8+ T-hücre yanıtı, yalnızca IFN- $\gamma$  üretimi açısından ölçülebilirken, aynı CD8+ T hücreleri, Jurkat hücrelerine güçlü sitotoksik bir T-lenfosit (STL) aktivitesi göstermiş olmalarına rağmen, allojeneik renal TEH'lerini destrükte edememişlerdir. Bu sonuçlar, insan TEH'lerinin in vitro olarak alloreaktif STL'lerin saldırısına karşı oldukça dirençli olduğunu göstermektedir. Güçlü B7/CD28 kostimülasyonunun olmaması da dahil olmak üzere, TEH'ler üzerindeki sınırlı kostimülatör molekül ekspresyonu, bu fenomeni en azından kısmen açıklayabilmektedir.

Bu sonuçlar IFN- $\beta$  ve IFN- $\gamma$ 'nın TEH'leri üzerinde in vitro olarak PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonunun yukarı regülasyonunda kritik bir role sahip olduğunu göstermektedir. Obata ve arkadaşları (227), akut ve kronik renal allograft rejeksiyon biyopsilerinde IFN- $\gamma$  mRNA ekspresyonunun güçlü bir şekilde arttığını göstermiştir. Lokal inflamasyon sırasında, doğal bağışıklığın bir tepkisi olarak üretilen IFN- $\beta$ 'nın ve infiltre olan alloreaktif T hücrelerinden salgılanan IFN- $\gamma$ 'nın herikisi de renal tübülointerstisyel dokulardaki PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonunun in vivo olarak artışından sorumlu olması mümkündür. Bu varsayım, inflamasyonun yokluğunda sağlıklı böbreklerde PD-1 ekspresyonunun olmaması ile tutarlıdır (228). Akut rejeksiyon olan renal allograft biyopsilerinde izlenen PD-1

ekspresyonu, iltihabi hücre infiltrasyonu olan böbreklerdeki aktifleştirilmiş T hücrelerinin varlığını göstermektedir. Önemli noktalardan biri olarak, tubulointerstisyel rejeksiyonlarda şiddetli tübülitis olan biyopsilerde daha düşük PD-L1 ekspresyonu izlenirken, vasküler rejeksiyonlarda bunun tam tersi gözlenmiştir. Bu farklılık, akut vasküler rejeksiyon sırasında tubulointerstisyumun eksprese ettiği kısmen korunmuş olan PD-L1 sayesinde korunabileceği fikrini düşündürmektedir. Oysaki PD-L1 ekspresyonu göstermeyenn vasküler endotel için durum böyle değildir. Daha önceki çalışmalarda bu sonuçları doğrular nitelikte olup, diffüz proliferatif lupus nefriti, IgA nefropatisi ve tubulointerstisyel nefrit gibi çok farklı diğer immün aracılı renal hastalıklarda da tübüllerde yüksek seviyede PD-L1 ekspresyonu bildirilmiştir (224, 228). Tüm bu veriler birlikte düşünüldüğünde, PD-1/PD-L1 aksının immün aracılı insan böbrek hastalıklarında ve özellikle akut tübülointerstisyel rejeksiyonlarda önemli olarak yer aldığı izlenmektedir. PDL1 özellikle renal allogreftlerde, periferik transplantasyon toleransı ve kronik allogreft rejeksiyonundan korunmak için gereklidir.

Sonuç olarak, farklı hücre tiplerinde PD-L1 ekspresyonunun rolünü ve tam mekanizmalarını anlamak, transplant sağkalımını uzatmaya yardımcı olabilir ve potansiyel olarak transplantasyondan önce dokuya yönelik belirli tedavilerin geliştirilmesine yol açabilir. Bu alanda yapılacak olan çalışmalar, reddi önlemek için immünosüpresif ilaç tedavisini azaltarak, alıcılarda ek enfeksiyon riskini azaltarak ve aynı anda transplant sağkalımını uzatarak birçok hastanın yaşamını iyileştirebilecektir.

## **2.16. Fetal In-Utero PD1/PDL1 Aksı**

PDL1'in ayrıca fetomaternal toleransta önemli bir rol oynadığı da bilinmektedir. Hamilelik ve cenin gelişimi, bağışıklık sistemine bir meydan okuma gibidir. Çünkü gelişmekte olan fetüs genetik olarak anneden farklı olmasına ve bu nedenle bağışıklık sistemi tarafından tanınabilir ve reddedilebilir olmasına rağmen, çoğu durumda gebeliğin terme devam etmesine izin vermek için fetüsün rejeksiyonu önlenir. PD-1/PD-L1 yolu bu süreçte hayati bir rol oynar ve PD-L1 ekspresyonu gebeliğin ilerlemesi sırasında artar. Hayvan çalışmalarında PD-L1'in bloke olması sonucu gebe hayvanlarda daha yüksek oranlarda prematüre doğumlar ve daha fazla gelişme gerilikleri izlenmiştir (229).

Özellikle anne kanının fetal doku ile doğrudan temas ettiği fetal-maternal arayüzü temsil eden plasentada, sinsityotrofoblast ve sitotrofoblastlar yüksek seviyelerde PD-L1 eksprese ederler. Hamilelik sırasındaki bu ekspresyondaki artış, PD-L1 ekspresyonundaki artıştan anne kanıyla temasın sorumlu olduğu hipotezini desteklemektedir (229, 230).

CD71+ eritroid hücrelerin (CEC'ler) immün yanıt düzenlenmesinde yer aldığı bulunmuştur (231). Hamilelik sırasında, CEC'ler periferik kanda ve plasentada zenginleşir ve fetö-maternal toleransın düzenlenmesinde yer alır. Gebeliğe bağlı bu CEC'lerde, miyeloid hücrelere kıyasla yüksek PD-L1 seviyeleri gözlenmektedir. Bu CEC'lerin, fetüse yönelik agresif bir allojenik yanıtı önlemek için PD-L1 sinyali yoluyla T hücre yanıtlarını baskıladığı bildirilmiştir. Bunun aksine, “syngeneic” (immünolojik olarak özdeş) gebelikle ilgili olarak CEC'lerde PD-L1 tespit edilememiştir (232).

Treg'lerin hamileliğin sürdürülmesi ile ilgisi Habicht ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (233). Treg'lerin daha önce organ toleransı ile ilgili olduğu ve hem PD-1 hem de PD-L1'i yüksek seviyelerde eksprese ettiği gösterilmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda görüldüğü gibi bunların gebelik sırasında sayıları artar ve doğum sonrası azalır. Treg sayısı yetersizse, paternal antijene özgü Th1 hücrelerinin oranlarının yükseldiği, gelişmekte olan yavruyu hedef aldığı ve gebelik kaybına katkıda bulunduğu bulunmuştur (234).

Fare modelleri, fetüsün genetik olarak anne ile özdeş olduğu “syngeneic” gebeliklerde, bu koruma mekanizmalarının hiçbirinin olmadığını, hatta PD-L1'in azalması durumunda bile hamileliğin etkilenmediğini göstermiştir. Bu da allojenik gebeliklerde immünojenik toleranstaki rollerini vurgulamaktadır (235).

Homeostatik koşullar altında, bir organizmanın allojenik dokuyu nasıl tolere edebildiğini anlamak transplant tıbbı ve araştırmalarını ilerletmek için faydalı olacaktır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Genel Hasta Bilgisi

Akut antikor aracılı rejeksiyonu (“antibody-mediated rejection” ABMR) olan toplam 110 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm hastaların demografik bilgileri ve klinik takip bilgileri hasta dosyalarından ve transplant veri bankasından alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen 110 hastanın toplam olarak 492 renal iğne kor biyopsisi incelenmiştir. Tanı konan 110 biyopsi endikasyon biyopsisi olup, artmış kreatinin, yeni başlayan proteinüri veya greft disfonksiyonu nedeni ile yapılmıştır. Renal allogreft biyopsileri her hastadan en az 3 kor alınacak şekilde yapılmıştır. Renal allogreft iğne biyopsi korları %10'luk tamponlanmış formalin içinde fiks edildikten sonra, parafine gömülmüş ve 3 mikron kalınlığında olacak şekilde çok sayıda seviyeli kesit alınmıştır. Kesitlere sırasıyla Hematoksilin Eozin (H&E), Periodic Acid Schiff (PAS), Masson's Trichrome (MT), PAS-Methenamine Silver ve Kongo Red histokimyası rutin olarak boyanmıştır. Tüm renal allogreft biyopsileri yeniden değerlendirilerek en son yayınlanan Banff sınıflamasına göre sınıflandırılmıştır (236). Merkezimizde klinik olarak şüphelenilen tüm akut rejeksiyon (AR) epizotları allogreft biyopsisi ile doğrulanmaktadır.

Hastaların demografik ve klinik bilgileri Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’de verilmiştir. Tablo 3.1’de de görüleceği üzere hastaların 74’ü (%67,3) erkek iken, geri kalanı kadındır. Alıcı ve donör yaş ortalaması sırasıyla  $36,3 \pm 1,4$  ve  $45,6 \pm 1,4$ ’tür. Renal greftler 87 hastada (%79,1) akrabalık bağı olan canlı donörlerden ve 23 hastada (%20,9) kadavradan elde edilmiştir. Hastaların primer hastalıkları detaylı olarak Tablo 3.1’de izlenmektedir. Tüm hastalar ortalama olarak  $63 \pm 4$  ay takip edilmiştir.

Transplantasyon sonrası uygulanan immünosüpresif tedavi, kortikosteroid, kalsinörin inhibitörleri (siklosporin veya takrolimus) ve mikofenolat mofetil veya mikofenolat asit ile karakterize üçlü bir immünosüpresif protokole dayanmaktadır. Akut T hücresi aracılı rejeksiyon (“T-cell mediated Rejection” TCMR) tanısı alan hastalar, üç ila dört pulse metilprednizolon ile tedavi edilmiştir. Akut aktif ABMR atakları olan hastalar ise plazmaferez (günlük veya alternatif gün x DSA titresine göre 4-6 gün), intravenöz

immüoglobulin (plazmaferez tedavisinin sonunda 2g/kg veya her plazmaferez tedavisinden sonra 100 mg/kg) ve kortikosteroidler ile tedavi edilmiştir (237).

**Tablo 3.1.** Hastaların demografik ve klinik verilerinin dağılımı

|                        |                            | <b>n</b>  | <b>%</b>    |
|------------------------|----------------------------|-----------|-------------|
| <b>Alıcı Cinsiyet</b>  | <b>Kadın</b>               | <b>36</b> | <b>32,7</b> |
|                        | <b>Erkek</b>               | <b>74</b> | <b>67,3</b> |
| <b>Donor Cinsiyet</b>  | <b>Kadın</b>               | <b>72</b> | <b>65,5</b> |
|                        | <b>Erkek</b>               | <b>38</b> | <b>34,5</b> |
| <b>Donor Tipi</b>      | <b>Canlı-akraba</b>        | <b>87</b> | <b>79,1</b> |
|                        | <b>Kadavra</b>             | <b>23</b> | <b>20,9</b> |
| <b>İlaç</b>            | <b>Takrolimus</b>          | <b>59</b> | <b>53,7</b> |
|                        | <b>Siklosporin</b>         | <b>36</b> | <b>32,7</b> |
|                        | <b>Rapamisin</b>           | <b>15</b> | <b>13,6</b> |
| <b>Primer Hastalık</b> | <b>Glomerülonefrit</b>     | <b>41</b> | <b>37,3</b> |
|                        | <b>Polikistik böbrek</b>   | <b>9</b>  | <b>8,2</b>  |
|                        | <b>FMF</b>                 | <b>7</b>  | <b>6,3</b>  |
|                        | <b>VUR</b>                 | <b>12</b> | <b>10,9</b> |
|                        | <b>Alport</b>              | <b>6</b>  | <b>5,5</b>  |
|                        | <b>TİN</b>                 | <b>4</b>  | <b>3,6</b>  |
|                        | <b>Bilinmiyor</b>          | <b>31</b> | <b>28,2</b> |
| <b>Ölüm</b>            | <b>Var</b>                 | <b>11</b> | <b>10</b>   |
|                        | <b>Yok</b>                 | <b>99</b> | <b>90</b>   |
| <b>Ölüm Nedenleri</b>  | <b>Sepsis</b>              | <b>4</b>  | <b>36,4</b> |
|                        | <b>Myokard infarktüsü</b>  | <b>3</b>  | <b>27,3</b> |
|                        | <b>Pnömoni</b>             | <b>2</b>  | <b>18,1</b> |
|                        | <b>Intrakranial kanama</b> | <b>1</b>  | <b>9,1</b>  |
|                        | <b>Akciğer karsinomu</b>   | <b>1</b>  | <b>9,1</b>  |

FMF: “Familial Mediterranean fever” Ailevi akdeniz ateşi

VUR: Veziko üretral reflü

TİN: Tübülointerstisyel nefrit

**Tablo 3.2.** Hastaların demografik ve klinik verilerinin ortalama değerleri

|                      | <b>Ortalama <math>\pm</math> SE</b>  | <b>Minimum</b> | <b>Maksimum</b> |
|----------------------|--------------------------------------|----------------|-----------------|
| <b>Alıcı Yaş</b>     | <b>36,3 <math>\pm</math> 1,46</b>    | <b>17</b>      | <b>58</b>       |
| <b>Donor Yaş</b>     | <b>45,6 <math>\pm</math> 1,44</b>    | <b>21</b>      | <b>63</b>       |
| <b>Takip</b>         | <b>63 <math>\pm</math> 4 ay</b>      | <b>8 ay</b>    | <b>142 ay</b>   |
| <b>Ölüm</b>          | <b>76,4 <math>\pm</math> 12,7 ay</b> | <b>12 ay</b>   | <b>128 ay</b>   |
| <b>ABMR Gelişimi</b> | <b>12,3 <math>\pm</math> 1,75 ay</b> | <b>1 ay</b>    | <b>38 ay</b>    |

Hastalar rejeksiyonun türüne göre iki gruba ayrılmıştır;

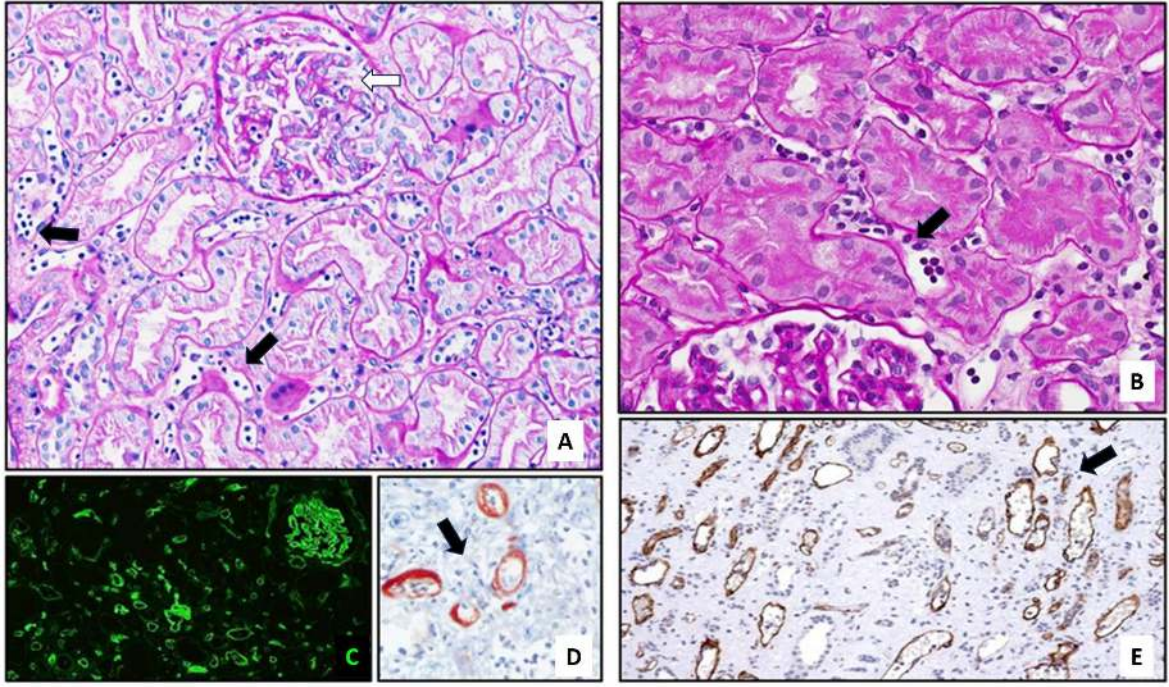
- **Grup 1**, sadece aktif ABMR tanısı olan hastaları içermektedir.

• **Grup 2**, aktif ABMR ve akut TCMR bulgularını birlikte içeren miks rejeksiyonlu hastaları içermektedir.

Ek olarak, aktif ABMR'si olan alıcılar rejeksiyonun tanı konduğu zamana göre iki gruba ayrılmıştır;

• **Erken ABMR (eABMR)**, transplantasyondan sonra erken dönemde (<30 gün) aktif ABMR tanısı alan hastaları içermektedir.

• **Geç ABMR (gABMR)** transplantasyondan sonra geç dönemde (>30 gün) aktif ABMR tanısı alan hastaları içermektedir.



**Resim 3.1.** (A) PTKitis ve Glomerülitis; ABMR ile karakterize olarak glomerülde (beyaz ok) ve PTK'lerde (siyah ok) şiddetli mikrovasküler inflamasyon (H&E X100), (B) PTKitis, PTK lümeninde (ok) şiddetli derecede inflamasyon (PAS x400), (C) İmmüno Floresan incelemede glomerül kapillerlerinde ve PTK'lerde diffüz C4d ekspresyonu (x40), (D) PTK'lerde sirküler (ok) C4d ekspresyonu (x400), (E) PTK'lerde diffüz sirküler ve kuvvetli C4d ekspresyonu. Dilate görünümde PTK'lerin lümenlerinde orta-şiddetli derecelerde inflamasyon dikkati çekmektedir (x200).

### 3.2. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal İnceleme

Araştırmaya dahil edilen 110 hastanın tanı sırasında ve takipleri boyunca yapılan toplam 492 adet renal allograft biyopsisi histopatolojik olarak değerlendirilerek Banff (236) sistemine göre peritübüler kapiller (PTK), glomerüller ve interstisyel iltihabi hücre infiltrasyonu yeniden skorlandı (**Resim 3.1**). Tüm immünohistokimya (IHK) boyamaları tanı sırasında yapılan 110 adet allograft biyopsisine yapılmıştır. Geriye kalan 382 takip biyopsisinde ise histopatolojik olarak difüz (>%50) interstisyel fibrozis (IF) gelişimi araştırılmıştır. Her iki parametrede var veya yok olarak değerlendirilmiştir.

IHK incelemesi için tüm hastaların tanı konan biyopsilerinin (n:110) parafin bloklarından 3 mikron kalınlığında kesitler elde edilmiştir. Renal biyopsi kesitlerinin hepsi elektrostatik yüklü lamlara (ISOTHERM, pozitif yüklü) alınıp, 60°C'de etüvde deparafinize

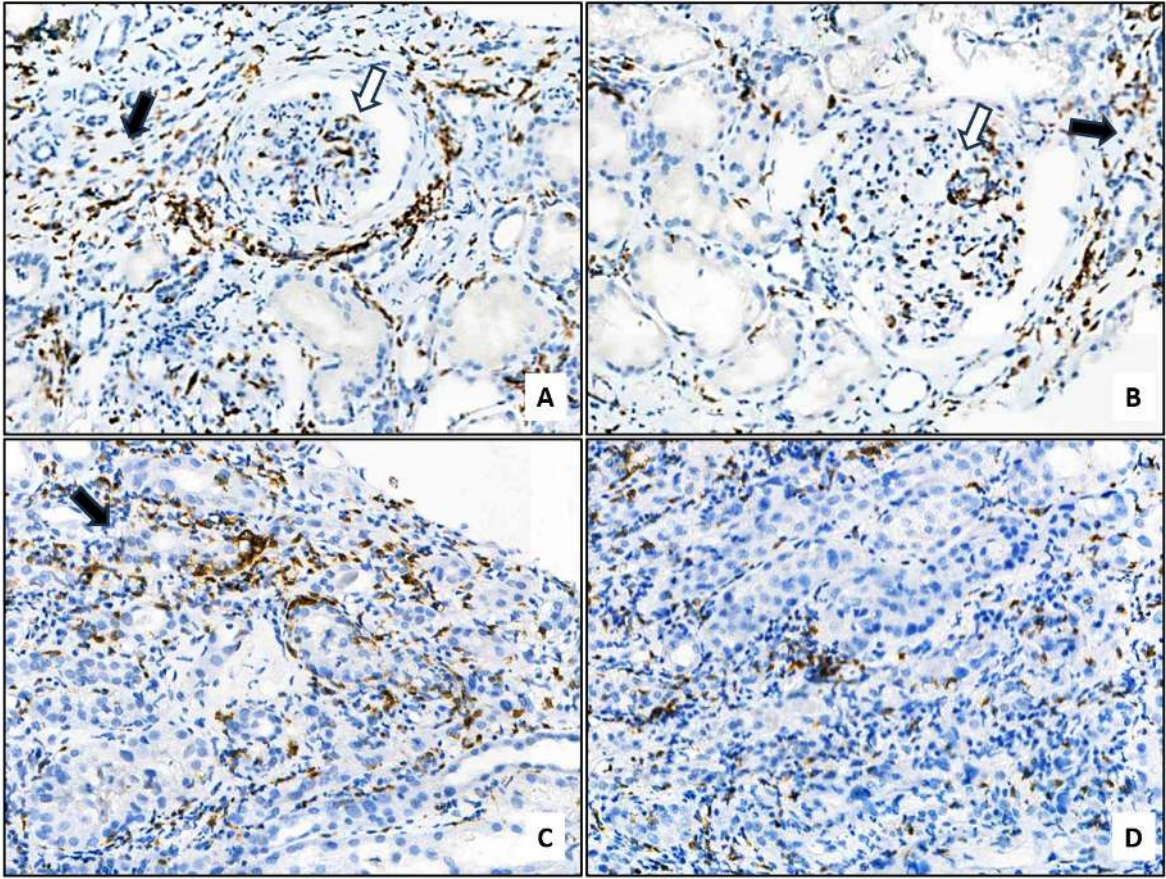
edilmiştir. Tüm boyamalar tam otomatik IHK boyama cihazı (Dako, OMNIS, Agilent, CA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. IHK boya işleminde 3, 3' diaminabenzidin tetrahidroklorit (DAB) kromojeni içeren hazır kit (EnVision FLEX Visualization Systems for Autostainer, Dako, Agilent, CA) kullanılmıştır.

