

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN İMMÜN YANITTA VE
İMMÜN REGÜLASYONDA ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN

AFAG KHALİLOVA

DOKTORA TEZİ

ANKARA - 2024

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN İMMÜN YANITTA VE
İMMÜN REGÜLASYONDA ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN

AFAG KHALİLOVA

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. BİLKAY BAŞTÜRK

ANKARA – 2024

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Afag KHALİLOVA tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20/02/2024

Tez Adı: Endoplazmik Retikulum Stresinin İmmün Yanıtta ve İmmün Regülasyonda Rolünün Araştırılması

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)

İmza

.....	
.....	
.....	
.....	
.....	

ONAY

.....

Enstitü Müdürü

Tarih: ... / ... /

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 05/02/2024

Öğrencinin Adı, Soyadı: Afag KHALİLOVA

Öğrencinin Numarası: 21910184

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Programı: Doktora Programı

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı:

Tez Başlığı: Endoplazmik Retikulum Stresinin İmmün Yanıtta ve İmmün Regülasyonda Rolünün Araştırılması

Yukarıda başlığı belirtilen Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 66 sayfalık kısmına ilişkin, 05/02/2024 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %5'dir. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç

2. Alıntılar hariç

3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

"Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını" inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

ONAY

Tarih: / /

Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad, İmza:

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin Başkent Üniversitesinde gerçekleşmesinde destek olan değerli bilim insanı, Başkent Üniversitesinin kurucusu hocam Prof. Dr. Mehmet HABERAL'a ve değerli hocam Feyyaz ARTUKOĞLUN'a, değerli fikirleri ile tezin gerçekleşmesinde katkı ve desteklerinden dolayı, tezi yönlendirmiş, saygı ve değer verdiğim hocam Prof. Dr. Fatma Belgin ATAÇ'a, doktora projesinde eğitimim ve tezin oluşumundan tamamlanmasına kadar geçen süreçte her türlü desteğini esirgemeyen, ailemden uzak olduğum dönemlerde benimle annem kadar ilgilenen, bizlere samimi ve içten davranan, nazik, kibar, sözün asıl anlamında her anlamda güzel insan, bilim insanı danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Bilkay BAŞTÜRK'e, tezimin tamamlanması için yoğun destek vermiş arkadaşlarım Miray KAVUZLU ve Bircan ZENGEL'e, tezin gerçekleşmesi için örneklerin elde edilmesinde destek olan Sayın Prof. Dr. Kenan ÇALIŞKAN'a, zamanlarını ayırarak, tezimin jürisine katılan ve tezi geliştirici fikir ve önerilerle zenginleştiren tüm hocalarıma teşekkür ederim. Azerbaycan'da birlikte çalıştığım ve beni destekleyen hocam Prof. Dr. Lale ALLAHVERDİYEVA'ya müteşekkirim. Tez çalışmalarım sürecinde her türlü desteğini ve anlayışını esirgemeyen annem NEZAKET'e, babam VLADİMİR'e, oğlum AZİZ'e, abim ANAR'a ve kardeşim GÜNEL'e minnettarım.

ÖZET

Afag Khalilova, Endoplazmik Retikulum Stresinin İmmün Yanıtta ve İmmün Regülasyonda Rolünün Araştırılması, Başkent Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Doktora Programı, 2024

Endoplazmik retikulum (ER), protein sentezi-modifikasyonuna, hücresel kalsiyum depolaması ile kalsiyum homeostazına ve lipid sentezine katkıda bulunan bir organeldir. ER homeostazını bozan fizyolojik ve patolojik faktörler endoplazmik retikulum stresine sebep olur ve hücre içinde farklı moleküler yollarla katlanmamış protein yanıtı başlatılabilir. Katlanmamış protein yanıtının birincil amacı, hücre sağ kalımı amacıyla ER homeostazını sağlamak için transkripsiyonel ve translasyonel programları başlatmaktır. ER stres sinyalleri üç sinyal proteini tarafından iletilir: ER transmembran sensör proteini (PRKR benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK), aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) ve inositol gerektiren protein 1 (IRE1). Bu yolların aktivasyonu sonucu genel protein sentezi zayıflatılır ve yanlış katlanmış proteinler yeniden işleme ve katlanmaya gönderilir. Şaperonların yeniden katlanmayı karşılayamadığı durumda, ER ile ilişkili bozulma yolağı protein katabolizması ERAD tetiklenir. Eğer, bu mekanizmalar da kronik ER homeostazını eski haline getiremezse, hücreler apoptozla ölür. ER stresi, hücre içi çeşitli fizyolojik fonksiyonların kontrolünde kritik roller oynar. ER stres yanıtının bozulması, edinilen bağışıklık yanıtlarının düzensizliği ile ilişkilidir. Katlanmamış protein yanıtının sensörlerinin, B ve T hücreleri ve diğer immün hücre türlerinin gelişiminde, farklılaşmasında, proliferasyonunda, sitokin ve antikor üretiminde rol oynadığını bilinmektedir. Farklılaşan immün hücrelerdeki ER stresini düzenlemek için, katlanmamış protein yanıtı ER’de yerleşik şaperonları ve sinyal yollarını aktive ettiği belirlenmiştir. Bunlardan, B hücrelerin plazma hücrelerine farklılaşması üzerine, yüksek düzeyde antikor sentezine uyum sağlamak amacıyla, ER kapsamlı XBP1 ekspresyonunun artmasıyla ilgili sonuçlar elde eden çalışmalar vardır. Önceleri, immünoglobulin sentezi ve katlanmamış immünoglobulin zincirlerinin birikmesi sonucu olarak XBP1 ekspresyonunun arttığı düşünülse de, sonraki araştırmalar, XBP1 indüksiyonunun immünoglobulin sentezinden önce B hücrelerde saptandığını göstermiştir. Ama plazma hücresi gelişiminde erken dönemde UPR aktivasyonunu yönlendiren faktörler tam olarak bilinmemektedir. İn vitro çalışmalar da, B hücresi farklılaşması sırasında katlanmamış protein yanıtıyla ilişkili proteinlerden XBP1’le beraber diğer, bağlayıcı-immünoglobulin proteini (BIP binding-

immunoglobulin protein) (BiP) ve GRP94'ü ekspresyonunun değişimi gösterilmiştir. Bağışıklık yanıtları önemli ölçüde hücre içi sinyallere bağlıdır. Yapılan diğer alışmalar UPR'ın, T hücresinin farklılaşması ve DC gelişiminde ve olgunlaşmasında da rol oynadığını göstermiştir. İnsan bağışıklık sisteminde, dalakta bulunan ve T bağımlı immün yanıtlarda önemli rol oynayan foliküler B hücrelerinde ER stresinin etkisi bilinmemektedir. Foliküler B hücreleri ER stresi altındayken T hücrelerinde etkisi olup olmadığı konusunda bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu literatür bilgileri doğrultusunda ER stresi ile indüklenmiş dalak foliküler B hücrelerinde ve onlarla ko-kültür yapılan T yardımcı hücrelerde hücre yüzey moleküllerinin ekspresyon değişikliğini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla in vitro koşullarda dalak örneğinden elde edilen hücre süspansiyonundan manyetik boncuk yöntemine dayalı B ve T hücre izolasyonu yapıldı. İzole edilen B hücrelerinde ER stresi oluşturmak amacıyla TG uygulanmıştır. ER stresi indüklenen B hücrelerle T hücre ko-kültür yapıldı. Kültür ortamında hücrelerde TG etkisine ve zamana bağlı gerçekleşen fenotipik değişkenlikleri değerlendirmek amacıyla akım sitometri yöntemiyle monoklonal antikörler kullanarak hücre yüzey molekülleri değerlendirildi.

Anahtar kelimeler: ER stres, katlanmamış protein yanıtları, foliküler B lenfositler, foliküler yardımcı T lenfositler

Bu alışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: KA22/309) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

ABSTRACT

Afag Khalilova, Investigation of the Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Immune Response and Immune Regulation, Başkent University, Institute of Health Sciences, Department of Medical Biology, PhD Program in Medical Biology, 2024

Endoplasmic reticulum (ER) is the vital organelle that contribute to protein synthesis-modification, cellular calcium storage and calcium homeostasis, and lipid synthesis. Physiological and pathological factors that disrupt ER homeostasis cause endoplasmic reticulum stress. In such cases, unfolded protein response can be initiated by the different molecular pathways within the cell. The primary purpose of the Unfolded Protein Response is to initiate transcriptional and translational programs to restore ER homeostasis for cell survival. Unfolded or misfolded proteins cause ER stress, that leads activation largely three signaling sensor proteins and consequently transmitting of signals by the 3 pathways. These sensors are ER transmembrane sensor protein (PRKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), activating transcription factor 6 (ATF6) and protein 1 (IRE1) requiring inositol. The result of activation of these pathways is weakening of overall protein synthesis, but the synthesis specific proteins that should process and fold misfolded proteins. In case the chaperons cannot provide refolding, protein catabolism associated with ERAD is triggered. If these mechanisms cannot restore chronic ER homeostasis, the cells undergo apoptosis. ER stress plays an important role in the control of various intracellular physiological functions. Impaired ER stress response is associated with the disruption of adaptive immune response regulation. It is known that sensors of the expanded protein response play a role in the development, differentiation, proliferation of B and T cells and other types of immune cells, and production of cytokines and antibodies by these cells. Unfolded Protein Response activates chaperones and signal pathways in the ER to regulate ER stress in differentiated immune cells. There are studies related B cells differentiation to plasma cells, which have achieved results about previous expression of upregulated XBP1 to adapt to high levels of antibody synthesis. It was previously thought that XBP1 expression increased because of immunoglobulin synthesis and the accumulation of extended immunoglobulin chains. Subsequent studies have shown that XBP1 induction occurs in B cells prior to immunoglobulin synthesis. However, the factors underlying the activation of UPR in the early stages of plasma cell development remain unclear. Some In vitro studies showed that the expression of proteins associated with

unfolded protein response during B cell differentiation, such as BiP binding-immunoglobulin protein and GRP94 expression are also changed. Immune responses mostly depend on intracellular signaling. Other studies have shown that UPR plays crucial role in T cell differentiation and DC development and maturation.

Despite studies on the role of ER stress in immunity, its role in human immunity, especially the role of ER stress in splenic follicular B cells, which play an important role in T-dependent immune responses has not been fully investigated. And how these cells affect the T cell subpopulation that they interact with, remains uninvestigated. For this reason, our task was to study the phenotypic variability of subpopulations of ER-stress-induced splenic follicular B cells. At the same time, we have sought to investigate how stress-induced ER populations will affect the variability of the phenotype of helper and regulatory T cells to express surface molecules. We have conducted studies on the variability of expression surface molecules of ER-stress-induced splenic follicular B cells and T helper cells that were co-cultivated with them. Research was started with the obtaining a cell suspension from the spleen. Then cell isolation by Magnetic Cell Isolation method from cell suspension was performed for further in vitro investigation. The next stage was the formation of cell culture. TG was used to induce ER stress in isolated B-cells. ER stress induced B cells co-cultivated with the T cell population. Flow cytometry method was used to estimate cellular immunophenotyping in cells.

Keywords: ER stress, unfolded protein response, follicular B lymphocytes, follicular helper T lymphocytes, follicular T helper cells.

This study was approved by Baskent University Institutional Review Board and Ethics Committee (Project no: KA22/309) and supported by Baskent University Research Fund.

ÖNSÖZ

Endoplazmik retikulum (ER), merkezi stres algılama platformudur, protein ve lipid sentezi, hücresel metabolizma dahil olmak üzere çeşitli biyolojik hayati işlemlerin düzenlenmesinden sorumludur. Hücrelerde ER stresinden korunmak için, katlanmamış protein yanıtı (unfolded protein response; UPR) adı verilen, strese duyarlı sinyal yolu gelişmiştir. Katlanmamış protein yanıtı çevresel, genetik ve diğer etkenlerden korunmak için hücresel fizyolojiyi uyarma işlevi görür. Kronik ER stresinin hafiflenmesinde yetersiz kaldığında, hücre ölümünü indüklemek için apoptotik sinyalleme destekler. Patolojik etkilere yanıt olarak hücre fizyolojisinin düzenlenmesindeki rolü nedeniyle UPR, hücresel metabolizma ve gelişim dahil olmak üzere çeşitli biyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynar. Bağışıklık hücrelerinde UPR'in orijinal kapsamının çok ötesinde işlevler gördüğü belirlenmiştir. Bağışıklık sistemi, organizmayı çeşitli zararlı etkenlerden (örneğin virüs, bakteri, kanser hücreleri vs.) etkili şekilde korumak için gelişmiştir. Çeşitli etkenlerden korunma, doğal ve edinilen bağışıklık sisteminin farklı hücreleri tarafından koordineli yanıtlarını gerektirir. Bağışıklık hücrelerin gelişimi, gelişimden sonra matürasyonu ve efektör hücre aşamasında işlevleri çok sayıda moleküllerin ekspresyonu ve salgısal faktörlerin etkisiyle meydana gelir. Bu süreçleri kolaylaştırmak için iyi gelişmiş ve doğru yapılandırılmış ER'in olması önemlidir.

Tez çalışmasında, endoplazmik retikulum stresinin, immün yanıtta ve immün regülasyonda rol oynayan foliküler B ve T hücrelerde etkisinin araştırılması planlanmıştır. İnsan dalağına özel immün hücreler üzerinde kısıtlı sayıda yapılan çalışmalar dikkate alınmıştır ve bu nedenle tez çalışması ikincil lenfoid organ olan dalak B ve T hücrelerinde ER stresinin nasıl bir rol oynadığını araştırması üzerine hedeflenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
RESİMLER LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiii
1.BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ.....	1
2. LENFOİD ORGANLAR.....	2
2.1. Birincil Lenfoid Organlar.....	2
2.2. İkincil Lenfoid Organlar.....	2
2.2.1.Lenfatik sistem.....	3
2.3. Lenf Düğümleri.....	3
2.4. Dalak.....	4
2.5. Dokular Arası ve İkincil Lenfoid Organlarda Hücre Göçünün Moleküler Düzenlenmesi.....	5
2.6. Lenfositlerin Antijen Arayışı.....	6
3. T HÜCRELER.....	7
3.1.CD4+ T Hücrelerin Aktivasyonu.....	8
3.2.T Foliküler Yardımcı Hücreler.....	9
3.2.1.T foliküler düzenleyici hücreler.....	9
3.2.2.Humoral yanıtların Tfr hücre aracılı regülasyon mekanizmaları.....	10
4. B LENFOSİTLER.....	11
4.1.Foliküler B Lenfositlerin Aktivasyon Yolu.....	13
5.GERMİNAL MERKEZLER.....	15
6.İTERLÖKİN-2 (IL-2).....	18
7.ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ.....	19
8.MHC SINIF-II MOLEKÜLÜ.....	21
9.HÜCRE İÇİ KALSİYUM HOMEOSTAZI.....	22

10.ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ İNDÜKLEYİCİLERİ.....	24
11.HÜCRE YÜZEY BELİRTEÇLERİ.....	25
11.1.Lökosit Ortak Antijeni; CD45.....	25
11.2. Yüzey Farklılaşma Antijeni 19;CD19.....	25
11.3.İnsan Lökosit Antijeni-DR; HLA-DR.....	25
11.4.Yüzey Farklılaşma Antijeni 40;CD40.....	26
11.5.İmmünglobülinM; IgM.....	26
11.6.Yüzey Farklılaşma Antijeni 21;CD21.....	26
11.7.Yüzey Farklılaşma Antijeni 3; CD3.....	27
11.8.Yüzey Farklılaşma Antijeni 4; CD4.....	27
11.9. Yüzey Farklılaşma Antijeni 185; CD185.....	27
11.10. Yüzey Farklılaşma Antijeni 278; CD278.....	27
11.11. Yüzey Farklılaşma Antijeni 279; CD279.....	27
12.HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	29
12.1.Birincil Hücre Kültürü.....	29
12.2.İkincil Hücre Kültürü.....	30
12.3.Hücrelerin Dokulardan İzolasyonu ve Kültürlenmesi.....	30
12.4.Hücrelerin Dokulardan Genel Yöntemlerle İzole Edilmesi.....	31
12.5.Hücrelerin Dondurulması.....	32
12.6.Hücrelerin Çözülmesi.....	33
12.7.Hücre Kültürü için Besiyeri Hazırlanması.....	34
13.AKIM SİTOMETRİ YÖNTEMİ.....	36
14.TEZ ÇALIŞMASININ AMAÇLARI VE HİPOTEZİ.....	37
15.MATERYAL VE METOD.....	38
15.1.Dalak Örneğinden Lenfosit İzolasyonu.....	38
15.2.Manyetik Boncuk Yöntemiyle T ve B Hücre İzolasyonu.....	39
15.3.Akimsitometri Yöntemi.....	41
15.4.İzole Edilen Lenfositlerin Dondurulması.....	42
15.5. Ko-Kültür Aşaması.....	42
15.6. 3/12/24. Saat Akimsitometri Çalışması.....	44
16. SONUÇLAR.....	45
16.1.Örnek 1 ve Örnek 2'ye Ait B Hücre Yüzeyindeki HLA-DR ve CD40 Ekspresyonu.....	45

16.2.Örnek 1 ve Örnek 2'ye Ait B Hücre Yüzeyindeki HLA-DR ve IGM Ekspresyonu.....	48
16.3.Örnek 1 ve Örnek 2'ye Ait B Hücre Yüzeyindeki HLA-DR ve CD21 Ekspresyonu.....	50
16.4.Örnek 1 ve Örnek 2'ye Ait T Hücre Yüzeyindeki CXCR5 ve ICOS Ekspresyonu.....	52
16.4.Örnek 1 ve Örnek 2'ye Ait T Hücre Yüzeyindeki CXCR5 ve PD-1 Ekspresyonu.....	55
17.TARTIŞMA.....	57
KAYNAKLAR.....	59



TABLolar LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 15.1. Hücre ko-kültür tablosu.....	43
Tablo 15.2. Monoklonal antikorların kullanım tablosu.....	44
Tablo 16.1. Örnek 1'e ait B hücre yüzeyindeki HLA-DR ve CD40 ekspresyonu.....	45
Tablo 16.2. Örnek 2'ye ait B hücre yüzeyindeki HLA-DR ve CD40 ekspresyonu.....	46
Tablo 16.3. Örnek 1'e ait B hücre yüzeyindeki HLA-DR ve IgM ekspresyonu.....	48
Tablo 16.4. Örnek 2'ye ait B hücre yüzeyindeki HLA-DR ve IgM ekspresyonu.....	49
Tablo 16.5. Örnek 1'e ait B hücre yüzeyindeki HLA-DR ve CD21 ekspresyonu.....	50
Tablo 16.6. Örnek 2'ye ait B hücre yüzeyindeki HLA-DR ve CD21 ekspresyonu.....	51
Tablo 16.7. Örnek 1'e ait T hücre yüzeyindeki CXCR5 ve ICOS ekspresyonu.....	52
Tablo 16.8. Örnek 2'ye ait T hücre yüzeyindeki CXCR5 ve ICOS ekspresyonu.....	53
Tablo 16.9. Örnek 1'e ait T hücre yüzeyindeki CXCR5 ve PD-1 ekspresyonu.....	55
Tablo 16.10. Örnek 2'ye ait T hücre yüzeyindeki CXCR5 ve PD-1 ekspresyonu.....	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Lenf nodu.....	4
Şekil 2.2. Dalak.....	5
Şekil 3.1. T lenfositlerin farklılaşması.....	8
Şekil 4.1. B hücre aktivasyonu.....	13
Şekil 4.2. B hücre farklılaşması.....	14
Şekil 5.1. Germinal merkezlerin oluşumu.....	17
Şekil 7.1. Katlanmamış protein yanıtı.....	20
Şekil 8.1. MHC sınıf -II molekülünün endoplazmik retikulumda sentezi.....	21
Şekil 9.1. B lenfositlerde hücre içi Ca^{+} homeostazının mekanizması.....	22

RESİMLER LİSTESİ

	Sayfa
Resim 15.1. Dalak örneğinin parçalanması.....	38
Resim 15.2. B lenfositlerin manyetik izolasyonu.....	39
Resim 15.3. T lenfositlerin manyetik izolasyonu.....	40
Resim 15.4. T hücre akımsitometri görüntüsü.....	40
Resim 15.5. B hücre akımsitometri görüntüsü.....	40
Resim 15.6. Tapsigargin muamelesi öncesi HLA-DR ekspresyonu.....	41
Resim 15.7. Tapsigargin muamelesi sonrası HLA-DR ekspresyonu.....	42
Resim 15.8. Hücre kültür inkübasyonu.....	43
Resim 15.9. Hücrelerin ko-kültürden sonra toplanması.....	43
Resim 16.1. Örnek 1'e ait B hücrelerde HLA-DR ve CD40 ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü.....	45
Resim 16.2. Örnek 2'ye ait B hücrelerde HLA-DR ve CD40 ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü.....	46
Resim 16.3. Örnek 1'e ait B hücrelerde HLA-DR ve IGM ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü.....	48
Resim 16.4. Örnek 2'ye ait B hücrelerde HLA-DR ve IGM ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü.....	49
Resim 16.5. Örnek 1'e ait B hücrelerde HLA-DR ve CD21 ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü.....	50
Resim 16.6. Örnek 2'ye ait B hücrelerde HLA-DR ve CD21 ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü.....	51
Resim 16.7. Örnek 1'e ait T hücrelerde CXCR5 ve ICOS ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü.....	52
Resim 16.8. Örnek 2'ye ait T hücrelerde CXCR5 ve ICOS ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü.....	53
Resim 16.9. Örnek 1'e ait T hücrelerde CXCR5 ve PD-1 ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü.....	55
Resim 16.10. Örnek 2'ye ait T hücrelerde CXCR5 ve PD-1 ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Ag	antijen
BCR	B hücre antijen reseptörü (B cell antigen receptor)
TCR	T hücre reseptörü (T cell receptor)
SLO	ikincil (sekonder) lenfoid organlar
LD	lenf düğümleri
LS	lenfatik sistem
DH	dendritik hücre
FDH	foliküler dendritik hücre
HEV	yüksek endotelyal venül (high endothelial venules)
PALS	periarteriyel lenfoid kılıf
PFZ	perifoliküler bölge (perifollicular zone)
APC	antijen sunumu yapan hücre (antigen presenting cell)
MHC	majör histokompatibilite kompleksi (major histocompatibility complex)
CD	yüzey farklılaşma antijenleri (cluster of differentiation)
Th	T yardımcı hücre (T helper)
Tfh	T foliküler yardımcı hücre (T follicular helper)
Treg	T düzenleyici hücreler (T regulatory cells)
BCL6	B hücreli lenfoma 6 (B-cell lymphoma 6)
GC	germinal merkez (germinal center)
TGF β	transforme edici büyüme faktör-beta (transforming growth factor beta)
IL	interlökin
CXCR5	CXC kemokin reseptörü tip 5 (C-X-C motif chemokine receptor)
Ascl2	achaete-scute homolog 2
ICOS	indüklenebilir ko-stimülatör (inducible co-stimulator)
PD-1	programlı hücre ölümü-1(programmed death-1)
BATF	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like
CCR7	CC kemokin reseptörü 7 (CC-chemokine receptor 7)
SHM	somatik hipermutasyon
CSR	sınıf değiştirme rekombinasyonu (class switching recombination)
LZ	parlak boyanan bölge (light zone)
DZ	koyu boyanan bölge (dark zone)

1.BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ

Organizma enfeksiyon etkenlerinden, onların toksinlerinden ve sebep oldukları hasarlardan, bağışıklık sistemini oluşturan çeşitli efektör hücre ve moleküller sayesinde korunur. Bağışıklıkta birbiriyle ilişkili iki tepki sistemi vardır: Doğal ve edinsel (kazanılmış). Bu iki sistem, vücudu yabancı istilacılara karşı korumak için birlikte çalışır. Doğal bağışıklık, evrimsel olarak ilkindir. Enfeksiyonu önlemeyi veya yaygın istilacıları hızlı bir şekilde ortadan kaldırmayı amaçlayan moleküler ve hücrel mekanizmaları içerir. Doğal bağışıklık sistemi enfeksiyona karşı fiziksel ve kimyasal engelleri ve birçok patojenin ortak kimyasal yapılarını tanıyan reseptörleri içerir. Bunlar ebeveynlerden yeni nesillere aktarılır, hızlı ve genel bir tepki oluştururlar. Sonuç olarak patojen hızla tanınır, bazıları bariyerin bozulmasından birkaç saniye sonra ortaya çıkar ve yok edilmesi için çalışılır. Bu son derece etkili ilk savunma hattını oluşumunu sağlar ve çoğu patojenin girişini önler [1, 2]. Doğal bağışıklık sisteminin tanıma unsurları hızlıdır, ancak çok spesifik değildirler. Bu nedenle yabancı antijenlerdeki küçük farklılıkları ayırt edemezler. Antijen (Ag), bağışıklık sisteminin kendisine karşı spesifik bir yanıt oluşturan ve oluşan spesifik ürünle (antikor) birleşme özelliğindeki maddeye denilir. Edinsel bağışıklık sistemi B ve T lenfositlerine dayanır ve işlevsel hale gelmesi daha uzun sürer. Edinsel bağışıklık antijene çok daha spesifiktir ve zaman sürecinde gelişir. Enfeksiyona yanıt olarak, istilacı belirli patojeni daha iyi tanımak, ortadan kaldırmak ve hatırlamak için uyum sağlaması gerektiğinden bir adaptasyon sürecinden geçer, bu nedenle bu tepkiye adaptif bağışıklık da denir. Hem doğal hem de edinilen bağışıklık tepkileri bağışıklık sisteminin hücrelerinin aktivitesine bağlıdır. [3-5].