### **3.2.1. Renal inflamasyonun immünohistokimyasal olarak incelenmesi**

PTK'lerde, glomerüllerde ve interstisyumda makrofaj ve lenfosit infiltrasyonunun varlığı ve yoğunluğu sırasıyla CD68 ve CD3 antikorları (Agilent, Dako, CA) ile gösterilmiştir (Resim 3, 4). Ayrıca, PTK'lerde, glomerüllerde ve interstisyumda CD4+ T-hücreler, CD8+ T-hücreler ve HLA-DR pozitif inflamatuvar hücreler bu hücelere spesifik antikorlar ile (Agilent, Dako, CA) değerlendirilmiştir (**Resim 3.2, 3.3**). Ayrıca tüm interstisyel infiltrasyon gösteren lökositlerde TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , CD80 ve CD86 ekspresyonlarının varlığı incelenmiştir (Agilent, Dako, CA).

İnterstisyumda infiltrasyon gösteren tüm immün hücrelerin yukarıdaki antikorlar ile boyanması üçlü bir ölçek kullanılarak yarı kantitatif olarak derecelendirilmiştir (Resim 3);

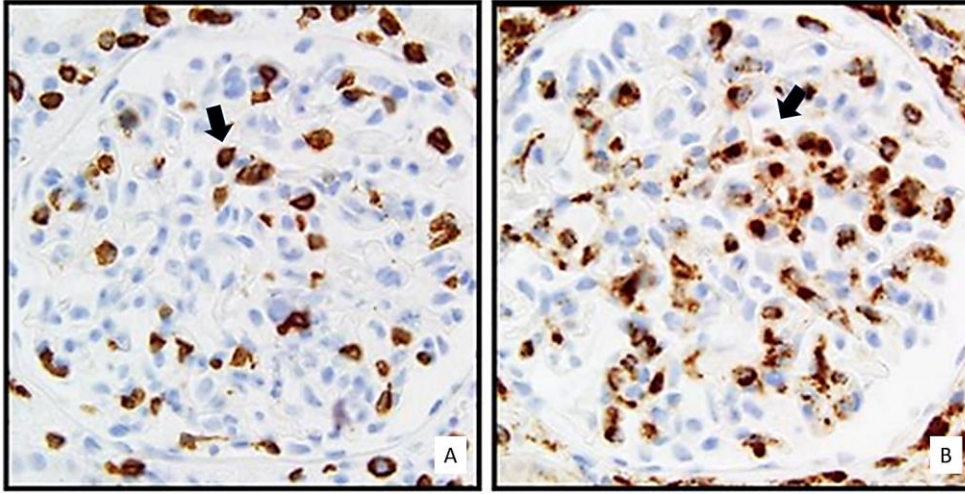
- **Grade 1:** boyanma gösteren hücreler tüm infiltrasyonun %10'undan az
- **Grade 2:** boyanma gösteren hücreler tüm infiltrasyonun %10-30'u
- **Grade 3:** boyanma gösteren hücreler tüm infiltrasyonun %30'undan fazla



**Resim 3.2.** İnterstisyel ve glomerüler immün hücrelerin dağılımı, (A) interstisyel (siyah ok) ve glomerüler (beyaz ok) CD3+ T-lenfositler, (B) interstisyel (siyah ok) ve glomerüler (beyaz ok) CD68+ makrofajlar, (C) interstisyel CD4+ T-lenfosit (ok) infiltrasyonu, (D) interstisyel CD8+ T-lenfosit (ok) infiltrasyonu, (x100).

Glomerüler infiltrasyon gösteren tüm lökositlerin immün boyanması sonucu pozitif olarak elde edilen tüm hücreler toplam glomerül sayısına bölünerek ortalama sayı elde edilmiştir. Ortalama değerler aşağıda verildiği gibi üç grub altında değerlendirmeye alınmıştır (**Resim 3.3**);

- **G1:** Tüm glomerüllerdeki ortalama hücre sayısı 1'den düşük
- **G2:** Tüm glomerüllerdeki ortalama hücre sayısı 1 ile 2 arası
- **G3:** Tüm glomerüllerdeki ortalama hücre sayısı 2'den yüksek



**Resim 3.3.** (A) Glomerülde CD68+ makrofaj (ok) infiltrasyonu (x400), (B) glomerülde CD3+ T-lenfosit (ok) infiltrasyonu (x400).

PTK infiltrasyon gösteren lökositlerin immün boyama değerlendirmesi aşağıdaki skala kullanılarak yapılmıştır (**Resim 3.1**);

- **PTK1:** PTK içinde infiltrasyon gösteren pozitif hücre sayısı 1-4 arası
- **PTK2:** PTK içinde infiltrasyon gösteren pozitif hücre sayısı 5-10 arası
- **PTK3:** PTK içinde infiltrasyon gösteren pozitif hücre sayısı 10'dan fazla

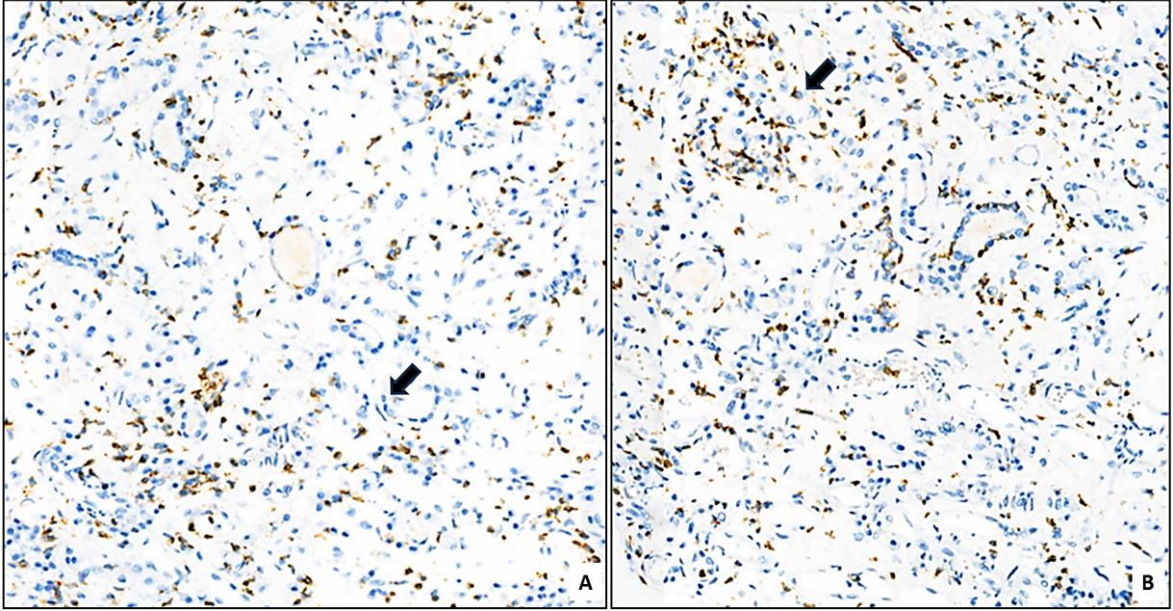
Ek olarak, interstisyumda infiltrasyon gösteren lökositlerin yüzeyinde PD1 (GenomeMe) ve PD-L1 (Agilent, Dako, 22C3, CA) ekspresyonunun birlikteliği aranmış (**Resim 3.4**) ve her iki antikoru da eksprese eden vakalar pozitif birliktelik olarak kabul edilmiştir;

- **iPD1/PD-L1 (-)** : İnterstisyel lökositlerde hem PD1 hem de PD-L1 negatiftir
- **iPD1/PD-L1 (+)** : İnterstisyel lökositlerde hem PD1 hem de PD-L1 pozitifdir.

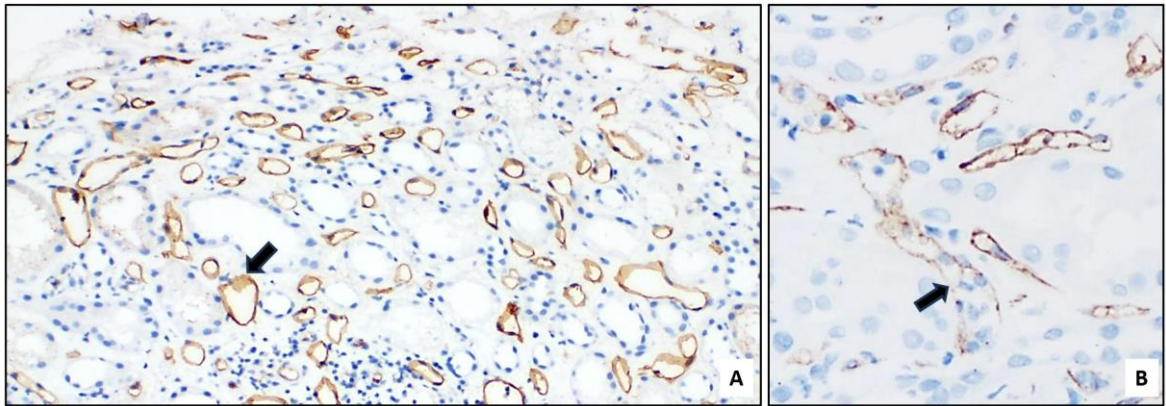
### 3.2.2. Peritübüler kapillerlerin (PTK) immünohistokimyasal incelemesi

Merkezimizde renal allograft biyopsilerinin incelenmesi sırasında rutin olarak tüm biyopsilere C4d (Medaysis®) ve HLA-DR (Agilent, Dako, CA) ile immünohistokimyasal olarak immün boyama uygulanmaktadır. Çalışmaya dahil edilen hastaların hepsinde tanı verilen biyopside PTK'lerde C4d antikoru pozitifdir (**Resim 3.5**). Pozitiflik derecesine göre biyopsiler C4d açısından üç grupta incelenmiştir;

- **C4d-1:** <%10 PTK boyama;
- **C4d-2:** %10-50 PTK boyama;
- **C4d-3:** >%50 PTK boyama.



**Resim 3.4.** (A) İnterstisyel infiltrasyon gösteren inflamatuvar hücrelerde (ok) PD-1 ekspresyonu (x200), (B) İnterstisyel infiltrasyon gösteren inflamatuvar hücrelerde (ok) PD-L1 ekspresyonu (x200).



**Resim 3.5.** (A) PTK'lerde diffüz kuvvetli sirküler C4d ekspresyonu (ok) (x200), (B) Sirküler C4d ekspresyonu gösteren PTK'in lümeninde belirgin inflamasyon (ok) (x400).

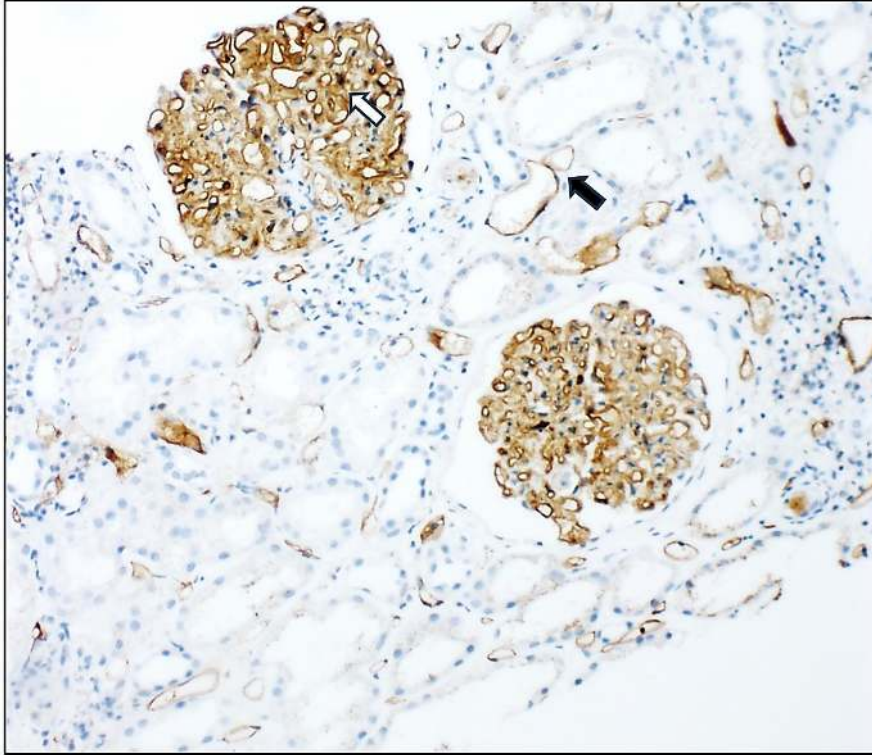
PTK'lerin endoteli normal şartlarda kuvvetli olarak HLA-DR ekspresyonu göstermektedir (**Resim 3.6**). Bununla birlikte, HLA-DR ekspresyon kaybı endotel hasarına

ve PTK yıkımına işaret etmektedir (238). Bu nedenle PTK boyanma yüzdelere göre PTK destrüksiyonu da (D) üçlü bir ölçek kullanılarak yarı kantitatif olarak derecelendirildi;

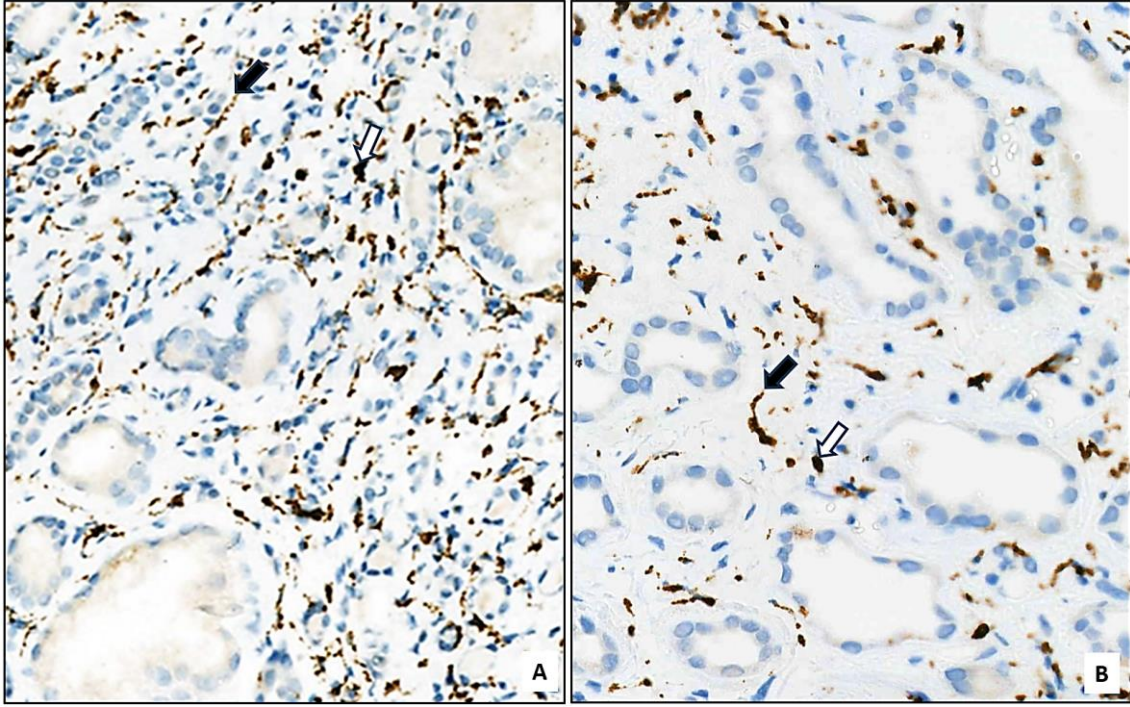
- **PTK-D0:** HLA-DR ile PTK'lerde >%50 boyama.
- **PTK-D1:** HLA-DR ile PTK'lerde %10-50 boyama;
- **PTK-D2:** HLA-DR ile PTK'lerde <%10 boyama;

Ek olarak, PTK'leri döşeyen endotel hücrelerinin yüzeyinde PD1 (GenomeMe) ve PD-L1 (Agilent, Dako, 22C3, CA) ekspresyonunun birlikteliği aranmış (**Resim 3.7**) ve her iki antikoru da eksprese eden vakalar pozitif birliktelik olarak kabul edilmiştir;

- **ePD1/PD-L1 (-)** : PTK endotel hücrelerinde hem PD1 hem de PD-L1 negatiftir
- **ePD1/PD-L1 (+)** : PTK endotel hücrelerinde hem PD1 hem de PD-L1 pozitifdir.



**Resim 3.6.** Böbrekte HLA-DR ekspresyonu. Normal böbrekte glomerül (beyaz ok) ve PTK'lerin endoteli kuvvetli ve sirküler olarak HLA-DR ile pozitif boyanır (x200).



**Resim 3.7.** Endotelial ve inflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu; (A) PTK endotel hücresinde (siyah ok) ve interstisyel immün hücrede (beyaz ok) PD-L1 ekspresyonu (x400), (B) PTK endotel hücresinde (siyah ok) ve interstisyel immün hücrede (beyaz ok) PD-1 ekspresyonu (x400).

### 3.2.3. Tübüllerin immünohistokimyasal incelemesi

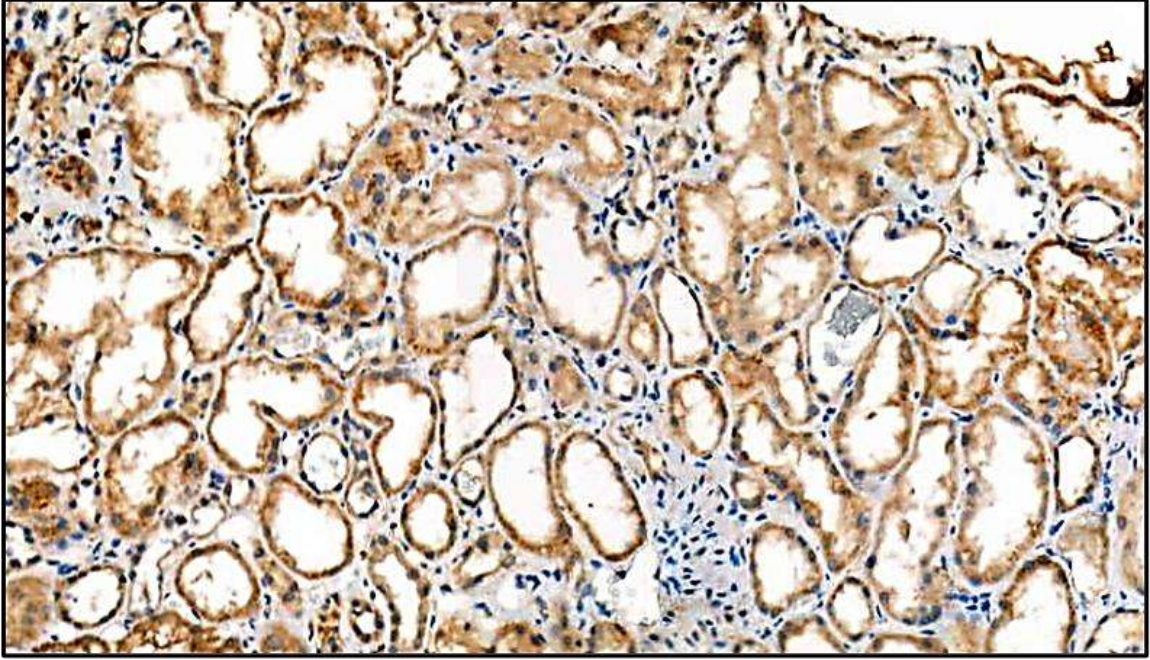
Tübüllerde HLA-DR (Agilent, Dako, CA), “Tumor Necrosis Factor alpha” (TNF- $\alpha$ ) (Abcam, UK), “Interferon gama” (IFN- $\gamma$ ) (Abcam, UK), “Transforming Growth Factor Beta” (TGF- $\beta$ ) (Agilent, Dako, CA), CD80 (Rabbit, polyclonal, 1/100, Abcam, UK), CD86 (Rabbit, monoclonal, 1/100, Abcam, UK), PD1 (GenomeMe) ve PD-L1 (Agilent, Dako, 22C3, CA) ekspresyonlarının varlığı incelenmiştir (**Resim 3.8, 3.9**). Tübüler PD1 ve PD-L1 ekspresyonları var veya yok olarak değerlendirilirken (**Resim 3.8**), tübüler HLA-DR, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve TGF- $\beta$ , ekspresyonları aşağıdaki gibi değerlendirilmiştir (**Resim 3.9**);