2.LENFOİD ORGANLAR

Dolaşım, solunum ve boşaltım gibi vücudun belirli sistemleri olan diğer önemli sistemlerden farklı olarak bağışıklık sistemi, tüm vücuda stratejik olarak dağılmış yapısal ve işlevsel olarak çeşitli organlara ve dokulara sahiptir. Kan damarları ve lenfatik damarlar bağışıklık sistemi içinde yer alan organlar ve dokular arasındaki bağlantıları destekler. Organlar birincil ve ikincil lenfoid organlar olarak sınıflandırılır.

2.1. Birincil Lenfoid Organlar

Doğumdan sonra tüm bağışıklık hücrelerinin üretimi (hematopoezis) için en önemli anahtar doku kemik iliği görülmektedir. Bağışıklık hücrelerinin çoğu, kan veya lenfatik sistemde dolaşıma girmeden önce kemik iliğinde oluşur ve bazıları kemik iliğinde olgunlaşır. Ancak pro-T hücreleri gelişip olgunlaşmak amacıyla kemik iliğinden timusa göç ederler. Birincil lenfoid organlar olan kemik iliği ve timus, B ve T hücrelerin ilk defa antijen reseptörlerini, B hücre antijen reseptörü (BCR-B cell antigen receptor) ve T hücre reseptörlerinin (TCR-T-cell receptor) eksprese ettiği ve sonuç olarak fenotipik ve fonksiyonel olgunluk elde ettiği bölgelerdir. Bu bölgeler, B ve T hücrelerinin olgunlaşması için gerekli büyüme faktörlerini ve diğer sinyalleri sağlar [6, 7]. Bu bölgelerde konakçı organizmanın kendi (self) antijenleri B ve T lenfositlere sunulur ve antijenleri yüksek afiniteyle tanımayan hücrelerin olgunlaşıp periferik dolaşıma çıkmama imkanı verilir. Organizma tarafından gereksiz enerji kaybını önlemek amacıyla yalnızca gerekli hücrelerin yaşamına devam etmesi sağlanırken diğerleri programlanmış hücre ölüm yoluyla apoptozla elimine edilir.

2.2. İkincil Lenfoid Organlar

Kemik iliğinde ve timusda gelişen ve farklılaşan olgun T ve B hücreler kan ve lenf sistemi yardımıyla ikincil lenfoid organlara (SLO) yani dalağa, lenf düğümlerine (LD) ve ayrıca vücudun her yerinde bulunan epitel dokulara göç ederler. İşlevsel olarak aktif olmayıp “sakinler” ve henüz herhangi bir yabancı spesifik antijenle temas halinde olmadıkları için immünolojik olarak deneyimsiz “naif” olarak adlandırılırlar [8]. İkincil lenfoid organlar lenfositlerin aktivasyon bölgeleridir, B ve T hücrelerinin antijenlerle etkileşimi için uygun bir ortam sağlamaktadırlar. İkincil lenfoid organlara lenf düğümleri ve dalakla beraber, apendiks, bağırsaktaki Peyer yamaları, faringeal nazofaringeal

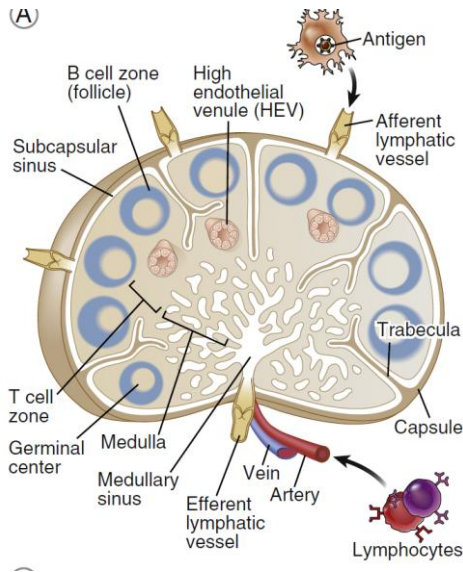
bademcikler, ve mukozal ilişkili lenfoid dokular da dahildir. Lenfositler bu organlara göç ederler ve antijenlerle mümkün olabilecek teması beklerler veya diğer ikincil lenfoid organlara giderler [9].

2.2.1. Lenfatik sistem

Lenfatik sistem (LS) lenfatik damarlar ve lenf düğümleri açısından oluşur. Lenfatik damarlar berrak lenf sıvısını taşıyan kanallardır. Lenf kılcal damarları ile dokulardan interstisyel sıvıyı alır. Lenf damarları topladığı interstisyel sıvıyı daha büyük toplama kanalları olan sağ ve sol torasik lenfatik kanallara taşır. Buradan sıvı kan dolaşımına geri döner. Lenfatik sistem antijen sunan dendritik hücrelerin (DH) enfekte dokulardan LD'ine geçmesini, B ve T hücrelerine ulaşmasını sağlar.

2.3. Lenf Düğümleri

Lenf düğümleri periferik lenfatik sistemden antijenleri toplayan kapsüllenmiş SLO'dır. Lenf düğümleri lenfatik sistemi kan dolaşım sistemine bağlar ve lenfin ve içinde bulunan lenfositlerin afferent lenf damarı yoluyla bir sistemden diğerine "atladığı" bölgelerdir. İnsanlarda yaklaşık 500 lenf nodu bulunur. Lenf düğümleri bacakların ve kolların proksimal uçlarında ve boyun bölgesinde kümelenir. Lenf düğümleri korteks, parakorteks ve medulla olarak üç bölgeye ayrılır. Bu bölgelerin her biri ayrı bir mikro ortamı destekler (Şekil 2.1). Bir lenf düğümünün yapısal olarak en iç kısmı medulla olarak adlandırılır. Efferent lenf damarının, arterlerin ve venlerin düğüme bağlandığı hilum olarak bilinen alt kısım hariç medulla her taraftan korteks ile çevrilidir. En dıştaki tabaka kortekstir ve foliküllerde lenfositleri, çoğunlukla B hücreleri, foliküler dendritik hücreleri (FDH) ve makrofajları içerir. Medulla ile korteks arasında bulunan bölgeye parakorteks ismi verilmiştir [10, 11]. Parakorteks, lenf düğümlerinin timusa bağımlı bir bölgesidir ve T hücreleri açısından zengindir. Parakorteks T lenfositlerle beraber çevre dokulardan lenf düğümüne göç eden DH'leri de içerir. Makrofajlar esas olarak parakorteks ve medullada bulunur. Retiküler hücrelerin oluşturduğu retiküler lifler, lenf düğümünün stromasının bir parçasını oluşturur. Lenfoid foliküller kortekste bulunur ve lenf düğümünün B hücresinden zengin bölgeleridir.

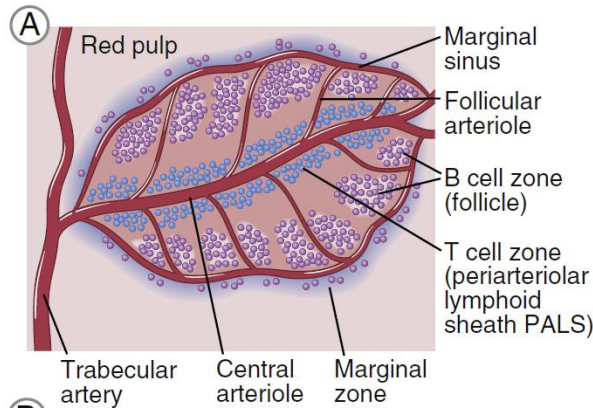


Şekil 2.1. Lenf nodu (Cellular and Molecular Immunology 2021)

2.4. Dalak

Dalak, vücudun sol üst karın bölgesinde, diyaframın altında yer alan, enfeksiyon durumunda büyüyeabilen yüksek vaskularize yapıli ikincil lenfoid organdır. Dalağın lenfatik sistemle doğrudan bağlantısı yoktur. Dalak yüksek endotelial venüller (HEV) içermez. Dalak kan dolaşımından antijeni toplar ve kan yoluyla bulaşan patojenlere karşı bağışıklık tepkilerinde rol oynar. Lenfositlerin dalağa girişi ve çıkışı kan damarları yoluyla gerçekleşir. Kan filtresi görevi görür, kan yoluyla bulaşan patojenleri ve partikül maddeleri yakalar, hasar görmüş veya yaşlanmış kan hücrelerini, örneğin eritrositleri ve trombositleri dolaşımdan uzaklaştırır [12,13]. Dalak, yoğun bağ dokusundan oluşan bir kapsül ile çevrilidir. Dalak kapsülden dalağın parankimine doğru uzanan ve dallanan trabekülleri içerir. Parankimal bölgeye pulpa adı verilir. Pulpa kırmızı ve beyaz pulpaya ayrılmıştır (Şekil 2.2.). Dalağın büyük kısmı, kırmızı kan hücrelerinin atıldığı yer olan kırmızı pulpadan oluşur. Kırmızı pulpa, ince duvarlı kan damarları dalak sinüzoidlerini, Billroth'un dalak kordonlarını, retiküler bağ dokusunu ve venöz sinüsleri içerir. Kırmızı pulpa, yukarıda belirtildiği gibi, yaşlanmış kan hücrelerini uzaklaştırarak, ilave kan akışını sağlayarak ve hemoglobini metabolize ederek kanın saflaştırılmasında önemli bir rol oynar. Beyaz pulpa, merkezi arterleri (merkezi arteriyoller) çevreleyen kırmızı pulpa içerisinde, lenfoid doku ve T hücresinden zengin bir alan olan periarteriyel lenfoid kılıftan (PALS) oluşan yuvarlak beyazımsı alanlar oluşturur. Beyaz pulpa, B hücreleri açısından zengin lenfoid foliküllerden oluşur. Kırmızı ve beyaz pulpa arasındaki sınır, marjinal bölge olarak

bilinir ve mantle içerir. Marjinal bölge folikülü çevreleyen bir alandır. Burada az sayıda T lenfositler ve çok sayıda makrofajlar bulunmaktadır. Aynı zamanda burada sirkülasyon yapmayan, marjinal alan B hücrelerini içeren B hücre popülasyonu vardır. Bu B hücrelerin görevi, bakteriyel kapsüler polisakkaritlere düşük afiniteye sahip antikorları hızla üretmedir. Bu antikorlar, adaptif immün yanıt tamamen aktive edilmeden önce korumayı sağlar. Beyaz pulpa, B hücresi aracılı yanıtlar, antikor sentezi, antikor kaplı mikropların uzaklaştırılması, properdin üretimi ve monosit depolanması dahil olmak üzere bağışıklık süreçleri için hayati öneme sahiptir. Dalaktaki marjinal bölgelerdeki olgunlaşmamış DH'ler, antijeni aldıktan ve aktive olduktan sonra T hücresi bölgelerine göç eder. Burada taşıdıkları antijenleri T hücrelerine sunabilirler. İnsan ve fare dalaklarının yapıları arasında temel farklılıklar insan dalağının ağırlıklı olarak kırmızı pulpadan oluşmasıdır ve tüm PALS'ı folikül ve marjinal bölgeleri çevreleyen, farelerde görülmeyen perifoliküler bölgenin (PFZ-perifollicular zone) olmasıdır [14, 15].



Şekil 2.2. Dalak (Cellular and Molecular Immunology 2021)

2.5. Dokular Arası ve İkincil Lenfoid Organlarda Hücre Göçünün Moleküler Düzenlenmesi

Dalakta ve lenf nodunda çok sayıda kemoatraktanlar salgılanır ve onlar kemokin reseptörlerini kullanarak lenf nodu boyunca doğrudan B hücresi ve T hücre göçünü yönlendirir. Lenfoid doku organizasyonu, bu kemoatraktanlar homeostatik veya lenfoid kemokinler olarak adlandırılan kemokinler tarafından desteklenir. Bunlar arasında B lenfosit atraktanı, CXCR5'in ligandı olan CXCL13, CCR7 için ligandları CCL19 (EBV kaynaklı molekül 1 ligand kemokin) ve CCL21 ve diğerleri bulunmaktadır. CXCL13, B hücresi foliküllerinde stromal hücreler ve FDC tarafından salgılanır. CCL19 ve CCL21'in

her ikisi de yapısal olarak lenfoid T bölgeleri içindeki stromal hücreler tarafından eksprese edilir ve CCL21 HEV'ler ve daha düşük seviyelerde lenfatik endotel tarafından eksprese edilir. Stromal hücrelere ek olarak, DC'lerde CCL19 ekspresyon yapar. Lenf düğümleri ve dalaktaki T hücresi bölgelerindeki stromal hücreler esas olarak CCL19'u eksprese eder. CCL21 ise esas olarak lenf düğümlerindeki HEV'ler ve çeşitli organlardaki lenfoid dokuların endotelial hücreleri tarafından eksprese edilir [16, 17]. Lenfositlerin lenf düğümlerine ve mukozal lenfoid dokulara girişi, HEV'ler yoluyla gerçekleşir. Ancak yukarıda da belirttiğimiz gibi, dalakta HEV'ler olmadığı için, T ve B lenfositlerin dalağa girişi beyaz pulpaya giriş yolağı antijenin yolağıyla aynıdır ve HEV'ler yerine marjinal sinüs yoluyla gerçekleşir. Dalakta PALS'da T lenfositlerin, foliküllerde ve marjinal bölgelerde ise B hücrelerin onlara özel bu bölgelere yerleşimi, lenf nodlarında da olduğu gibi, yukarıda belirttiğimiz gibi, bu organlarda bulunan farklı alanlardaki stromal hücreler tarafından çeşitli sitokinlerin ve kemokinlerin üretilmesine bağlı düzenlenmiş bir süreçtir. CXCL13 kemokini ve B hücrelerin ve Tfh hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen onun reseptörü CXCR5, B hücrelerinin ve Tfh hücrelerin foliküllere doğru göçü için gereklidir ve CCL19, CCL21 kemokinler ve bunların reseptörü CCR7, naif T hücrelerinin PALS'lara göçünden sorumludurlar [18].

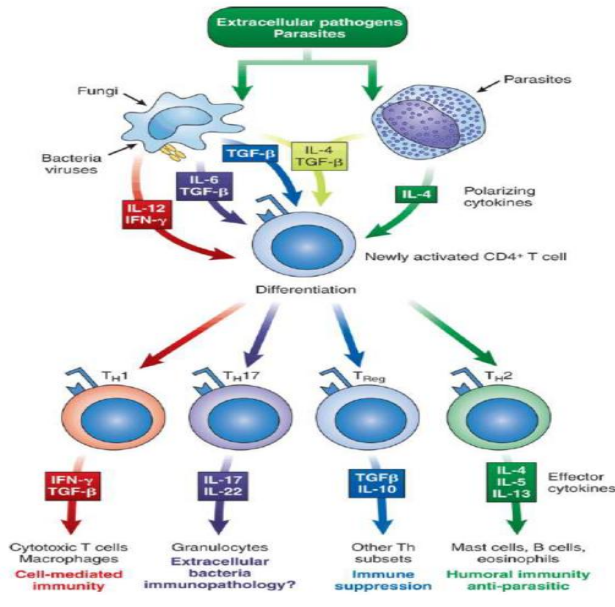
2.6. Lenfositlerin Antijen Arayışı

Olgun naif T hücreleri ve B hücreleri antijeni kendi nişlerinde ararlar. Bu naif B ve T hücreler yolculukları sırasında antijenle karşılaşp tanımazlarsa, onların ikincil lenfoid dokulardan ayrılmalarını sağlayan ve yüzeylerinde eksprese edilen diğer kemokin reseptörü sfingozin 1-fosfat reseptörü (S1P), S1PR1 aktive edilir. Lenf düğümünü terk ettikten sonra lenfositler kan dolaşımına geçerler ve diğer lenf düğümlerine geçerek, antijeni aramaya devam ederler. T ve B hücrelerin dalaktan çıkış yollarının ayrıntıları hala araştırılmaktadır.

3.T HÜCRELER

T hücresi aracılı bağışıklık, bakteriyel, viral veya paraziter enfeksiyonları veya kanser hücreleri yok etmek için antijen spesifik T lenfositlerin gelişimiyle başlayan bir süreçtir. T hücresi aracılı bağışıklık, otoimmün inflamatuvar hastalıklara yol açan kendi antijenlerin anormal tanınmasını da içerebilir. Her T lenfosit, timusta olgunlaşma üzerine gelişimsel seleksiyon sonucu, yüzeyinde özgün TCR eksprese eder. Ag özgüllüğü, antijen sunumu yapan hücreler (APC) üzerindeki büyük doku uygunluk kompleksi (majör histokompatibilite kompleksi; MHC) molekülleri tarafından sunulan özgün antijenik peptitlerin TCR aracılığıyla tanınmasına dayanır. Naif T hücreleri henüz yabancı Ag ile karşılaşmamış ve henüz aktive edilmemiş hücrelerdir. T hücrelerinin fonksiyonel statüsü, hücrelerin naif, efektör ve bellek hücreleri olarak ayırt etmemizi sağlar. Bunların her biri fenotip, fonksiyon ve anatomik dağılım açısından geniş çeşitlilik gösterir. Naif T hücreleri, CD4+ ve CD8+ alt kümelerinin en homojen temsilcileridir. Ancak, aktivasyonları üzerine onlar sitokin profilleri ile daha da çok alt kümelere ayrılabilirler. CD4+ T hücreleri, işlevsel olarak farklı birkaç alt kümeye ayrılır [19]. Naif CD4+ T hücreleri, farklı bağışıklık fonksiyonlarını düzenleyen çeşitli yardımcı veya düzenleyici T efektör hücrelerine farklılaşabilir. Yardımcı T hücrelerin ana alt kümeleri, T yardımcı 1 (Th1), Th2, Th17, T foliküler yardımcı (Tfh) ve düzenleyici T (Treg) hücreleridir (Şekil 3.1). Th1, Th2 ve Th17 alt kümeleri, farklı patojen sınıfları tarafından ortaya çıkar ve salgıladıkları farklı sitokin kombinasyonlarına bağlı olarak tanımlanır. Tfh farklılaşması, büyük ölçüde Tfh hücresi ile Tfh olmayan diğer efektör hücre, örneğin Th1, Th2 veya Th17 hücresi olmak arasında bir seçim yaparlar. Tfh hücreleri, B hücreli lenfoma 6 (BCL6; B-cell lymphoma 6) transkripsiyon faktörünü gerektiren, B hücre foliküllerinde ve germinal merkezlerde (GC) lokalize olan CD4+ T hücrelerinin bir alt kümesidir [20]. Foliküler yardımcı T hücreler germinal merkezlerin oluşumundan sorumludur. Böylece, Tfh'ler, GC'de B hücrelerinin afinite olgunlaşmasını, yani yüksek afiniteli antikör üreten plazma hücrelerinin farklılaşmasını ve bellek B hücrelerinin üretimi gibi B hücresi tepkilerini uyarımı gibi özel fonksiyonları gerçekleştiren yardımcı CD4+ T hücrelerinin bir alt kümesidir. T foliküler yardımcı hücre gelişimi aşamalı bir süreçte gerçekleşir. Tfh farklılaşması genellikle naif bir CD4+ T hücresinin DH gibi bir miyeloid profesyonel antijen sunan hücre ile etkileşimi ile başlar. Farklılaşmanın yardımcı T hücre gelişimi öncesi (pre-Th) olarak adlandırılan bu ilk aşamasında, CD4+ T hücreleri transforme edici büyüme faktör-beta (TGFβ-Transforming

growth factor beta), interlökin-12 (IL-12), interlökin-23 (IL-23) sitokinlerin varlığında DH'lerle MHC / antijen etkileşimine girer. Bu olay transkripsiyonel ve hücreyel değişikliklerin erken kaskadını oluşturur. Kemokin reseptör 5 (CXCR5) ifadesi artar, Tfh yolağının anahtar genleri olan Bcl6, Achaete-scute homolog 2 (Ascl2), indüklenebilir ko-stimülatör (ICOS; inducible co-stimulator), Programlı hücre ölümü-1 (PD-1; Programmed death-1), Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like (BATF) genlerinin ekspresyonu artar, CC kemokin reseptör 7'nin (CCR7; CC-chemokine receptor 7) ifadesi ise azalır. Bu değişiklikler, Tfh öncesi hücreleri, T:B hücre sınırına yönlendirir. Burada, B hücreleri ile etkileşim üzerine, B hücrelerinden alınan uygun sinyaller Tfh ile ilişkili gen ekspresyon paterninde (BCL6, PD-1, ICOS ve CXCR5) artışı daha fazla tetikler diğer transkripsiyon faktörleriyle işbirliği içinde germinal merkezlerdeki Tfh hücrelerinin son farklılaşma durumunu belirler [21].



Şekil 3.1. T lenfositlerin farklılaşması (Clinical immunology and serology: a laboratory perspective 2021)

3.1. CD4+ T Hücrelerin Aktivasyonu

T hücresi aktivasyonu, T hücresini hızlı klonal genişleme ve farklılaşmaya hazırlayan metabolik değişiklikleri indükler. Naif CD4+ T hücrelerin aktivasyonu DC'ler tarafından sunulan antijenle aktive edilir. Naif T hücrelerinin aktivasyonu, en az üç sinyale bağlıdır. Birinci sinyal, T hücresi reseptörü (TCR) tarafından, aktive edilmiş dendritik hücrelerin yüzeyinde eksprese eden, antijenik özellikteki peptidyle yüklü MHC kompleksini

tanınmasıyla oluşur. İkinci sinyal, aynı DC tarafından sunulan eş uyaran (co-stimulator) moleküllerin tanınmasından alınır; DC üzerinde antijenin TCR tarafından tanınmasından sonraki ilk dakikalardan saatlere kadar, TCR ve CD28'den gelen sinyaller, NFAT, AP-1 ve NFκB gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Bu transkripsiyon faktörleri, transkripsiyonunu indüklediği genlerin ürünleri aktive olan T hücresinin efektör T hücresine farklılaşması ve çoğalması için (örneğin, IL-2 ve IL-2Ra) gereklidir [22].

3.2.T Foliküler Yardımcı Hücreler

T foliküler yardımcı (Tfh) hücreler ayrı bir yardımcı T hücresi alt kümesi olarak bilinmektedir. T hücreleri, germinal merkezlerin (GC) oluşumu için gereklidir ve B hücrelerinin afinite olgunlaşması için gereken sinyalleri sağlar. Tfh yüzeylerinde ifade edilen CD4, CXCR5, ICOS ve PD1 Tfh yüzey belirteçleridir. Aktive edilmiş T hücrelerini Tfh'e doğru polarize eden sitokinler, her ikisi de çeşitli aktive edilmiş antijen sunan hücreler tarafından üretilen IL-6 ve IL-21'i içerir. Bu sitokinler TCR ve eş uyaran moleküller tarafından üretilen sinyallerle birlikte, Bcl-6'nın ekspresyonunu indükler. Bcl-6 T hücrelerinin ana transkripsiyonel düzenleyicisi olan bir baskılayıcıdır. Bcl-6, T-Bet, GATA-3 ve RORγt ekspresyonunu baskılar, dolayısıyla, Th1, Th2, ve Th17 farklılaşmasını sırasıyla baskılar, ama aynı zamanda Tfh polarizasyonunu indükler. Tfh hücreleri, B hücresi farklılaşmasına katkıda bulunan IL-21 salgılanmaları ile karakterize edilir [23, 24]. Ayrıca, Tfh'ler aynı kökenli B hücresi yardımı için gerekli olan yüksek düzeyde CD40L ifade ederler. Tfh hücreleri başka T yardımcı hücrelerden farklı olarak özel CXCR5 reseptörü ekspresyon ederler. Bu reseptörler onları B hücresi folikül bölgelerinde bulunan CXCL13 kemokinlere çeker ve ileride germinal merkezlerin kurulmasına yardımcı olmasını sağlar. Sonuç olarak, naif T hücreleri aktive edildiğinde, bazıları çoğalır, efektör hücrelere farklılaşır, farklılaşma sonucu kemokin reseptörleri ekspresyon yaparlar ki, bu reseptörler onları lenfoid dokudan çıkarır. Bununla birlikte, bu hücrelerin bir kısmı Tfh hücrelere farklılaşır ve Tfh'ler özel CXCR5 reseptörlerini yukarı yönde regüle ederler ve B hücrelerin bulunduğu foliküllere göç ederler [25, 26].

3.2.1.T foliküler düzenleyici hücreler

T foliküler düzenleyici hücreler (Tfr), T regülatör (Treg) hücre popülasyonudur. T regülatör hücrelerden farklı olarak B hücresi folikülüne ve germinal merkeze (GC) göç edilebilir bir düzenleyicidir. Tfr hücreleri, GC yanıtını doğrudan Tfh proliferasyonunu, B

hücre metabolizmasını, Tfh tarafından salgılanan sitokinler ikincil lenfoid organlarda modüle ederek düzenler. Böylece, Tfr hücreleri GC sonuçlarını çeşitli seviyelerde GC boyutunun kontrolü, antijene özgü Tfh ve B hücre klonlarının seçimi, sınıf geçişinin modülasyonu ve antikorların afinite olgunlaşması şeklinde değiştirebilirler.