#### 3.2.3.1. Tübüler HLA-DR ekspresyonunun değerlendirmesi

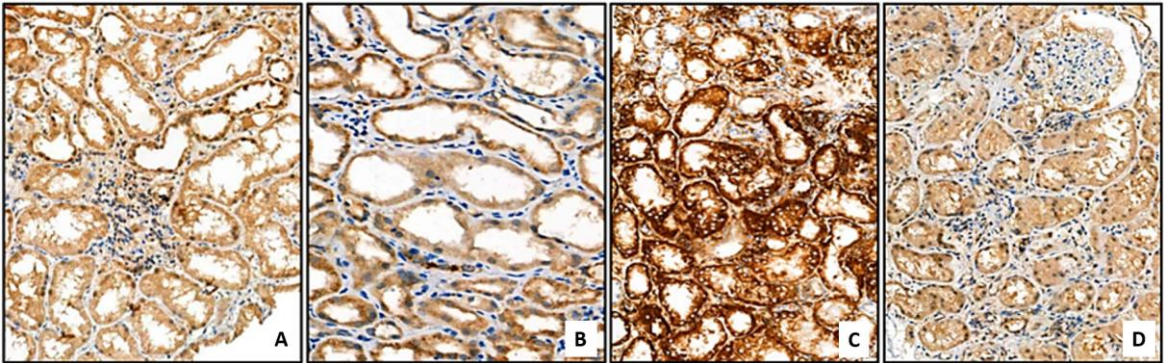
- **TDR0:** Tübüllerde HLA-DR ekspresyonu yok
- **TDR1:** Sadece proksimal tübüllerde HLA-DR ekspresyonu var.
- **TDR2:** Tüm tübüllerde HLA-DR ekspresyonu var

### 3.2.3.2. Tübüler TNF- $\alpha$ ekspresyonunun değerlendirmesi

- **TTNF0:** Tübüllerde TNF-  $\alpha$  ekspresyonu yok
- **TTNF1:** Sadece proksimal tübüllerde TNF-  $\alpha$  ekspresyonu var.
- **TTNF2:** Tüm tübüllerde TNF-  $\alpha$  ekspresyonu var



**Resim 3.8.** Diffüz tübüler PD-L1 ekspresyonu (x200).



**Resim 3.9.** (A) Tübüler TGF- $\beta$  ekspresyonu, (B) Tübüler TNF- $\alpha$  ekspresyonu, (C) Tübüler IFN- $\gamma$  ekspresyonu, (D) Tübüler CD86 ekspresyonu

### 3.2.3.3. Tübüler IFN- $\gamma$ ekspresyonunun değerlendirmesi

- **TIFN0:** Tübüllerde IFN- $\gamma$  ekspresyonu yok
- **TIFN1:** Sadece proksimal túbüllerde IFN- $\gamma$  ekspresyonu var
- **TIFN2:** Tüm túbüllerde IFN- $\gamma$  ekspresyonu var

### 3.2.3.4. Tübüler TGF- $\beta$ ekspresyonunun değerlendirmesi

- **TTGF0:** Tübüllerde TGF- $\beta$  ekspresyonu yok
- **TTGF1:** Sadece proksimal túbüllerde TGF- $\beta$  ekspresyonu var
- **TTGF2:** Tüm túbüllerde TGF- $\beta$  ekspresyonu var

CD80+, CD86+ túbüllerin sayısı sayıldı ve sonuçlar pozitif túbüllerin yüzdesi olarak ifade edildi ve semikantitatif olarak aşağıdaki gibi grublandı;

### 3.2.3.5. Tübüler CD80 ve CD86 ekspresyonunun değerlendirmesi

- **Grade 0:** Pozitif boyanma yok
- **Grade 1:** Boyanma gösteren túbüller  $\leq$ %10
- **Grade 2:** Boyanma gösteren túbüller  $>$ %10

## 3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizlerin hepsi Windows için geliştirilen SPSS yazılımı (IBM® SPSS® Statistics 25.0) kullanılarak yapılmıştır. Nicel değişkenler için veriler ortalama  $\pm$  standart hata (SE) olarak verilmiştir. Sürekli değişkenler için çeyrekler arası aralık (IQR), kategorik değişkenler için yüzde değerler verilmiştir. Tek değişkenli analizde grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Kategorik verilerin karşılaştırılmasında ise Fisher'in kesinlik testi ve ki-kare testi kullanılmıştır. Korelasyon analizi için Spearman rank korelasyonu kullanılmıştır. Greft kaybına kadar geçen süreyi analiz etmek için Kaplan-Meier yöntemi ve log-rank testi uygulanmıştır. Fonksiyonel

allogreft ile ölen hastalar sansürlenmiştir. P değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### **3.4. Araştırma Kurulu Onayı ve Etik**

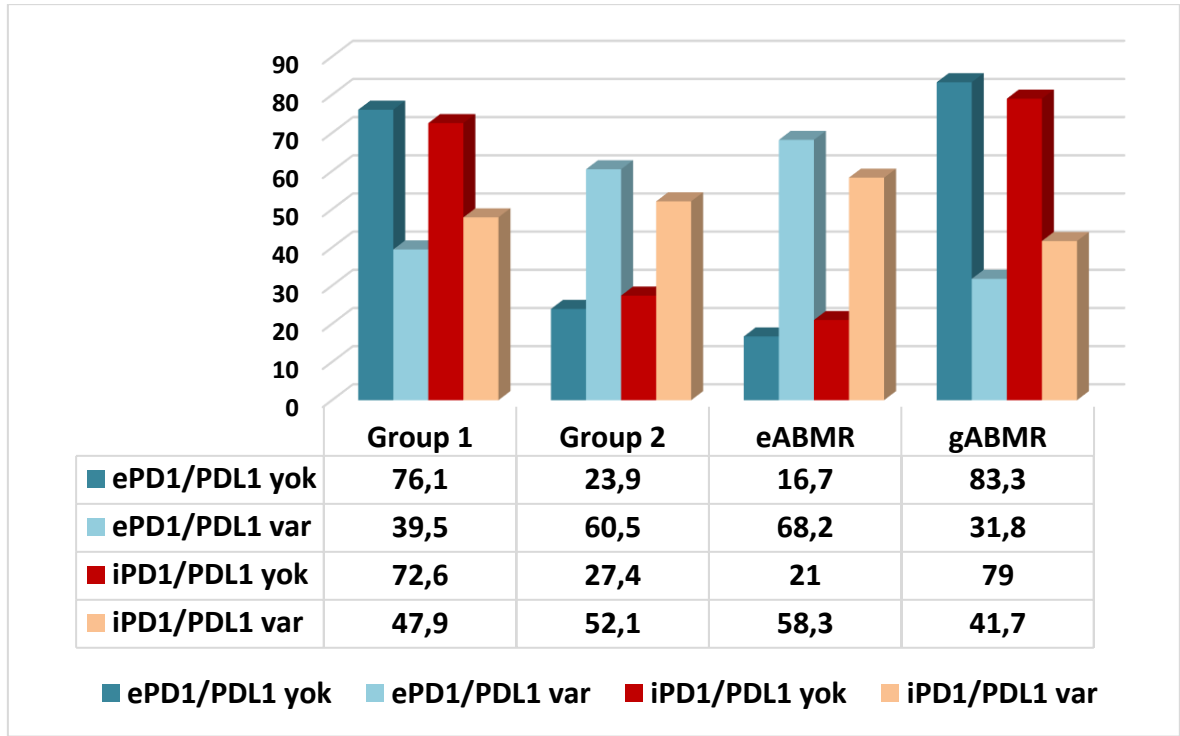
Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: KA22/402) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Ayrıca çalışma, 1964 Helsinki Bildirgesi ve sonraki değişikliklerine uygun olarak tasarlanmıştır. Raporlanan araştırma ve klinik faaliyetler, “Organ Ticareti ve Organ Nakli Turizmi İstanbul Deklarasyonunda” belirtilen İstanbul Bildirgesi İlkeleri ile uyumludur (239).

#### 4. SONUÇLAR

Tüm hastalarda ortalama olarak  $12,3 \pm 1,75$  ay içinde ABMR meydana gelmiştir. Sadece 41 (%37,3) hastada erken dönemde (<30gün) ABMR (eABMR) gelişmiştir. Geriye kalan 69 (%62,7) hastada ise ABMR otuz günden sonra gelişmiştir. Tüm hastaların biyopsilerinin yeniden değerlendirilmesinde 68 (%61,8) hastada saf ABMR tanısı doğrulanırken geriye kalan 42 (% 38,2) hastaya ise TCMR ve ABMR'in birlikte eşlik ettiği miks rejeksiyon tanısı verilmiştir. Saf ABMR tanısı olan hastalar grup 1 olarak miks rejeksiyonu olan hastalar ise Grup 2 olarak değerlendirilmiştir.

Şekil 4.1'de tüm hastaların gruplara göre endotelial ve inflamatuvar PD-1/PD-L1 ekspresyonunun dağılımı izlenmektedir. Grup 1 ile karşılaştırıldığında, Grup 2 hastalarda endotelial ve inflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu insidansı daha yüksek olarak bulunmuştur ( $p < 0.01$ ). Benzer şekilde erken dönem rejeksiyon tanısı alan hastalar geç dönem tanı alan hastalara oranla daha fazla oranlarda endotelial ve inflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu göstermiştir ( $p < 0.001$ ).

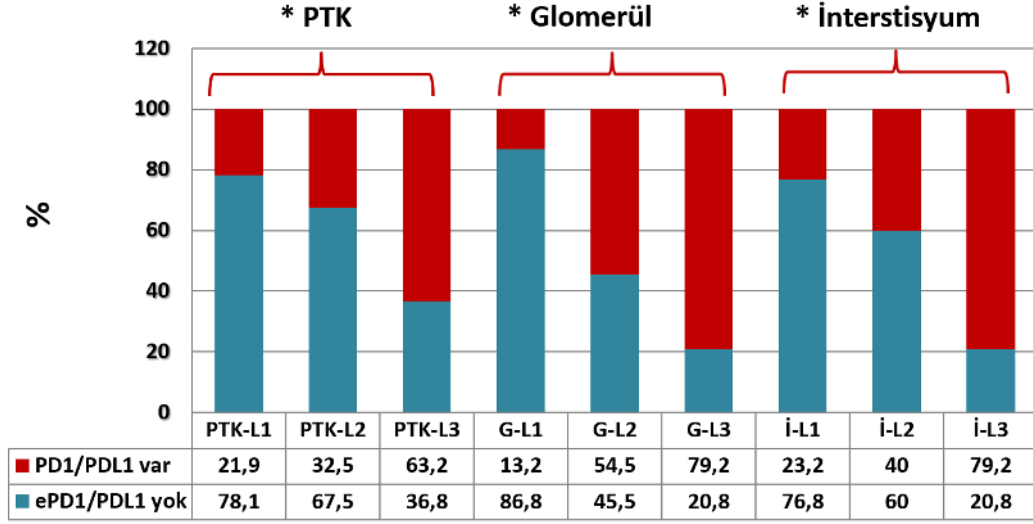
Endotelial ve inflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonunun insidansı, artan PTK, glomerüler ve interstisyel lökosit infiltrasyon dereceleriyle artış göstermektedir. (Şekil 4.2, 4.3). Benzer şekilde, endotelial ve inflamatuvar hücre PD-L1/PD-1 ekspresyon oranı, PTK, glomerüler ve interstisyel makrofaj infiltrasyonunun artan dereceleri ile artış göstermektedir (Şekil 4.4, 4.5). Ek olarak, endotelial ve inflamatuvar hücre PD-L1/PD-1 ekspresyon oranı, artan PTK, glomerüler ve interstisyel CD8+ ve CD4+ lenfosit infiltrasyonu dereceleriyle artış göstermektedir (Şekil 4.6-4.9). Ayrıca endotelial ve inflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüler ve interstisyel HLA-DR pozitif hücre infiltrasyonu ile de paralel bir artış göstermektedir (Şekil 4.10, 4.11).



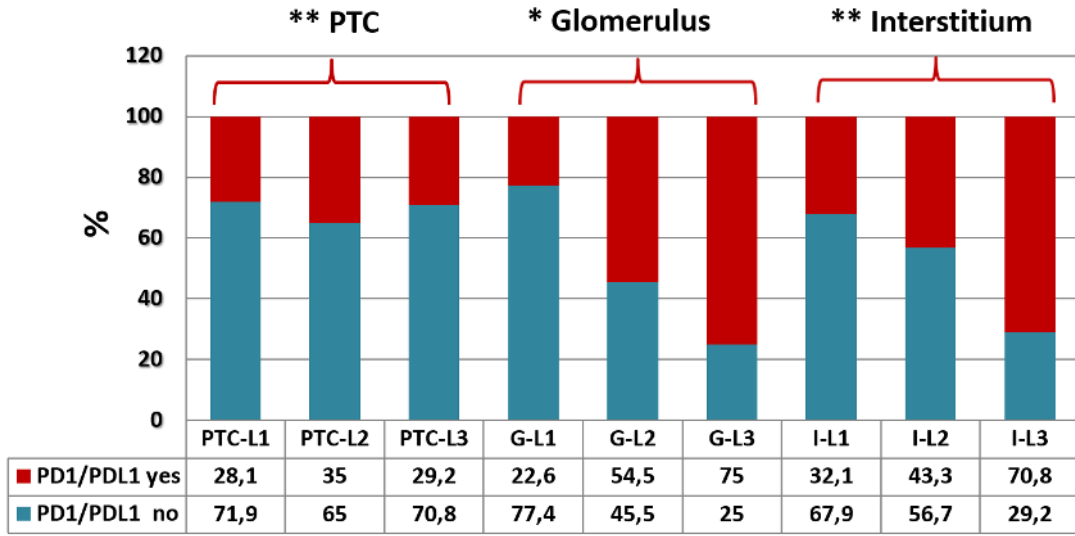
**Şekil 4.1.** Grup 2 ve Erken ABMR (eABMR) grubundaki hastalar Grup 1 ve geç ABMR (gABMR) grubundaki hastalara göre daha yüksek oranlarda endotelial ve inflamatuvar PD-1/PDL1 ekspresyonu göstermektedir.

Endotelial ve inflamatuvar hücre PD-1/PDL1 ekspresyonu, tübüler HLA-DR ekspresyonu ve PTK C4d ekspresyonu ile pozitif bir ilişki göstermektedir (Şekil 4.12, 4.13). Artan endotelial ve inflamatuvar hücre PD-1/PDL1 ekspresyonu ile tübüler HLA-DR ekspresyonu ( $p < 0.001$ ) ve C4d ekspresyonunun da ( $P = 0.003$ ) arttığı dikkati çekmiştir. Bununla birlikte PTK HLA-DR ekspresyonu, endotelial ve inflamatuvar hücre PD-1/PDL1 ekspresyon oranları ile negatif bir ilişki göstermektedir ( $p < 0,001$ ). HLA-DR ekspresyonunun PTK'lerde kaybı bize endotel hasarını gösterdiği için bu durum PTK destrüksiyon olarak kabul edilmiştir. Bu bulgu artan endotelial ve inflamatuvar hücre PD-1/PDL1 ekspresyonu ile paralel şekilde PTK destrüksiyonunun da (PTK-D) arttığını göstermektedir (Şekil 4.12, 4.13).

İnteristisyumda infiltrasyon gösteren TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve CD86 pozitif lökositlerin sayısı arttıkça ve tübüler TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve CD80 ekspresyonları arttıkça endotelial ve inflamatuvar hücre PD-1/PDL1 ekspresyonlarının da arttığı dikkati çekmiştir (Şekil 4.13-4.17). Tübüler HLA-DR, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve CD80 ekspresyonları birbirleri ile çok anlamlı şekilde korelasyon göstermektedir (Tablo 4.1).



**Şekil 4.2.** Endotelial hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüller ve interstisyel lökosit infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (\* $p<0,001$ )



**Şekil 4.3.** İnflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüller ve interstisyel lökosit infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (\* $p<0,001$ , \*\* $p=0,001$ )

Ayrıca interstisyel lökositlerde izlenen HLA-DR, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve CD86 ekspresyonu ile tübüler HLA-DR, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve CD80 ekspresyonu arasında da çok anlamlı şekilde pozitif ilişki bulunmuştur (**Tablo 4.2**).

**Tablo 4.1.** Tübüler protein ekspresyonlarının birbirleri ile korelasyonu

|                                      | TÜBÜL  |                                  |                                     |                                     |                                     |                                     |
|--------------------------------------|--------|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|                                      | HLA-DR | TNF- $\alpha$                    | TGF- $\beta$                        | IFN- $\gamma$                       | CD80                                | PD-L1                               |
| <b>Tübül-HLA-DR</b>                  |        | <b>r=0,284</b><br><b>P=0,003</b> | <b>r=0,421</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,314</b><br><b>P=0,001</b>    | <b>r=0,389</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,270</b><br><b>P=0,004</b>    |
| <b>Tübül-TNF-<math>\alpha</math></b> |        |                                  | <b>r=0,871</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,825</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,882</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,745</b><br><b>P&lt;0.001</b> |
| <b>Tübül-TGF-<math>\beta</math></b>  |        |                                  |                                     | <b>r=0,852</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,865</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,807</b><br><b>P&lt;0.001</b> |
| <b>Tübül-IFN-<math>\gamma</math></b> |        |                                  |                                     |                                     | <b>r=0,704</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,736</b><br><b>P&lt;0.001</b> |
| <b>Tübül-CD80</b>                    |        |                                  |                                     |                                     |                                     | <b>r=0,673</b><br><b>P&lt;0.001</b> |

**Tablo 4.2.** Tübüler ve interstisyel protein ekspresyonlarının korelasyonu

|                                      | INTERSTİSYUM                        |                                     |                                     |                                     |                                     |
|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|                                      | HLA-DR                              | TNF- $\alpha$                       | TGF- $\beta$                        | IFN- $\gamma$                       | CD86                                |
| <b>Tübül-HLA-DR</b>                  | <b>r=0,448</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,433</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,381</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,408</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,429</b><br><b>P&lt;0.001</b> |
| <b>Tübül-TNF-<math>\alpha</math></b> | <b>r=0,488</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,543</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,487</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,655</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,725</b><br><b>P&lt;0.001</b> |
| <b>Tübül-TGF-<math>\beta</math></b>  | <b>r=0,658</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,720</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,691</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,827</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,841</b><br><b>P&lt;0.001</b> |
| <b>Tübül-IFN-<math>\gamma</math></b> | <b>r=0,534</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,613</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,572</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,736</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,719</b><br><b>P&lt;0.001</b> |
| <b>Tübül-CD80</b>                    | <b>r=0,449</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,498</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,479</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,585</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,737</b><br><b>P&lt;0.001</b> |
| <b>Tübül-PD-L1</b>                   | <b>r=0,597</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,649</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,551</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,708</b><br><b>P&lt;0.001</b> | <b>r=0,618</b><br><b>P&lt;0.001</b> |

Hiçbir hastada tübüler PD-1 boyanması boyanması saptanamamıştır. Bununla birlikte bazı hastalarımızda tübüler PD-L1 boyanması saptanmıştır. Tübüler PD-L1 ekspresyonu hem endotelial ( $r=0,340$ ,  $p<0.001$ ) hem de inflamatuvar ( $r=0,247$ ,  $P=0,009$ )

hücre PD-D1/PD-L1 ekspresyonları ile kuvvetli pozitif ilişki göstermiştir. Ayrıca tübüler PD-L1 ekspresyon varlığı ile tübüler ve interstisyel lökosit HLA-DR, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CD80 ve CD86 ekspresyonu arasında da kuvvetli pozitif ilişki saptanmıştır (Tablo 4.1, 4.2).

Hastaların ortalama  $63 \pm 4$  ay takibi sırasında toplam olarak 31 (28,2) hastada ortalama  $15,6 \pm 1,7$  ay içinde diffüz ( $>50\%$ ) interstisyel fibrozis (IF) gelişimi saptanmıştır. Miks rejeksiyonu olan Grub 2 ( $42,9\%$ ) hastalar Grub 1 ( $19,1\%$ ) ile karşılaştırıldığında bu hastalarda daha fazla oranlarda IF geliştiği dikkati çekmiştir ( $P=0,007$ ). Ayrıca her iki grub arasında IF gelişme zamanı açısından da istatistiksel olarak çok anlamlı fark vardır ( $P<0,001$ ). Grub 2 hastalarda IF gelişimi ortalama olarak  $8,8 \pm 0,9$  ay içinde meydana gelirken IF Grub 1 hastalarda  $23,9 \pm 1,8$  ay içinde gelişmiştir. Erken ve geç dönem ABMR gelişimi birbiri ile karşılaştırıldığında IF gelişimi açısından istatistiksel olarak farklılık göstermediği izlenmiştir. Bununla birlikte her iki grub IF gelişimin ortalama zamanı açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak çok anlamlı fark olduğu saptanmıştır ( $P=0,001$ ). Erken ABMR grubundaki hastalar ortalama  $9,7 \pm 1,5$  ay içinde IF gelişimi gösterirken, geç ABMR grubundaki hastalar ise  $20,3 \pm 2,2$  ay içinde IF gelişimi göstermişlerdir ( $P=0,001$ ).

Endotelyal hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu pozitif ve negatif olan hastalarda IF gelişimi sırasıyla  $52,3\%$  ve  $12,1\%$  olarak saptanmıştır ( $p<0,001$ ). Bu iki grub arasında IF gelişim zamanı açısından da istatistiksel olarak farklılık izlenmiştir. Endotelyal hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu pozitif olan hastalarda IF gelişimi ortalama olarak  $12 \pm 1,4$  ay içinde meydana gelirken, endotelyal PD-1/PD-L1 ekspresyonu negatif olan hastalarda ise IF gelişimi ortalama  $25,1 \pm 3,1$  ay içinde saptanmıştır ( $P<0,001$ ). İnflamatuar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu pozitif ve negatif olan hastalarda IF gelişimi sırasıyla  $47,9\%$  ve  $12,9\%$  olarak saptanmıştır ( $P<0,001$ ). Ayrıca her iki grub arasında IF gelişim zamanı açısından da istatistiksel olarak farklılık izlenmiştir ( $P=0,013$ ). İnflamatuar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu pozitif olan hastalarda IF gelişimi ortalama olarak  $13 \pm 1,5$  ay içinde meydana gelirken inflammatuar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu negatif olan hastalarda IF gelişimi ise  $22,3 \pm 3,9$  ay içinde saptanmıştır ( $P=0,013$ ). İnterstisyumda infiltrasyon gösteren HLA-DR, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve CD86 pozitif lökositlerin sayısı arttıkça ve tübüler HLA-DR, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  CD80 ve PD-L1 ekspresyonları arttıkça IF riskinin arttığı dikkati çekmiştir (**Tablo 4.3**).