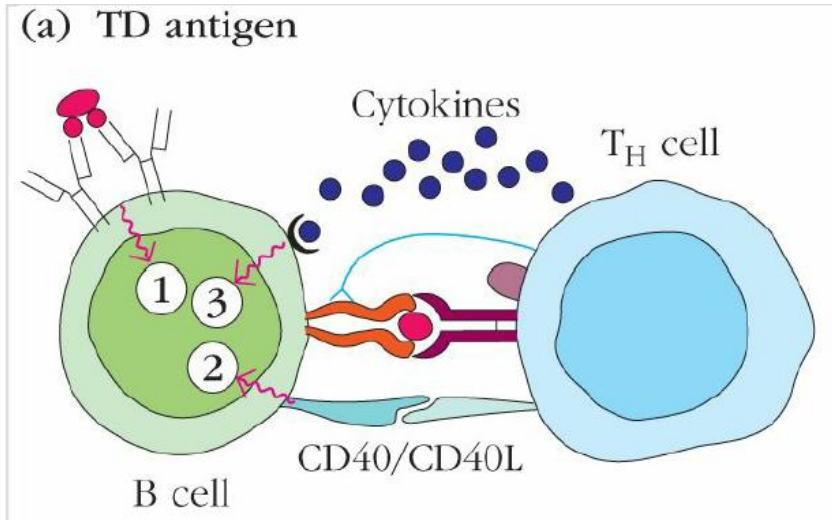
3.2.2. Humoral yanıtların Tfr hücre aracılı regülasyon mekanizmaları

T foliküler düzenleyici (Tfr) hücreleri, GC B hücreleri ve T foliküler yardımcı hücreleri (Tfh) arasındaki hayatta kalma geri besleme döngüsü için gerekli olan immünolojik sinapsta fiziksel girişim yoluyla germinal merkez (GC) içindeki T-B etkileşimlerini düzenler. GC Tfr hücreleri, sitotoksik T lenfosit antijeni 4'ün (CTLA-4) GC B hücreleri üzerindeki ortak eş uyaran ko-stimulatör moleküllere bağlanarak Tfh-B hücre tanınmasını bozar ve dolayısıyla GC yanıtını da önleyebilir. Tfr, CTLA-4, CD80 / CD86 eş uyaran bağlanmasını doğrudan bloke edebilir. Bu mekanizmaları kullanarak, Tfr hücreleri GC B hücresi metabolizmasını, esas olarak glikoz alımını ve kullanımını azaltarak bozar. Tfr B hücresi efektör molekülünün aşağı regülasyonunu indükler, örneğin GC B hücresi oluşumu için gerekli "POU class 2 homeobox associating factor 1 (POU2AF1)", antikor salgılanması için önemli "X-box binding protein 1 (XBP1)" ve sınıf değişimi rekombinasyonu için gerekli "Activation-induced cytidine deaminase (AID)". İmmünolojik sinapsın diğer tarafında, Tfr hücreleri, Tfh hücreleri tarafından IL-21 ve IL-4 salgılanmasını sınırlar. Tfr hücreleri granzim B, IL-10 ve TGF- β salgılar ve bu hücrelerin düzenleyici kapasitelerini göstermektedir [27-29].

4.B LENFOSİTLER

B hücresi gelişimi kemik iliğinde meydana gelir. Çoğunlukla timusta gelişimini tamamlayan ve olgunlaşan T hücrelerinin aksine, B hücreleri kemik iliğinde gelişmeye başlar ve immünoglobulin (Ig) ekspresyonuna ve B hücresi yüzey belirteçlerinin ekspresyonuna kemik iliğinde başlar. B hücrelerinin işlevi, vücutta tehdit oluşturan bir mikroorganizmaya veya moleküle bağlanabilen spesifik antikorlar üretmektir. Antikor üretimi, adaptif bağışıklık tepkilerinde humoral bağışıklığın ayırt edici bir özelliğidir. B lenfositleri antikor üretebilen tek hücrelerdir. Üretilen antikorlar, B hücrelerinin yüzeyinde reseptör moleküllerine benzer şekilde antijen bağlama bölgelerine sahiptir. Antikorlar, immünoglobulinler olarak bilinen bir protein sınıfına aittir ve üretildikten sonra vücudu, istilacı virüslerin, bakterilerin ve parazitlerin patojenik etkilerinden çeşitli şekillerde koruma yeteneğine sahiptir [30, 31]. B hücresi bağışıklık tepkilerinin iki ana türü vardır: T'ye bağımlı yanıt ve T'den bağımsız yanıt. T'ye bağımlı yanıt protein antijenlerinin B2 alt popülasyonunun varlığıyla tanınmasından sonra meydana gelir ve CD4+ yardımcı T hücrelerinin katılımını gerektirir. B hücresi alt sınıfı B-1 hücreleri, yardımcı bir T lenfositinin yardımı olmadan bir bağışıklık tepkisi üretir. B-2 B hücreleri, yüksek afiniteli, ikincil ve sonraki antikor yanıtlarından sorumlu olan bellek B hücrelerinin oluşumundan sorumludur ve protein bileşenli bir antijenle ilk karşılaşma sonrasında vücudu korur. B-2 B hücreleri somatik hipermutasyon (SHM) ve sınıf değiştirme rekombinasyonunun (CSR) kompleks süreçlerinden geçer ve IgM olmayan izotiplerin yüksek afiniteli antikor üretimine yol açarlar. Olgunlaşma programını tamamladıktan sonra B hücreleri lenfoid foliküllere göç eder. B hücresinin hayatta kalması, foliküler dendritik hücreler (FDC) dahil olmak üzere lenfoid stromal hücrelerin yanı sıra nötrofiller, makrofajlar/monositler gibi diğer bağışıklık hücreleri tarafından üretilen, TNF ailesinin bir üyesi olan sitokin BAFF'a (B hücresini aktive eden B hücresi) bağlıdır. Yeterli BAFF desteği almayan olgun B hücreleri apoptoz yoluyla elimine edilir. Dolaşımdaki olgun B hücrelerinin yarı ömrü yaklaşık 4-5 aydır. Organizmadaki tüm süreçler mükemmel bir kontrol "dengesi" altındadır [32, 33]. Denge bozulduğunda yanlış sonuçlara yol açabilir. B hücrelerinin etkinleştirilmesi için 3 sinyal alması gerekir (Şekil 4.1). Sinyal 1: T'ye bağımlı B hücre yanıtının başlangıcında, B hücresi antijeni Ig reseptörleri (membrana bağlı Ig) aracılığıyla bağlar ve bu tanımadan birinci sinyali alır. Bağlanan antijenin bir kısmı daha sonra özel veziküllere alınır ve burada işlenir ve MHC sınıf II moleküllerinin antijen bağlama bölgesinde peptitler olarak yeniden ifade edilir. Sinyal 2: T hücresi tarafından B hücresine

sağlanır. T hücresi iki yolla bağlanır; hem antijen reseptörü yoluyla hem de B hücresi üzerindeki CD40 ile aktive edilmiş T hücresi üzerindeki CD40L (CD154) arasındaki (eş uyaran) ayrı bir etkileşim yoluyla. Sinyal 3: B hücrelerine bağlandıktan sonra T hücresi, aktive edici sitokinlerini doğrudan T hücresi/B hücresi ara yüzüne salgılar B hücreleri yüzeyinde bulunan bu sitokinlere özel reseptörler onlara bağlandıktan sonra 3.sinyali hücre içine alır. T hücresinden antijenle aktifleşen bir B hücrelerine iletilen sinyallerin, B hücrelerini üç yoldan biriyle farklılaşmaya teşvik ettiğini göstermiştir. Yani ilk defa 3 sinyali alan B hücrelerin aktivasyondan sonra 3 yol seçeneği vardır (Şekil 4.2). Bu 3 seçenek B lenfositlerle bağlanan T lenfosit alt sınıfına ve sitokin türüne bağlıdır. Yollardan biri B hücreleri, birincil yanıt için birincil IgM antikorları sağlayan, antikor üreten plazmatik hücrelerin “birincil odağını” oluşturmak üzere çoğalabilmesidir. Diğer bir yol doğrudan IgM taşıyan hafıza hücrelerine farklılaşabilmeleridir. 3.yol olarak da B hücrelerin germinal merkeze (GC) girmesi ve bilimde bildiğimiz en sıra dışı programlardan biri olan farklılaşma programını üstlenebilmesidir. Tek bir B hücresi, haftada 5.000’e kadar antikor üreten hücre üretebilir ve bunların her biri saniyede yaklaşık 2.000 antikor molekülü salgılayabilir. Hücrelerin bu çoğalması ve antikor üretiminin şaşırtıcı hızı, hızla bölünen mikroplara ayak uydurmak için kritik öneme sahiptir. Ama bağışıklık sistemimiz bununla yetinmiyor, antikorları hem nicelik olarak artırır, hem de nitelik olarak düzenler. Naif B hücresinden başlayan ve olgun bir plazma hücresinin oluşumuyla sonuçlanan farklılaşma süreci, yüzlerce genin koordineli ekspresyonunu ve baskılanmasını gerektirir. İnsan ve murin B hücreleri, alt popülasyonları, gelişimleri ve işlevleri açısından birçok benzerlik göstermektedir. Bu nedenle, murin modellerinde B hücrelerini araştıran çalışmalardan elde edilen sonuçlar, mevcut bağışıklık anlayışımıza önemli ölçüde katkı sağlamaktadır. Üç B lenfosit hattı B-1a, B-1b ve B-2 hücrelerinin tanımlanmıştır. Bu hücre hatları ayrıca olgunlaşmamış ve olgun, foliküler, marjinal bölge (MZ), germinal merkez (GC) dahil olmak üzere çeşitli alt kümeler ve gelişim aşamalarına ayrılabilir. Tüm B hücre hatları, Antikor salgılayan plazma hücrelerine farklılaşabilir. Ama bu hücreler farklı B hücresi reseptör repertuarları (BCR) sergilerler, farklı antijenleri (protein, lipid veya karbonhidrat antijeni) tanırlar [34-36].

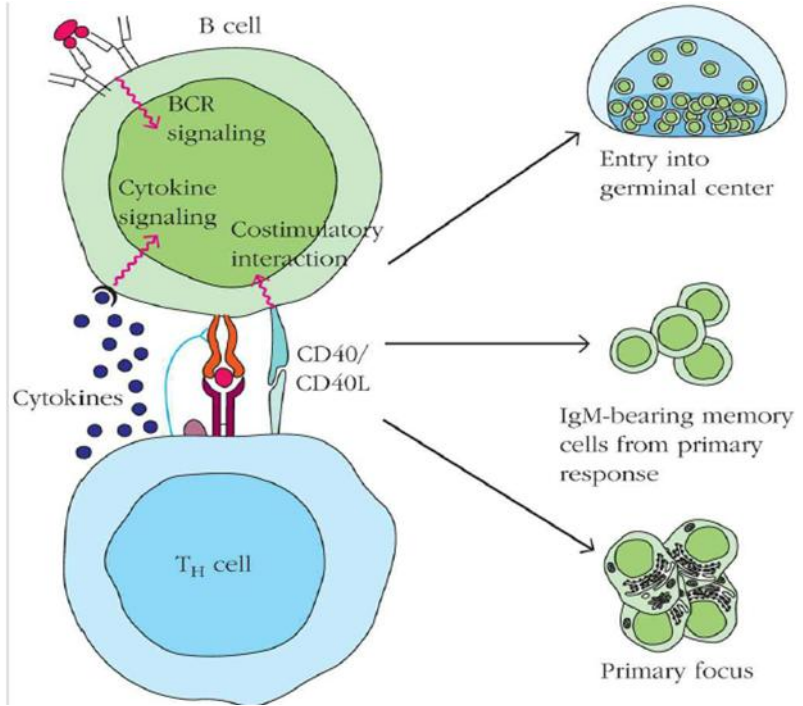


Şekil 4.1. B hücre aktivasyonu (Punt, Kuby Immunology, 2018)

4.1. Foliküler B Lenfositlerin Aktivasyon Yolu

Foliküldeki antijene özgü B hücreleri çözünür antijenle karşılaştıkları zaman, BCR-antijen sinyali ile aktive olur. Yukarıda belirttiğimiz gibi, naif B hücrelerinin tamamen aktif hale gelmesi için üç sinyale ihtiyacı vardır. Birinci sinyal: B hücresi folikülü boyunca yaptıkları yolculuklar sırasında antijeni bulup bağladıktan sonra kısmen aktive olurlar. Folikülde aktif B hücreler, hareket kalıplarını değiştirir ve T hücresi bölgesine doğru göç eder. Burada, aynı antijenle aktive olan ve aktivasyondan sonra hareket kalıplarını değiştirerek, T hücresi bölgesi ile folikül arasındaki sınıra göç eden T hücreleri ile karşılaşabilirler. İkinci sinyal: B hücreleri aktive edilmiş yardımcı T hücresiyle karşılaşmalıdır. Aktif yardımcı T hücresinin yüzeyinde B lenfositlerin CD40 molekülüne bağlanacak ligandlar (CD40L) bulunmaktadır. Bu ligand CD40 molekülüne bağlandığında B hücrelerinde CD40 sinyallenmesini uyarır ve farklılaşma, hafıza hücrelerin oluşumunu destekleyen sitokinlerin salgılanmasını sağlar. Üçüncü sinyal: foliküler B lenfositlerin tamamen aktivasyonu için, ara yüzeyine salgılanan sitokinleri yüzey reseptörlerine bağlanması gerekir [37, 38]. Protein antijenine özgü naif B hücrelerinin sıklığı son derece düşüktür (1/10.000'den az). İnsanlarda tüm periferik B hücrelerinin % 0,2'sine kadar reaksiyona girebilen galaktoz- α -1,3-galaktoz (α -Gal) gibi bazı korunmuş karbonhidrat veya fosfolipid antijenleri için frekans daha yüksek olabilir. Bununla birlikte, aynı antijen özgüllüğüne sahip bir T ve bir B hücresi arasında rastgele bir karşılaşma şansı 10^8 'de 1'den az olmalıdır, bu da B hücrelerinin benzer antijen özgüllüğüne sahip Th hücreleriyle etkileşime girmesini önemli kılar. Bu nedenlerden dolayı, bağlantılı tanıma, birkaç ligand

ve reseptör seti tarafından düzenlenen aktive edilmiş B ve T hücrelerinin lenfoid dokulardaki belirli yerlere göçünün kesin bir şekilde düzenlenmesini gerektirir ve bu da üretken bir etkileşim şansını artırmaya hizmet eder. T hücresinden yardımı aldıktan sonra, aktive edilmiş B hücreleri folikülün dış kenarlarına göç eder. Bu aktive edilmiş B hücrelerinin bir kısmı doğrudan kısa ömürlü, IgM üreten plazma hücrelerine farklılaşır ve lenfoid dokunu terk eder. Diğer kısmı folikülün iç kısmına geri döner ve burada germinal merkez oluşturur. Daha fazla T hücresi yardımı varlığında (T foliküler yardımcı hücreler-Tfh) daha fazla proliferasyon yapar, somatik hipermutasyon ve sınıf geçişine uğrar.



Şekil 4.2. B hücre farklılaşması (Punt, Kuby Immunology, 2018)

5.GERMİNAL MERKEZLER

Germinal merkezler (GC), B hücre folikülleri içindeki ikincil lenfoid mikro anatomik yapılardır. Bu yapılar ilk kez 1884'te Walter Flemming tarafından çok sayıda mitotik figür içeren büyük lenfosit odakları olarak tanımlandı ve bu, GC'lerin lenfosit gelişiminde rol oynayabileceği hipotezine yol açmıştır (bu nedenle "germinal" adı verilmiştir). GC'lerden ekstrakte edilen B hücrelerinin immünoglobulin gen dizilimi, GC'lerin üretken organlar değil, SHM ve afinite olgunlaşma bölgeleri olduğunu gösterdi. Somatik hipermutasyon terimi biyolojideki en sıra dışı süreçlerden birini tanımlar. "Somatik" kelimesi bize mutasyon süreçlerinin germ hattı hücrelerinin (yumurta ve sperm) dışında meydana geldiğini anlatır. Hipermutasyon, mutasyon süreçlerinin son derece hızlı gerçekleştiğini gösterir. Farelerde ve insanlarda somatik hipermutasyon, yalnızca antijene maruz kaldıktan sonra meydana gelir, yalnızca antikor ağır ve hafif zincirlerinin değişken bölgelerini etkiler ve CD40-CD40L bağlanması yoluyla T hücresi bağlanmasını gerektirir. Bu yapılarda B hücrelerde afinite olgunlaşması ve izotip değişimi gerçekleşir ve bunun sonucu olarak yüksek afiniteli antikorlar üretilir (Şekil 5.1.). Germinal merkezler B hücre mutasyonunun ve antikor afinite olgunlaşmasının gerçekleştiği mikro anatomik bölgelerdir. Hızla bölünen B hücrelerinin Ig genlerine çoklu nokta mutasyonları eklenir. İzotip değişimi için gerekli olan AID enzimi somatik mutasyonda da önemli rol oynamaktadır. Bu enzim C'yi U'ya dönüştürür. DNA'nın Ig V bölgesinde oluşan urasiller, DNA replikasyonu sırasında sıklıkla timidinlerle değiştirilir ve C'den T'ye mutasyonlar oluşturulur veya hatayla ilişkili mekanizmalar tarafından kaldırılır ve onarılır. Bu da sıklıkla orijinal mutasyona uğramış sitozin dışındaki nükleotidlerin dahil edilmesine yol açar. Germinal merkez B hücrelerindeki Ig V genleri son derece yüksek oranda nokta mutasyonlara uğrar [39-41]. Ig genindeki mutasyon oranının, hücre bölünmesi başına V geninin her 103 baz çiftinde 1 olduğu tahmin edilmektedir; bu, diğer memeli genlerinin spontan mutasyon oranından yaklaşık 1000 kat daha yüksektir. Bu nedenle germinal merkez B hücrelerindeki Ig V mutasyonuna somatik hipermutasyon adı verilir. Bu kapsamlı mutasyon, B hücrelerinin farklı klonlarının oluşmasıyla sonuçlanır. Bu klonların Ig molekülleri, yanıtı başlatan antijene geniş ölçüde değişen afinitelerle bağlanabilir. Bu süreçteki bir sonraki adım, en kullanışlı antijen reseptörlerine sahip B hücrelerini seçmektir.

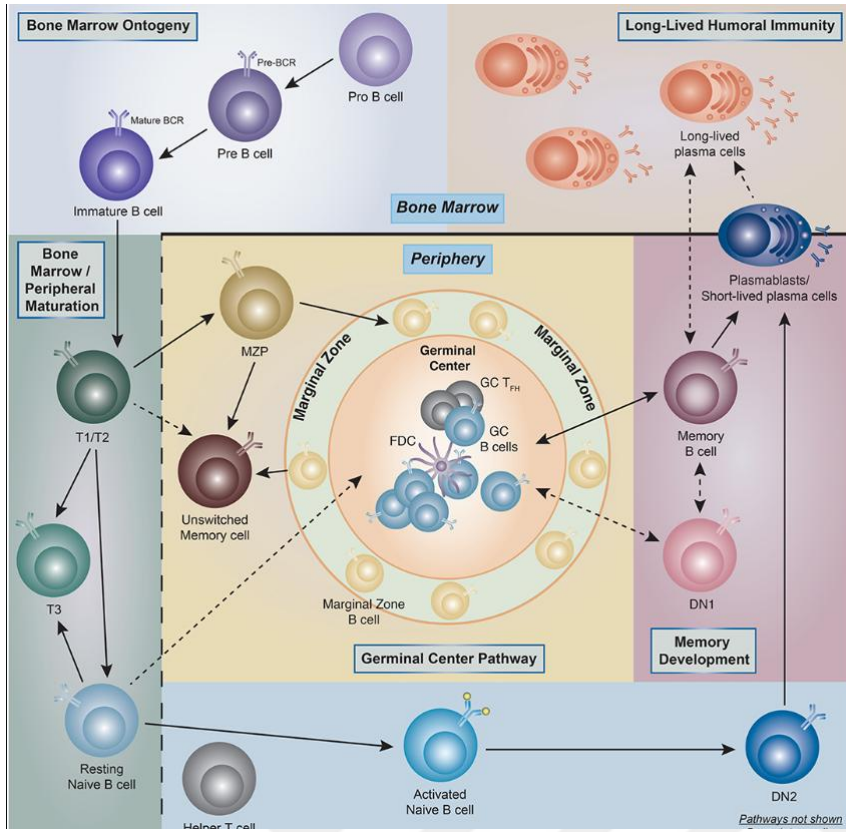
Afinite olgunlaşması, bir protein antijenine yanıt olarak üretilen antikorların afinitesinin, o antijene uzun süreli veya tekrarlı maruz kalmanın bir sonucu olarak arttığı

bir süreçtir. Enfeksiyon kalıcı veya tekrarlayan ise, afinite olgunlaşmasına bağlı olarak antikorların mikrobiyal antijene bağlanma yeteneği artar. Afinitedeki bu artış, antikorları kodlayan genlerin V segmentindeki nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Afinite olgunlaşması yalnızca yardımcı T hücrelerine bağımlı protein antijenlerine verilen yanıtlarda gözlemlenir, dolayısıyla yardımcı hücrelerin bu süreçte kritik bir rol oynadığını gösterir. Afinite olgunlaşması süreci, antijenleri bağlama konusunda yüksek kapasiteye sahip antikorlar üretir, böylece mikropları ve toksinlerini daha etkili bir şekilde nötralize edip öldürürler.

Bu sonuçlar iki ilginç soruyu gündeme getiriyor: B hücrelerinde Ig genlerindeki mutasyonlar nasıl tetikleniyor ve en yüksek afiniteye sahip (yani en faydalı) çoğalan B hücreleri nasıl seçiliyor?

İmmünizasyondan yaklaşık 1 hafta sonra, çoğalan GC öncesi B hücre grupları iki farklı bölgeye polarize olur. Parlak bölge (LZ), GC-B hücreleri ve CD4+ T foliküler yardımcı hücrelerin (T_{fh}) bir karışımından oluşur. Karanlık bölge (DZ) neredeyse yalnızca GC B hücrelerinden ve FDC benzeri DZ retiküler hücrelerden oluşur. LZ'deki yüksek stromal hücre yoğunluğu ve düşük hücre çekirdeği yoğunluğu, bu bölgeyi klasik histolojik boyamada parlak görüntüsünü sağlar.

Germinal merkezlerde B hücreleri yoğun bir çoğalma dönemine girer ve Ig genleri süreçlere maruz kalır. İlk olarak, Ig değişken bölge genleri, son derece yüksek mutasyon oranlarına maruz kalır. Mutasyona uğramış genler fonksiyonel Ig reseptör moleküllerini kodlayabiliyorsa, bu BCR'ler daha sonra GC içindeki B hücreleri üzerinde eksprese edilir. Daha sonra BCR'lerin antijene olan afinitesinin değişerek çoğalması test edilir. Anne hücrelerinden daha yüksek afiniteye sahip reseptörler taşıyan B hücreleri, daha ileri mutasyon ve seleksiyon turları için seçilir [42-44]. Ama antijene afinitesi olmayan veya azalmış reseptörler taşıyan B hücreleri ise apoptoza gönderilir. Germinal merkezde meydana gelen aktif mutasyon ve seleksiyon olayları bu bölgeni, "Darwin mikrokozmu" olarak adlandırılmasına sebep olmuştur [45, 46].



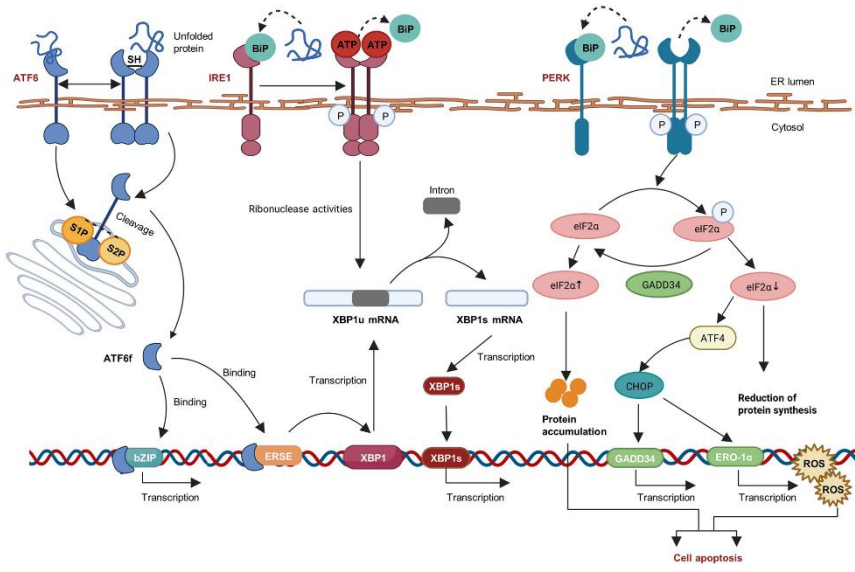
Şekil 5.1. Germinal merkezlerin oluşumu (Front Immunol, 2019)

6.İTERLÖKİN-2 (IL-2)

IL-2, T hücre aktivasyonunda rol oynayan en iyi bilinen sitokinlerden biridir. IL-2 antijen ve / veya uyarıcı ligandlar sınırlandığında optimal T hücresi proliferasyonunun indüklenmesinde anahtar rol oynar. Dinlenen T hücrelerinde, IL-2 reseptör β zinciri chain (IL-2R β ;CD122) ve γ zinciri (γ c; CD132) konstitutif (yapısal) eksprese edilir ve IL-2'yi intermediate (ara) afinite ile bağlarlar. T hücrelerinin aktivasyonu (TCR ve ko-stimülatör sinyalleri), IL-2'yi yakalayan ve onu IL-2R β ve γ zincirlerine sunan, T hücresine sinyal veren yüksek afiniteli heterotrimerik reseptörü oluşturmak için IL-2 reseptör α zincirinin (IL-2R α ; CD25) sentezini indükler. IL-2'nin salgılanması ve ardından yüksek afiniteli IL-2 reseptörüne bağlanması, aktive edilmiş naif T hücrelerinin kuvvetli bir şekilde çoğalmasına neden olur [47].