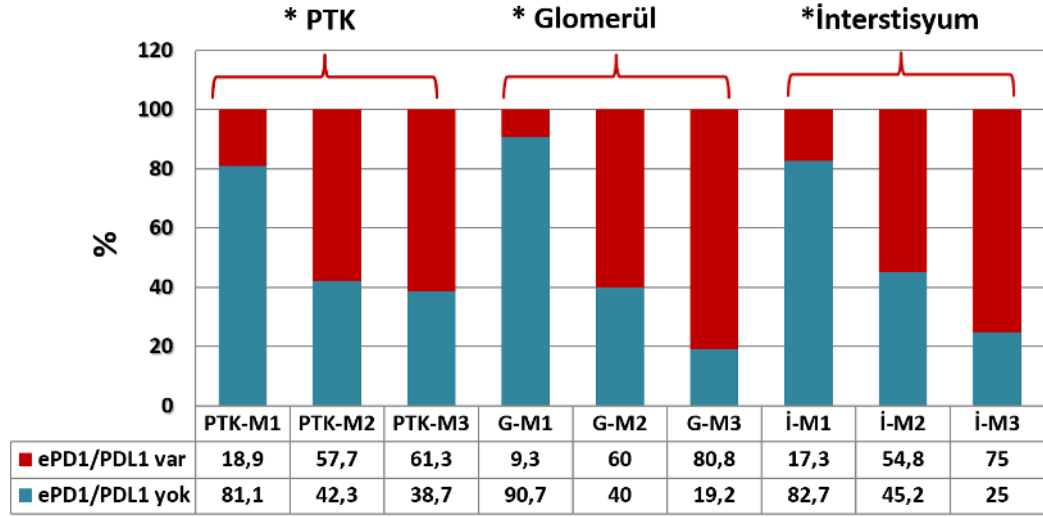
**Tablo 4.3.** Tübüler ve interstisyel protein ekspresyonlarının IFTA gelişimi ile korelasyonu

|                                              | <b>IFTA varlığı</b>        |
|----------------------------------------------|----------------------------|
| <b>Tübül-HLA-DR</b>                          | <b>r=0,345, P&lt;0.001</b> |
| <b>Tübül-TNF-<math>\alpha</math></b>         | <b>r=0,316, P=0.001</b>    |
| <b>Tübül-TGF-<math>\beta</math></b>          | <b>r=0,391, P&lt;0.001</b> |
| <b>Tübül-IFN-<math>\gamma</math></b>         | <b>r=0,297, P=0.002</b>    |
| <b>Tübül-CD80</b>                            | <b>r=0,304, P=0.001</b>    |
| <b>Tübül-PD-L1</b>                           | <b>r=0,316, P=0.001</b>    |
| <b>İnterstisyum- HLA-DR</b>                  | <b>r=0,448, P&lt;0.001</b> |
| <b>İnterstisyum- TNF-<math>\alpha</math></b> | <b>r=0,451, P&lt;0.001</b> |
| <b>İnterstisyum- TGF-<math>\beta</math></b>  | <b>r=0,332, P&lt;0.001</b> |
| <b>İnterstisyum- IFN-<math>\gamma</math></b> | <b>r=0,403, P&lt;0.001</b> |
| <b>İnterstisyum- CD86</b>                    | <b>r=0,412, P&lt;0.001</b> |
| <b>İnterstisyum-PD-L1</b>                    | <b>r=0,597, P&lt;0.001</b> |

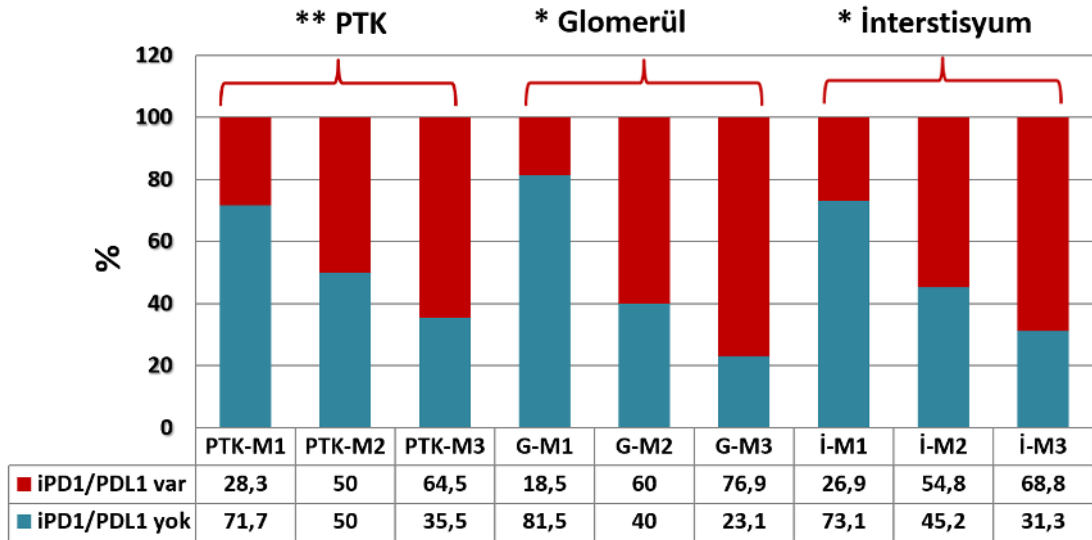
Takip sırasında toplam 11(%10) hasta ortalama 76,4 $\pm$ 12,7 ay içinde ölmüştür. Hastaların ölüm nedenleri Tablo 3.1’de ayrıntılı olarak verilmiştir. Hasta öldüğünde greft kaybı yok ise bu durum greft survival testlerinde sansürlenmiştir. Hastaların sadece 54’ünde (%49) 26,6 $\pm$ 3,4ay içinde greft kaybı izlenmiştir. Geriye kalan 56 hasta (%51) ortalama 98 $\pm$ 2,6 ay süresince fonksiyonel greft göstermiştir. Grub 2 (14,3 $\pm$ 2 ay) hastalar Grub 1 (28,1 $\pm$ 3,4 ay) hastalara oranla çok daha erken dönemde greft kaybı göstermiştir (P=0,002). Benzer şekilde erken dönemde ABMR (16,1 $\pm$ 2,2 ay) tanısı alan vakalar geç dönemde ABMR tanısı (26 $\pm$ 3,4 ay) alan gruba göre daha erken greft kaybı göstermiştir (P=0,037). Ek olarak endotelial (16,7 $\pm$ 1,7 ay) ve inflamatuvar (18 $\pm$ 1,8 ay) hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu pozitif olan hastaların greft kaybı endotelial (27,2 $\pm$ 4,5 ay) ve inflamatuvar (29,3 $\pm$ 4,7) hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu negatif olan hastaların greft kaybından daha erken olarak bulunmuştur (endotelial hücre grubu için P=0,04, inflamatuvar hücre grubu için P=0,048).

Genel 5- ve 10 yıllık greft sağkalımı Grub 1 hastalarda sırasıyla %60,3 ve %57,4 iken Grub 2 hastalarda sırasıyla %45,2 ve %40,5’dur (P=0,023), (Şekil 4.18). Ek olarak, 5- ve 10 yıllık greft sağkalımı endotelial hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu pozitif olan hastalarda %31,8 ve %27,3 iken endotelial ekspresyonu negatif olan hastalarda %69 ve %66,7’dir (P<0.001) (Şekil 4.19). Benzer şekilde 5- ve 10 yıllık greft sağkalımı inflamatuvar hücre PD-

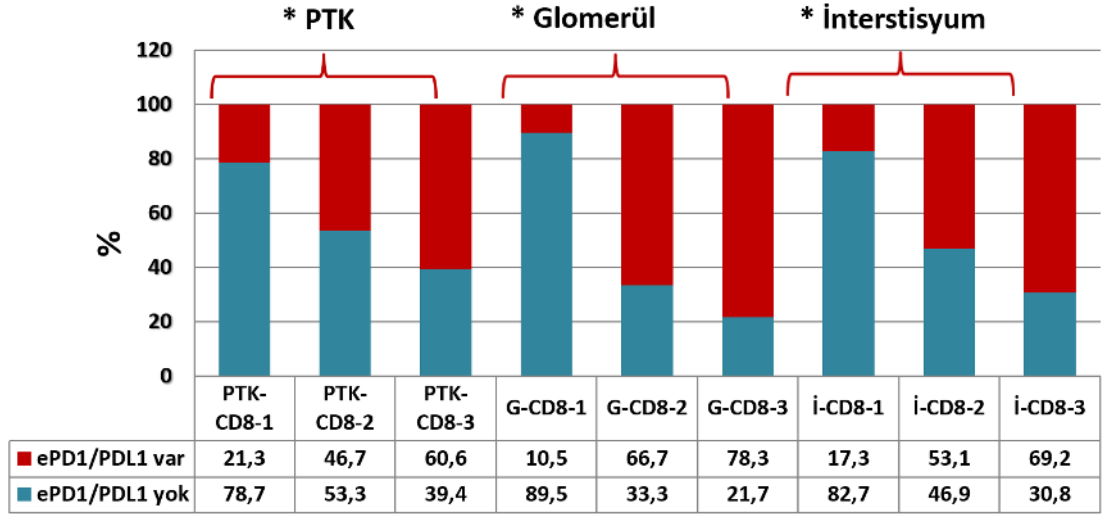
1/PD-L1 ekspresyonu pozitif olan hastalarda %35,4 ve %31,3 iken inflamatuvar hücre ekspresyonu negatif olan hastalarda %69,4 ve %66,1'dir ( $P<0.001$ ) (Şekil 4.20).



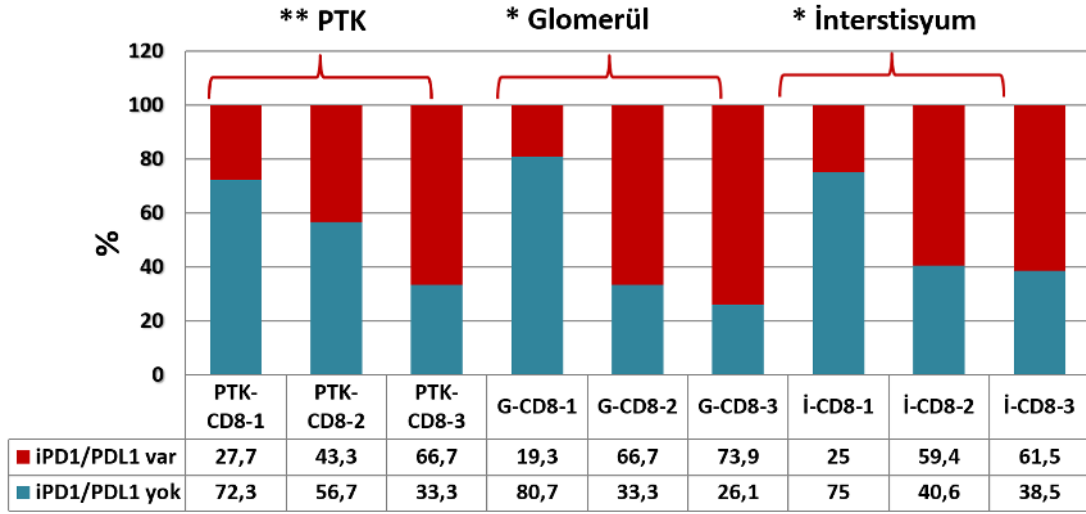
Şekil 4.4. Endotelial hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüller ve interstisyel makrofaj infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (\* $p<0,001$ )



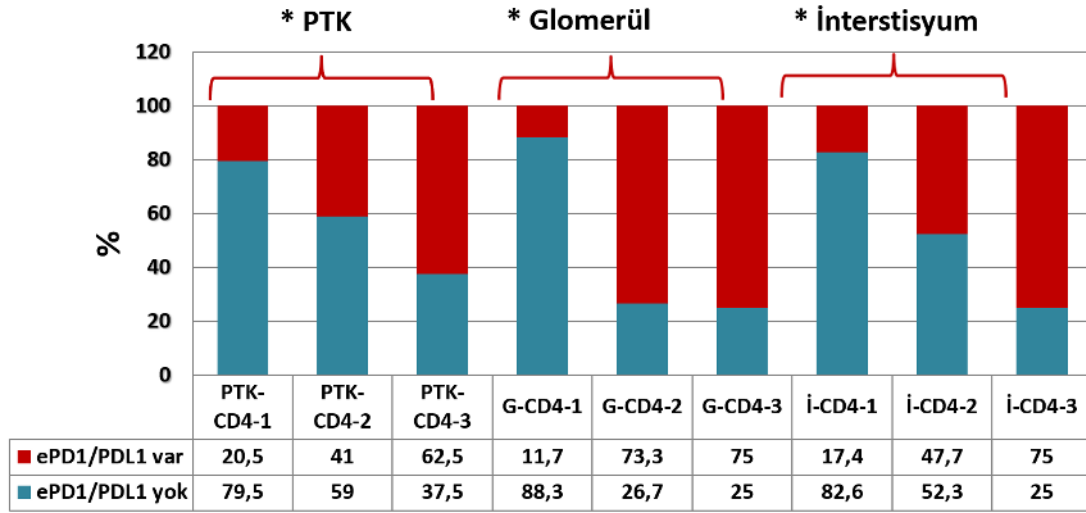
Şekil 4.5. İnflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüller ve interstisyel makrofaj infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (\* $p<0,001$ , \*\* $p=0,001$ )



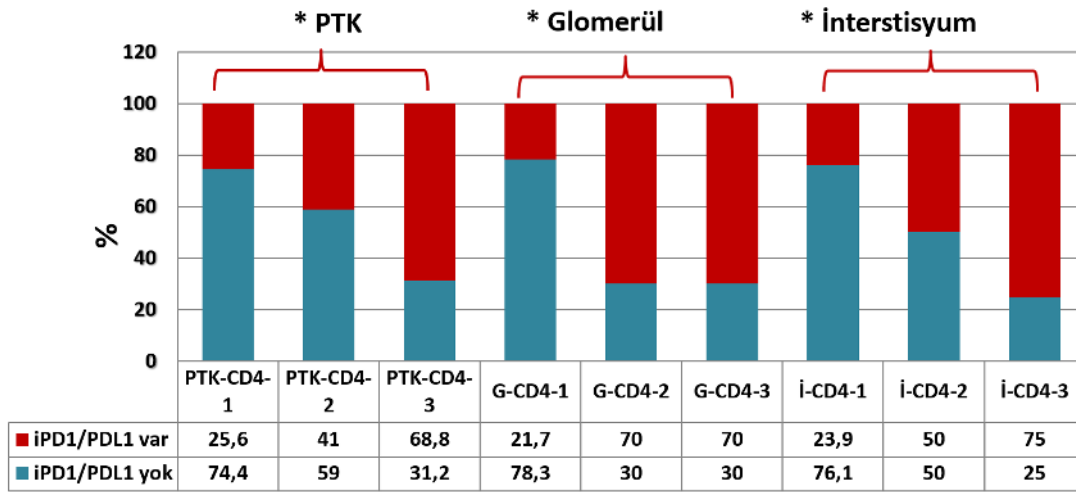
**Şekil 4.6.** Endotelial hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüller ve interstisyel CD8 pozitif T lenfosit infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (\*p<0,001)



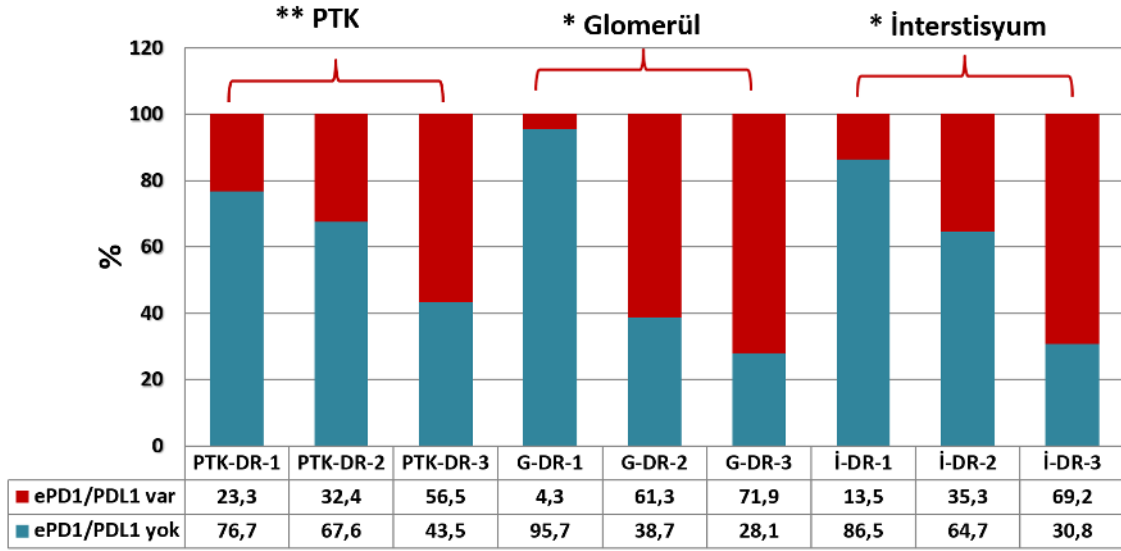
**Şekil 4.7.** İnflamatuar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüller ve interstisyel CD8 pozitif T lenfosit infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (\*p<0,001, \*\*p=0,001)



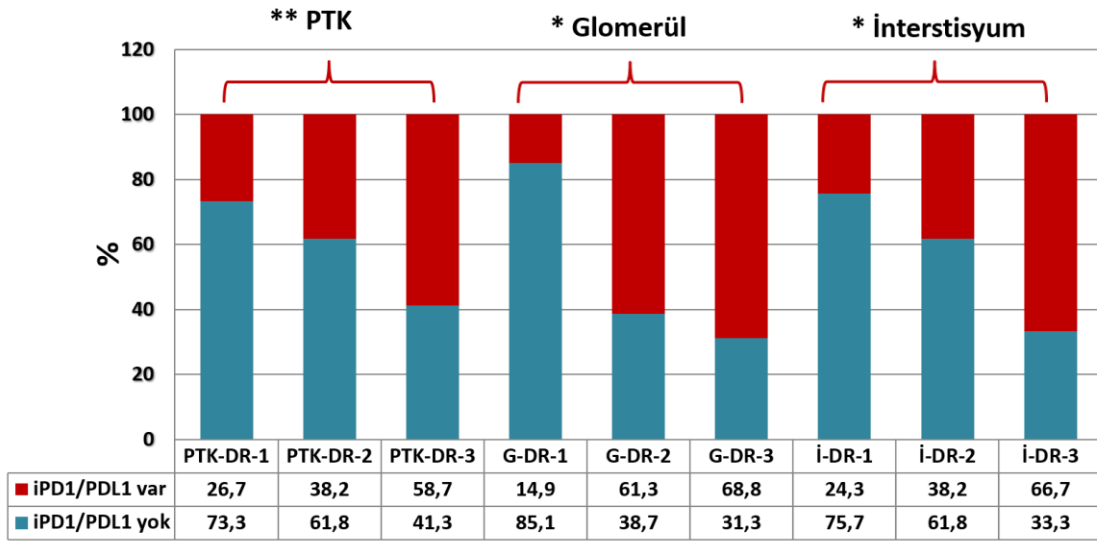
**Şekil 4.8.** Endotelial hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüller ve interstisyel CD4 pozitif T lenfosit infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (\*p<0,001)



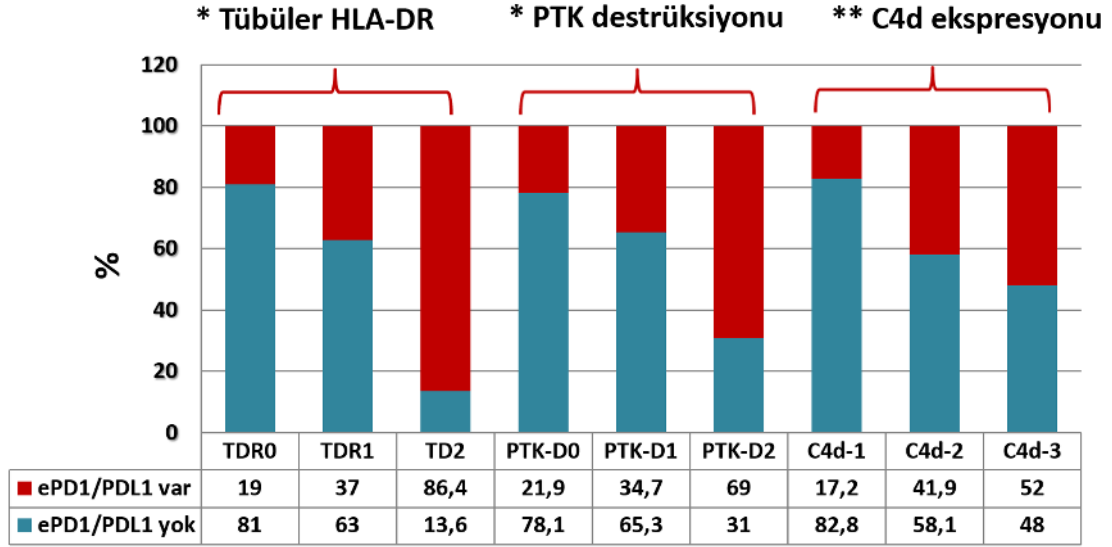
**Şekil 4.9.** İnflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüller ve interstisyel CD4 pozitif T lenfosit infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (\*p<0,001)