7.ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ

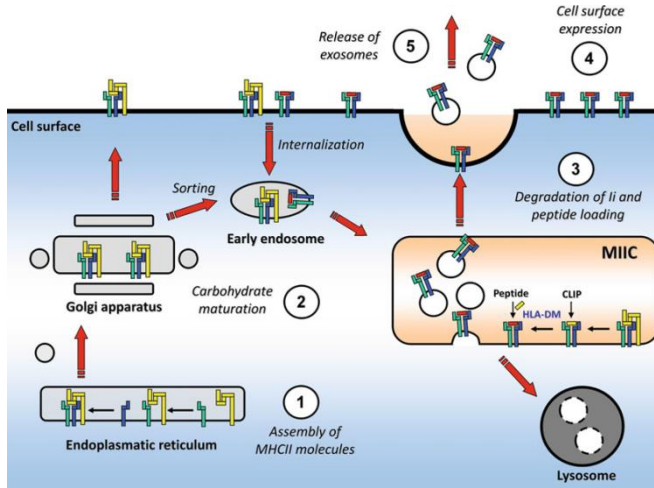
Endoplazmik retikulum (ER), tüm ökaryotlarda bulunan hayati önem taşıyan organeldir. Endoplazmik retikulum (ER), protein homeostazının korunması için uygun protein katlanması, trafiği ve yıkılımı için gereken mekanizmaları içeren bir organeldir. ER'nin düzenli çalışması, doğru protein katlanması için gerekli olan şaperonlar, disülfid köprüsü oluşumunu ve N-glikosilasyonu sağlayan çok sayıda enzim ve veziküler ve zar ötesi kaçakçılığı için birçok taşıyıcı ve translayon kanalı gibi çeşitli proteinlere dayanır. ER stres ajanları tarafından ER proteostazının bozulması durumunda, savunma mekanizması aktive olunur ve ER'den çekirdeğe katlanmamış protein tepkisi (UPR) olarak bilinen bir dizi sinyal yolunu aktive eder. UPR'nin birincil amacı, hücre sağ kalımı için ER homeostazını eski haline getirmek için transkripsiyonel ve translasyonel programları başlatmaktır. Besin yoksunluğu, hipoksi, asit-baz dengesizliği ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesi gibi belirli koşullar altında, ER fonksiyonunun kapasitesi aşılarak yanlış katlanmış proteinler ER'de birikebilir [48, 49]. Daha sonra, ER'nin stres ve işlev bozukluğunu gidermek için evrimsel olarak korunan ve koruyucu mekanizmalarından biri olan katlanmamış protein yanıtı (UPR) ortaya çıkar (Şekil 7.1). Endoplazmik retikulum (ER) stres sensörleri inositol gerektiren enzim 1 (IRE1), PKR benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6), ER lümeninden ER stres sinyallerini sitozole iletir[50;51]. IRE1 yolağı: ER stresi IRE1'in oligomerizasyonunu ve otofosforilasyonunu indükler, ardından XBP1'in pre mRNA'nın splicingi, aktive edilmiş IRE1 tarafından tetiklenir. X-box bağlayıcı proteinler 1 (XBP1) çekirdeğe geçer, UPR ile ilişkili genleri aktive eder. ATF6 yolağı: ATF6, ATF6-N'yi üretmek için proteazlar S1P ve S2P tarafından bölünür ve çekirdeğe geçer. PERK yolağı: Aktive edilen PERK, eLF2a'yı fosforile eder, genel translayonu engeller, ER'ye giren protein miktarını azaltır. Aktif PERK ATF4'ü uyarır, böylece tercihli protein sentezini sağlar (şaperonları kodlayan UPR hedef genleri, lipid sentezinde yer alan enzimleri ve ERAD proteinlerinin sentezi) [52-55].



Şekil 7.1. Katlanmamış protein yanıtı (Sig Transduct Target Ther 8, 352 (2023))

8.MHC SINIF-II MOLEKÜLÜ

MHC sınıf-II molekülleri klasik transplantasyon antijenleridir ve polimorfik proteinlerdir. Fizyolojik işlevleri, peptitleri bağlayarak T hücrelerine tanımları için makro moleküler substratı oluşturarak antijeni sunmaktır. Tüm çekirdekli hücreler yüzeyinde eksprese olan diğer klasik transplantasyon antijenleri sınıfının (MHC sınıf-I molekülleri) aksine, MHC sınıf-II molekülleri, enflamatuvar sinyallere yanıt olarak yalnızca belirli bir grup bağışıklık hücrelerinde ve epitelyal, bağ dokusu ve vasküler dokulardaki hücrelerde eksprese ederler [56]. MHC sınıf-I molekülleri esas olarak proteazom yoluyla sitozolde üretilen endojen peptitleri sunarken, MHC sınıf-II molekülleri endozomal sistemdeki antijenlerin endositik alımı ve işlenmesi üzerine üretilen peptitleri sunar. İnsan MHC lokusu, hücre yüzeyinde eksprese edilen üç klasik MHC sınıf-II moleküllerinin izotiplerini kodlar: HLA-DR, HLA-DQ ve HLA-DP. MHC sınıf II α - ve β -zincir kodlayan genler çok yüksek bir polimorfizm sergiler [57]. MHC sınıf-II moleküllerinin hücre içi yolculuğu α ve β alt birimlerinin Ii (CD74) ile birleştiği ER içinde başlatılır (Şekil 8.1). ER’de sınıf-II moleküller kovalent olmayan bağlarla Ii’ye bağlı alfa ve beta alt birimleri moleküllerinden oluşur. Bu ilişki, yeni oluşan MHC sınıf-II moleküllerinin doğru katlanmasına yardımcı olur ve yanlış katlanmış polipeptitlerin erken bağlanmasını önler [58].

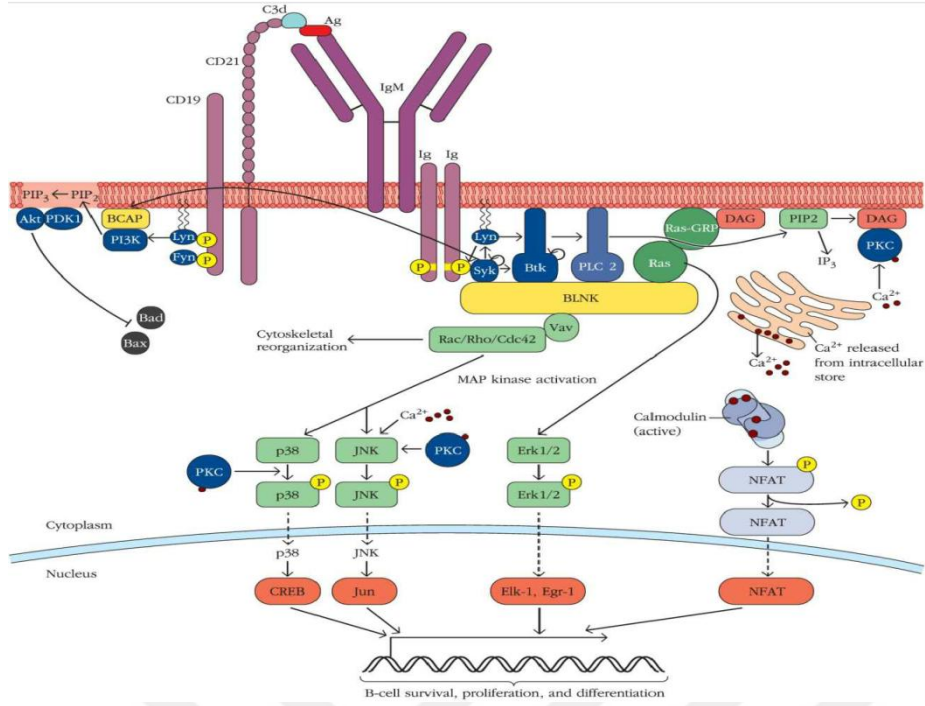


Şekil 8.1. MHC sınıf-II molekülünün endoplazmik retikulumda sentezi (Springer Nature 2019)

9.HÜCRE İÇİ KALSİYUM HOMEOSTAZI

Hücre içi kalsiyum (Ca^{2+}) tüm ökaryotik hücrelerin fizyolojik işlevlerini düzenler. Hücre içi kalsiyum metabolizma, kasılma, bağışıklık, apoptoz dahil olmak üzere çeşitli hücrel süreçlerinin düzenlenmesinde etkili rol oynar. Sitozolda ve hücre dışı ortamdaki Ca^{2+} homeostazının bozulması çok çeşitli metabolik, enflamatuvar ve diğer bozukluklarda rol oynar. Hücrelerdeki Ca^{2+} homeostazını korumak için, Ca^{2+} 'yı endoplazmik retikulum içinde depolamak ve fazla Ca^{2+} 'yı plazma membranı (PM) boyunca dışarı pompalamak için iyon kanalları ve taşıyıcılar görev yaparlar. Uyarılmayan hücrelerde Ca^{2+} 'nin hücre içine girişinin esas mekanizması “store-operated calcium entry” (SOCE) yolağından geçer. SOCE, endoplazmik retikulum lümeni, sitozol ve hücre dışı boşluk arasındaki Ca^{2+} değişimidir (Şekil 9.1). Bu yolağa ait ana moleküler oyuncular ER, Ca^{2+} sensörleri ve PM depo-kontrollü Ca^{2+} kanalları (store-operated channels) SOC'lerin aktivatörleri olarak işlev gören stromal etkileşim molekülleri (STIM) ile tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Fosfoinositide özgü fosfolipaz C'nin (PLC) izoformlarına bağlanan PM reseptörlerinin uyarılması, PLC tarafından plazma zarı fosfolipid fosfatidilinositol 4,5-bifosfatın (PIP2) hidrolizinin katalizine neden olur. Çözünür inositol 1,4,5-trisfosfat (IP3) üretimiyle sonuçlanır ve bu da ER Ca^{2+} 'nın IP3 reseptörleri aracılığıyla salınmasını tetikler [59, 60]. IP3, endoplazmik retikulumda bulunan reseptörüne, ligandlanmış kalsiyum kanalına bağlanır ve kalsiyum depolarından kalsiyumun salınmasını uyarır. IP3 endoplazmik retikulum kalsiyumunun tükenmesine neden olur. Ca^{2+} 'nın tükenmesi, ER membran proteini olan STIM1 ve onun homologu STIM2 tarafından algılanır, bu da STIM proteinlerinin konformasyonel bir değişikliğine neden olur. Ca^{2+} 'nın hücreye girmesini sağlamak için PM ORAI kanallarını hapsettikleri, kümeledikleri ve kapadıkları ER-PM kavşaklarına translokasyonuna neden olur. Daha sonra kalsiyum salınımı ile aktive olan kalsiyum (CRAC) kanalı adı verilen bir plazma zarı iyon kanalını aktive eder. CRAC kanalının önemli bir bileşeni ORAI proteindir [61, 62]. Kalsiyum (Ca^{2+}), bağışıklık hücresi fonksiyonunun temel bir düzenleyicisidir. T hücresi reseptörü (TCR) veya B hücresi reseptörü (BCR) gibi immünoresseptörlerin çapraz bağlanması, endoplazmik retikulum (ER) Ca^{2+} depolarının salınmasıyla sonuçlanır.

Yapılan çalışmalar (Matsumoto ve ark.) SOCE'nin B hücrelerinin sağ kalımını ve proliferasyonunu düzenlemede önemli rolü olduğunu belirledi [63, 64].



Şekil 9.1. B lenfositlerde hücre içi Ca²⁺ homeostazının mekanizması (Punt, Kuby Immunology, 2018)

10. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ İNDÜKLEYİCİLERİ

Tapsigargin, Brefeldin A, Tunikamisin, dithiothreitol (DTT) ve MG132 dahil olmak üzere doku kültürü sistemlerinde ER stresini indüklemek ve UPR'i aktive etmek için çeşitli kimyasallar mevcuttur [65, 66].

Tapsigargin (TG), kalsiyuma bağımlı ER şaperonlarının aktivitesine müdahale ederek protein katlanmasını bozan bir ER kalsiyum pompasının inhibitörüdür. Thapsigargin, sarkoplazmik / endoplazmik retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) kalsiyum pompasını inhibe ederek protein katlanmasını etkiler. Bu, kalsiyuma bağımlı ER şaperonlarının aktivitesine müdahale ederek protein katlanmasını bozar ve ER stresine neden olur. SOCE aktivasyonuna neden olur [67, 68].

Brefeldin A, proteinlerin ER'den Golgi'ye taşınmasını engeller ve Golgi aparatından endoplazmik retikuluma retrograd protein taşınmasını indükler ve böylece katlanmamış proteinlerin birikmesine ve ER'da strese yol açar.

Tunikamisin, ER'de glikoprotein biyosentezinin ilk adımını bloke eder, UDP-N-asetilglukozamin-dolikol fosfat N-asetilglukozamin-1-fosfat transferazın (GPT) inhibitörüdür. Tunikamisin hücrelere uygulandığında, ER'de katlanmamış glikoproteinlerin birikmesine neden olur ve ER'da strese neden olur.

DTT disülfid bağı oluşumunu bloke ederek hızla ER stresine yol açar. Ancak DTT, yeni sentezlenen proteinlerin de disülfid bağı oluşumunu bloke ettiği için spesifik ER stres indükleyicisi değildir.

MG132 bir proteazom inhibitörüdür. MG132, ER ile ilişkili protein bozulmasını (ERAD) bloke ederek ER'de yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olur ve dolaylı bir yolla ER stresini indükler.

11.HÜCRE YÜZEY BELİRTEÇLERİ

11.1. Lökosit Ortak Antijeni; CD45

Tüm çekirdekli hematopoetik hücrelerde eksprese edilen reseptör tipi bir protein tirozin fosfatazdır (PTP). Lenfositlerdeki tüm yüzey proteinlerinin yaklaşık %10'unu oluşturur. Hematopoetik olmayan hücre hatlarında, normal ve malign, hematopoetik olmayan dokularda CD45 ifadenmesi (ekspresyonu) yoktur. T ve B hücreleri gibi kemik iliği kaynaklı hücreleri diğer hücre tiplerinden ayırmak için CD45 monoklonal antikorlarla hücre yüzey molekülleri belirlenir.

11.2. Yüzey Farklılaşma Antijeni 19; CD19

CD19 proteini, B hücreleri üzerinde eksprese edilen 95 Kda'lık bir transmembran glikoproteindir, genellikle bir B hücresi soy belirteci olarak kullanılır. B hücrelerini tanımlamak için, B hücrelerine özgü moleküller CD19 ve / veya CD20, spesifik yüzey belirteçleri olarak işlev görür. CD19, immünoglobulin ağır zincirinin yeniden düzenlenmesi sırasında eksprese edilen bir B hücresi yüzey molekülüdür.

Dalak ve diğer ikincil lenfoid dokularda, tüm B hücreleri CD19 yüzey molekülü eksprese ederler (CD19 pozitifdir) ve tüm plazma hücreleri bu belirteci ifade etmez. Bu nedenle, CD19 bu dokulardaki B hücre hatlarının tanımlanması için alternatif belirteçler olarak kullanılabilir. Dalakta CD19, CD21 ve IgM için boyama, foliküler B hücrelerinin ve MZ B hücrelerinin tanımlanmasına izin verir.

11.3. İnsan Lökosit Antijeni -DR; HLA-DR

HLA-DR, B lenfositlerin yüzeyinde yapısal olarak eksprese edilen insan sınıf -II büyük doku-uyumluluk kompleksi (MHC) antijenidir. Aktivasyon belirteçidir. Adaptif bağışıklık yanıtının indüklenmesi ve sürdürülmesi önemli şekilde antijenlerin, ana büyük doku-uyumluluk kompleksi tarafından kodlanan MHC sınıf-I veya MHC sınıf-II glikoproteinler tarafından işlenmesine ve sunulmasına bağlıdır. MHC molekülleri, nakledilen greft dokunun reddedilmesindeki önemli rolleri nedeniyle fark edilmişlerdir. Günümüzde ise peptit yapıları antijenlerin MHC sınıf-I / MHC sınıf-II molekülleri tarafından T hücrelere sunulmasının, bulaşıcı patojenlere karşı bağışıklık tepkileri için büyük önem taşıdığı bilinmektedir.

11.4. Yüzey Farklılaşma Antijeni 40; CD40

CD40 antijeni, 20'den fazla üyeden oluşan tümör nekroz faktör / sinir büyüme faktörü (TNF) süper ailesinin bir üyesidir. Tek zincirli glikoprotein yapısındadır. CD40, plazma hücreleri dışındaki tüm B hücreleri yüzeyinde ifadelenir bulunur. CD40 reseptör stimülasyonu sonrasında NFκB yolağını aktive ederek hücre sağ kalımını destekler. B hücresi üzerindeki CD40 molekülü T yardımcı hücre yüzeyinde ifadelenen CD40L'a bağlanır. Bu bağlanma iki sinyal yolağıyla NFκB sinyalini aktive eder: 1) IKK yolağıyla 2) NFκB'yi indükleyen kinaz (NIK) yolağıyla. Bunun sonucu olarak, Mcl1 (miyeloid hücreli lösemi-1) gibi anti-apoptotik proteinin ekspresyonu indüklenir ve B hücrelerin sağ kalımı sağlanır. CD40L ile CD40 arasındaki etkileşim B hücresi çoğalması ve farklılaşması için önemlidir. X kromozomuna bağlı bozukluk olarak tanımlanan CD40L veya CD40 eksikliği durumunda, T hücreleri üzerindeki CD40L ile B hücreleri veya diğer antijen sunan hücreler üzerindeki CD40 arasındaki etkileşim oluşmaz ve B hücreler gereken sinyali alamaz. Sonuç olarak, T'ye bağımlı bağışıklık yanıtı bozulur, germinal merkezlerin oluşumu, IgG, IgA ve IgE antikorlarının üretimi için sınıf değişimi, antijenin daha etkili şekilde ortadan kaldırılması için gereken somatik hipermutasyon, bellek hücrelerinin üretimi gerçekleşemez ve hiper IgM (HIM) sendromu gelişir.

11.5. İmmünoglobülin M; IgM

IgM, integral membran proteinidir. Matür (olgunlaşmış) B hücresi için anahtar belirteçlerdendir. Olgun naif B hücreleri, yüzey IgM'i eksprese eder. Aktivasyon üzerine, naif IgM+ B hücreleri "Sınıf Değişkenliği Rekombinasyonuna" maruz kalabilir ve bunun sonucu olarak, üretilen immünoglobulinin ağır zincir izotipinde bir değişikliğe neden olurken antijen özgüllüğü korunur. Sınıf değişkenliğine maruz kalmayan B hücreleri CD19+'dır ve hücre yüzeylerinde IgM eksprese eder. Bu hücre popülasyonu geçici (transitional) B hücreleri, naif olgun B hücreleri ve IgM+ CD27+ bellek B hücrelerini içerir. Sınıf değişkenliği rekombinasyonu geçiren B hücreleri IgM ekspresyonunu kaybeder ve CD19+ IgM- olarak tanımlanabilir.

11.6. Yüzey Farklılaşma Antijeni 21; CD21

CD21, kompleman reseptörü 2 (CR2) olarak da bilinir. B hücre yüzeyinde eksprese olan transmembran proteindir. CD21 B hücresi ko-reseptör kompleksinin bir parçası olan kompleman reseptörü. C3b'nin parçalanma ürünleri ile kaplanmış antijenlere bağlanır ve

BCR'a çapraz bağlayarak antijene duyarlılığı en az 100 kat artırır. CD21 aynı zamanda Epstein–Barr virüsü tarafından B hücrelerini enfekte etmek için kullanılan bir reseptördür. Marjinal bölge B hücreleri, CD21'in çok yüksek seviyelerinin ekspresyonu ile tanımlanabilir.

11.7. Yüzey Farklılaşma Antijeni 3; CD3

CD3, bir yüzey T hücresi belirteçidir ve periferik kan ve lenfoid dokuların T hücreleri tarafından eksprese edilir. CD3 ün hücre içinde stoplazmik kuyruk bölgesi T hücre yüzey reseptörünün sinyal kapasitesi için önemli bir yer alır.

11.8. Yüzey Farklılaşma Antijeni 4; CD4

CD4, transmembran glikoproteindir ve immünoglobulin süper ailesinin üyesidir. Öncelikle yardımcı T hücresi alt kümeleri için bir belirteç olarak tanımlanır ve TCR için ko-reseptör görevi görür. CD4 molekülü antijen sunan hücrelerde eksprese eden MHC sınıf-II moleküllerinin beta 2 domaini ile ilişkilidir.

11.9. Yüzey Farklılaşma Antijeni 185; CD185

CD185, kemokin reseptörü tip 5 (CXCR5) olarak da bilinir, foliküler yardımcı T hücrelerinin belirteçidir. Dolaşımdaki B hücreleri ve aktive edilmiş T hücreleri tarafından eksprese edilir. Hücreleri CXCL13 kemokini bulunan foliküllere yönlendirir.

11.10. Yüzey Farklılaşma Antijeni 278; CD278

CD278, ICOS olarak da bilinir ve CD28 ailesinin bir üyesidir. Aktivasyonu takiben esas olarak aktive edilmiş CD4+ T hücrelerinde eksprese edilen indüklenabilir bir uyarıcı moleküldür. TFH hücrelerinin yardımcı aktivitesi için çok önemlidir. ICOS için bir ligand aktive edilmiş B hücreler yüzeyinde eksprese olan B7 aile üyesi olan ICOSL'dır. ICOS naif T hücrelerinde ifade edilmez.

11.11. Yüzey Farklılaşma Antijeni 279; CD279

CD279, Programlanmış Ölüm-1 (PD-1) olarak da bilinir, aktive edilmiş T hücrelerinde indüklenen inhibitör reseptördür T hücresi aktivasyonunu bloke eden, dolayısıyla bağışıklık tepkilerini aşağı yönde düzenleyen bir reseptördür. B7 ailesi

ligandlarına bağlanabilir. PD-L1 (programlanmış ölüm ligand-1; B7-H1) ve PD-L2 (programlanmış ölüm ligand-2; B7-DC) olarak iki ligand bilinmektedir. PD-L1, çeşitli hücreler tarafından eksprese edilir. PD-L2 ekspresyonu inflamasyon sırasında ASH üzerinde indüklenir. PD-1 tümörlerde T hücresi tepkilerini uyarmayı amaçlayan kanser tedavilerinin de bir hedefidir.



12.HÜCRE KÜLTÜRÜ

Canlılardan hücre alma ve bunları yapay olarak kontrol edilen bir ortamda yetiştirme tekniği **hücre kültürü** olarak bilinmektedir. Hücre kültürü düzenlenmiş koşullar altında hücre çoğalması, farklılaşması ve ürün geliştirme çalışmalarının temelini oluşturur.

12.1.Birincil Hücre Kültürü

Doğrudan hayvan veya insan dokusundan enzimatik veya mekanik yollarla elde edilen ilk kültürü Birincil Kültür olarak adlandırılır. Bu hücreler yavaş büyüyen ve çeşitliliği olan hücrelerdir ve geldikleri dokunun tüm özelliklerine sahiptirler. Bu kültürün temel amacı, kontrollü bir ortamda cam veya plastik kap şeklinde olabilen uygun bir substrat üzerinde hücre büyümesini desteklemektir. Doğrudan dokudan alınmaları nedeniyle orijinal doku ile aynı karyotipe sahiptirler. Alt kültür oluşturduktan sonra, birincil hücre kültürleri sınırlı yaşam ömrüne sahip hücre hatlarını oluştururlar [69, 70]. Hücre hatları birkaç alt kültürden sonra yaşamlarını bitirirler.

Enzimatik veya mekanik prosedürler kullanılarak doğrudan insan veya hayvan dokusundan üretilen iki tür birincil hücre vardır:

Yapışkan hücre: Bu hücreler kültür kabının yüzeyine yapışma yeteneğine sahiptir. Bu hücreler genellikle, hücrelerin hareketsiz olduğu ve bağ dokusuna tutunduğu, örneğin, böbrekler gibi organ dokularından elde edilir.

Süspansiyon hücreleri: Gelişmek için herhangi bir bağlanma veya destek gerektirmez. Tüm süspansiyon hücreleri, örneğin, lenfositler kan sisteminden çıkarılır ve plazmada süspanse edilir [71, 72].

Birincil kültürlerden yetiştirilen hücreler, çeşitli nedenlerle kısa bir ömre sahiptir ve kalıcı olarak tutulamazlar. Birincil kültürdeki hücre popülasyonundaki artışın neden olduğu substrat ve besin maddesi tükenmesi, hücresel aktiviteyi etkileyebilir ve kültürde büyük miktarlarda tehlikeli metabolitlerin birikmesine ve sonuç olarak hücre büyümesinin inhibisyonuna yol açabilir. Devam eden hücre gelişimini sağlamak için ikincil bir kültür

veya alt kültür elde etmek gerektiğinde, bu adım füzyon aşaması (temas inhibisyonu) olarak bilinir.

12.2. İkincil Hücre Kültürü

Hücrelerin ilk pasajlanması, farklı türde bir kültür sistemine geçiş ve birincil kültürden elde edilen ilk kültür ikincil kültür olarak bilinmektedir.

Bu genellikle yapışkan kültürlerdeki hücrelerin mevcut tüm substratı tüketmesinden sonra veya süspansiyon kültürlerindeki hücreler ortamın daha fazla büyümeyi destekleme kapasitesini aştığında ve hücre proliferasyonu yavaşladığında veya tamamen durduğunda yapılır. Büyümeyi sürdürmek ve daha fazla çoğalmayı teşvik etmek amacıyla uygun hücre yoğunluğunu korumak için birincil kültürün alt kültürlenmesi gerekir. İkincil hücre kültürü bu işlemin adıdır [73].

12.3.Hücrelerin Dokulardan İzolasyonu ve Kültürlenmesi

Hücrelerin üzerinde bilimsel araştırma yapabilmemiz için öncelikle hücreyi sağlanan doku örneğinden izole etmemiz gerekir. Dokulardan izole edilen hücreler ölümsüz değildir, dolayısıyla bunların izole edilmesi, kültürlenmesi ve bu hücre tipleriyle ilgili analizlerin yapılması için özel yöntemler geliştirmemiz gerekmektedir. Ayrıca, farklı kontaminasyonlara duyarlıdırlar, bu nedenle onlarla çalışırken dikkatle davranmak önemlidir [74].

Birincil kültür, dokudan hücre izolasyonundan sonraki kültür aşamasıdır ve uygun koşullar altında mevcut tüm substratı tüketene (yani birleşme noktasına ulaşana) kadar çoğalan kültür aşamasına söylenilir. Bu noktada, sürekli büyüme için daha fazla alan sağlamak amacıyla hücrelerin taze büyüme ortamına sahip yeni bir flaska taşınarak geçirilmesi (yani alt kültürlenmesi) gerekir. Pasajlama olarak da bilinen alt kültürleme, büyüme ortamının hariç tutulması ve hücrelerin önceki kültürden taze büyüme ortamına aktarılmasıdır. Bu süreçte hücre hattının daha fazla çoğalması sağlanır.

Birincil kültür, enzimatik veya mekanik yöntemlerle doğrudan hayvan veya insan dokularından elde edilir. Bu hücreler daha yavaş büyümeye eğilimlidir, doğası gereği heterojendir ve köken aldıkları dokunun tüm özelliklerini taşırlar.

İlk kez pasajlandıktan sonra, birincil hücre kültürleri, çok sayıda geçişten sonra (genellikle sonlu hücre hatları olarak adlandırılır) ölebilen hücre hatları oluşturabilir. Birçok nedenden dolayı birincil kültürlerden elde edilen hücrelerin ömrü sınırlıdır; Hücreler süresiz olarak muhafaza edilemez. Birincil kültürde hücre sayısının artması, hücresel aktiviteyi etkileyebilen substrat ve besinlerin tüketimine yol açar ve dolayısıyla kültürde yüksek düzeyde öldürücü metabolitlerin birikmesine neden olur. Bu, sonunda hücre büyümesinin inhibisyonuna yol açabilir. Bu aşama, hücre büyümesinin devamını sağlamak için ikincil bir kültür veya alt kültürün gerekli olduğu füzyon aşaması (temas inhibisyonu) olarak bilinir.

12.4.Hücreleri Dokulardan Genel Yöntemlerle İzole Edilmesi

Birincil kültür için izole edilen dokuların ayrıştırılması için çok sayıda teknik geliştirilmiştir. Ayrışma (dissosiyon/disaggregasyon) araştırmacıların üzerinde çalıştıkları hücre türlerini etiketlemelerine ve izole etmelerine olanak sağlayacak önemli bir tekniktir. Hücre ayrışması için mekanik, enzimatik, birincil eksplant ve kimyasal gibi belirli yaklaşımlar vardır [75].

Mekanik Ayrışma

Mekanik ayrışma doku ayrışma yöntemleri arasında en basit tekniklerden biridir. Dokuyu ezme, kazıma veya kesme gibi fiziksel güç yoluyla parçalamayı içerir. Bu yöntem genellikle yumuşak dokuların (beyin, dalak, yumuşak tümörler, embriyonik karaciğer gibi) ayrışması için uygulanır. Bu kalıntılar arasında, beklenen hücrelerin daha fazla ayrışması için hafifçe yüzer olması gerekir. Bu yöntem hızlıdır ve bu nedenle gevşek bağlanmış numuneler için daha uygundur. Bu nedenle lenf düğümleri, kemik iliği, dalak gibi dokular ve gevşek bağlı dokular için tercih edilen işlemdir.

Manyetik boncuk yöntemiyle T ve B hücre izolasyonu

İmmünomanyetik hücre ayrımı veya manyetik hücre separasyonu olarak da bilinen manyetik hücre ayrımı, spesifik hücre yüzeyi antijenlerine yönelik antikolar veya ligandlar kullanılarak hücrelerin seçim veya tükenme için hedeflenmesini içerir. Etiketli hücreler, bir elektromanyetik alan uygulandığında hareketsiz hale getirilebilen manyetik boncuklar olarak da bilinen manyetik parçacıklara çapraz bağlanır.

Pozitif ve negatif seleksiyon

Pozitif bir seçim yapıldığında, süpernatant atılabilir ve elde edilmek istenen manyetik olarak etiketlenmiş hücreler elektromanyetik alandan çıkarılana kadar hareketsiz olarak kalır. Negatif bir seçim yapıldığında, istenen hücreler süpernatant da bulunur.

12.5. Hücrelerin Dondurulması

Hücrelerin krioprezervasyonu

İnsanlar da dahil olmak üzere tüm canlılarda aşırı düşük sıcaklıklarda metabolik aktivite azalır veya tamamen ortadan kalkar. Ancak dondurma yöntemini kullanarak canlı hücre ve dokuların uzun süreli korunmasını sağlamak mümkündür. Bununla birlikte, bilimsel olarak kanıtlanmış en önemli gerçeklerden biri, hücreleri dondurdukça hücre içindeki kimyasal bileşenler ve olaylar düşük sıcaklıktan etkilenir değişir ve çeşitli mekanik hücre kısıtlamalarına ve ölümcül olan hasarlara yol açabilir. Düşük sıcaklıklarda insan hücrelerinin önündeki temel ve en önemli engellerden biri, çok sayıda hücre hasarına sebep olan sudan buza geçiş fazıdır ve bu hasara katkıda bulunan hücre içi buz kristallerinin oluşumuna yol açan yüksek soğutma hızları ve ozmotik hasara neden olan yavaş soğutma hızları gibi çeşitli faktörler vardır. Yavaş soğutmada hücre içi ve hücre dışı çözeltilerdeki konsantrasyon değişiklikleri veya buz kristalleri arasındaki mekanik etkileşimlerin engellenmesi hücrelerde ozmotik hasarlara yol açar [75]. Krioprezervasyon, biyolojik örneklerin kriogen sıcaklıklarda uzun süre canlı askıda tutulmasına ve aynı zamanda hücre bileşenlerin korunmasına yardımcı olur.

Krioprotektif ajanlar (CPA'lar)

Araştırmalarda kullanılan en yaygın ve önemli CPA'lar, dimetil sülfoksit (DMSO), gliserol, polimerler, proteinlerdir. CPA'lar, dimetil sülfoksit (DMSO), propilen glikol, gliserin gibi hücre zarını geçebilen kriyoprotektanlar, ve 2-metil-2,4-pentandiol gibi zarı geçemeyen kriyoprotektanlar olarak iki ana sınıfta tanımlanabilir.

Dimethyl Sulphoxide (DMSO)

DMSO ilk olarak 1959 yılında gösterildi. DMSO herhangi bir sıcaklıkta hücrenin içinde ve çevresinde bulunan çözülmüş kalan çözeltideki elektrolit konsantrasyonunu azaltarak ekspresyonlarını kolaylaştırır. Ayrıca, DNA metilasyonu ve histon değişikliklerinin neden olduğu hücre ayrılmasının kabul edilmesiyle birlikte azalan canlılık

seviyesi de dikkate alındı. Yağ dokusundan türetilen mezenkimal kök hücreler (MSC'ler), deri altı yağ dokusunun özelliklerini korumada etkili olan özellikler göstermiştir. DMSO aracılı kriyoprezervasyonun ana özelliği, DMSO'nun plazma membranından hücrenin içine nüfuz etmesi ve hücreleri kriyojenik bir ortamda meydana gelen her türlü zarar verici faktörlerden korumasıdır. DMSO genel olarak, suda yüksek çözünürlük seviyelerine sahip, plazma zarı boyunca difüzyonu kolaylaştıran ve hücre içine nüfuz eden iyonik olmayan parçacıklarla işlev görür [76]. Klinik olarak DMSO'nun, CPA aşılınmış hematopoietik kök hücre örnekleriyle tedavi edildiği bildirilen hastalarda çok sayıda aşırı alerjik reaksiyona neden olduğu ve ayrıca fare modellerinde merkezi sinir sisteminin belirli bölgelerinde apoptozu tetiklediği gösterilmiştir. Şu anda, hücre dondurulması için en önemli öneri, kontrollü bir hızda yavaş soğutmadır. Yapılan araştırmalar, taşıma veya depolama sırasında kısa süreli sıcaklık değişimlerinin ve dondurularak saklanan hücrelerin tekrarlanan donma çözülme döngülerinin hücre canlılığına zarar verdiğini göstermiştir. Hasarlı hücrelerin donma ve çözülme sırasında mekanik strese dayanma olasılığı daha düşüktür bu nedenle hücrelerin hazırlık süreci boyunca hassas bir şekilde ele alınması zorunludur.

Hücrelerin dondurulması protokolü

Dondurulacak hücreler santrifüj edilerek dibe çöktürülür. Daha sonra yüksek hücre yoğunluklarında (1×10^6 /ml) kriyokoruyucu (örneğin, %10 v/v DMSO) içeren dondurma ortamının yavaş yavaş eklenmesiyle dikkatlice yeniden süspanse edilir. Hücreler kriyojenik şişelere bölünür, bir CoolCell değişken hızlı dondurma kabına yerleştirilir ve uzun süreli depolama için bir sıvı nitrojen dondurucuya yerleştirilmeden önce ilk dondurma döngüsü için -80°C 'lik bir dondurucuya aktarılır. Saklanan tüm hücre hatlarının adlarını ve konumlarını kaydetmek için bir kayıt defteri veya barkod sistemi kullanılmalıdır.

12.6. Hücrelerin Çözülmesi

Hücrelerin mümkün olan en kısa sürede çözülmesi veya sıcaklığın kriyojenik koşullara göre 0°C 'nin biraz üzerine çıkarılması önerilmektedir. Dimetil sülfoksitin (DMSO) veya diğer kriyoprotektanların potansiyel zararlı etkilerini azaltmak için, genellikle dondurucu ortamdan hızlı bir şekilde arındırılması ve çözülmüş hücrelerin iyileşme ve büyüme için en uygun ortama aktarılması önerilir. Hücre çözülme hızının hücrenin hayatta kalması için hücrelerin dondurulma hızı kadar önemli olduğu açıkça ortaya konmuş olmasına rağmen, hücre çözülmenin optimal hızı ve sıcaklığı için net bir

kılavuz geliştirilmemiştir. Herhangi bir kriyoprezervasyon yönteminin çözülme aşamasında sıcaklık kontrolü için çok az sayıda otomatik yöntem vardır. Hücrelerin çözülmesine yönelik mevcut metodoloji standartlaştırılmamıştır. Donmuş hücre şişeleri 37-38°C bir su banyosunda manuel olarak çözülür veya şişeler su banyosundaki yüzen bir rafa yerleştirilir. Son buz kristali eriyene kadar şişe periyodik olarak kontrol edilir. Koruyucu ajanları uzaklaştırmak amacıyla santrifüjleme için çözülmüş hücreler doku kültürü ortamında seyreltilir. Bu prosedür sadece kontaminasyon olasılığını ortaya çıkarmakla kalmaz, aynı zamanda subjektiftir ve elde edilen sonuçlarda önemli değişkenliğe yol açabilir. DMSO özellikle çok etkili bir kriyoprotektandır ve bu nedenle dondurucu ortamlarda yaygın olarak kullanılır. Ancak yüksek dozlarda memeli hücreleri için toksiktir ve hücre terapisinde kullanılmak üzere hücreleri dondurarak saklamak için kullanıldığında bazı ciddi yan etkilerle yol açabilir. Bazı yöntemler, dondurma çözeltisindeki DMSO miktarını ve dolayısıyla toksisitesini azaltmayı amaçlar. Ancak bu her zaman pratik değildir.

Hücre Çözme Tekniği

Elle Isıtma, kriyoviallerin elle ısıtılması, herhangi bir ekipman gerektirmemesi, vücut sıcaklığının su banyosuyla karşılaştırılabilir olması ve kullanıcının flakonu sürekli olarak kontrol edip çalkalayabilmesi nedeniyle hücre çözme yaklaşımı olarak kullanılabilir.

12.7.Hücre Kültürü için Besiyeri Hazırlanması

Hücre büyümesi için gereken temel koşullar arasında düzenli sıcaklık, hücre bağlanması için bir substrat, uygun besiyeri ve pH ve ozmoliteyi kontrol eden inkübatördür. Hücre kültürü besiyeri genel olarak hücre döngüsünü destekleyen yeterli enerji ve bileşenler tabanını sağlar. Hücre kültüründe besiyeri, hücre gelişimi için gerekli olan hormonları, besin maddelerini ve büyüme faktörlerini sağladığı için kültür ortamının en önemli unsurudur. Farklı besiyerleri büyüme faktörlerinin, hormonların ve bağlanma faktörlerinin temeli olarak bilinen amino asitlerin, inorganik tuzların, glikozun ve serumun dengesinden oluşur. Besiyeri, hücre büyümesini desteklemesiyle beraber kültürün ozmotik basıncını ve pH'ını da düzenler.

Besiyerinin Fizyokimyasal Özellikleri

Kültürlenmiş hücrelerin daha iyi büyümesini ve çoğalmasını desteklemek için kültür besiyerinin belirli fizyokimyasal özelliklere (pH, CO₂, tamponlama, ozmolarite, viskozite,

sıcaklık vb.) sahip olması gerekir. Önemli fizyokimyasal özelliklerden biri ortamın pH değeridir. Hücreler genellikle alkalın aralığındaki (7,2-7,4) pH ortama ihtiyaç duyar. Bu uyumlu ortam değışiklik gösterebilir. Örneğın, fibroblastlar için alkalın ortam uyumluysa (pH: 7,4–7,7), kanser hücrelerin tercih ettiğı ortamın pH'ı normal hücrelere göre daha asidiktir.

Besiyeri içerikleri

İnorganik Tuzlar

İnorganik tuzların ortama eklenmesi birçok fonksiyona hizmet eder. Tuzlar (başta Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} ve HCO_3^- tuzları) ortamın ozmolalitesine katkıda bulunan ana bileşenlerdir. Temel olarak bu tuzlar hücrelerin ozmotik dengenin korunmasına yardımcı olur ve Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} sunarak hücre zarı potansiyelinin korunmasına yardımcı olur. Yukarıdaki faktörlerin tümü, enzim kofaktörleri olarak ve hücre bağlanması için hücre matrisi tarafından gereklidir.

13.AKIM SİTOMETRİ YÖNTEMİ

Akım sitometri yöntemi (Flow cytometry), canlı hücre yüzeyinde ifadelenen proteinleri ve hücre fenotipini analiz yapma amacıyla geliştirilmiştir. Bu yöntemde hücre yüzeyinde ifade edilen proteinlere yüzey belirteçleri denilir. Bu proteinlerin ve onların kombinasyonlarının önemli rolü, hücrelere benzersiz fenotiplerini sağlamaktır. Belirteçler antijen olarak düşünülmüş, onlara karşı spesifik antikorlar geliştirilmiştir. Antikorlar spesifik antijenleri ifade eden hücre popülasyonlarını tanımlamak için kullanılır. Flow cytometry'nin açılımına bakarsak, Flow= akışkan, sito= hücre, metri= ölçü olarak tanımlanır. Bir akım sitometrenin ana bileşenleri akışkan sistemi (fluidics system), ışık kaynağı olan lazerler, optik sistem, fotodetektörlerdir ve veri analizini gerçekleştiren elektronik bilgisayar sistemidir. Akım sitometrisi, sıvı fazında bulunan hücrelerin ölçülmesidir. Hücreler, hücresel belirtece özgü florokromla ilişkili antikorlarla etiketlenir. Florokromlar, uyarıldığında farklı dalga boyunda ışık yayan kimyasal floresan bileşiklerdir. Hücreler tek tek florokromu uyaran lazer ışımından geçer. Bu geçiş sırasında her hücreden yayılan ışık dedektör tarafından alınarak spesifik sinyal şeklinde bilgisayara aktarılır. Akım sitometride birkaç farklı florokrom kullanılarak aynı anda birden fazla hücresel özellikler ölçülebilir. Her florokromun farklı spektral özellikleri olduğu için tüm lazerlerle kullanılamazlar. Yeni cihazlar kırmızı, sarı-yeşil, mavi, ultraviyole (UV), mor olarak beş lazer içerebilir. Her bir lazer belirli bir florokromu uyardığında farklı renkler üretilir. Böylece aynı anda tek tüpte 20'ye kadar florokrom analiz edilebilir. Kohler ve Milstein, 1979 yılında antikor üreten B hücrelerini miyelom hücrelerine dönüştürerek, sınırsız ölçüde antikor üreten bir hibridom hücresi üretebildiler ve sonunda monoklonal antikorları elde ettiler. Monoklonal antikorlar aynı hedef antijenin tek bir epitopunu bağlayan tek valentli afiniteye sahip antikora denilir. Monoklonal antikorlar laboratuvar testlerinde in vitro olarak kullanılır. Akım sitometri, florokrom etiketli monoklonal antikor kullanımına dayanır.

14. TEZ ÇALIŞMASININ AMAÇLARI VE HİPOTEZİ

Çalışmanın Amaçları; bu projede, ER stresi etkisinde Foliküler B hücrelerin (FO Bh) ve onlarla etkileşen foliküler T yardımcı hücrelerin (Tfh) yüzey molekül ifadenmesinin değişikliğinin özelliklerinin incelenmesi amaçlanmaktadır. Projede, endoplazmik retikulum stresine maruz kalmış Foliküler B hücrelerin (FO Bh), ve bu hücrelerle ko-kültürlenmiş foliküler T yardımcı hücrelerin (Tfh) endoplazmik retikulum stres arasında ilişkisi ve endoplazmik retikulum stresin immün regülasyonda rolünün değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın hipotezi; ER stresi etkisindeki Foliküler B hücreler ve onlarla etkileşen foliküler T yardımcı hücrelerin yüzey moleküllerinin ekspresyonu değişir.

Çalışmanın sonuçları ER stresine bağlı immün sistem yanıtların altında yatan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması ve immün sistem bozukluğuyla ilişkili hastalıkların patojenezinin daha iyi anlaşılmasına ışık tutacağı, kaynak sağlayacağı ve literatüre katkı sağlayacağı beklenmektedir.

Çalışmanın özgün değeri; Çalışmada B hücrelerindeki endoplazmik retikulum stresinin foliküler B, T foliküler yardımcı hücreler üzerinde etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Yapılan literatür çalışmalarında daha önce bu konuda yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışma daha önce çok az çalışılan insan dalağından izole edilen lenfositler üzerinde yapılmıştır ve bu ikincil lenfoid organda foliküler B lenfositlerinde ER stresi indüklendikten sonra yüzey moleküllerinde dolayısıyla bu moleküllerin ekspresyonunun altında yatan mekanizmaların iyi anlaşılmasına düşünülmüştür. Daha sonra onlarla ko-kültür yapılan etkileşime geçen foliküler yardımcı T lenfosit ve B lenfositlerin düzenlenmesinde rol oynayan foliküler yardımcı düzenleyen T lenfositlerde nasıl fenotip değişkenliği olacak bakılmıştır. Düzenlenmiş immün yanıtların altında yatan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması düşünülmüştür. Çalışmanın sonuçları ER stresine bağlı immün sistem bozukluğuyla ilişkili hastalıkların patojenezinin daha iyi anlaşılmasına ışık tutacağı, kaynak sağlayacağı ve literatüre katkı sağlayacağı beklenmektedir.

15.MATERYAL VE METOD

Yapılan çalışmada Başkent Üniversitesi Adana Dr. Turgut Noyan Uygulama ve Araştırma Merkezine başvuran ve dalaktan kaynaklanan onkolojik nedenler dışında herhangi bir nedenle dalağı alınan hastaların tıbbi atık olarak değerlendirilebilecek iki dalak örneği kullanılmıştır.

15.1.Dalak Örneğinden Lenfosit İzolasyonu

Tezimizde Mekanik Ayırışma kullanılmıştır. Dalak örneğinden hücre elde etmek amacıyla, dalak örneği PBS (Fosfat Buffer Salin) (Gibco) içeren petri kabına alınarak ve bistüri yardımıyla fiziksel olarak parçalanmıştır (yaklaşık 2 mm²). Dalaktan hücre süspansiyonu elde etmek amacıyla doku süspansiyonu gazlı bezden süzüldü (Resim 15.1).

Alınan hücre süspansiyonu falkon tüp (15 ml'lik) içerisine 4 ml fikol (Stemcell Technologies) üzerine yayıldı. Tüpler santrifüjde 10 dakika boyunca 2140 rpm'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında dansite gradient yöntemiyle ayrılmış olan fikolün üst kısmında bulunan lenfosit kümeleri pastör pipet yardımıyla toplanarak yeni bir 15 ml'lik falkon içerisine alındı.



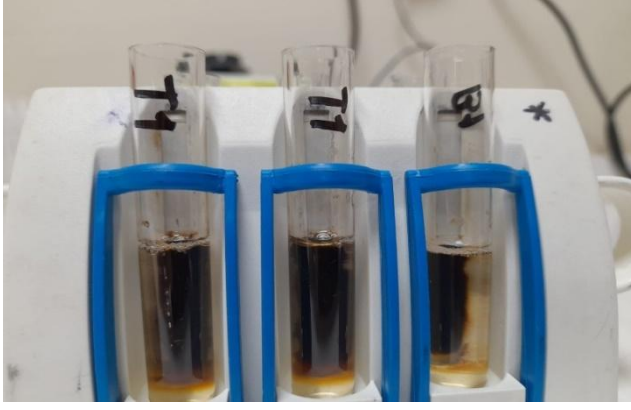
Resim 15.1. Dalak örneğinin parçalanması

15.2. Manyetik Boncuk Yöntemiyle T ve B Hücre İzolasyonu

Hızı ve sadeliği nedeniyle, manyetik hücre ayrımı, belirli hücre alt kümelerinin yüksek oranda saflaştırılmış popülasyonlarını izole ettiği en yaygın kullanılan yöntemlerden biri olduğu için bu yöntem tercih edilerek T ve B hücrelerin ayrımı bu yöntemle yapıldı. İzole edilen lenfositlerden B hücre izolasyon kiti (Stemcell Technologies-Easysep) kullanılarak negatif seleksiyon yöntemiyle önce B hücre, daha sonra T hücre izolasyon kiti (Stemcell Technologies-Easysep) kullanılarak aynı negatif seleksiyon yöntemiyle T hücre izolasyonu yapıldı. B hücre ve T hücre izolasyonu için birer adet 5 ml'lik polistren tüp isimlendirildi ve her tüpe 1,5 ml (1×10^6 hücre/ml olacak şekilde) lenfosit eklendi. Lenfositlerin üzerine B hücre için 75µl hücre kokteyli ve 75µl manyetik boncuk; T hücre için 75µl hücre kokteyli ve 75µl manyetik boncuk eklendi. Tüpler iyice vorteks yardımıyla karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüplerin her birine 1 ml PBS eklenerek hafifçe vorteksle karıştırıldı. Daha sonra tüpler manyetik tüp sporuna alınarak 7 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı (Resim 15.2). Süre sonunda pastör pipet yardımıyla tüp spordan çıkarılmadan süpernatant başka bir tüp içerisine alındı ve yine manyetik tüp sporunda 7 dakika oda ısısında tekrar inkübasyona bırakıldı (Resim 15.3). Pastör pipet yardımıyla tüp spordan çıkarılmadan süpernatant yeniden yeni bir tüp içerisine alındı, 2300 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası ve süre sonunda süpernatantı döküldü ve pellet PBS ile dilüe edildi.



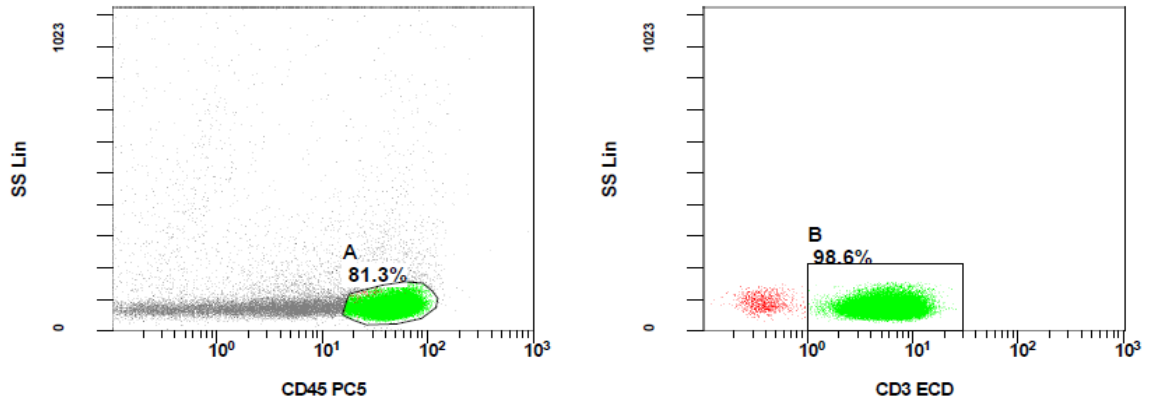
Resim 15.2. B lenfositlerin manyetik izolasyonu



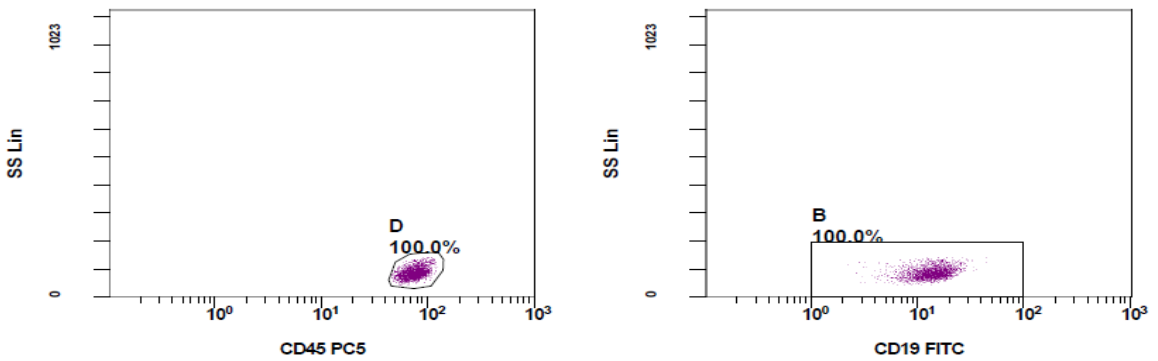
Resim 15.3. T lenfositlerin manyetik izolasyonu

Hücre sayımı yapıldı:

Elde edilen B ve T hücre sayıları Hematoloji Laboratuvarında bulunan CELL-DYN cihazında belirlendi. B hücreler 1 μ l'de 84 hücre; T lenfositler 1 μ l'de 296 hücre olarak saptandı.