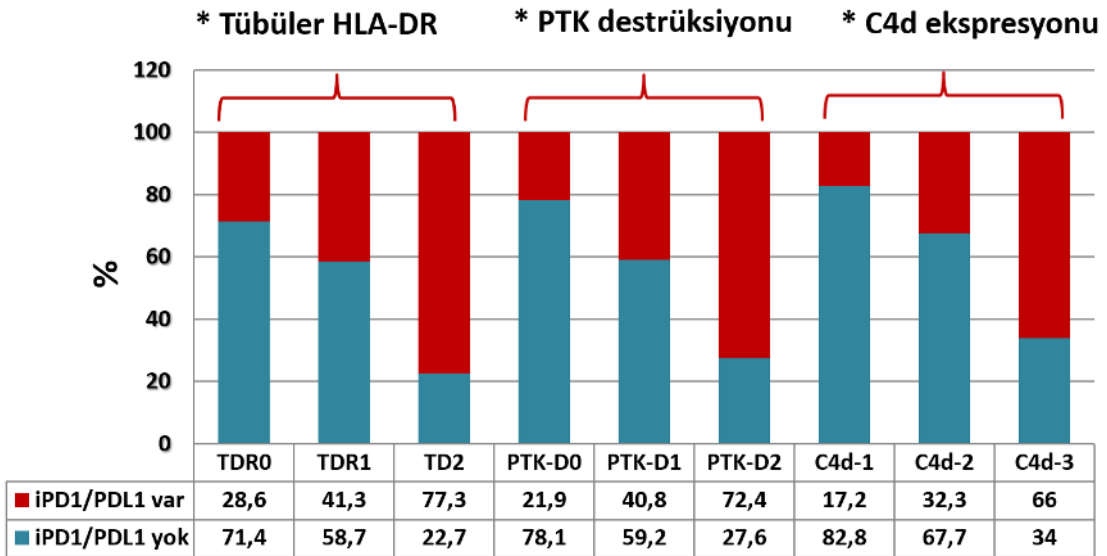
**Şekil 4.10.** Endotelial hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüller ve interstisyel HLA-DR pozitif hücre infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (\* $p<0,001$ , \*\* $p=0,003$ )



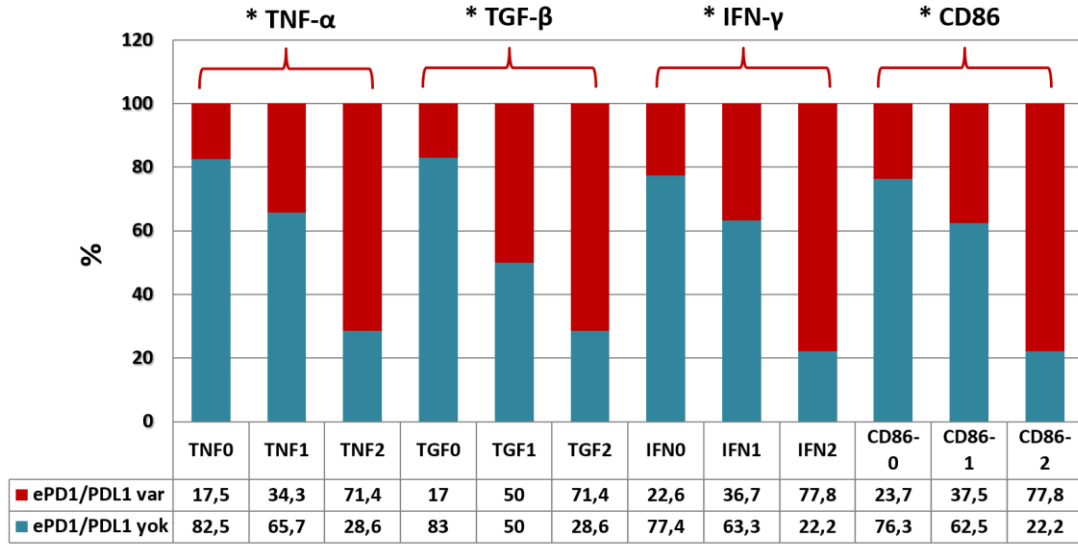
**Şekil 4.11.** İnflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, PTK, glomerüller ve interstisyel HLA-DR pozitif hücre infiltrasyonunun artışı ile paraleldir. (\* $p<0,001$ , \*\* $p=0,005$ )



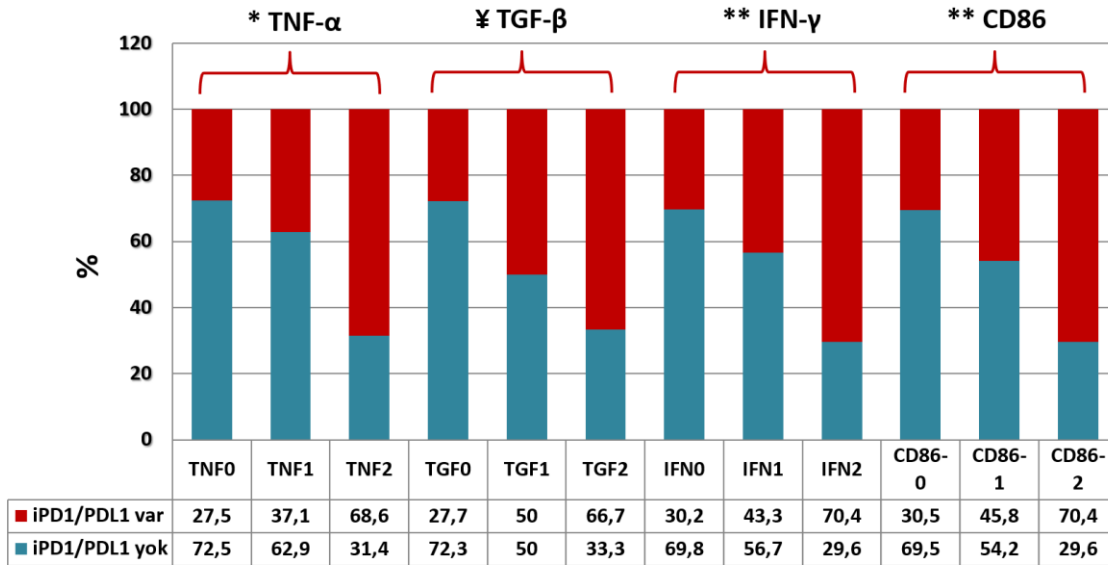
**Şekil 4.12.** Endotelial hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, tübüler HLA-DR ekspresyonu, PTK destrüksiyonu ve C4d ekspresyonu ile pozitif bir ilişki göstermektedir. (\* $p<0,001$ , \*\* $p=0,003$ )



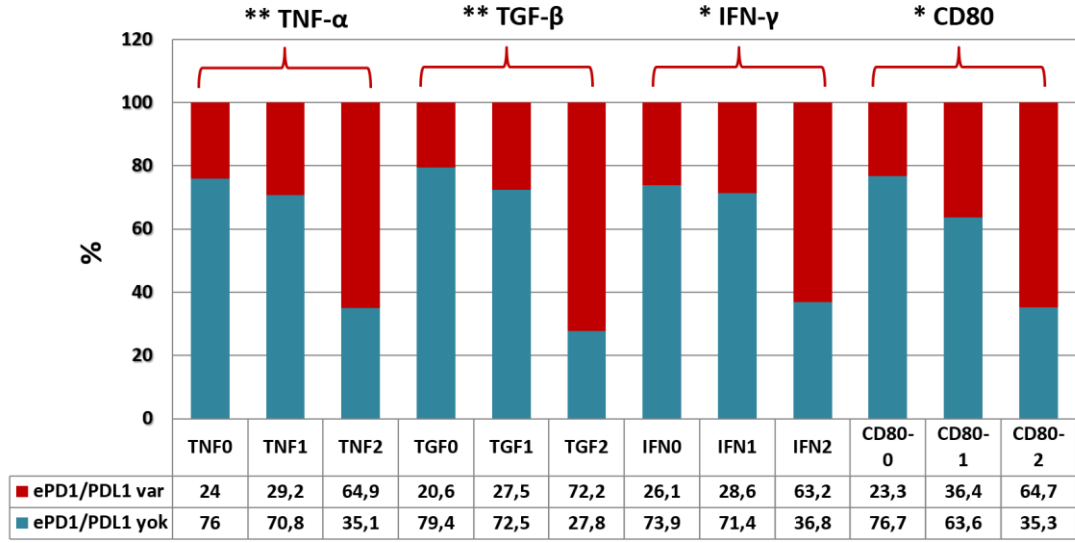
**Şekil 4.13.** İnflamatuar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu, tübüler HLA-DR ekspresyonu, PTK destrüksiyonu ve C4d ekspresyonu ile pozitif bir ilişki göstermektedir. (\* $p<0,001$ )



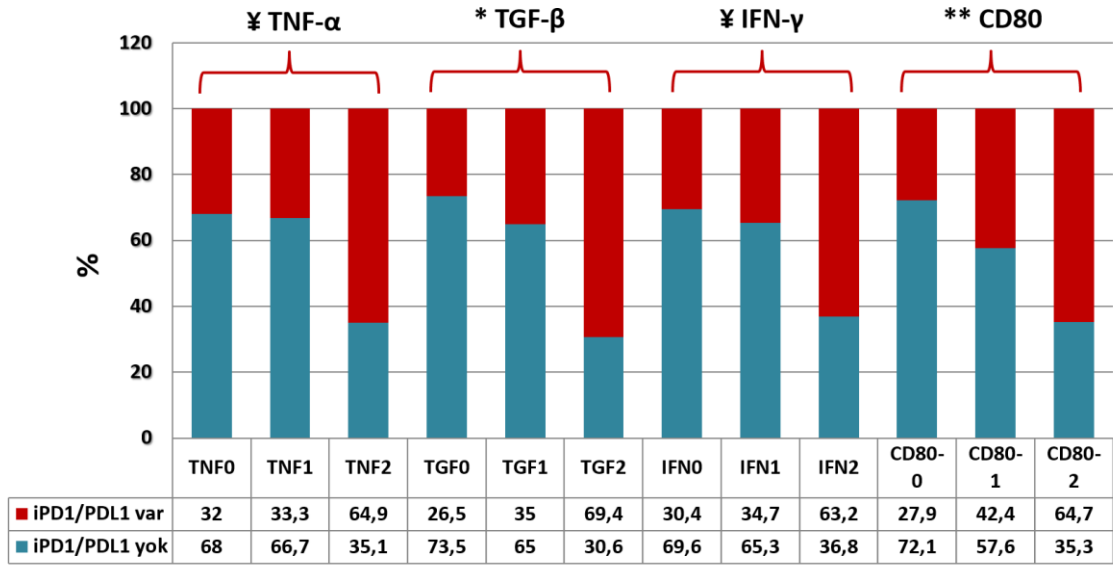
**Şekil 4.14.** İnterstisyel infiltrasyon gösteren TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve CD86 pozitif lökositlerin sayısı arttıkça endotelial hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu da artış göstermektedir. (\*p<0,001)



**Şekil 4.15.** İnterstisyel infiltrasyon gösteren TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve CD86 pozitif lökositlerin sayısı arttıkça inflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu da artış göstermektedir. (\*p<0,001 \*\* p=0.001, ¥p=0,002)



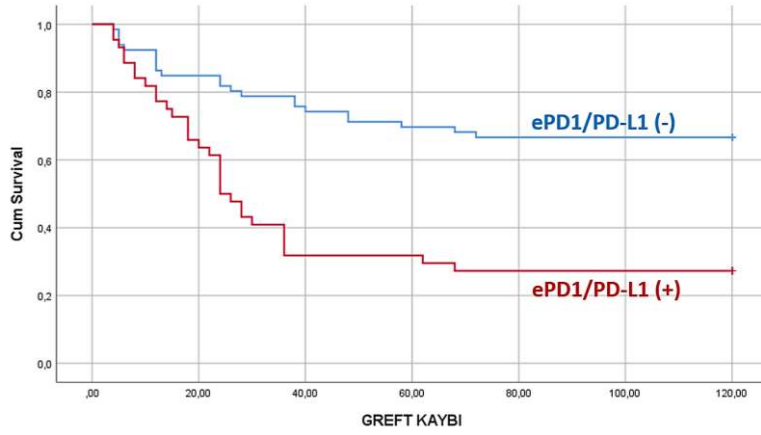
Şekil 4.16. Tübüler TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve CD86 ekspresyonları arttıkça endotelial hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu da artmaktadır. (\*  $p<0.001$  \*\* $p=0,001$ )



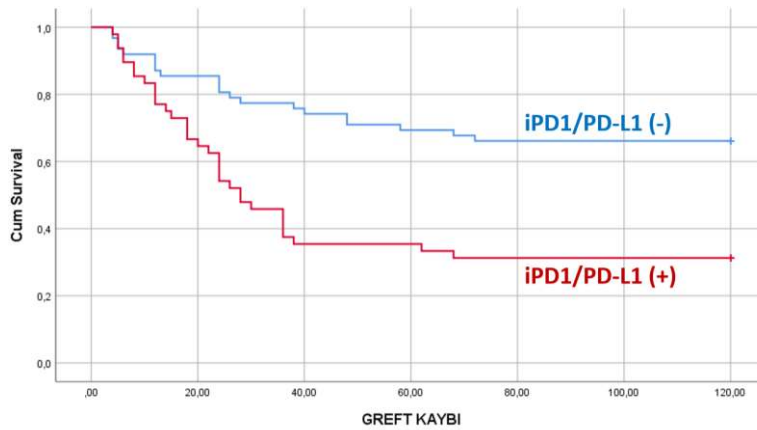
Şekil 4.17. Tübüler TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ve CD86 ekspresyonları arttıkça inflamatuvar hücre PD-1/PD-L1 ekspresyonu da artmaktadır. (\*  $p<0.001$  \*\* $p=0,001$  ¥  $p=0,006$ )



**Şekil 4.18.** Grup 1 ve Grup 2 hastaların greft sağkalımı



**Şekil 4.19.** Endotelial hücre PD1/PD-L1 ekspresyonu negatif ve pozitif hastaların greft sağkalımı



**Şekil 4.20.** İnflamatuar hücre PD1/PD-L1 ekspresyonu negatif ve pozitif hastaların greft sağkalımı

## 5. TARTIŞMA

PD-L1'in T-hücre biyolojisindeki kritik rolüne ve solid organ transplantasyonundaki işlevi hakkındaki artan bilgiye rağmen, böbrek naklindeki ve özellikle antikor aracılı rejeksiyonlardaki rolü net olarak bilinmemektedir. PD-L1, deneysel ve klinik çalışmaların büyük çoğunluğunda T-hücre regülasyonu sağlayan inhibitör bir molekül olarak karakterize edilmiştir (3-6, 9, 11, 23). Birçok çalışma PD1/PD-L1 aksının greft toleransının korunması için gerekli olduğunu ve AR ataklarını engellediğini göstermiştir (24-27, 207-218, 225-228). Ancak çalışmamız PD-1/PD-L1 aksının T hücre proliferasyonunu ve dolayısıyla AR ataklarını artırabileceğine dair beklenmedik bir sonuç ortaya çıkarmıştır. Bizim sonuçlarımızın aksine birçok deneysel ve klinik transplant çalışmasında PD-1/PD-L1 aksının T-hücre proliferasyonu ve T hücrelerinin hayatta kalma süresini kısaltarak inhibitör fonksiyonlar uyguladığı ve rejeksiyon gelişimini azalttığı bildirilmiştir (24-27, 207-218, 225-228). Çalışmalar, PD-1/PD-L1 aksının, periferik dokulardaki ekspresyonları nedeniyle, allogreftlerde kendi kendine toleransın korunmasında, doku inflamasyonunun düzenlenmesinde ve immün yanıtların modülasyonunda özel bir role sahip olduğunu ve bu nedenle akut allogreft reddini önlediği hükmüne varmışlardır (207-218, 225-228).

Anti-PDL1 monoklonal antikor (mAb) uygulamasıyla sonuçlanan PD-L1 blokajı sonrası kardiyak allogreft rejeksiyonunun ve özellikle kronik kardiyak rejeksiyonun en önemli bulgusu olan allogreft vaskülopatisinin hızlandığı gösterilmiştir (207-209). Bununla birlikte Koga ve arkadaşları (210) daha önce anti-PDL1 ile tedavi edilen kalp allogreft alıcılarında greft arter hastalığının şiddetinde artış olduğunu ancak arter hastalığının gelişiminde hızlanma olmadığını bildirmişlerdir. Bu farklı sonuçların olası nedeni, her iki çalışmada kullanılan anti-PDL1 antikorlarının dozlarının farklılıkları ile açıklamaya çalışmışlardır. Başka bir çalışmada ise, "Fully mismatch" bir kalp allogreft modelinde, erken ve gecikmiş PD-L1 blokajının CTLA-4-immünglobulin aracılı periferik toleransını ortadan kaldırdığı da saptanmışlardır (215). Benzer şekilde böbrek transplantının klinik ve deneysel çalışmalarında da PD-1/PD-L1 aksının rejeksiyonu engellediği gösterilmiştir. PD-L1, TEH'leri üzerindeki en belirgin ko-inhibitör moleküldür (98). Starke ve arkadaşları (225), insan renal TEH'lerinde eksprese edilen PD-L1'in insan alloreaktif T-hücre yanıtlarını baskıladığını ve AR ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Yazarlar PD-1/PD-L1 varlığının, alloreaktif T hücrelerinin renal TEH'lere yanıt vermemesinde çok önemli bir rolü olduğunu

ortaya koymuştur. Çünkü TEH'leri üzerindeki PD-L1 inhibisyonu, CD4+ ve CD8+ T-hücre yanıtlarını güçlü bir şekilde artırmıştır.

Solid organ naklindeki PD-1/PD-L1 aksının rolü ile ilgili tüm bu verilerin aksine çalışmamızda PD-1/PD-L1 aksının AR ataklarını artırabileceğine ve bunu çok sayıda farklı sitokin ve büyüme faktörleri aracılığı ile T hücreleri ve diğer immün hücrelerin proliferasyonu ile gerçekleştirdiğini şaşırtıcı bir şekilde saptadık. Endotelial ve inflamatuvar hücrelerde PD-1 ve PD-L1 pozitif olan hastalar ilginç bir şekilde hem erken dönemde ABMR atağı hem de daha fazla oranlarda miks rejeksiyon varlığı göstermiştir. Ayrıca endotelial ve inflamatuvar hücrelerde PD-1 ve PD-L1 pozitif olan hastalarda glomerüllerde, interstisyumda ve PTK alanlarda artış gösteren CD4+ ve CD8+ T-hücre, makrofaj ve HLA-DR pozitif hücre proliferasyonu saptanmıştır. Ek olarak, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$  gibi sitokin ve büyüme faktörlerinin inflamatuvar ve tübüler hücrelerdeki ekspresyon derecesi endotelial ve inflamatuvar hücrelerdeki PD-1 ve PD-L1 ekspresyonu ile yakın ilişki göstermiştir. Bu sitokin ve büyüme faktörlerinin tübüllerde ve interstisyel inflamatuvar hücrelerdeki ekspresyonu arttıkça endotel ve inflamatuvar hücrelerdeki PD-1 ve PD-L1'in pozitiflik oranlarında da artış izlenmiştir. Benzer şekilde IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$  ekspresyonu tübüllerde ve interstisyel inflamatuvar hücrelerde arttıkça glomerüler, interstisyel ve PTK alanlardaki lökosit, CD4+ ve CD8+ lenfosit, makrofaj ve HLA-DR pozitif hücrelerin sayısında da artış saptanmıştır.

AR olan renal allograft biyopsilerinde izlenen PD-1 ekspresyonu, iltihabi hücre infiltrasyonu olan böbreklerdeki aktiveleştirilmiş T hücrelerinin varlığını göstermektedir. Aynı şekilde glomerülde, interstisyumda ve PTK'lerdeki HLA-DR pozitif inflamatuvar hücreler, interstisyumda makrofajların yanısıra aktiveleşmiş T-hücrelerinin de olduğuna işaret etmektedir. HLA-DR, tipik olarak antijen sunan hücreler tarafından eksprese edilen bir moleküldür ve antijenin sunumu ile ilişkilidir. HLA-DR, T hücresi aktivasyonu ile ilişkili olup, T hücreleri üzerinde de eksprese edilebilmektedir (240). İnterstisyel ve tübüler hücrelerdeki HLA-DR ekspresyonu ile allograft reddi arasında çok önemli bir ilişki bildirilmiştir (241). HLA-DR ekspresyonu indüklenmiş olan hücreler, sırasıyla, allograft yanıtı için daha fazla uyarı sağlayabilir ve rejeksiyon sürecinde bu HLA-DR pozitif olan hücreler potansiyel hedefler haline gelebilir (241). Bunları destekleyecek şekilde ABMR tanısı olan hastalarımızın tümünde interstisyumdaki inflamatuvar hücrelerde PD-1, PD-L1 ve HLA-DR pozitifliği açık şekilde izlenmiştir. İnterstisyel hücrelerde PD-1 ve PD-L1 negatifliği olan ve düşük derecede HLA-DR pozitifliği gösteren vakalarda IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ve

TGF- $\beta$  gibi sitokin ve büyüme faktörlerinin de negatif veya çok düşük seviyede eksprese olduğu saptanmıştır.

PD-L1 ekspresyonunun IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , VEGF, HIF-1 $\alpha$ , GM-CSF ve IL-10 gibi çeşitli pro-inflamatuar sitokinler veya büyüme faktörleri tarafından indüklendiği birçok deneysel ve klinik çalışmada gösterilmiştir (1, 3, 7, 29, 74, 76, 89). Bu sitokinlerden olan IFN- $\gamma$ , PD-L1 ekspresyonunun en güçlü indükleyicilerinden biri olarak kabul edilmektedir. IFN- $\gamma$ , CD8<sup>+</sup> T hücreleri, NK hücreleri ve CD4<sup>+</sup> T hücreleri tarafından üretilen bir sitokin olup, hücreler arasında iletişim kurarak immün yanıtın düzenlenmesinde kritik bir rol oynar (71-81,89). Çalışmamızdaki bulgulara bunu desteklemekte olup, IFN- $\gamma$ 'nin tübülerdeki ve inflammatuar hücrelerdeki ekspresyon varlığı ve şiddeti interstisyel ve PTK CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T-lenfositlerinin yoğunluğu ile çok önemli derecede paralellik göstermiştir. Sonuçta, ABMR zemininde artış gösteren CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T-lenfositlerinden salgılanan yoğun miktardaki IFN- $\gamma$ , tübüllerde, endotelde, inflammatuar hücrelerde PD-L1'in yaygın şekilde eksprese olmasını indükler. Bu süreçte PD-L1'in yoğun şekilde eksprese olması rejeksiyon atağını ve onun sonucu olan tübüler ve PTK destrüksiyonunu ortadan kaldırmaya yönelik bir savunma mekanizması olabileceği fikrini akla getirmektedir. Ancak bu olasılığı destekleyecek bulgu olmadığı gibi tam aksine PD-L1'in böbrekte eksprese olduğu hastalarda PTK destrüksiyonu artmış ve ABMR'nin şiddeti ile paralellik gösteren PTK C4d ekspresyonunun şiddeti de PD-L1 pozitif vakalarda yüksek bulunmuştur. Ayrıca gözden kaçırılmaması gereken diğer önemli bir nokta PD-1/PD-L1 pozitif vakalarda yüksek oranlarda izlenen CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T-lenfositlerinin varlığıdır. Klasik bilgi olarak PD-1/PDL-1 etkileşimi T hücresi proliferasyonunu baskıladığı gibi sitokin üretimini de baskılar (6, 7, 40, 89, 211). Yüksek konsantrasyonlarda anti-CD3 antikorları ile aktive olarak artış gösteren TCR uyarıcı sinyalleri ve T-hücre proliferasyonu, takip eden PD1/PD-L1 etkileşimi sonucu azalma gösterir (6). Hem sayıca azalan T-hücreleri nedeniyle hem de mevcut T-hücrelerinden salgılanan sitokinlerin seviyesinin düşmesi sonucu ortamdaki tüm sitokin seviyeleri önemli ölçüde düşer. Özellikle IFN- $\gamma$  seviyesi önemli ölçüde düşerken, IL-10 ve hatta IL-2 için sitokin seviyesi tespit edilebilir eşiğin çok altında kalır (6). Ancak tüm bu klasik bilgilerin aksine çalışmamızda PD-1/PDL-1'in pozitif olduğu vakalarda lökositler, CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T-lenfositleri ve makrofajların sayısı yüksek olarak bulunmuştur. Üstelik rejeksiyonların patogeneğinde rol alan aktif lenfosit ve makrofajların varlığını kanıtlayan HLA-DR pozitif hücrelerin sayısı da yüksek olarak saptanmıştır. Benzer şekilde PD-1/PDL-1 pozitif olan hastalarda diğer önemli bir sitokin olan TNF- $\alpha$  ve büyüme faktörü olan TGF- $\beta$  da yüksek

oranlarda izlenmiştir. Her iki proteininde PD-1 ve PD-L1'in ekspresyonu için çok önemli olduğu bildirilmiştir (93, 95-99, 104-107, 242). Hem TNF- $\alpha$  hem de TGF- $\beta$ 'nin yüksek olduğu hastalarımız benzer şekilde yüksek oranlarda PD-1/PDL-1 pozitifliği gösterdiği gibi yüksek sayılarda interstisyel ve PTK lökosit, makrofaj, CD4+ ve CD8+ T-lenfosit infiltrasyonu göstermiştir. Bizim sonuçlarımız ile benzer şekilde Baas ve arkadaşlarının (242) çalışmasında dokuda yerleşik CD8+ lenfositlerinin TGF- $\beta$  ürettiği, bunun sonucunda PD-1 ve PD-L1'in ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. Ancak bizim çalışmamızdan farklı olarak Baas ve arkadaşları, PD-1 ve PD-L1'i bloke eden antikörlerle tedavi yaptıklarında allogreftlerin hızla saldırıya uğradığını ve rejeksiyon geliştiğini bildirmişlerdir (242). Bu, inhibe edici reseptörlerin, ilk antikör tedavisinde CD8+ T hücrelerini durdurmaya yardımcı olduğunu ve nakledilen organların uzun süreli hayatta kalmasına izin verdiğini göstermişlerdir. Ayrıca yazarlar antikörle tedavi edilen farelerde TGF- $\beta$  büyüme faktörünün de bloke edilmesi sonucu farelerde rejeksiyon geliştiğini saptamışlardır (242).

CD8+ T hücreleri, transplant reddinde önemli bir rol oynamaktadır. Doğrudan sunum yoluyla, CD8+ T hücreleri, özellikle allogreftten sekonder lenfoid organlara göç eden dendritik hücreler olmak üzere donör antijen sunan hücreler tarafından aktive edilirler (32, 93). Bu yanıt hızlı, yoğun ve akut allogreft reddine neden olur. Alıcı APC ayrıca allogreftten donör antijenlerini yakalar, bunları kendi MHC I molekülleri aracılığıyla alloreaktif CD8+ T hücrelerine sunar (çapraz hazırlama/dolaylı sunum) böylece akut ve kronik allogreft reddine katkıda bulunur. Bu klasik bilgiyi destekleyecek şekilde bizim vakalarımızın hepsinde CD8+ T-lenfositlerin varlığı değişken derecelerde mevcuttu. Doğal olarak hastalarımızın hepsinin tanısı ABMR olduğu için bu bulgu aslında şaşırtıcı değildir. Esas şaşırtıcı olan CD8+T-lenfositlerin yüksek PD-1/PD-L1 varlığında halen yüksek oranlarda dokuda bulunmasıdır. Bizim bulgularımız ile benzer şekilde ancak litertürdeki birçok çalışmadan farklı olarak Nowicki ve arkadaşları (243) synovial sarkomlar ile ilişkili yaptıkları bir çalışmada artan PD-L1, PD-1 ve CD8 ekspresyonlarının birbirleri ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir. Yazarlar çalışmasında synovial sarkomun invaziv sınırında CD8+ T-lenfositlerinin varlığının, eşzamanlı PD-1 ve PD-L1 ekspresyonu ile, PD-1 inhibisyonuna klinik yanıtı gösteren bir bulgu olduğunu öne sürmüşlerdir (243). Tümör hücrelerinin ve allogreft reddi birbiri ile çok fazla benzerlikler göstermektedir. Ancak bu veriler eşliğinde düşünürsek bizim hastalarımızda da artan PD-1, PD-L1 ve CD8+ T-lenfosit paralelliğini bu şekilde açıklamak mümkün değildir. Çünkü PD-1, PD-L1 ve CD8+ T-lenfosit paralelliği gösteren hastalarımızda çok daha fazla oranlarda greft kaybı izlenmiştir.

Bu nedenle, PD-1/PD-L1 ekspresyonu gösteren hastalarımızdaki yüksek sayıdaki CD8+ T-lenfositlerinin varlığının sebebi, bu hücrelerin PD-1/PD-L1 yolağına direnç gösterdiği şeklinde açıklanabilir. Bu varsayımızı kısmen destekleyecek şekilde Kristen ve arkadaşlarının (244) çalışmasında anerjik CD4+ T-hücrelerinin PD-L1 blokajına dirençli olduğu dikkati çekmiştir. Ek olarak, PD-L1, CD8+ T-hücresi bağırsak toleransının indüksiyonu için kritik olduğu, ancak idamesi için kritik olmadığı bildirilmiştir. PD-L1 blokajı, efektör T hücrelerinin işlevselliğini artırırken, yerleşik toleranslı veya anerjik T hücreleri, tepkisiz kalmak için PD-1/PD-L1 sinyaline bağımlı olmadığı izlenmiştir. Sonuç olarak bu bulgular, PD-1/PD-L1 düzenlemesine bel bağlamayan Ag deneyimli T hücresi alt kümelerinin varlığını vurgulamaktadır.

Hastalarımıza ait tüm bu veriler sonucunda çok önemli ve yanıtlanması gereken bir soru ortaya çıkmaktadır. Klasik bir bilgi olan PD-1/PDL-1 aksının immün yanıtı baskılayıcı etkisi neden hastalarımızda izlenmemiş ve kötü allogreft prognozu ile sonuçlanmıştır? Bu sorunun cevabı belki Freeman ve arkadaşlarının PD-1/PDL-1 aksı ile ilgili geliştirdiği bir hipotez ile açıklanabilir. Freeman ve arkadaşları (6), PD-L1'in T-hücrelerinin aktivasyonu üzerindeki düzenleyici fonksiyonunun, yalnızca düşük T-hücresi aktivasyonu seviyelerinde mevcut olduğunu, oysa yüksek T-hücresi aktivasyonu seviyelerinde belirsizleştiğini bildirmektedir. PD-1/PD-L1 etkileşiminin işlevsel sonuçlarının TCR ve CD28 aracılığıyla iletilen sinyallerin göreceli gücüne bağlı olduğunu göstermişlerdir. Artan TCR veya CD28 sinyal seviyelerinin, aktivasyon aşamasında PD-1 ligasyonunun inhibe edici etkilerini önleyebildiğini saptamışlardır (6). Hastalarımızdaki T-hücresi aktivasyonun yüksek seviyelerde olduğu T-hücrelerimizin çoğunluğunun HLA-DR ile pozitif boyanması ile gösterilmiştir. Aktif olmayan T-hücrelerinde boyanma göstermeyen HLA-DR hastalarımızın hepsinde infiltratif T-hücrelerinde pozitif olarak saptanmıştır.

PD-1/PDL-1 ekspresyonu ve buna eşlik eden artmış sayılardaki HLA-DR pozitif aktif CD8+ T-lenfositlerinin varlığı ve buna mukabil gelişen kötü allogreft prognozu literatürdeki çalışmalar ile çelişkili olsa da bizim bu bulgularımız ile benzer şekilde Subudhi ve arkadaşları (245), PD-L1'in pankreatik adacık B hücrelerinde aşırı ekspresyonunun, nakledilen allojenik PD-L1 eksprese eden hücrelerin reddini hızlandırdığını ve CD8 T-hücre proliferasyonunu arttırdığını göstermiştir. Özetle yazarlar çalışmalarında, B7-H1'in (PD-L1) dokuya özgü ifadesinin, in vivo T hücresi aracılı tepkileri birlikte uyatabildiğini, bunun da

hızlandırılmış allogreft reddine, bağışıklık toleransının bozulmasına ve otoimmün hastalık patogeneze yol açtığını ortaya koymuşlardır (6).

Verilerimiz ile daha önce yayınlanmış sonuçlar arasındaki tutarsızlıkların bir diğer olasılığında, ABMR'nin immünolojik doğasının potansiyel farklılığına atfedilebilir. Daha önceki çalışmaların hepsi saf akut TCMR olan hastalarda veya hayvan TCMR modellerinde yapılmıştır. Tüm bu çalışmalar, PD-1/PDL-1 aksının, TCMR gelişimini engellediğini ve allogreft biyopsilerinde düşük seviyelerde T-lenfosit ile makrofaj infiltrasyonu gösterdiğini bildirilmiştir (23-25, 207-210, 215, 225). Ayrıca solid organ transplant hastalarında kanser tanısı nedeni ile kullanılan, PD-L1 veya PD-1'i inhibe eden, bağışıklık kontrol noktası inhibitörü (BKİ) tedavisi, hastaların çok önemli bir kısmında (%41,2) TCMR' na ve %23,5 hastada ise graft yetmezliğine neden olmuştur. Bu hastalarda allogreft rejeksiyonu BKİ tedavisine ilk maruz kalmanın ardından hızla ortalama üç haftalık bir süre içinde gerçekleşmiştir (246). Benzer şekilde Nguyen ve arkadaşlarının çalışmasında da rejeksiyon gelişimi ortalama 21 gün (IQR=13-56 gün) olarak bildirilmiştir (246). Literatürdeki diğer çalışmalar ile benzer şekilde, Nguyen ve arkadaşları, anti-PD-1/PD-L1 tedavisi alan kişilerde anti-CTLA4 tedavisi alan kişilere göre daha yüksek oranlarda BKİ ilişkili transplant rejeksiyonu geliştiğini saptamışlardır (247, 248). Fark istatistiksel olarak anlamlı olmasa da BKİ kombine terapilerinin, BKİ monoterapilere kıyasla daha fazla oranlarda ölümcül rejeksiyonlarla neden olduğu gösterilmiştir (%40,7'ye karşı %10,0,  $p = 0,08$ ). BKİ tedavisi sonrası izlenen mortalite, BKİ ile ilişkili allogreft rejeksiyonun ortaya çıkmasından sonra %36,5 olarak saptanmıştır (247). Bu hastaların hepsinde biyopside akut TCMR bulguları mevcut olup sadece çok az hastada (6/28, %21,4) eşzamanlı olarak antikör aracılı rejeksiyon ile ilişkili lezyonlar izlenmiştir. Nguyen ve arkadaşlarının (247) çalışmasında hiçbir hastanın biyopsisi sadece antikör aracılı rejeksiyon olarak kategorize edilmemiş, bu da donöre özgü antikörlerin BKİ tedavisi uygulamasını takiben AR patogenezinde çok az rol oynadığını düşündürmektedir.

Hastalarımızın hepsinde tanı ABMR olduğu ve miks rejeksiyonlarda eşlik eden akut TCMR vakalarının çoğunluğunda hücressel rejeksiyon bulgusu olarak vasküler rejeksiyona işaret eden arterit olduğu için birçok vakada belirgin bir tübülit yoktur. Var olan tübülitler ise genellikle minimal derecede saptanmıştır. Önemli noktalardan biri olarak, tubulointerstisyel rejeksiyonlarda şiddetli tübülit olan biyopsilerde daha düşük PD-L1 ekspresyonu izlenmektedir (224-228). Benzer şekilde şiddetli tübüliti olan çok az sayıdaki

hastamızda tübüler PD-L1 negatif olarak saptanmıştır. Bununla birlikte şiddetli tübülitisin eşlik etmediği ve özellikle vasküler rejeksiyonun eşlik ettiği miks rejeksiyon vakalarının çoğunda tübüler PD-L1 ekspresyonu izlenmiştir. Bu farklılık, akut vasküler rejeksiyon sırasında tübüllerin eksprese ettiği PD-L1 sayesinde tübül epitel hücrelerinin korunabileceği fikrini düşündürmektedir.

Vasküler endotelial hücreler immün hücreler ile hedef greft arasındaki ilk arayüz olduğundan, PTK endotel hücreleri ve immün hücreler üzerindeki PD-1/PD-L1 etkileşiminin durumunu anlamak özellikle akut ABMR'larda önemlidir. Akut ABMR'larda ilk hedef PTK endotel hücreleridir. İnhibitör bir yolak olan PD-1/PD-L1'in endotelial ekspresyonu normal şartlarda PTK içindeki inflamatuvar hücrelerin çoğalmasını ve endotelin hasarlanmasını engellemesi gerekirken bizim çalışmamızda bunun tam tersi olarak PD-1/PD-L1 eksprese eden PTK'lerin varlığı kötü allograft prognozu ile sonuçlanmıştır. Endotelial PD-1/PD-L1 eksprese eden hastaların büyük bir kısmında PTK destrüksiyon ve diffüz interstisyel fibrozis gelişimi (%52,3) saptanmıştır. PTK destrüksiyona ek olarak, artan hücrel infiltrasyonun, immün hücrelerin ve sitokinlerin bir sonucu olarak beklendiği üzere takip biyopsilerinde erken dönemde IF gelişimi meydana gelmiş ve tüm bu bulgular kaçınılmaz olarak kötü greft sağkalımına neden olmuştur. Bundan dolayı endotelial PD-1/PD-L1 ekspresyonu pozitif olan hastalarda 10 yıllık sağkalım %27,3 iken endotelial PD-1/PD-L1 ekspresyonu negatif olan hastalarda %66,7'dir. Benzer şekilde immün hücrelerin üzerindeki PD-1/PD-L1 ekspresyonunun da allograft prognozu üzerinde çok önemli etkileri saptanmıştır. HLA-DR ekspresyonu ile aktif olduğu gösterilen T-lenfosit ve makrofajların pozitif PD-1/PD-L1 ekspresyonu PTK destrüksiyon, diffüz interstisyel fibrozis (%47,9) gelişimi ve kötü greft prognozu ile kuvvetli bir ilişki göstermiştir. Ayrıca immüne hücrelerde PD-1/PD-L1 ekspresyonu pozitif olan hastalarda 10 yıllık sağkalım %31,3 iken endotelial PD-1/PD-L1 ekspresyonu negatif olan hastalarda %66,1'dir.

Sonuç olarak bulgularımız, endotel ve immün hücrelerdeki PD-L1 yukarı regülasyonunun, T-hücre toleransını kolaylaştırmak yerine T-hücreye bağımlı doku yıkımını artırabileceği fikrini desteklemektedir. Çalışmamızdaki bu bulgular ile daha önce yayınlanmış sonuçlar arasındaki tutarsızlıkların bir olasılığı, ABMR'nin immünolojik doğasının potansiyel farklılığına atfedilebilir. Bu bulgular göz önüne alındığında PD-1/PD-L1 yolağının inhibitör fonksiyonlarının, ABMR gibi yüksek immünolojik kostimülatör etkiye sahip koşullarda ve güçlü T-hücre aktivasyonu altında yeterli olmayabileceğini

düşündük. PD-1/PD-L1 yolağının, ilgili bağışıklık hücrelerinin tipine, T hücrelerinin ve B hücrelerinin aktivasyon durumuna bağlı olarak pozitif veya negatif sinyaller iletebilmesi mümkündür. PD-1/PD-L1 yolağının çok açık bir şekilde görülen çok karmaşık birbirine tamamen zıt olan çift etkisini tam olarak anlayabilmek için genomik ve transkriptomik seviyelerde daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.



## KAYNAKLAR

1. Boussiotis, VA. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *New Eng J Med* 2016; 375(18): 1767–1778
2. Foy SP, Mandl SJ, dela Cruz T, Cote JJ, Gordon EJ, Trent E, Rountree RB. Poxvirus-based active immunotherapy synergizes with CTLA-4 blockade to increase survival in a murine tumor model by improving the magnitude and quality of cytotoxic T cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2016; 65(5); 537–549.
3. Sharpe A, Pauken K. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol* 2018;8:153–167
4. Wang S, Chen L. Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. *Microbes Infect.* 2004;6(8):759-66
5. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* 1999;5:1365–1369
6. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000; 2;192(7):1027-34. doi: 10.1084/jem.192.7.1027. PMID: 11015443
7. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T-cell activation. *Nat Immunol.* 2001;2(3):261-8. doi: 10.1038/85330. PMID: 11224527.
8. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med.* 2001;2;193(7):839-46. doi: 10.1084/jem.193.7.839. PMID: 11283156
9. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe, A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008;26:677–704
10. Nagai S, Azuma M. The CD28-B7 Family of Co-signaling Molecules. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1189:25-51. doi: 10.1007/978-981-32-9717-3\_2.
11. Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev* 2009;229:114–125

12. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999;11:141–151
13. Wang J, Yoshida T, Nakaki F, Hiai H, Okazaki T, Honjo T. Establishment of NOD-Pdcd1<sup>-/-</sup> mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(33):11823-8. doi: 10.1073/pnas.0505497102.
14. Pauken KE, Wherry EJ. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol* 2015;36:265–276
15. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006;9;439:682-7. doi: 10.1038/nature04444.
16. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res*. 2005;1;65(3):1089-96.
17. Page DB, Postow MA, Callahan MK, Allison JP, Wolchok JD. Immune modulation in cancer with antibodies. *Annu. Rev. Med* 2014;65:185–202
18. Duraiswamy J, Ibegbu CC, Masopust D, et al. Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. *J Immunol* 2011;1;186(7):4200-12. doi: 10.4049/jimmunol.1001783.
19. Chinai JM, Janakiram M, Chen F, Chen W, Kaplan M, Zang X. New immunotherapies targeting the PD-1 pathway. *Trends Pharmacol Sci* 2015;36:587–95.
20. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, et al. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med* 2005;353:770–781
21. Taube JM, Galon J, Sholl LM, et al. Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics. *Mod Pathol* 2018;31(2):214–234
22. Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune responses: The unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nature Immunology* 2013;14(12):1212–1218.
23. Beenen AC, Sauerer T, Schaft N, Dörrie J. Beyond Cancer: Regulation and Function of PD-L1 in Health and Immune-Related Diseases. *Int J Mol Sci* 2022;23:8599

24. Gao W, Demirci G, Strom TB, Li XC. Stimulating PD-1-negative signals concurrent with blocking CD154 co-stimulation induces long-term islet allograft survival. *Transplantation*. 2003;76:994–999.
25. Ito T, Ueno T, Clarkson MR, et al. Analysis of the role of negative T cell costimulatory pathways in CD4 and CD8 T cell-mediated alloimmune responses in vivo. *J. Immunol*. 2005;174:6648–6656.
26. Andner SE, Clarkson MR, Salama AD, et al. Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses in vivo. *J. Immunol*. 2005;174:3408–3415.
27. Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, Sharpe AH. Coinhibitory pathways in the B7-CD28 ligand-receptor family. *Immunity* 2016;44:955–972
28. Taylor A, Harker JA, Chanthong K, Stevenson PG, Zuniga EI, Rudd CE. Glycogen synthase kinase 3 inactivation drives T-bet-mediated downregulation of co-receptor PD-1 to enhance CD8(+) cytolytic T cell responses. *Immunity* 2016;44:274–286
29. Nallasamy P, Chava S, Verma SS, et al. PD-L1, inflammation, non-coding RNAs, and neuroblastoma: Immuno-oncology perspective. *Seminars in Cancer Biology*, 2018: 52:53
30. Youngblood B, Oestreich KJ, Ha SJ, et al. Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells. *Immunity* 2011;35:400
31. Park BV, Freeman ZT, Ghasemzadeh A, et al. TGFbeta1-mediated SMAD3 enhances PD-1 expression on antigen-specific T cells in cancer. *Cancer Discov* 2016;6:1366–1381
32. Sun Z, Fourcade J, Pagliano O, et al. IL10 and PD-1 cooperate to limit the activity of tumor-specific CD8+ T cells. *Can Res* 2015;75:1635–1644
33. Scharping NE, Menk AV, Moreci RS et al. The tumor microenvironment represses T cell mitochondrial biogenesis to drive intratumoral T cell metabolic insufficiency and dysfunction. *Immunity* 2016: 45:374–388.
34. O’Sullivan D, Pearce EL. Targeting T cell metabolism for therapy. *Trends Immunol* 2015;36:71–80.