Resim 15.4. T hücre akımsitometri görüntüsü



Resim 15.5. B hücre akımsitometri görüntüsü

Besiyeri hazırlandı:

50 ml FBS ve 12 ml penisilin/streptomisin (PSTM) ve 500 ml RPMI kullanılarak besiyeri hazırlandı.

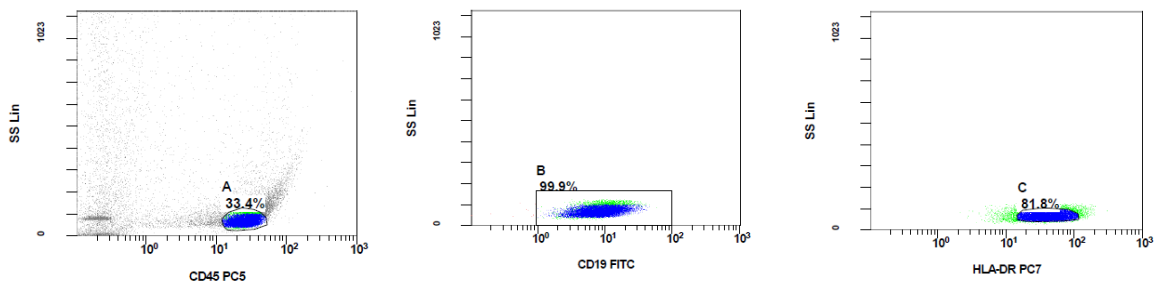
Tapsigargin muamelesi

B hücrelerin sayıları ve saflığı belirlendikten sonra hücre kültüründe zamana ve doza bağlı olarak tapsigargin (EMD Millipore) ile endoplazmik retikulum stresi oluşturmak amacıyla hücre kültürü basamağına geçildi. B hücreler 2 μ M Tapsigargin ile muamele edildi. Tapsigargin muamesinden sonra endoplazmik retikulum stresini gözlemlemek için akımsitometri yöntemi çalışıldı.

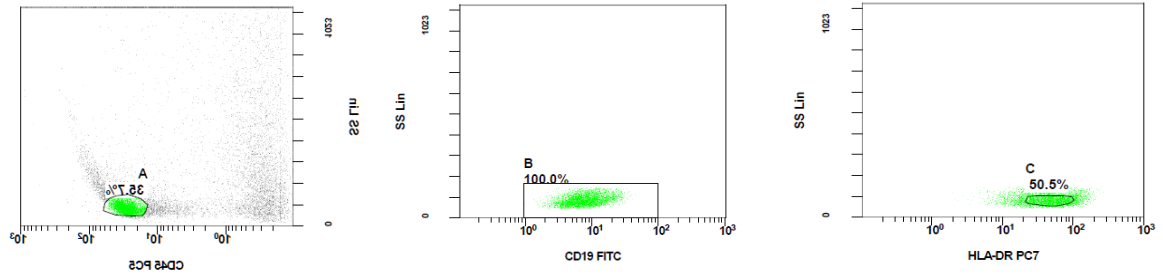
15.3. Akımsitometri Yöntemi

Tapsigargin muamalesi sonrası akımsitometri yöntemi ile B hücrelerin HLA-DR ekspresyonuna bakıldı. 1 adet 5 ml polistren tüp B hücre için isimlendirildi. B hücre tüpüne 50 μ l (10.000 hücre) B hücre, 5 μ l CD45, 5 μ l CD19 ve 5 μ l HLA-DR monoklonal antikoları eklendi. Hafifçe vortekslendi ve oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüplere 2 ml %1 FBS içeren PBS eklendi ve 2300 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı pellet üzerine 500 μ l %1 FBS içeren PBS eklendi. Tüpler hafifçe vortekslendi ve akımsitometri cihazında okutuldu.

Okutma sonrasında software programında hücre saflıklarının değerlendirilmesi yapıldı.



Resim 15.6. Tapsigargin muamelesi öncesi HLA-DR ekspresyonu



Resim 15.7. Tapsigargin muamelesi sonrası HLA-DR ekspresyonu

15.4. İzole Edilen Lenfositlerin Dondurulması

İzole edilen B ve T lenfositler stok olarak saklanmak için donduruldu. Bu amaçla 2 adet 15 ml'lik falkon tüp T ve B hücre için isimlendirildi. Falkon tüplere T ve B lenfosit eklenip 3000 rpm'da 5 dakika santrifüjlendi. Dibe çöken hücreye temas etmeden süpernatant atıldı. Hücrelerin üzerine RPMI eklenip pipetaj yapılarak hücreler yeniden süspanse edildi. Hücrelerin üzerine %10 Dimetil sülfoksit (DMSO) ve %20 FBS eklendi ve isimlendirilen cryovial tüplere pasajlandı ve (-)80°C dondurucuya konuldu.

15.5. Ko-kültür Aşaması

İzole edilen T ve B hücrelerin saflıkları akım sitometri yöntemi kullanılarak değerlendirildi. T hücre yüzey belirteci olarak CD45 ve CD3 monoklonal antikoları, B hücre yüzey belirteci olarak CD45 ve CD19 monoklonal antikoları kullanıldı. 2 adet 5 ml polistren tüp T ve B hücre için isimlendirildi. T hücre tüpüne; 50µl (10.000 hücre) T hücre, 5µl CD45 ve 5µl CD3 monoklonal antikoları eklendi. B hücre tüpüne; 50µl (10.000 hücre) B hücre, 5µl CD45 ve 5µl CD19 monoklonal antikoları eklendi. Hafifçe vortekslendi ve oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda tüplere 2 ml %1 FBS içeren PBS eklendi ve 2300 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı pellet üzerine 500 µl %1 FBS içeren PBS eklendi. Tüpler hafifçe vortekslendi ve akımsitometri cihazında okutuldu. Okutma sonrasında software programında hücre saflıklarının değerlendirilmesi yapıldı.

Tapsigargin ile muamele edilmiş B hücre ve T hücreler ile ko-kültür yapıldı. 3/12/24 saatler için toplamda 12 flask isimlendirildi (tablo 15.1'de olduğu gibi). Her flask 4300 µl RPMI eklendi. Her saat için 2 flask 500 µl Tapsigarginle muamele edilmiş B lenfositler eklendi, diğer 2 flask 500 µl Tapsigargin muamelesi yapılmayan B lenfositler eklendi.

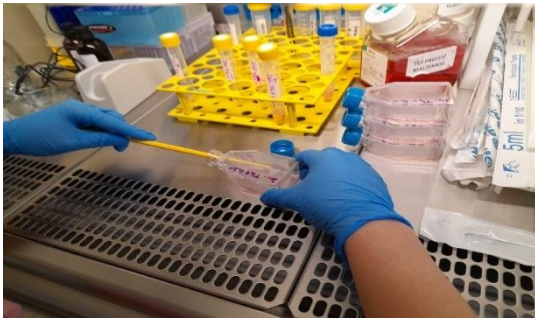
Tüm flasklara 200 µl T hücreler eklendi. Her bir flask içindeki toplam hacim 5000 µl olacak şekilde hazırlandı. Hücrelerin proliferasyonu için ortama her saat için 4 flasktan 2'sine (Tapsigarginle muamele edilmiş ve Tapsigarginle muamele edilmemiş) 200 µl IL-2 eklendi. Tüm flasklar 37°C CO2'li etüvde 3/12/24 saatler için inkübe edildi (Resim 15.8). İnkübasyon süresi sonunda hücreler flasklardan toplandı (Resim 15.9). Ko-kültüre edilen hücrelere zamana bağlı olarak (3. 12. ve 24. saatlerde) hücre yüzey belirteçlerinin değişimine bakmak için akımsitometri yöntemiyle immünfenotipleme yapılarak değerlendirildi.

Tablo 15.1. Hücre ko-kültür tablosu

Ko-kültür saatleri	TG uygulanan IL-2 uygulanmayan örnekler	TG ve IL-2 uygulanan örnekler	TG ve IL-2 uygulanmayan örnekler	TG uygulanmayan IL-2 uygulanan örnekler
3. saat	ER stres (+) B hücre-CD3+T hücre -IL2(-)	ER stres (+) B hücre-CD3+T hücre -IL2(+)	ER stres (-) B hücre-CD3+T hücre -IL2(-)	ER stres (-) B hücre-CD3+T hücre -IL2(+)
12. saat	ER stres (+) B hücre-CD3+T hücre -IL2(-)	ER stres (+) B hücre-CD3+T hücre -IL2(+)	ER stres (-) B hücre-CD3+T hücre -IL2(-)	ER stres (-) B hücre-CD3+T hücre -IL2(+)
24. saat	ER stres (+) B hücre-CD3+T hücre -IL2(-)	ER stres (+) B hücre-CD3+T hücre -IL2(+)	ER stres (-) B hücre-CD3+T hücre -IL2(-)	ER stres (-) B hücre-CD3+T hücre -IL2(+)



Resim 15.8. Hücre kültür inkübasyonu



Resim 15.9. Hücrelerin ko-kültürden sonra toplanması

15.6. 3/12/24. Saat Akımsitometri Çalışması

Önce 5 ml'lik polistren tüpler tablo 15.2'de olduğu gibi isimlendirildi. Her tüpe 100 µl (10.000 hücre) hücre ve monoklonal antikorlar eklendi ve iyice vortekslenerek karanlık ortamda oda sıcaklığında +4 °C 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Tüplere 2 ml %1 FBS'li (Fetal Bovine Serum) (Gibco) PBS eklendi ve vortekslendi. Tüpler 3 dakika boyunca 2300 rpm'de santrifüjlendi ve santrifüj sonunda süpernatant atıldı. Tüplere 500 µl PBS (%1 FBS'li) eklendi ve vortekslendi. Tüpler akımsitometri cihazında okutuldu ve analiz yapıldı.

Tablo 15.2. Monoklonal antikorların kullanım tablosu

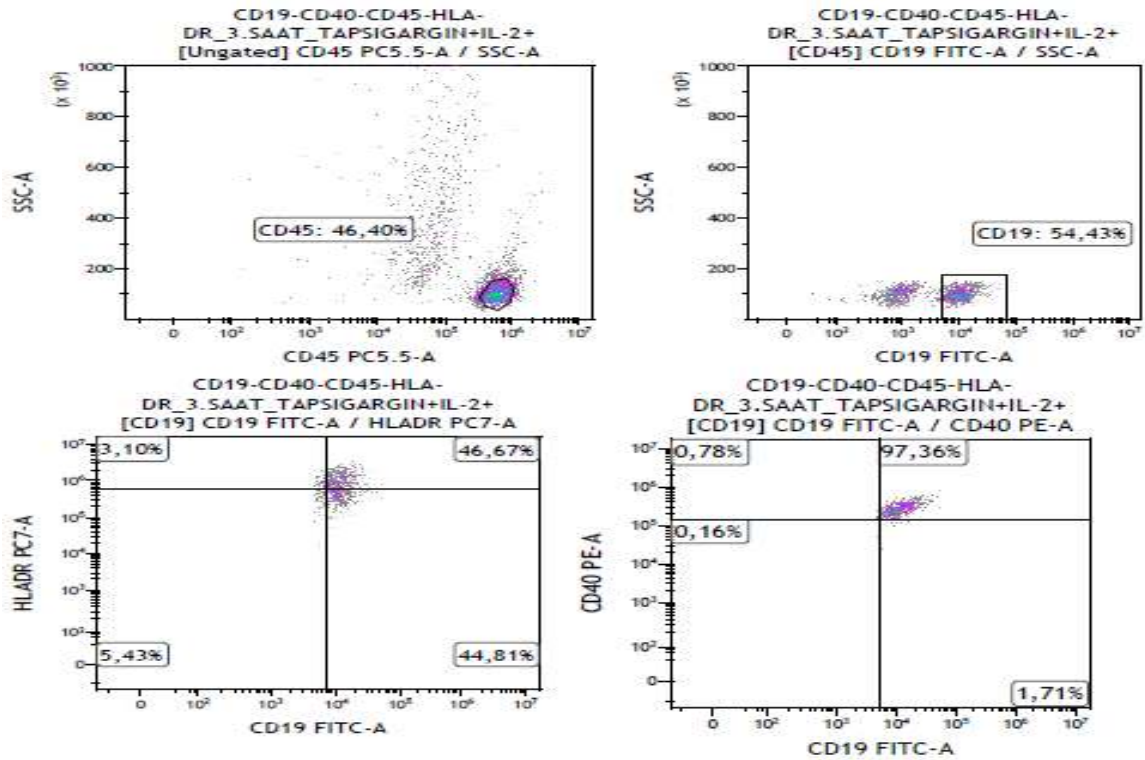
Tüpler	FITC	PE	ECD	PC5	PC7
Tüp1	CD4	-	CD3	CD185	CD279
Tüp2	CD4	-	CD3	CD185	CD278
Tüp3	CD19	CD40	-	CD45	HLA-DR
Tüp4	CD19	IgM	-	CD45	HLA-DR
Tüp5	CD19	CD21	-	CD45	HLA-DR

16.SONUÇLAR

16.1.Örnek 1 ve Örnek 2’ye Ait B Hücre Yüzeyindeki HLA-DR ve CD40 Ekspresyonu

Tablo 16.1. Örnek 1’e ait B hücre yüzeyinde HLA-DR ve CD40 ekspresyonu

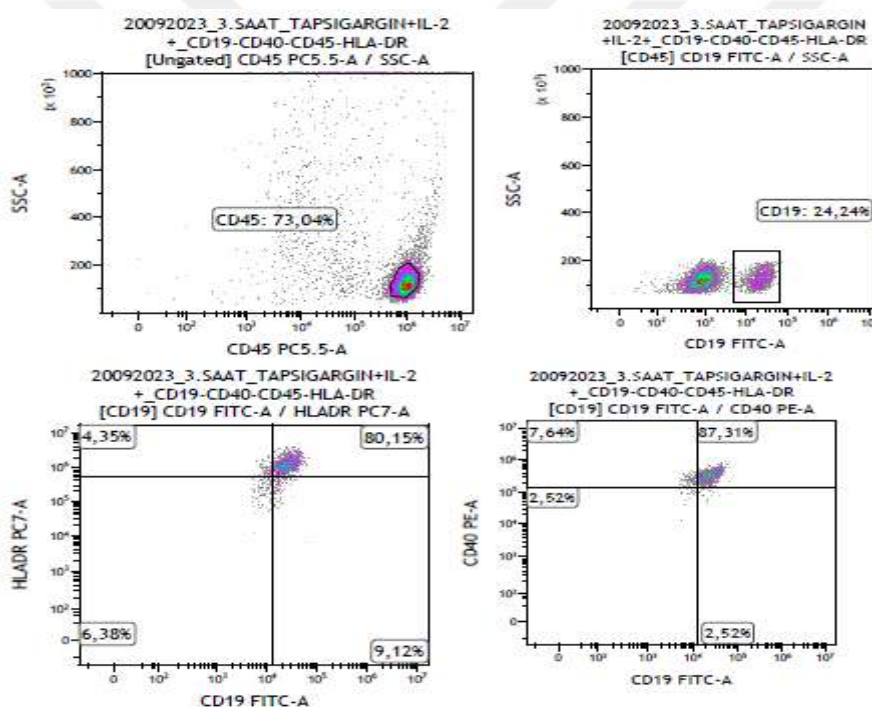
ZAMAN	MUAMELE	CD45	CD19	CD19+ HLA-DR	CD19+ CD40
0. SAAT	—	60,07%	99,09%	91,02%	92,52%
3. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	37,81%	68,54%	90,65%	97,52%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	45,50%	57,33%	89,15%	96,90%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	56,25%	51,07%	62,23%	96,82%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	46,40%	54,43%	46,67%	97,36%
12. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	20,63%	83,57%	81,17%	96,65%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	23,71%	79,55%	91,82%	95,62%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	19,28%	49,83%	37,20%	93,17%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	14%	51,87%	33,09%	86,33%
24. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	23,39%	58,85%	95,21%	91%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	16,42%	69%	95,19%	98,40%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	21,70%	48,84%	82,04%	92,08%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	24,14%	55,44%	82,76%	90,95%



Resim 16.1. Örnek 1’e ait B hücrelerde HLA-DR ve CD40 ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü

Tablo 16.2. Örnek 2'ye ait B hücre yüzeyinde HLA-DR ve CD40 ekspresyonu

ZAMAN	MUAMELE	CD45	CD19	CD19+ HLA-DR	CD19+ CD40
0. SAAT	—	81,21%	99,08%	95,94%	86,53%
3. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	77,30%	19,03%	81,53%	92,94%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	74,46%	18,07%	73,88%	88,28%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	59,38%	17,10%	81,25%	81,94%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	73,04%	24,24%	80,15%	87,31%
12. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	26,12%	38,50%	83,33%	88,19%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	46,55%	52,22%	82,56%	93,32%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	42,74%	85,12%	34,71%	92,67%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	41,16%	67,14%	28,80%	92,02%
24. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	73,21%	17,20%	78,79%	88,20%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	63,57%	12,36%	72,65%	93,77%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	72%	13,14%	81,50%	91,12%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	65,83%	15,20%	83,32%	87,01%



Resim 16.2. Örnek 2'ye ait B hücrelerde HLA-DR ve CD40 ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü

- **CD45 ifadesi**

B hücre yüzeyinde ifadelenen CD45 yüzey molekülünün, tapsigargin etkisinden bağımsız olarak zamana bağlı azalan bir ekspresyon değişikliği gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuçlar tüm lenfositler için ortak yüzey belirteci olarak kullanılan CD45 yüzey molekülünün ekspresyonunun ER stresinden etkilenmediğini göstermektedir.

- **CD19 ifadesi**

B hücre yüzey belirteci olarak da değerlendirilen CD19 yüzey molekül ifadenmesi zamana bağılı değışim göstermekle birlikte tapsigargin uygulanan hücrelerde ekspresyon azalması 3. saatte belirgin olarak saptanmamıştır. 12. ve 24. saatlerdeki CD19 ekspresyon azalması tapsigargin muamelesi ile oluşturulan ER stresinde daha açık bir değışiklikle azalma şeklinde görölmektedir. Bu sonuç CD19 yüzey molekül ekspresyonunun ER stresinden etkilendiğini göstermektedir.

- **HLA-DR ifadesi**

B hücreleri yüzeyinde bulunana HLA-DR molekülü sınıf-II MHC molekülleri içinde değışlendirilen aynı zamanda B hücre aktivasyonunu gösteren bir moleküldür. Tüm HLA molekülleri gibi ER'de sentezlenip sunulacak peptid yapılı antijen ile birleşip hücre yüzeyinde ifadenmektedir. Çalışmanın sonuçları değışlendirildiğinde ER stresi amacıyla tapsigargin uygulanan hücrelerde HLA-DR ekspresyonunun tapsigarginine bağılı belirgin olarak azaldığı saptanmıştır. Bu etki 3. ve 12. saatlerde daha belirgin olup 24. saatteki HLA-DR ekspresyonundaki azalmanın daha az olduğu saptanmıştır. 24. saatteki azalmanın tapsigargin etkisinin azalmasıyla birlikte oluşabileceğı değışlendirilmiştir.

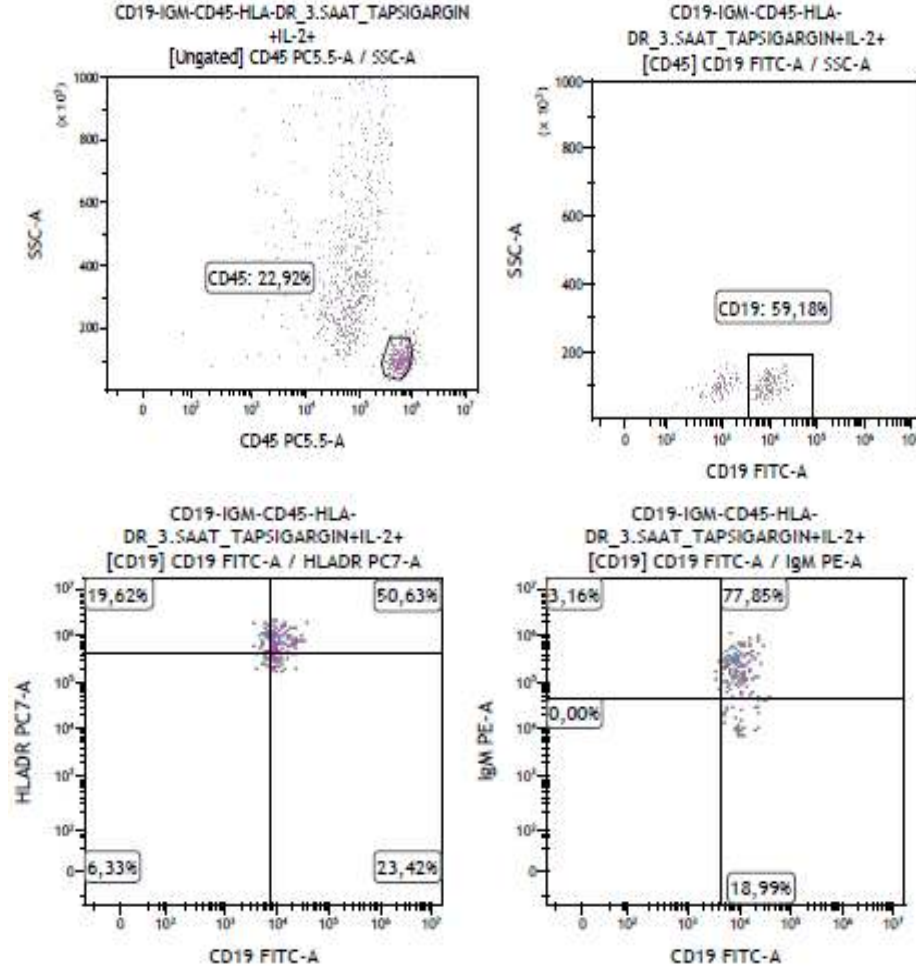
- **CD40 ifadesi**

B lenfositlerin yüzeyinde eksprese eden CD40 hücre yüzey molekülünde zamana ve tapsigarginine bağılı bir değışiklik oluşmamıştır. Bu sonuçlar CD40 yüzey molekülünün de CD45 ve CD19 gibi tapsigarginle oluşturulan ER stresinden etkilenmediğini göstermektedir.