35. Sanmamed MF, Chen L. Inducible expression of B7-H1 (PD-L1) and its selective role in tumor site immune modulation. *Cancer J*. 2014;20:256–261.
36. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*. 2007;8:239–245.
37. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med*. 2015;21:24–33.
38. Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, et al. PD-1 expression by tumor-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumor immunity. *Nature* 2017;545:495–499
39. Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe A. Coinhibitory pathways in immunotherapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 2016;34:539–573
40. Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and function of the PD-L1 checkpoint. *Immunity* 2018;48:434–452
41. Ji M, Liu Y, Li Q, et al. PD-1/PD-L1 pathway in non-small-cell lung cancer and its relation with EGFR mutation. *J Transl Med*. 2015;13:5.
42. Ai L, Xu A, Xu J. Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond. In: Xu, J. (eds) *Regulation of Cancer Immune Checkpoints. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2020, vol 1248. Springer, Singapore.
43. Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med* 2012;209(6):1201–17.
44. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 2004;173(2):945–54. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.945
45. Zhao Y, Qu Y, Ha, C, Yao W. PD-1/PD-L1 axis in organ fibrosis. *Frontiers in Immunology*, 2023;14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1145682>

46. Hui E, Cheung J, Zhu J, et al. T Cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* 2017;355:1428–33. doi: 10.1126/science.aaf1292
47. Ying H, Zhang X, Duan Y, et al. Non-cytomembrane PD-L1: an atypical target for cancer. *Pharmacol Res* 2021; 170:105741. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105741
48. Xiong W, Gao Y, Wei W, Zhang J. Extracellular and nuclear PD-L1 in modulating cancer immunotherapy. *Trends Cancer* 2021;7(9):837–46. doi: 10.1016/j.trecan.2021.03.003
49. Hassounah NB, Malladi VS, Huang Y, et al. Identification and characterization of an alternative cancer-derived PD-L1 splice variant. *Cancer Immunol Immunother* 2019;68(3):407–20. doi: 10.1007/s00262-018-2284-z
50. Frigola X, Inman BA, Lohse CM, et al. Identification of a soluble form of B7-H1 that retains immunosuppressive activity and is associated with aggressive renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2011;17(7):1915–23. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0250
51. Zhang G, Hou J, Shi J, Yu G, Lu B, Zhang X. Soluble CD276 (B7-H3) is released from monocytes, dendritic cells and activated T cells and is detectable in normal human serum. *Immunology* 2008;123(4):538–46. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02723.x
52. Jeannin P, Magistrelli G, Aubry JP, et al. Soluble CD86 is a costimulatory molecule for human T lymphocytes. *Immunity* 2000;13(3):303–12.
53. Nielsen C, Ohm-Laursen L, Barington T, Husby S, Lillevang ST. Alternative splice variants of the human PD-1 gene. *Cell Immunol* 2005;235(2):109–16.
54. Ng KW, Attig J, Young GR, et al. Soluble PD-L1 generated by endogenous retroelement exaptation is a receptor antagonist. *Elife* 2019;8:e50256. doi: 10.7554/eLife.50256
55. Dezutter-Dambuyant C, Durand I, Alberti L, et al. A novel regulation of PD-1 ligands on mesenchymal stromal cells through MMP-mediated proteolytic cleavage. *Oncoimmunology* 2016;5(3):e1091146. doi: 10.1080/2162402X.2015.1091146
56. Song MY, Park SH, Nam HJ, Choi DH, Sung YC. Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8(+) T-cell responses by soluble PD-1. *J Immunother* 2011;34(3):297–306. doi: 10.1097/CJI.0b013e318210ed0e

57. Geng H, Zhang GM, Xiao H, et al. HSP70 vaccine in combination with gene therapy with plasmid DNA encoding sPD-1 overcomes immune resistance and suppresses the progression of pulmonary metastatic melanoma. *Int J Cancer* 2006;118(11):2657–64.
58. Chen G, Huang AC, Zhang W, et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* 2018;560(7718):382–6.
59. Yang Y, Li CW, Chan LC, et al. Exosomal PD-L1 harbors active defense function to suppress T cell killing of breast cancer cells and promote tumor growth. *Cell Res* 2018; 28(8):862–4. doi: 10.1038/s41422-018-0060-4
60. Chen L, Deng H, Lu M, et al. B7-H1 expression associates with tumor invasion and predicts patient's survival in human esophageal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(9):6015–23.
61. Fan Y, Che X, Qu J, et al. Exosomal PD-L1 retains immunosuppressive activity and is associated with gastric cancer Prognosis. *Ann Surg Oncol* 2019;26(11):3745–55.
62. Poggio M, Hu T, Pai CC, et al. Suppression of exosomal PD-L1 induces systemic anti-tumor immunity and Memory. *Cell* 2019;177(2):414–427
63. Qiu Y, Yang Y, Yang R, et al. Activated T cell-derived exosomal PD-1 attenuates PD-L1-induced immune dysfunction in triple-negative breast cancer. *Oncogene* 2021;40(31):4992
64. Gao Y, Nihira NT, Bu X, et al. Acetylation-dependent regulation of PD-L1 nuclear translocation dictates the efficacy of anti-PD-1 immunotherapy. *Nat Cell Biol* 2020; 22(9):1064–75. doi: 10.1038/s41556-020-0562-4
65. Du W, Zhu J, Zeng Y, et al. KPNB1-mediated nuclear translocation of PD-L1 promotes non-small cell lung cancer cell proliferation via the Gas6/MerTK signaling pathway. *Cell Death Differ* 2021;28(4):1284–300. doi: 10.1038/s41418-020-00651-5
66. Yu J, Qin B, Moyer AM, et al. Regulation of sister chromatid cohesion by nuclear PD-L1. *Cell Res* 2020; 30(7):590–601. doi: 10.1038/s41422-020-0315-8
67. Parra ER, Villalobos P, Rodriguez-Canales J. The multiple faces of programmed cell death ligand 1 expression in malignant and nonmalignant Cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2019;27(4):287–94. doi: 10.1097/PAI.0000000000000602

68. Raimondi G, Shufesky WJ, Tokita D, Morelli AE, Thomson AW. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells. *J Immunol* 2006;176(5):2808–16.
69. Pentcheva-Hoang T, Chen L, Pardoll DM, Allison JP. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(45):17765–70. doi: 10.1073/pnas.0708767104
70. Takahashi R, Sato Y, Kimishima M, Shiohara T, Ohyama M. Intracellular accumulation of PD-1 molecules in circulating T lymphocytes in advanced malignant melanoma: an implication for immune evasion mechanism. *Int J Clin Oncol* 2020;25(10):1861–9.
71. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol* 2016;7:550
72. Padmanabhan S, Gaire B, Zou Y, Uddin MM, Vancurova I. IFN $\gamma$ -induced PD-L1 expression in ovarian cancer cells is regulated by JAK1, STAT1 and IRF1 signaling. *Cell Signal*. 2022;97:110400. doi: 10.1016/j.cellsig.2022.110400.
73. Michalska A, Blaszczyk K, Wesoly J, Bluysen HAR. A Positive Feedback Amplifier Circuit That Regulates Interferon (IFN)-Stimulated Gene Expression and Controls Type I and Type II IFN Responses. *Front Immunol* 2018;9:1135.
74. Rusinova I, Forster, S, Yu S, et al. INTERFEROME v2.0: An updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:D1040–D1046.
75. Lee SJ, Jang BC, Lee SW, et al. Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS Lett*. 2006;580:755–762
76. Karakhanova S, Meisel S, Ring S, Mahnke K, Enk AH. ERK/p38 MAP-kinases and PI3K are involved in the differential regulation of B7-H1 expression in DC subsets. *Eur. J. Immunol* 2010;40: 254–266.
77. Patsoukis N, Brown J, Petkova V, Liu F, Li L, Boussiotis VA. Selective Effects of PD-1 on Akt and Ras Pathways Regulate Molecular Components of the Cell Cycle and Inhibit T Cell Proliferation. *Sci. Signal* 2012;5:ra46.

78. Mi Y, Han J, Zhu J, Jin T. Role of the PD-1/PD-L1 Signaling in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Recent Insights and Future Directions. *Mol. Neurobiol* 2021;58:6249–6271.
79. Billiau A. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol* 1996;62:61–130.
80. Kak G, Raza M, Tiwari BK. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomol Concepts*. 2018;30;9(1):64-79.
81. Nakiboneka R, Mugaba S, Auma BO, et al. Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) negative CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells can produce immune mediators in response to viral antigens. *Vaccine*. 2019;3;37(1):113-122. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.11.024.
82. Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, et al. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Frontiers in Immunology* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>
83. Chen S, Crabill GA, Pritchard TS, et al. Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells. *J Immunotherapy Cancer* 2019;7:305.
84. Mimura K, Teh JL, Okayama H, et al. PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer. *Cancer Sci* 2018;109(1):43
85. Abiko, K., Matsumura, N., Hamanishi, J. et al. IFN- $\gamma$  from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br J Cancer* 2015;112:1501–1509
86. Imai Y, Chiba T, Kondo T, et al. Interferon- $\gamma$  induced PD-L1 expression and soluble PD-L1 production in gastric cancer. *Oncol Lett*. 2020;20(3):2161-2168.
87. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, et al. IFN- $\gamma$ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest* 2017;1;127(8):2930-2940. doi: 10.1172/JCI91190.
88. Noguchi T, Ward JP, Gubin MM, et al. Temporally distinct PD-L1 expression by tumor and host cells contributes to immune escape. *Cancer Immunol Res* 2017;5:106–17.

89. Guo L, Tang X, Wong SW et al. Regulation of IFN- $\gamma$ -mediated PD-L1 expression by MYC in colorectal cancer with wild-type KRAS and TP53 and its clinical implications. *Frontiers in Pharmacology* 2022;13. doi.org/10.3389/fphar.2022.1022129
90. Kubickova L, Sedlarikova L, Hajek R et al. TGF- $\beta$  – an excellent servant but a bad master. *J Transl Med* 2012;10:183, <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-183>
91. Xue VW, Chung JYF, Córdoba CAG, et al. Transforming Growth Factor- $\beta$ : A Multifunctional Regulator of Cancer Immunity. *Cancers*. 2020;12(11):3099.
92. Batlle E, Massague J. Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* 2019; 50:924-940
93. Chatterjee S, Chatterjee A, Jana S, et al. Transforming growth factor-beta orchestrates PD-L1 enrichment in tumor-derived exosomes and mediates CD8 T-cell dysfunction regulating early phosphorylation of TCR signalome in breast cancer. *Carcinogenesis*, 2021;42(1): 38–47 <https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa092>
94. Miah S, Banks CA, Ogunbolude Y, et al. BRK phosphorylates SMAD4 for proteasomal degradation and inhibits tumor suppressor FRK to control SNAIL, SLUG, and metastatic potential. *Sci Adv*. 2019;5(10):eaaw3113.
95. Garo LP, Ajay AK, Fujiwara M, et al. Smad7 controls immunoregulatory PDL2/1-PD1 signaling in intestinal inflammation and autoimmunity. *Cell Rep*. 2019;28(13):3353-3366.
96. Ou JN, Wiedeman AE, Stevens AM. TNF-alpha and TGF-beta counter-regulate PD-L1 expression on monocytes in systemic lupus erythematosus. *Sci Rep*. 2012;2:295.
97. Shi, X., Yang, J., Deng, S. et al. TGF- $\beta$  signaling in the tumor metabolic microenvironment and targeted therapies. *J Hematol Oncol* 2022;15:135
98. Starke A, Wüthrich RP, Waeckerle-Men Y. TGF-beta treatment modulates PD-L1 and CD40 expression in proximal renal tubular epithelial cells and enhances CD8 cytotoxic T-cell responses. *Nephron Exp Nephrol* 2007;107(1):e22-9. doi:10.1159/000106506.
99. Carbone FR, Mackay LK. Functional T cell tolerance by peripheral tissue-based checkpoint control. *Nat Immunol*. 2023;24(8):1224-1225.

100. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF- $\alpha$ : Structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*. 2010;49:1215–1228. doi: 10.1093/rheumatology/keq031.
101. Jang DI, Lee AH, Shin HY, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) in Autoimmune Disease and Current TNF- $\alpha$  Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2021;8;22(5):2719. doi: 10.3390/ijms22052719. PMID: 33800290
102. Sedger L.M., McDermott M.F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants—Past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014;25:453–472.
103. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:49–62. doi:10.1038/nrrheum.2015.169
104. Yi M, Niu M, Xu L et al. Regulation of PD-L1 expression in the tumor microenvironment. *J Hematol Oncol* 2012;14:10
105. Wang X, Yang L, Huang F, et al. Inflammatory cytokines IL-17 and TNF- $\alpha$  up-regulate PD-L1 expression in human prostate and colon cancer cells. *Immunol Lett* 2017;184:7-14.
106. Benoot T, Piccioni E, De Ridder K, Goyvaerts C. TNF $\alpha$  and Immune Checkpoint Inhibition: Friend or Foe for Lung Cancer? *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(16):8691.
107. Hartley G, Regan D, Guth A, et al. Regulation of PD-L1 expression on murine tumor-associated monocytes and macrophages by locally produced TNF- $\alpha$ . *Cancer Immunol Immunother* 2017;66, 523–535 <https://doi.org/10.1007/s00262-017-1955-5>
108. Gowrishankar K, Gunatilake D, Gallagher SJ, Tiffen J, Rizos, H, Hersey, P. Inducible but Not Constitutive Expression of PD-L1 in Human Melanoma Cells Is Dependent on Activation of NF- $\kappa$ B. *PLOS ONE*, 2015;10(4), e0123410.
109. Hamza T, Barnett JB, Li B. Interleukin 12 a Key Immunoregulatory Cytokine in Infection Applications. *International Journal of Molecular Sciences* 2010;11(3), 789-806.
110. Tait Wojno ED, Hunter C A, Stumhofer JS. The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery. *Immunity* 2019; 50: 851-870

111. Sun L, He C, Nair L, Yeung J, Egwuagu CE. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. *Cytokine* 2015;75(2):249-55. doi: 10.1016/j.cyto.2015.01.030.
112. Cheng X, Zhao Z, Ventura E, Gran, B, Shindler, KS, Rostami A. The PD-1/PD-L pathway is up-regulated during IL-12-induced suppression of EAE mediated by IFN- $\gamma$ . *J Neuroimmunology* 2007;185:75. doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.01.012
113. Lin L, Rayman P, Pavicic PG Jr, et al. Ex vivo conditioning with IL-12 protects tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells from negative regulation by local IFN- $\gamma$ . *Cancer Immunol Immunother.* 2019;68(3):395-405. doi: 10.1007/s00262-018-2280-3.
114. Nguyen KG, Vrabel MR, Mantooth SM, et al. Localized Interleukin-12 for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2020;15;11:575597. doi: 10.3389/fimmu.2020.575597.
115. Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, et al. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol* 2008;15;181(10):6738-46. doi: 10.4049/jimmunol.181.10.6738.
116. Hirahara K, Ghoreschi K, Yang XP, et al. Interleukin-27 priming of T cells controls IL-17 production in trans via induction of the ligand PD-L1. *Immunity.* 2012;29;36(6):1017
117. Li N, Wang J, Zhang N, et al. Cross-talk between TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  signaling in induction of B7-H1 expression in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67(2):271-283. doi: 10.1007/s00262-017-2086-8.
118. Wang S, Wang G, Zhang L, et al. Interleukin-17 promotes nitric oxide-dependent expression of PD-L1 in mesenchymal stem cells. *Cell Biosci.* 2020;26;10:73.
119. Taube JM, Young GD, McMiller TL, et al. Differential Expression of Immune-Regulatory Genes Associated with PD-L1 Display in Melanoma: Implications for PD-1 Pathway Blockade. *Clin. Cancer Res.* 2015;21: 3969–3976.
120. Lemma EY, Letian A, Altorki NK, McGraw TE. Regulation of PD-L1 Trafficking from Synthesis to Degradation. *Cancer Immunol Res.* 2023;5;11(7):866-874.
121. Qian Q, Wu C, Chen J, Wang W. Relationship between IL-10 and PD-L1 in esophageal carcinoma tissues and IL-10 down-regulates PD-L1 expression via Met signaling pathway. *J Gastrointest Oncol* 2020;11, 337–355.

122. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep* 2017;19, 1189–1201.
123. Chen RY, Zhu Y, Shen YY, et al. The role of PD-1 signaling in health and immune-related diseases. *Front Immunol.* 2023;16;14:1163633.
124. Schreiner B, Mitsdoerffer M, Kieseier BC, et al. Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2004;155(1-2):172-82. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.06.013.
125. Li H, Xia JQ, Zhu FS, et al. LPS promotes the expression of PD-L1 in gastric cancer cells through NF- $\kappa$ B activation. *J Cell Biochem.* 2018;119(12):9997-10004.
126. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 2010;236:219–242.
127. Schwartz RH. T Cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003;21:305–34.
128. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005;23:515–48. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611
129. Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* 2017;545(7655):495–9.
130. Chen W, Wang J, Jia L, Liu J, Tian Y. Attenuation of the programmed cell death-1 pathway increases the M1 polarization of macrophages induced by zymosan. *Cell Death Dis* 2016;7(2):e2115. doi: 10.1038/cddis.2016.33
131. Cho HY, Choi EK, Lee SW, et al. Programmed death-1 receptor negatively regulates LPS-mediated IL-12 production and differentiation of murine macrophage RAW264.7 cells. *Immunol Lett* 2009;127(1):39–47. doi: 10.1016/j.imlet.2009.08.011
132. Ma CJ, Ni L, Zhang Y, et al. PD-1 negatively regulates interleukin-12 expression by limiting STAT-1 phosphorylation in monocytes/macrophages during chronic hepatitis c virus infection. *Immunology* 2011;132(3):421–31. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03382.x

133. Imai D, Yoshizumi T, Okano S, et al. IFN- $\gamma$  Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and the Expression of PD-L1 in Pancreatic Cancer. *J Surg Res.* 2019;240:115
134. Burger GA, Nesenberend DN, Lems CM, Hille SC, Beltman JB. Bidirectional crosstalk between epithelial-mesenchymal plasticity and IFN $\gamma$ -induced PD-L1 expression promotes tumour progression. *R Soc Open Sci.* 2022;2;9(11):220186. doi: 10.1098/rsos.220186.
135. Chen L, Xiong Y, Li J, et al. PD-L1 Expression Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Esophageal Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2017;42(6):2267-2280
136. Dongre A, Rashidian M, Reinhardt F, et al. Epithelial-to-Mesenchymal transition contributes to immunosuppression in breast Carcinomas. *Cancer Res* 2017;77(15):3982–9.
137. Ueno T, Tsuchikawa T, Hatanaka KC, et al. Prognostic impact of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression and its association with epithelial-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncotarget* 2018;9(28):20034–47.
138. Kumar S, Davra V, Obr AE, et al. Crk adaptor protein promotes PD-L1 expression, EMT and immune evasion in a murine model of triple-negative breast cancer. *Oncoimmunology* 2017;7(1):e1376155. doi: 10.1080/2162402X.2017.1376155
139. Bouillez A, Rajabi H, Jin C, et al. MUC1-c integrates PD-L1 induction with repression of immune effectors in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2017;36(28):4037–46.
140. Alsuliman A, Colak D, Al-Harazi O, et al. Bidirectional crosstalk between PD-L1 expression and epithelial to mesenchymal transition: significance in claudin-low breast cancer cells. *Mol Cancer* 2015;14:149. doi: 10.1186/s12943-015-0421-2
141. Jiang Y, Zhan H. Communication between EMT and PD-L1 signaling: New insights into tumor immune evasion. *Cancer Lett.* 2020;1;468:72-81
142. Qiu XY, Hu DX, Chen WQ, et al. PD-L1 confers glioblastoma multiforme malignancy via ras binding and Ras/Erk/EMT activation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018;1864(5 Pt A):1754–69. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.03.002