16.2.Örnek 1 ve Örnek 2'ye Ait B Hücre Yüzeyindeki HLA-DR ve IGM Ekspresyonu

Tablo 16.3. Örnek 1'e ait B hücre yüzeyindeki HLA-DR ve IgM ekspresyonu

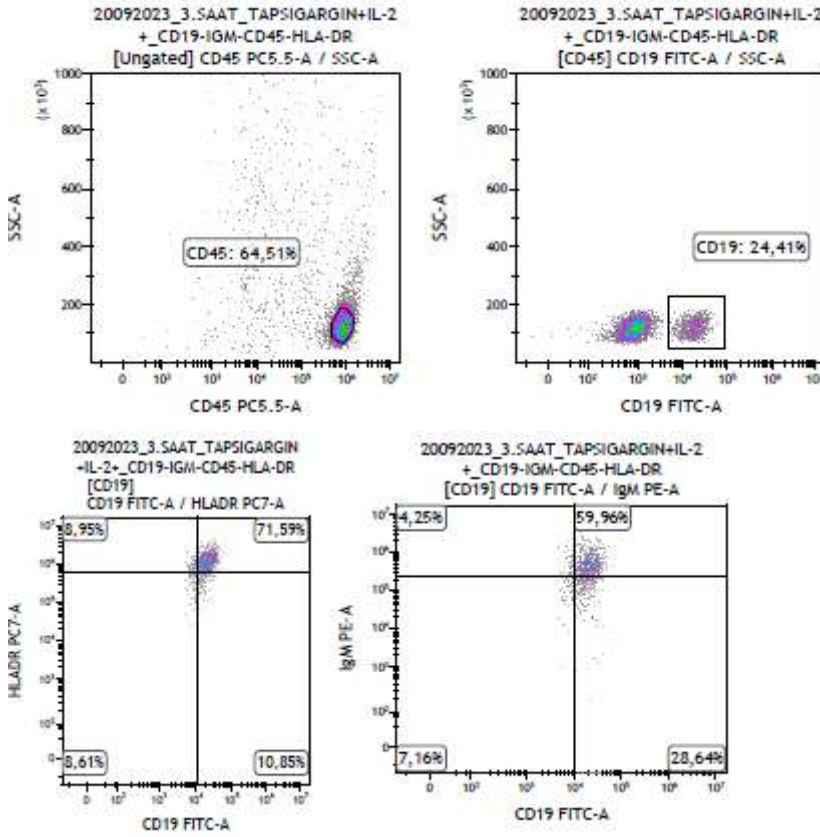
ZAMAN	MUAMELE	CD45	CD19	CD19+ HLA-DR	CD19+ IGM
0. SAAT	—	79,08%	99,50%	95,81%	78,36%
3. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	37,42%	67,45%	95,56%	74,60%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	37,61%	60,16%	96,54%	77,06%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	35,75%	64,10%	40,60%	79,32%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	22,92%	59,18%	50,63%	77,85%
12. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	28,60%	77,40%	90,79%	67,38%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	14,63%	77,18%	84,95%	69,89%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	18,34%	46,67%	34,76%	72,38%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	15,55%	67,20%	32,14%	71,83%
24. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	18,02%	53,93%	90,28%	74,31%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	14,65%	80,33%	91,55%	76,68%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	22,10%	46,10%	80,18%	71,27%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	28,98%	43,73%	87,23%	59,03%



Resim 16.3. Örnek 1'e ait B hücrelerde HLA-DR ve IgM ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü

Tablo 16.4. Örnek 2'ye ait B hücre yüzeyindeki HLA-DR ve IgM ekspresyonu

ZAMAN	MUAMELE	CD45	CD19	CD19+ HLA-DR	CD19+ IGM
0. SAAT	—	74,40%	99,62%	94,87%	80,90%
3. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	70,26%	19,77%	76,24%	71,94%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	76,67%	17,48%	76,41%	72,48%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	69,92%	15,29%	77,68%	71,95%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	64,51%	24,41%	71,58%	59,95%
12. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	30,46%	36,63%	79,75%	76,69%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	50,05%	52,22%	85,63%	76,18%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	42,14%	84,76%	27,83%	77,79%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	32,78%	60,21%	39,80%	78,12%
24. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	75,69%	20,90%	81,90%	69,64%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	63,66%	20,98%	83,34%	77,79%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	73,57%	20,40%	82,81%	70,48%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	57,60%	15,02%	77,30%	65,47%



Resim 16.4. Örnek 2'ye ait B hücrelerde HLA-DR ve IgM ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü

- **IgM ifadesi**

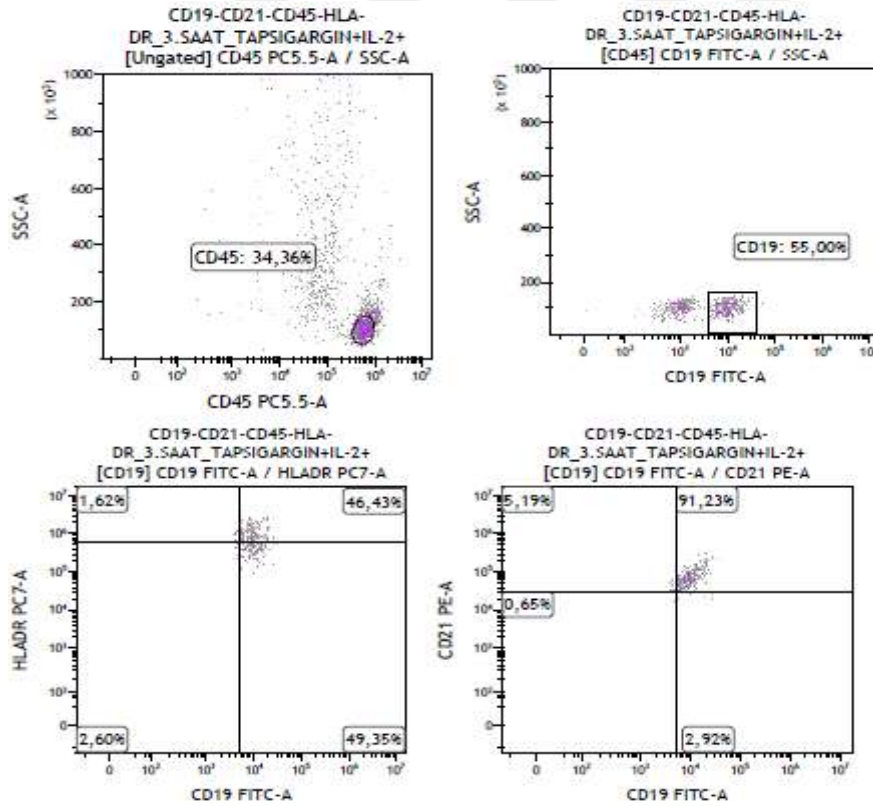
B lenfositlerin yüzeyinde eksprese eden IgM, naif B hücrelerin yüzeyinde eksprese eden B hücrelerinin de belirlenmesinde de önemli olan bir yüzey belirteçidir. IgM ekspresyonunun da zamana ve tapsigargine bağlı bir değişiklik göstermediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar IgM yüzey molekülünün de CD45 ve CD19 gibi tapsigarginle oluşturulan ER

stresinden etkilenmediğini göstermektedir. 24. saatte oluşan azalmanın tapsigarginle oluşturulan ER stresinden bağımsız olabileceği değerlendirilmiştir.

16.3.Örnek 1 ve Örnek 2'ye Ait B Hücre Yüzeyindeki HLA-DR ve CD21 Ekspresyonu

Tablo 16.5. Örnek 1'e ait B hücre yüzeyindeki HLA-DR ve CD21 ekspresyonu

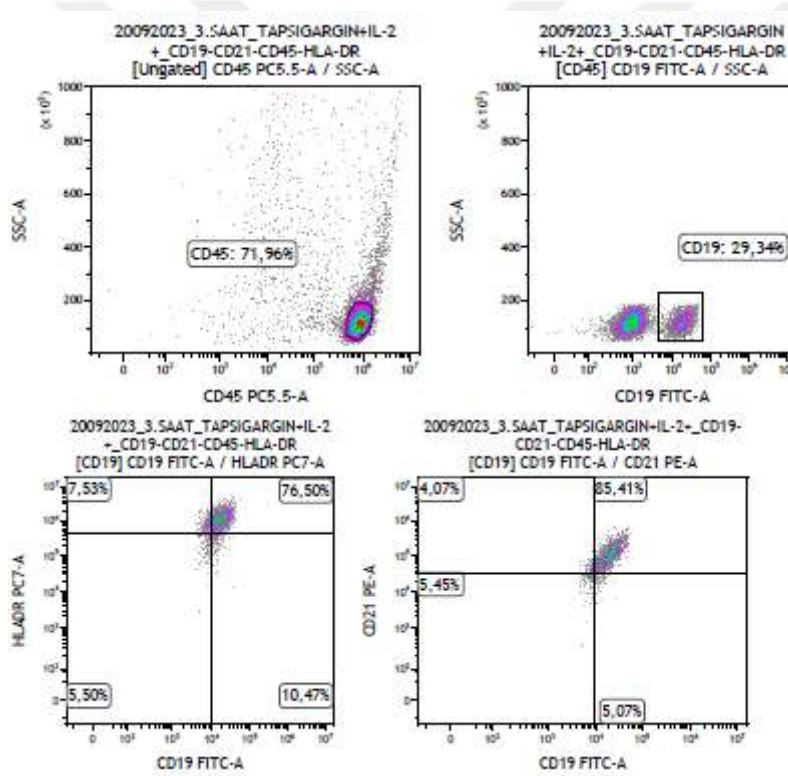
ZAMAN	MUAMELE	CD45	CD19	CD19+ HLA-DR	CD19+ CD21
0. SAAT	—	65,32%	99,90%	93,31%	97,07%
3. SAAT	TAPSIGARGIN(-) IL-2(-)	43,71%	66,57%	93,64%	94,70%
	TAPSIGARGIN(-) IL-2(+)	33,76%	64,47%	94,88%	95,67%
	TAPSIGARGIN(+) IL-2(-)	44,30%	51,07%	48,56%	93,96%
	TAPSIGARGIN(+) IL-2(+)	34,36%	55%	46,43%	91,23%
12. SAAT	TAPSIGARGIN(-) IL-2(-)	22,28%	80,22%	85,79%	94,18%
	TAPSIGARGIN(-) IL-2(+)	17,46%	79,16%	91,12%	88,76%
	TAPSIGARGIN(+) IL-2(-)	11,86%	56,67%	40,34%	84,03%
	TAPSIGARGIN(+) IL-2(+)	7,66%	52,59%	39,34%	90,16%
24. SAAT	TAPSIGARGIN(-) IL-2(-)	16,37%	59,68%	90,18%	95,68%
	TAPSIGARGIN(-) IL-2(+)	14,38%	72,56%	93,29%	95,41%
	TAPSIGARGIN(+) IL-2(-)	19,12%	49,83%	85%	81,36%
	TAPSIGARGIN(+) IL-2(+)	18,03%	57,19%	83,43%	57,19%



Resim 16.5. Örnek 1'e ait B hücrelerde HLA-DR ve CD21 ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü

Tablo 16.6. Örnek 2'ye ait B hücre yüzeyindeki HLA-DR ve CD21 ekspresyonu

ZAMAN	MUAMELE	CD45	CD19	CD19+ HLA-DR	CD19+ CD21
0. SAAT	—	69,28%	98,43%	92,23%	93,05%
3. SAAT	TAPSiGARGİN(-) IL-2(-)	70,67%	24,88%	71,41%	90,03%
	TAPSiGARGİN(-) IL-2(+)	73,04%	17,05%	77,78%	92,41%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	66,74%	24,19%	73,46%	76,69%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	71,96%	29,34%	76,50%	85,41%
12. SAAT	TAPSiGARGİN(-) IL-2(-)	51,27%	24,29%	89,26%	92,95%
	TAPSiGARGİN(-) IL-2(+)	49,70%	46,06%	88,44%	92,71%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	40,08%	88,02%	24,09%	91,09%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	X	X	X	X
24. SAAT	TAPSiGARGİN(-) IL-2(-)	73,80%	17,15%	76,94%	92,97%
	TAPSiGARGİN(-) IL-2(+)	50,09%	12,66%	73,51%	90,75%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	69,07%	17,29%	80,34%	76,01%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	52,94%	18,89%	71,76%	76,74%



Resim 16.6. Örnek 2'ye ait B hücrelerde HLA-DR ve CD21 ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü

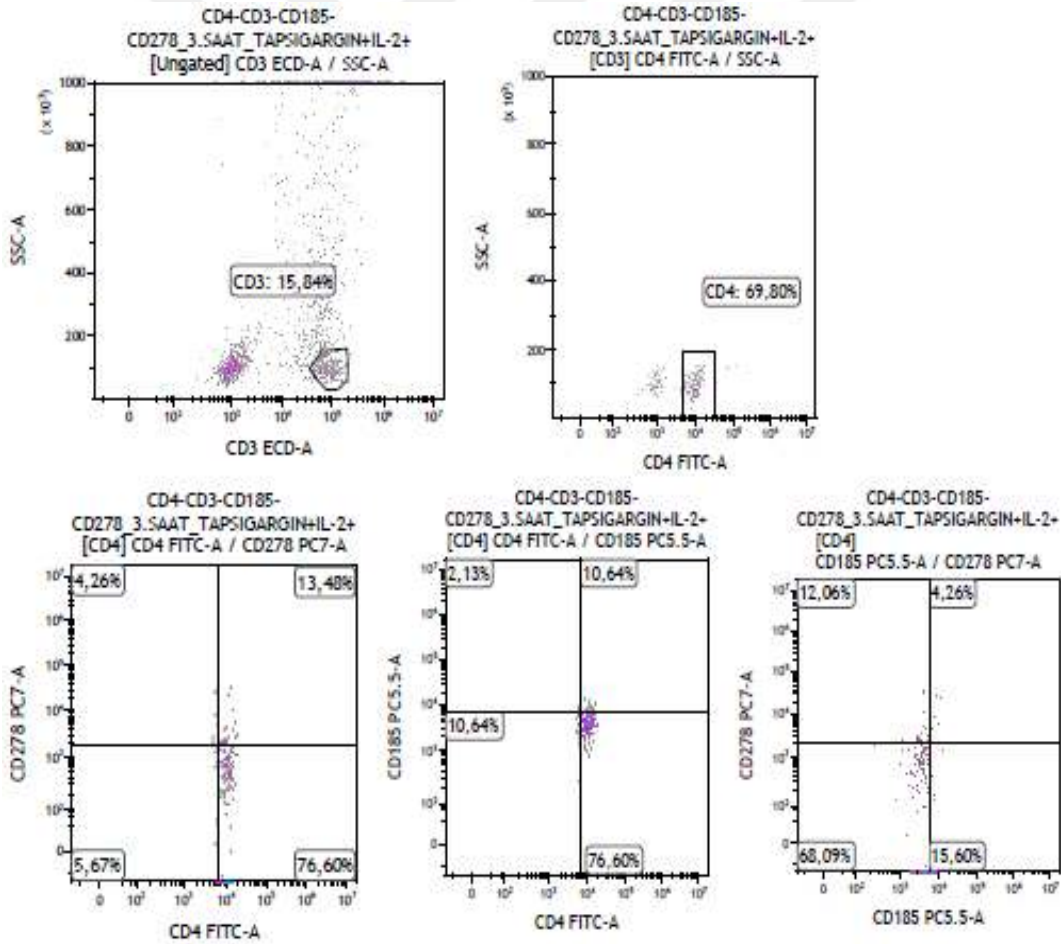
- **CD21 ifadesi**

B lenfositlerin yüzeyinde eksprese eden CD 21 hücre yüzey molekülünde zamana ve tapsigargine bağlı bir değişiklik oluşmamıştır. Bu sonuçlar CD21 yüzey molekülünün de CD45 gibi tapsigarginle oluşturulan ER stresinden etkilenmediğini göstermektedir.

16.4.Örnek 1 ve Örnek 2'ye Ait T Hücre Yüzeyindeki CXCR5 ve ICOS Ekspresyonu

Tablo 16.7. Örnek 1'e ait T hücre yüzeyindeki CXCR5 ve ICOS ekspresyonu

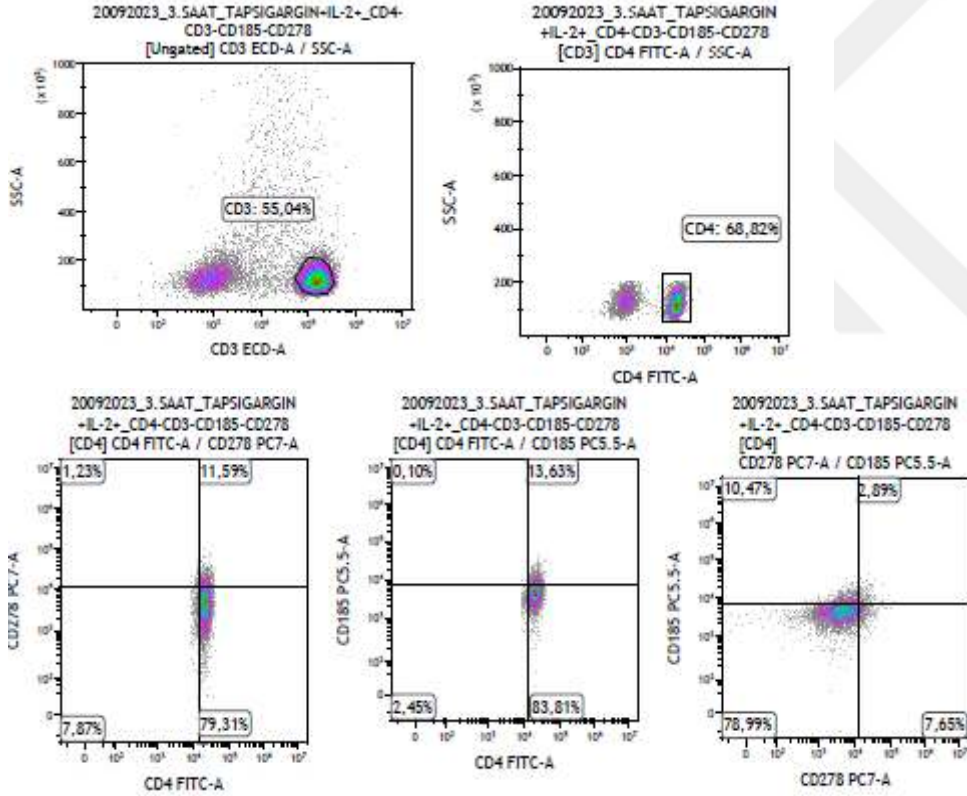
ZAMAN	MUAMELE	CD3	CD4	CD4+ CXCR5	CD4+ ICOS	CD4+ CXCR5+ ICOS+
0. SAAT	—	58,20 %	68,52 %	7,63 %	12,93 %	2,34 %
3. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	6,02 %	58,46 %	13,16 %	21,05 %	5,26 %
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	15,15 %	58,93 %	12,12 %	19,19 %	6,06 %
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	15,98 %	70,69 %	9,27 %	6,83 %	1,46 %
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	15,84 %	69,80 %	10,64 %	13,48 %	4,26 %
12. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	5,89 %	55,19 %	23,31 %	11,28 %	3,76 %
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	4,64 %	68,59 %	34,58 %	12,15 %	5,61 %
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	14,82 %	32,11 %	7,29 %	17,71 %	3,13 %
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	8,74 %	61,45 %	6,86 %	12,75 %	2,94 %
24. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	5,25 %	66,89 %	32,35 %	14,22 %	6,86 %
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	4,12 %	78,46 %	45,10 %	15,69 %	1,96 %
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	12,38 %	77,24 %	23,57 %	13,12 %	7,22 %
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	9,08 %	77,73 %	14,04 %	30,90 %	11,24 %



Resim 16.7. Örnek 1'e ait T hücrelerde CXCR5 ve ICOS ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü

Tablo 16.8. Örnek 2'ye ait T hücre yüzeyindeki CXCR5 ve ICOS ekspresyonu

ZAMA N	MUAMELE	CD3	CD4	CD4+ CXCR5	CD4+ ICOS	CD4+ CXCR5+ ICOS+
0. SAAT	—	81,64%	61,35%	5,05%	14,63%	1,76%
3. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	55,57%	69,42%	12,51%	25,49%	5,59%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	59,59%	69,47%	9,21%	20,57%	4,51%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	53,48%	73,61%	11,85%	19,31%	5,43%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	55,04%	68,82%	13,63%	11,59%	2,89%
12. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	15,49%	74,55%	9,58%	14,37%	4,19%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	18,65%	73,50%	8,39%	15,65%	4,76%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	4,50%	67,54%	5,52%	16,02%	4,42%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	12,70%	75,32%	7,62%	12,96%	8,47%
24. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	42,27%	72,98%	38,85%	12,96%	8,71%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	48,10%	72,18%	35,82%	14,02%	4,75%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	51,60%	71,67%	19,12%	11,28%	3,89%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	46,14%	75,01%	20,35%	8,77%	3,48%



Resim 16.8. Örnek 2'ye ait T hücrelerde CXCR5 ve ICOS ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü

- **CD3 ifadesi**

T hücre yüzeyinde ifadelenen CD3 yüzey molekülünün, tapsigargin etkisinden ve zamandan bağımsız olarak bir ekspresyon değişikliği göstermediği saptanmıştır. Bu sonuçlar tüm T lenfositler için ortak yüzey belirteci olarak kullanılan CD3 yüzey molekülünün ekspresyonunun ER stresinden etkilenmediğini göstermektedir.

- **CD4 ifadesi**

T hücre yüzeyinde ifadelenen CD4 yüzey molekülünün, taptigargin etkisinden ve zamandan bağımsız olarak bir ekspresyon değişikliği göstermediği saptanmıştır. Bu sonuçlar tüm Tyardımcı lenfositler için ortak yüzey belirteci olarak kullanılan CD4 yüzey molekülünün ekspresyonunun ER stresinden etkilenmediğini göstermektedir.

- **CD185 ifadesi (CXCR5)**

T hücreleri yüzeyinde bulunana CXCR5 molekülü kemotaktik etki içinde değerlendirilen aynı zamanda foliküler B hücre ile T hücrelerin ilişkisini destekleyen kemotaktik etki gösteren bir moleküldür. Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde ER stresi amacıyla taptigargin uygulanan B hücrelerle birlikte kültüre edilen T hücrelerin yüzeylerinde CXCR5 ekspresyonunun belirgin olarak azaldığı saptanmıştır. Bu etki 12. Ve24. saatlerde daha belirgindir. Çalışmanın sonuçları B hücrelerin yüzeyindeki HLA-DR ekspresyonuna benzer şekilde foliküler T hücrelerin yüzeyinde CXCR5 ekspresyonunun azalmasını göstermektedir.

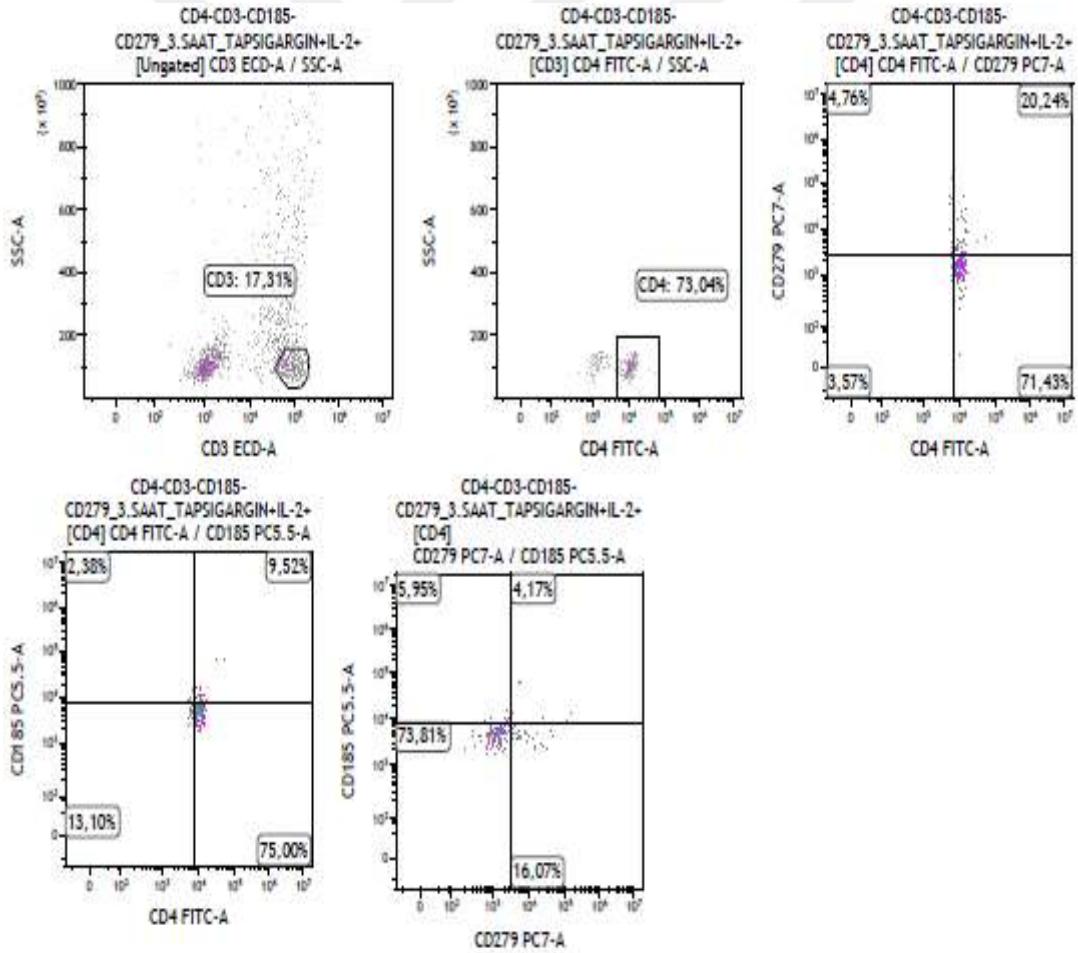
- **CD278 ifadesi (ICOS)**

T hücre yüzeyinde ifadelenen CD278 yüzey molekülünün, taptigargin etkisinden ve zamandan bağımsız olarak bir ekspresyon değişikliği göstermediği saptanmıştır. Bu sonuçlar foliküler T lenfositler için ortak yüzey belirteci olarak kullanılan CD278 yüzey molekülünün ekspresyonunun ER stresin etkisindeki foliküler B hücre kokültüründe etkilenmediğini göstermektedir.