143. Wang Y, Wang H, Zhao Q, Xia Y, Hu X, Guo J. PD-L1 induces epithelial-to-mesenchymal transition via activating SREBP-1c in renal cell carcinoma. *Med Oncol* 2015;32(8):212. doi: 10.1007/s12032-015-0655-2
144. Guo X, Sunil C, Adeyanju O, et al. PD-L1 mediates lung fibroblast to myofibroblast transition through Smad3 and beta-catenin signaling pathways. *Sci Rep* 2022;12(1):3053.
145. Lu Y, Zhong W, Liu Y, et al. Anti-PD-L1 antibody alleviates pulmonary fibrosis by inducing autophagy via inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Int Immunopharmacol* 2022;104:108504. doi: 10.1016/j.intimp.2021.108504
146. Geng Y, Liu X, Liang J, et al. PD-L1 on invasive fibroblasts drives fibrosis in a humanized model of idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight* (2019) 4(6):e125326.
147. Kang JH, Jung MY, Choudhury M, Leof EB. Transforming growth factor beta induces fibroblasts to express and release the immunomodulatory protein PD-L1 into extracellular vesicles. *FASEB J* 2020;34(2):2213–26. doi: 10.1096/fj.201902354R
148. Cui L, Chen SY, Lerbs T, et al. Activation of JUN in fibroblasts promotes pro-fibrotic programme and modulates protective immunity. *Nat Commun* 2020;11(1):2795.
149. Veluswamy P, Wacker M, Scherner M, Wippermann J. Delicate Role of PD-L1/PD-1 Axis in Blood Vessel Inflammatory Diseases: Current Insight and Future Significance. *Int J Mol Sci.* 2020;31;21(21):8159. doi: 10.3390/ijms21218159. PMID: 33142805
150. Lan Y, Moustafa M, Knoll M, et al. Simultaneous targeting of TGF-beta/PD-L1 synergizes with radiotherapy by reprogramming the tumor microenvironment to overcome immune evasion. *Cancer Cell* 2021;39(10):1388–1403 e1310.
151. Curran CS, Kopp JB. PD-1 immunobiology in glomerulonephritis and renal cell carcinoma. *BMC Nephrology* volume 2021: 22: 80
152. Huinen ZR, Huijbers EJM, van Beijnum JR et al. Anti-angiogenic agents — overcoming tumour endothelial cell anergy and improving immunotherapy outcomes. *Nat Rev Clin Oncol* 2021;18, 527–540 <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00496-y>
153. Tamosiuniene R, Manouvakhova O, Mesange P, et al. Dominant role for regulatory T cells in protecting females against pulmonary Hypertension. *Circ Res* 2018;122(12):1689

154. Krupnick AS, Gelman AE, Barchet W, et al. Murine vascular endothelium activates and induces the generation of allogeneic CD4+25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005;175(10):6265–70. doi: 10.4049/jimmunol.175.10.6265
155. Nakayama Y, Bromberg JS. Lymphotoxin-beta receptor blockade induces inflammation and fibrosis in tolerized cardiac allografts. *Am J Transplant* 2012;12(9):2322–34.
156. Ravaglia C, Doglioni C, Chilosi M, et al. Clinical, radiological and pathological findings in patients with persistent lung disease following SARS-CoV-2 infection. *Eur Respir J* 2022;60(4):2102411. doi: 10.1183/13993003.02411-2021
157. He J, Hu Y, Hu M. et al. Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci Rep* 2015;5:13110
158. Jubel JM, Barbaty ZR, Burger C, Wirtz DC, Schildberg FA. The Role of PD-1 in Acute and Chronic Infection. *Front Immunol.* 2020;24;11:487. doi: 10.3389/fimmu.2020.00487.
159. Veerman RE, Akpınar GG, Offens A, et al. Antigen-Loaded Extracellular Vesicles Induce Responsiveness to Anti-PD-1 and Anti-PD-L1 Treatment in a Checkpoint Refractory Melanoma Model. *Cancer Immunol Res.* 2023;3;11(2):217-227.
160. Muralidharan S, Sehgal M, Soundharya R, et al. PD-L1 Activity Is Associated with Partial EMT and Metabolic Reprogramming in Carcinomas. *Current Oncology.* 2022;29(11):8285-8301.
161. Wang Y, Wang Y, Ren Y, Zhang Q, Yi P, Cheng C. Metabolic modulation of immune checkpoints and novel therapeutic strategies in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 2022;86:542-565. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.02.010>
162. Zhang C, Quinones A, Le A. Metabolic reservoir cycles in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 2022;86:180-188. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.03.023>
163. Vanhersecke L, Brunet M, Guégan JP, et al. Mature tertiary lymphoid structures predict immune checkpoint inhibitor efficacy in solid tumors independently of PD-L1 expression. *Nat Cancer.* 2021;2(8):794-802. doi: 10.1038/s43018-021-00232-6.
164. Sato Y, Silina K, van den Broek M, Hirahara K, Yanagita M. The roles of tertiary lymphoid structures in chronic diseases. *Nat Rev Nephrol.* 2023;12:1–13.

165. Philips EA, Garcia-España A, Tocheva AS, et al. The structural features that distinguish PD-L2 from PD-L1 emerged in placental mammals. *J Biol Chem.* 2020;3;295(14):4372
166. Hong JJ, Chang KT, Villinger F. The Dynamics of T and B Cells in Lymph Node during Chronic HIV Infection: TFH and HIV, Unhappy Dance Partners? *Front Immunol.* 2016;22;7:522. doi: 10.3389/fimmu.2016.00522.
167. Zhang XY, Liu ZM, Zhang HF, et al. Decreased PD-1/PD-L1 Expression Is Associated with the Reduction in Mucosal Immunoglobulin A in Mice with Intestinal Ischemia Reperfusion. *Dig Dis Sci* 2015;60:2662–2669
168. Luo J, Liu K, Wang Y, Li H. Divergent roles of PD-L1 in immune regulation during ischemia-reperfusion injury. *Front Immunol.* 2022;21;13:1021452
169. Smith V, Mukherjee D, Lunj S, et al. The effect of hypoxia on PD-L1 expression in bladder cancer. *BMC Cancer* 2021;21:1271 <https://doi.org/10.1186/s12885-021-09009-7>
170. Shurin MR, Umansky V. Cross-talk between HIF and PD-1/PD-L1 pathways in carcinogenesis and therapy. *J Clin Invest* 2022; 2;132(9):e159473. doi: 10.1172/JCI159473.
171. Ding Xc, Wang Ll, Zhang Xd, et al. The relationship between expression of PD-L1 and HIF-1 $\alpha$  in glioma cells under hypoxia. *J Hematol Oncol* 2021;14:92
172. van Duijn A, Willemsen KJ, van Uden NOP, et al. A secondary role for hypoxia and HIF1 in the regulation of (IFN $\gamma$ -induced) PD-L1 expression in melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2022;71(3):529-540. doi: 10.1007/s00262-021-03007-1.
173. Stamatiades EG, Tremblay ME, Bohm M, et al. Immune Monitoring of Transendothelial Transport by Kidney-Resident Macrophages. *Cell* 2016;166(4): 991–1003
174. Kitching AR. Dendritic cells in progressive renal disease: some answers, many questions. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(12):2185–93.
175. Holdsworth SR, Summers SA. Role of mast cells in progressive renal diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(12):2254–61.

176. Lukacs-Kornek V, Burgdorf S, Diehl L, Specht S, Kornek M, Kurts C. The kidney-renal lymph node-system contributes to cross-tolerance against innocuous circulating antigen. *J Immunol.* 2008;180(2):706–15.
177. Gottschalk C, Damuzzo V, Gotot J, et al. Batf3-dependent dendritic cells in the renal lymph node induce tolerance against circulating antigens. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(4):543–9.
178. Nakae S, Suto H, Iikura M, et al. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. *J Immunol.* 2006;176(4):2238–48.
179. Curran CS, Sharon E. PD-1 immunobiology in autoimmune hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol.* 2017;44(6):428–32.
180. Khanna R. Clinical presentation & management of glomerular diseases: hematuria, nephritic & nephrotic syndrome. *Mo Med.* 2011;108(1):33–6.
181. Cruz-Whitley J, Giehl N, Jen KY, Young B. Membranoproliferative Glomerulonephritis Associated with Nivolumab Therapy. *Case Rep Nephrol.* 2020;2020:2638283.
182. Daanen RA, Maas RJH, Koornstra RHT, Steenbergen EJ, van Herpen CML, Willemsen A. Nivolumab-associated Nephrotic Syndrome in a Patient With Renal Cell Carcinoma: A Case Report. *J Immunother.* 2017;40(9):345–8.
183. Gallan AJ, Alexander E, Reid P, Kutuby F, Chang A, Henriksen KJ. Renal Vasculitis and Pauci-immune Glomerulonephritis Associated With Immune Checkpoint Inhibitors. *Am J Kidney Dis.* 2019;74(6):853–6.
184. Uner M, Alhasson B, Obhrai J, Bagnasco SM. ANCA-associated pauci-immune necrotizing glomerulonephritis during the treatment with pembrolizumab. *Virchows Arch.* 2021;478(4):801-804. doi: 10.1007/s00428-020-02882-w.
185. Koda R, Watanabe H, Tsuchida M, et al. Immune checkpoint inhibitor (nivolumab)-associated kidney injury and the importance of recognizing concomitant medications known to cause acute tubulointerstitial nephritis: a case report. *BMC Nephrol.* 2018;19(1):48.

186. Bottlaender L, Breton AL, de Laforcade L, Dijoud F, Thomas L, Dalle S. Acute interstitial nephritis after sequential ipilimumab-nivolumab therapy of metastatic melanoma. *J Immunother Cancer*. 2017;5(1):57.
187. Glutsch V, Gran F, Weber J, Gesierich A, Goebeler M, Schilling B. Response to combined ipilimumab and nivolumab after development of a nephrotic syndrome related to PD-1 monotherapy. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):181.
188. Escandon J, Peacock S, Trabolsi A, Thomas DB, Layka A, Lutzky J. Interstitial nephritis in melanoma patients secondary to PD-1 checkpoint inhibitor. *J Immunother Cancer*. 2017;5:3.
189. Tabei A, Watanabe M, Ikeuchi H, et al. The Analysis of Renal Infiltrating Cells in Acute Tubulointerstitial Nephritis Induced by Anti-PD-1 Antibodies: A Case Report and Review of the Literature. *Intern Med*. 2018;57(21):3135–9.
190. Kodner CM, Kudrimoti A. Diagnosis and management of acute interstitial nephritis. *Am Fam Physician*. 2003;67(12):2527–34. 35.
191. Perazella MA. Clinical Approach to Diagnosing Acute and Chronic Tubulointerstitial Disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2017;24(2):57–63.
192. Nast CC. Medication-Induced Interstitial Nephritis in the 21st Century. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2017;24(2):72–9.
193. Cortazar FB, Kibbelaar ZA, Glezerman IG, et al. Clinical Features and Outcomes of Immune Checkpoint Inhibitor-Associated AKI: A Multicenter Study. *J Am Soc Nephrol*. 2020;31(2):435–46.
194. Martins F, Sofiya L, Sykiotis GP, et al. Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(9):563–80
195. Henderson LJ, Reoma LB, Kovacs JA, Nath A. Advances toward Curing HIV-1 Infection in Tissue Reservoirs. *J Virol*. 2020;94(3).
196. Sezgin E, An P, Winkler CA. Host Genetics of Cytomegalovirus Pathogenesis. *Front Genet*. 2019;10:616.
197. Curran CS, Gupta S, Sanz I, Sharon E. PD-1 immunobiology in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*. 2019;97:1–9

198. Pio R, Ajona D, Ortiz-Espinosa S, Mantovani A, Lambris JD. Complementing the Cancer-Immunity Cycle. *Front Immunol.* 2019;10:774.
199. Cassol C, Satoskar A, Lozanski G, Rovin B, Hebert L, Nadasdy T, Brodsky SV. Anti-PD-1 Immunotherapy May Induce Interstitial Nephritis With Increased Tubular Epithelial Expression of PD-L1. *Kidney Int Rep.* 2019;4(8):1152–60
200. Ke MY, Xu T, Fang Y, et al. Liver fibrosis promotes immune escape in hepatocellular carcinoma via GOLM1-mediated PD-L1 upregulation. *Cancer Lett* 2021;513:14–25
201. Huang N, Zhou R, Chen H, et al. Splenic CD4(+) and CD8(+) T-cells highly expressed PD-1 and Tim-3 in cirrhotic patients with HCV infection and portal hypertension. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2021;35:20587384211061051
202. Jiang A, Liu N, Wang J, et al. The role of PD-1/PD-L1 axis in idiopathic pulmonary fibrosis: Friend or foe? *Front Immunol.* 2022;5;13:1022228.
203. Tominaga K, Takeuchi K, Takakuma S, et al. Immune checkpoint inhibitors associated granulomatous small vessel vasculitis accompanied with tubulointerstitial nephritis: A case report. *BMC Nephrology* 2023;24. <https://doi.org/10.1186/s12882-023-03091-8>
204. Xipell M, Victoria I, Hoffmann V, et al. Acute tubulointerstitial nephritis associated with atezolizumab, an anti-programmed death-ligand 1 (pd-l1) antibody therapy. *Oncoimmunology* 2018;7(7):e1445952. doi: 10.1080/2162402X.2018.1445952
205. Schoop R, Wahl P, Le Hir M, Heemann U, Wang M, Wuthrich RP. Suppressed T-cell activation by IFN-gamma-induced expression of PD-L1 on renal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(11):2713–20. doi: 10.1093/ndt/gfh423
206. Hagerty DT, Allen PM. Processing and presentation of self and foreign antigens by the renal proximal tubule. *J Immunol* 1992;148(8):2324–30. doi: 10.4049/jimmunol.148.8.2324
207. Yang J, Popoola J, Khandwala S et al. Critical Role of Donor Tissue Expression of Programmed Death Ligand-1 in Regulating Cardiac Allograft Rejection and Vasculopathy. *Circulation.* 2008;117: 660-669
208. Mitchell RN, Libby P. Vascular remodeling in transplant vasculopathy. *Circ Res.* 2007;100:967–978.

209. Russell ME, Hancock WW, Akalin E, et al. Chronic cardiac rejection in the LEW to F344 rat model. Blockade of CD28-B7 costimulation by CTLA4Ig modulates T cell and macrophage activation and attenuates arteriosclerosis. *J Clin Invest.* 1996;97:833–838.
210. Koga N, Suzuki J, Kosuge H, et al. Blockade of the interaction between PD-1 and PD-L1 accelerates graft arterial disease in cardiac allografts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:2057–2062.
211. Habicht A, Kewalaramani R, Vu MD, et al. Striking dichotomy of PD-L1 and PD-L2 pathways in regulating alloreactive CD4(+) and CD8(+) T cells in vivo. *Am J Transplant* 2007; 7:2683–2692
212. Kitazawa Y, Fujino M, Wang Q, et al. Involvement of the programmed death-1/programmed death-1 ligand pathway in CD4+ CD25+ regulatory T-cell activity to suppress alloimmune responses. *Transplantation* 2007; 83:774–782.
213. Dudler J, Li J, Pagnotta M, et al. Gene transfer of programmed death ligand-1.Ig prolongs cardiac allograft survival. *Transplantation* 2006; 82:1733–1737.
214. Izawa A, Yamaura K, Albin MJ, et al. A novel alloantigen-specific CD8+ PD1+ regulatory T cell-induced by ICOS-B7h blockade in vivo. *J Immunol* 2007; 179:786–796.
215. Tanaka K, Albin MJ, Yuan X, et al. PDL1 is required for peripheral transplantation tolerance and protection from chronic allograft rejection. *J Immunol* 2007;179:5204–5210.
216. Wang L, Han R, Hancock WW. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand PD-L1 are required for allograft tolerance. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2983–2990.
217. Liu C, Chen H, Jia J, Hong T, Wang C. DCs sensitized with mPD-L1-Ig fusion protein improve the effect of heart transplantation in mice by promoting the generation of T-reg cells. *Cell. Immunol* 2014; 290: 169–177.
218. Geng L, Jiang G, Xie H, et al. Mycophenolic acid upregulates B7-DC expression on dendritic cells, which is associated with impaired allostimulatory capacity of dendritic cells. *Transplant Proc* 2006; 38:1622–1624.

219. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T-cell responses. *Immunity* 2007; 27:111–122.
220. Cornell LD, Smith RN, Colvin RB. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 189–220.
221. Waeckerle-Men Y, Starke A, Wahl PR et al. Limited costimulatory molecule expression on renal tubular epithelial cells impairs T-cell activation. *Kidney Blood Press Res* 2007; 30: 421–429.
222. Frasca L, Marelli-Berg F, Imami N et al. Interferon-gamma-treated renal tubular epithelial cells induce allospecific tolerance. *Kidney Int* 1998; 53: 679–689.
223. de Haij S, Woltman AM, Trouw LA et al. Renal tubular epithelial cells modulate T-cell responses via ICOS-L and B7-H1. *Kidney Int* 2005; 68: 2091–2102.
224. Chen Y, Zhang J, Li J et al. Expression of B7-H1 in inflammatory renal tubular epithelial cells. *Nephron Exp Nephrol* 2006; 102: e81–e92
225. Starke A, Lindenmeyer MT, Segerer S et al. Renal tubular PD-L1 (CD274) suppresses alloreactive human T-cell responses. *Kidney International* 2010;78:38–47
226. Kirby JA, Ikuta S, Clark K et al. Renal allograft rejection: investigation of alloantigen presentation by cultured human renal epithelial cells. *Immunology* 1991;72:411–417.
227. Obata F, Yoshida K, Ohkubo M et al. Contribution of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and interferon-gamma to the progress of chronic rejection of kidney allografts: the Th1 response mediates both acute and chronic rejection. *Transpl Immunol* 2005;14:21–25.
228. Ding H, Wu X, Gao W. PD-L1 is expressed by human renal tubular epithelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. *Clin Immunol* 2005;115:184–191.
229. Guleria I, Khosroshahi A, Ansari MJ, et al. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J Exp Med.* 2005;202:231–237.
230. Holets LM, Hunt JS, Petroff MG. Trophoblast CD274 (B7-H1) Is Differentially Expressed Across Gestation: Influence of Oxygen Concentration. *Biol Reprod* 2006;74:352.
231. Grzywa TM, Nowis D, Golab J. The role of CD71<sup>+</sup> erythroid cells in the regulation of the immune response. *Pharmacol Ther* 2021;228:107927

232. Delyea C, Bozorgmehr N, Koleva P, et al. CD71+ Erythroid Suppressor Cells Promote Fetomaternal Tolerance through Arginase-2 and PDL-1. *J Immunol.* 2018;200, 4044–4058.
233. Habicht A, Dada S, Jurewicz M, et al. A Link between PDL1 and T Regulatory Cells in Fetomaternal Tolerance. *J Immunol.* 2007;179:5211–5219
234. Zenclussen AC, Gerlof K, Zenclussen ML, et al. Abnormal T-Cell Reactivity against Paternal Antigens in Spontaneous Abortion: Adoptive Transfer of Pregnancy-Induced CD4+CD25+ T Regulatory Cells Prevents Fetal Rejection in a Murine Abortion Model. *Am. J Pathol* 2005;166:811–822.
235. Fife BT, Pauken KE. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1217:45–59.
236. Loupy A, Haas M, Roufosse C, et al. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell– and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2020;20:2318– 2331. <https://doi.org/10.1111/ajt.15898>
237. Schinstock CA, Mannon RB, Budde K, et al. Recommended Treatment for Antibody-mediated Rejection After Kidney Transplantation: The 2019 Expert Consensus From the Transplantation Society Working Group. *Transplantation* 2020;104(5):911-922
238. Muczynski KA, Ekle DM, Coder DM, Anderson SK. Normal human kidney HLA-DR-expressing renal microvascular endothelial cells: characterization, isolation, and regulation of MHC class II expression. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(5):1336-48.
239. [https://www.declarationofistanbul.org/images/documents/doi\\_2018\\_Turkish.pdf](https://www.declarationofistanbul.org/images/documents/doi_2018_Turkish.pdf)
240. Rashmi Tippalagama, Akul Singhania, Paige Dubelko, et al. HLA-DR Marks Recently Divided Antigen-Specific Effector CD4 T Cells in Active Tuberculosis Patients. *J Immunol* 2021; 207 (2): 523–533.
241. Ozdemir BH, Aksoy PK, Haberal AN, Demirhan B, Haberal M. Relationship of HLA-DR expression to rejection and mononuclear cell infiltration in renal allograft biopsies. *Ren Fail.* 2004;26(3):247-51. doi: 10.1081/jdi-200026752. PMID: 15354973.
242. Baas, M, Besanc A, Goncalves T, et al. TGFβ-dependent expression of PD-1 and PD-L1 controls CD8+ T cell anergy in transplant tolerance. *eLife* 2016;5:e08133.

243. Nowicki TS, Akiyama R, Huang RR, et al. Infiltration of CD8 T cells and expression of PD-1 and PD-L1 in synovial sarcoma. *Cancer immunology research* 2017;5(2):118.
244. Pauken KE, Nelson CE, Martinov T, et al. Cutting edge: identification of autoreactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets resistant to PD-1 pathway blockade. *J Immunol* 2015;194(8):3551-3555. doi: 10.4049/jimmunol.1402262
245. Subudhi SK, Zhou P, Yerian LM. Et al. Local expression of B7-H1 promotes organ-specific autoimmunity and transplant rejection. *J Clin Invest* 2004;113: 694-700.
246. Portuguese AJ, Tykodi SS, Blosser CD, Gooley TA, Thompson JA, Hall ET. Immune Checkpoint Inhibitor Use in Solid Organ Transplant Recipients: A Systematic Review. *J Natl Compr Canc Netw* 2022;20(4):406–416
247. Nguyen LS, Ortuno S, Lebrun-Vignes B, et al. Transplant rejections associated with immune checkpoint inhibitors: a pharmacovigilance study and systematic literature review. *Eur J Cancer* 2021;148:36–47.
248. Gassmann D, Weiler S, Mertens JC, et al. Liver Allograft Failure After Nivolumab Treatment-A Case Report With Systematic Literature Research. *Transplant Direct*. 2018;20;4(8):e376. doi: 10.1097/TXD.0000000000000814.