16.5.Örnek 1 ve Örnek 2'ye Ait T Hücre Yüzeyindeki CXCR5 ve PD-1 Ekspresyonu

Tablo 16.10. Örnek 1'e ait T hücre yüzeyindeki CXCR5 ve PD-1 ekspresyonu

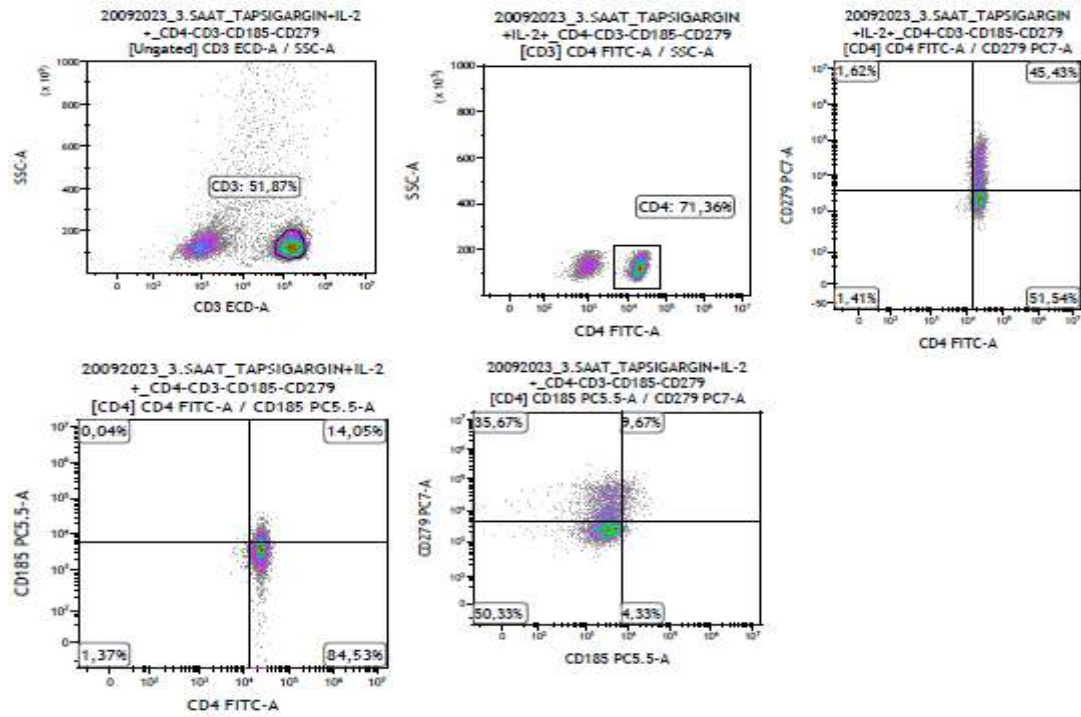
ZAMAN	MUAMELE	CD3	CD4	CD4+ CXCR5	CD4+ PD-1	CD4+ CXCR5+ PD-1+
0. SAAT	—	51,65%	74,73%	4,52%	17,38%	1,67%
3. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	7,09%	69,23%	9,52%	19,05%	1,59%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	13,57%	62,33%	12,09%	17,58%	3,30%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	15,64%	70,22%	4%	20%	2,40%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	17,31%	73,04%	9,52%	20,24%	4,17%
12. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	7,29%	70,26%	22,22%	18,52%	10,58%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	4,97%	76,84%	37,67%	15,07%	10,27%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	3,38%	74%	8,11%	29,73%	2,70%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	9,34%	56,44%	8,77%	26,32%	5,26%
24. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	6,45%	86,30%	30,16%	32,54%	19,84%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	5,71%	72,09%	45,97%	18,55%	8,06%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	11,24%	83,33%	21,84%	25,26%	13,16%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	9,87%	69,32%	14,94%	34,48%	6,90%



Resim 16.9. Örnek 1'e ait T hücrelerde CXCR5 ve PD-1 ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü

Tablo 16.10. Örnek 2'ye ait T hücre yüzeyindeki CXCR5 ve PD-1 ekspresyonu

ZAMAN	MUAMELE	CD3	CD4	CD4+ CXCR5	CD4+ PD-1	CD4+ CXCR5+ PD-1+
0. SAAT	–	76,79%	60,45%	6,96%	35,57%	3,21%
3. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	60,63%	69,31%	8,02%	42,92%	6,08%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	59,07%	70,74%	8,27%	41,58%	6,01%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	60,77%	71,62%	12,18%	39,93%	8,29%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	51,87%	71,36%	14,05%	45,43%	9,67%
12. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	34,40%	70,49%	10,70%	16,90%	8,84%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	13,07%	65,87%	9,78%	18,12%	6,88%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	4,53%	69,26%	13,27%	28,57%	7,14%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	9,45%	73,21%	7,23%	15,74%	3,83%
24. SAAT	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(-)	54,86%	70,36%	40,28%	48,88%	23,45%
	TAPSiGARGİN(-)- IL-2(+)	51,04%	73,68%	39,30%	44,98%	27,13%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(-)	53,12%	73,40%	18,63%	47,14%	15,50%
	TAPSiGARGİN(+)- IL-2(+)	45,80%	74,45%	18,37%	52,77%	15,91%



Resim 16.10. Örnek 2'ye ait T hücrelerde CXCR5 ve PD-1 ekspresyonu analizi akımsitometri görüntüsü

- **CD279 ifadesi (PD1)**

T hücreleri yüzeyinde bulunana CD279 ifadesi (PD-1) molekülü hücre ölümü ile ilgili değerlendirilen aynı zamanda foliküler B hücre ile T hücrelerin ilişkisini de destekleyen bir moleküldür. Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde ER stresi amacıyla tapsigargin uygulanan folüküler B hücrelerle birlikte kültüre edilen T hücrelerin yüzeylerinde CD279 ifadesi (PD1) ekspresyonunda belirgin değişiklik olmadığını göstermiştir.

17.TARTIŞMA

Çalışmamızda iki farklı donöre ait dalak örneğinden izole edilen lenfositlerden B hücre popülasyonunda ER stresi indükleyerek, daha sonra diğer izole ettiğimiz T-lenfositlerle ko-kültür yaptık. Farklı B hücre popülasyonlarını tespit etmek amacıyla monoklonal antikorlar kullanıldı. Bunlardan CD45; CD19; HLA-DR ve CD40 ifade eden B hücrelerini aktif B hücre popülasyonu olarak belirledik. CD19 monoklonal antikorları B hücrelerini belirlemek için kullandık. CD40 molekülleri aktif B hücreler yüzeyinde ifade olduğu için, bu hücreleri tespit etmemiz için kullanıldı. HLA-DR molekülleri aktif B hücre yüzeyinde daha çok ifade olduğundan yukarıda söylenilen monoklonal antikorların tümünü kullanarak aktif B hücre popülasyonunu tespit ettik. Bu hücre popülasyonunda TG uygulanan örneklerde CD40 ifadesinin HLA-DR molekülüyle kıyasla daha az ifade değişimine maruz kaldığını gözlemledik. Daha önce yapılan ön çalışmalarıda göz önüne aldığımızda, HLA-DR belirteçlerin TG uygulanan dalak folikular B hücreler yüzeyinde ifadesinin azaldığını görmüş olduk [78-80]. Bu ifade artımını HLA-DR molekülünün ER içinde ayrı parçalar olarak toplandığını ve ER stress durumunda bu sürecin bozulması HLA-DR ifadesinin azalmasına neden olur. HLA-DR ifadesini CD40 ifadesiyle kıyasladığımızda, HLA-DR ifadesinin daha anlamlı şekilde değiştiğini gördük. Bu da HLA-DR'ın farklı yolla hücre yüzeyine ekspresyon olduğundan bize haber veriyor [81]. Diğer monoklonal antikorlar yardımıyla tespit olunan B hücre popülasyonu CD45+ CD19+ HLA-DR+ CD21+ oldu. CD21 molekülü genelde tükenmiş B hücre popülasyonu üzerinde ifade olunur. Biliyoruz ki, CD21 molekülü kompleman sisteminin alt komponenti için reseptör rolünü oynar aynı zamanda Epstein-Barr virüsü CD21 molekülünü kullanarak B hücre içine istila eder [82-83]. ER stres indüklenmiş B lenfositler yüzeyinde CD21 ekspresyonunun azalması bu iki önemli durumda rol oynayabileceğinden bize haber verir. Bu hücre popülasyonunda da yine HLA-DR moleküllerinin ifadesinin TG uygulanmasına bağlı olarak azaldığını gözlemledik, ve bu sonuç bize HLA-DR'in TG'bağlı değişime uğraması bilgisini daha da kuvvetlendirdi.

Diğer monoklonal antikor IgM, diğer monoklonal antikorlarla beraber CD45+ CD19+ HLA-DR+ IgM+ popülasyonunun tespiti için kullanıldı. IgM ifadesinin TG etkisinden dolayı azaldığını gözlemledik. IL-2'nin lenfositlerin proliferasyonu ve aktivasyonunda rol oynadığını biliyoruz. IL-2 uygulanan bazı örneklerde ER stres indüklenen B-lenfosit sayısının azalmasını önlemediğini gözlemledik. Ayrıca IL-2 uygulanmayan örneklerde hücrelerin zamana bağlı ölümünün artmasını gördük [84-85].

B lenfositlerle ko-kültür yapılan T lenfositleri incelendiğinde, TG uygulanan B lenfositlerin T lenfositler üzerinde etki gösterdiğini gözlemledik. Bu amaçla önce CD3; CD4; CD185; CD278; CD279 monoklonal antikoları kullanarak T lenfositlerin iki popülasyonunu tespit ettik. Biri CD3+ CD4 + CD185 + CD278+ diğeri ise CD3+ CD4 + CD185 + CD279+ oldu. CD185 monoklonal antikolar foliklular T lenfositlerin tespiti için kullanıldı. CD185 molekülünün kemotaksis için önemli rol oynadığını biliyoruz [86]. IL-2 uygulanan örneklerde CD185 ifadesinin arttığını gözlemledik, bu da IL-2'nin kemotaktik etkinin artmasına neden olduğunu gösterdi. CD278 molekülleri aktif T hücreler yüzeyinde ifade olunur[87]. CD279 molekülleri ise tükenmiş T hücreler yüzeyinde ifade olunur. ER stress indüklenmiş B hücrelerle ko-kültür yapılan T hücreler yüzeyinde zamanla arttığı saptandı. IL-2 uygulanmayan örneklerde de CD279 ifadesinin arttığı saptandı [88-89]. Yine ER stress indüklenmiş B hücrelerle ko-kültür sonucu olarak bu molekül ifadesinin arttığını gördük. Bu da yine hücre tükenmesinden ve hücre ölümünün artmasını göstermiş oldu.

UPR'in iyi ve zararlı etkileri arasında bir denge oluşturmak önemlidir. ER stresinin hücre popülasyonuna özgü hedeflenmesinin gerçekleştirilmesinde göz önüne alınmalıdır. Örneğin, son CD21'le ilgili verdiğimizde bu molekülün özellikle B hücre yüzeyinde eksprese olduğunu ve bu molekülle ilgili 2 önemli bilgiyi hatırlatmış olduk. İmmün hücrelerin aktivasyonunu, farklılaşmasını, işlevini ve tükenmesini kontrol etmede ER stresinin ortaya çıkan rolü daha sonra bu hücrelerle ilişkili hastalıkların tedavisinde, örneğin immünoterapide rol oynayabilir. HLA-DR'ların Transplanasyon immünolojisinde önemli rol oynadığını bilerek, ER stresin bu belirtecin ifadesine etkisi ile ilgili bilgileri ve verileri daha sonra Organ naklinin rejeksiyon reaksiyonlarının önlenmesinde kullanabileceğimizi gösterir. Son çalışmalar, UPR sensörlerinin, T hücreleri, B hücreleri, DC'ler, makrofajlar dahil olmak üzere çoklu immün hücre tiplerinin gelişimini, farklılaşmasını, aktivasyonunu, sitokin üretimini ve apoptozunu düzenlemede rol oynadığını göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Paul, W.E. (ed): Fundamental Immunology, 7th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
2. Du Pasquier, A. L., and M. F. Flajnik. 2004. Evolution of the immune system. In: Fundamental Immunology, 5th ed., W. E. Paul, ed. Lippincott-Raven, Philadelphia.
3. Murphy K, Weaver C (2017) Janeway's immunobiology, 9th edn. Garland Press, New York
4. Punt J, Stranford SA, Jones PP, Owen JA (2019) Kuby immunology, 8th edn. W.H. Freeman and Company, New York. Chapter 20, Antigen-Antibody Interactions.
5. Simon AK, Hollander GA, McMichael A (2015) Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. Proc R Soc B 282:20143085
6. Cesta MF (2006) Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. Toxicol Pathol 34:599–608
7. Pearse G (2006) Normal structure, function and histology of the thymus. Toxicol Pathol 34:504–514
8. Mebius, R.E.: Organogenesis of lymphoid tissues. Nat. Rev. Immunol. 2003, 3:292–303.
9. Li, L., Wu, J., Abdi, R., Jewell, C. M., & Bromberg, J. S. (2021). Lymph node fibroblastic reticular cells steer immune responses. Trends in Immunology, 42(8), 723–734. doi:10.1016/j.it.2021.06.006
10. Picker, L. J., and M. H. Siegelman. 1999. Lymphoid tissues and organs. In Fundamental Immunology, 4th ed. W. E. Paul, ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 145.
11. Mebius, R. E., and G. Kraal. 2005. Structure and function of the spleen. Nature Reviews Immunology 5:606.
12. Cesta MF (2006) Normal structure, function, and histology of the spleen. Toxicol Pathol 34:455–465
13. Mescher L (2018) Junqueira's basic histology text and atlas, 15th edn. McGraw Hill Lange
14. Carsten Carlberg, Eunike Velleuer. Molecular Immunology. How Science Works. Springer Nature Switzerland AG 2022, XV; 219. doi.org/10.1007/978-3-031-04025-2
15. Klimov, V. V. (2019). From Basic to Clinical Immunology. doi:10.1007/978-3-030-03323-1
16. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Cellular and Molecular

Immunology. 10th Edition - February 19, 2021

17. von Andrian, U.H., and Mempel, T.R.: Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* 2003, 3:867–878.
18. Wu, B., Zhao, L., & Zhang, X. (2019). CXCR4 and CXCR5 orchestrate dynamic germinal center reactions and may contribute to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Cellular & Molecular Immunology*. doi:10.1038/s41423-019-0244-y
19. Qin, L., Waseem, T. C., Sahoo, A., Bieerkehazhi, S., Zhou, H., Galkina, E. V., & Nurieva, R. (2018). Insights Into the Molecular Mechanisms of T Follicular Helper-Mediated Immunity and Pathology. *Frontiers in Immunology*, 9. doi:10.3389/fimmu.2018.01884
20. Schroeder AR, Zhu F, Hu H. Stepwise Tfh cell differentiation revisited: new advances and long-standing questions. *Fac Rev.* 2021;10:3. doi: 10.12703/r/10-3. Epub 2021 Jan 15. PMID: 33644779; PMCID: PMC7894273.
21. Vinuesa, C. G., Linterman, M. A., Yu, D., & MacLennan, I. C. M. (2016). Follicular Helper T Cells. *Annual Review of Immunology*, 34(1), 335–368. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055605
22. Panneton, V., Chang, J., Witalis, M., Li, J., & Suh, W. (2019). Inducible T- cell co- stimulator: Signaling mechanisms in T follicular helper cells and beyond. *Immunological Reviews*, 291(1), 91–103. doi:10.1111/imr.12771
23. Ji LS, Sun XH, Zhang X, et al. Mechanism of Follicular Helper T Cell Differentiation Regulated by Transcription Factors. *Journal of Immunology Research*. 2020;2020:1826587. DOI: 10.1155/2020/1826587. PMID: 32766317; PMCID: PMC7387970.
24. Juno JA, Hill DL. T follicular helper cells and their impact on humoral responses during pathogen and vaccine challenge. *Curr Opin Immunol.* 2022 Feb;74:112-117. doi: 10.1016/j.coi.2021.11.004. Epub 2021 Nov 30. PMID: 34861545.
25. Song, W., & Craft, J. (2019). T follicular helper cell heterogeneity: Time, space, and function. *Immunological Reviews*, 288(1), 85–96. doi:10.1111/imr.12740
26. Fahlquist Hagert, C., & Degn, S. E. (2020). T follicular regulatory cells: guardians of the germinal center? *Scandinavian Journal of Immunology*. doi:10.1111/sji.12942
27. Fahlquist Hagert, C., & Degn, S. E. (2020). T follicular regulatory cells: guardians of the germinal center? *Scandinavian Journal of Immunology*. doi:10.1111/sji.12942
28. Qiang Chen; Alexander L. Dent. Nonbinary Roles for T Follicular Helper Cells and T Follicular Regulatory Cells in the Germinal Center Response. *J Immunol* (2023) 211 (1):

15–22.

29. Wallin, E. F. (2018). T follicular regulatory cells and antibody responses in transplantation. *Transplantation*, 1. doi:10.1097/tp.

30. Cyster, J. G. (2010). B cell follicles and antigen encounters of the third kind. *Nature Immunology*, 11(11), 989–996. doi:10.1038/ni.1946

31. Kurosaki, T., H. Shinohara, and Y. Baba. 2010. B cell signaling and fate decision. *Annual Review of Immunology* 28:21.

32. Somasundaram, R., M. A. J. Prasad, J. Ungerback, and M. Sigvardsson. 2016. Transcription factor networks in B-cell differentiation link development to acute lymphoid leukemia. *Blood* 126:144.

33. Cerutti, A., M. Cols, and I. Puga. 2013. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature Reviews Immunology* 13:118.

34. Kuka, M., & Iannacone, M. (2017). Viral subversion of B cell responses within secondary lymphoid organs. *Nature Reviews Immunology*, 18(4), 255–265. doi:10.1038/nri.2017.133

35. Harwood, N. E., and F. D. Batista. 2010. Early events in B cell activation. *Annual Review of Immunology* 28:185.

36. Barrington, R.A., Zhang, M., Zhong, X., Jonsson, H., Holodick, N., Cherukuri, A., Pierce, S.K., Rothstein, T.L., and Carroll, M.C.: CD21/CD19 coreceptor signaling promotes B cell survival during primary immune responses. *J. Immunol.* 2005, 175:2859–2867

37. Kerfoot, S. M., et al. 2011. Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* 34:947.

38. 10-6 The second phase of a primary B-cell immune response occurs when activated B cells migrate into follicles and proliferate to form germinal centers.

39. Roco, J.A., Mesin, L., Binder, S.C., Nefzger, C., Gonzalez-Figueroa, P., Canete, P.F., Ellyard, J., Shen, Q., Robert, P.A., Cappello, J., et al.: Class-switch recombination occurs infrequently in germinal centers. *Immunity* 2019, 51:337–350

40. Arulraj, T., Binder, S. C., Robert, P. A., & Meyer-Hermann, M. (2021). Germinal Centre Shutdown. *Frontiers in immunology*, 12, 705240. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.705240>

41. Bannard, O., and Cyster, J.G.: Germinal centers: programmed for affinity maturation and antibody diversification. *Curr. Opin. Immunol.* 2017, 45:21–30.

42. Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T.:

Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000, 102:553–563

43. Attaf, N., Baaklini, S., Binet, L., & Milpied, P. (2021). Heterogeneity of germinal center B cells: New insights from single- cell studies. *European Journal of Immunology*. doi:10.1002/eji.202149235

44. Kennedy DE, Clark MR. Compartments and Connections Within the Germinal Center. *Front Immunol*. 2021 Mar 31;12:659151. doi: 10.3389/fimmu.2021.659151. PMID: 33868306; PMCID: PMC8045557.

45. Ersching, J., Efeyan, A., Mesin, L., Jacobsen, J. T., Pasqual, G., Grabiner, B. C., ... Victora, G. D. (2017). Germinal Center Selection and Affinity Maturation Require Dynamic Regulation of mTORC1 Kinase. *Immunity*, 46(6), 1045–1058.e6. doi:10.1016/j.immuni.2017.06.005

46. Son, Y. M., Cheon, I. S., Goplen, N. P., Dent, A. L., & Sun, J. (2020). Inhibition of Stearoyl- CoA desaturases suppresses follicular help T and germinal center B cell responses. *European Journal of Immunology*. doi:10.1002/eji.201948257

47. Crispin, J. C., and G. C. Tsokos. 2009. Transcriptional regulation of IL-2 in health and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 8:190

48. Bettigole, S. E., & Glimcher, L. H. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress in Immunity. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 107–138. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112116

49. So JS. Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Immune Responses. *Mol Cells*. 2018 Aug 31;41(8):705-716. doi: 10.14348/molcells.2018.0241. Epub 2018 Jul 30. Erratum in: *Mol Cells*. 2019 Jun 30;42(6):501. PMID: 30078231; PMCID: PMC6125421.

50. Marisa R., Andreia M., J.A.R., Evelina G., Philippe P. At the crossway of ER-stress and proinflammatory responses. *FEBS J*. 2018 doi: 10.1111/febs.14391.

51. Di Conza, G., & Ho, P.-C. (2020). ER Stress Responses: An Emerging Modulator for Innate Immunity. *Cells*, 9(3), 695. doi:10.3390/cells9030695

52. Cao S.S., Luo K.L., Shi L. Endoplasmic reticulum stress interacts with inflammation in human diseases. *J Cell Physiol*. 2016;231:288–294.

53. Bettigole S.E., Lis R., Adoro S., Lee A.-H., Spencer L.A., Weller P.F., Glimcher L.H. The transcription factor XBP1 is selectively required for eosinophil differentiation.

54. Li, A., Song, N.-J., Riesenberg, B. P., & Li, Z. (2020). The Emerging Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Balancing Immunity and Tolerance in Health and Diseases: Mechanisms and Opportunities. *Frontiers in Immunology*, 10.

doi:10.3389/fimmu.2019.03154

55. Song, M., & Cubillos-Ruiz, J. R. (2019). Endoplasmic Reticulum Stress Responses in Intratumoral Immune Cells: Implications for Cancer Immunotherapy. *Trends in Immunology*. doi:10.1016/j.it.2018.12.001
56. Unanue, E. R., Turk, V., & Neefjes, J. (2016). Variations in MHC Class II Antigen Processing and Presentation in Health and Disease. *Annual Review of Immunology*, 34(1), 265–297. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055420
57. Jurewicz, M. M., & Stern, L. J. (2018). Class II MHC antigen processing in immune tolerance and inflammation. *Immunogenetics*. doi:10.1007/s00251-018-1095-x
58. Temme, S., Temme, N., & Koch, N. (2019). Assembly, Intracellular Transport, and Release of MHC Class II Peptide Receptors. *Methods in Molecular Biology*, 297–314. doi:10.1007/978-1-4939-9450-2_22
59. Van Breemen C, Farinas BR, Casteels R, Gerba P, Wuytack F, Deth R (1973) Factors controlling cytoplasmic Ca²⁺ concentration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 265:57–71
60. Wedel B, Boyles RR, Putney JW, Bird GS (2007) Role of the store-operated calcium entry proteins, Stim1 and Orai1, in muscarinic-cholinergic receptor stimulated calcium oscillations in human embryonic kidney cells. *J Physiol* 579:679–689
61. Zweifach A, Lewis RS (1993) Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6295–6299
62. Hogan PG (2012) STIM1-ORAI1 store-operated calcium current. Chapter 6.24 in Egelman E (ed) *Comprehensive Biophysics*. Elsevier, Amsterdam, in press
63. Lepple-Wienhues A, Cahalan MD (1996) Conductance and permeation of monovalent cations through depletion-activated Ca²⁺ channels (ICRAC) in Jurkat T cells. *Biophys J* 71:787–794
64. Lewis RS, Cahalan MD (1989) Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T cells. *Cell Regul* 1:99–112
65. Kim HM, Do CH, Lee DH. Combined effects of multiple endoplasmic reticulum stresses on cytokine secretion in macrophage. *Biomol Ther (Seoul)*. 2012 May;20(3):346–51. doi: 10.4062/biomolther.2012.20.3.346. PMID: 24130934; PMCID: PMC3794534.
66. Lindner, P., Christensen, S. B., Nissen, P., Møller, J. V., & Engedal, N. (2020). Cell death induced by the ER stressor thapsigargin involves death receptor 5, a non-autophagic function of MAP1LC3B, and distinct contributions from unfolded protein response

- components. *Cell Communication and Signaling*, 18(1). doi:10.1186/s12964-019-0499-z
67. Kamiya, T., Hara, H., & Adachi, T. (2013). Effect of endoplasmic reticulum (ER) stress inducer thapsigargin on the expression of extracellular-superoxide dismutase in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 52(2), 101–105. doi:10.3164/jcbtn.12-46
68. Mendez, J. M., Kolora, L. D., Lemon, J. S., Dupree, S. L., & Keestra-Gounder, A. M. (2019). Activation of the endoplasmic reticulum stress response impacts the NOD1 signaling pathway. *Infection and Immunity*. doi:10.1128/iai.00826-18
69. Kim, J., Koo, B. K., & Knoblich, J. A. (2020). Human organoids: Model systems for human biology and medicine. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(10), 571–584.
70. Segeritz, C. P., & Vallier, L. (2017). Cell culture: Growing cells as model systems in vitro. In *Basic science methods for clinical researchers* (pp. 151–172). Academic.
71. Merten, O. W. (2015). Advances in cell culture: anchorage dependence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1661), 20140040.
72. Phelan, M. C. (2007). Techniques for mammalian cell tissue culture. *Current Protocols in Neuroscience*, 38(1), A–3B.
73. Malm, M., Saghaleyni, R., Lundqvist, M., Giudici, M., Chotteau, V., Field, R., et al. (2020). Evolution from adherent to suspension: Systems biology of HEK293 cell line development. *Scientific Reports*, 10.
74. Freshney, R. I. (1987). *Animal cell culture: A practical approach*. IRL Press.
75. Pegg, D. E. (2007). Principles of cryopreservation. *Methods in Molecular Biology*, 368, 39–57.
76. Ishizuka, Y., & Bramham, C. R. (2020). A simple DMSO-based method for cryopreservation of primary hippocampal and cortical neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 333, 108578. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2019.108578>
77. Yan, B.-C., Adachi, T., & Tsubata, T. (2008). ER stress is involved in B cell antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 365(1), 143–148. doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.137
78. Lanzi, G., Ferrari, S., Vihinen, M., Caraffi, S., Kutukculer, N., Schiaffonati, L., ... Giliani, S. (2010). Different molecular behavior of CD40 mutants causing hyper-IgM syndrome. *Blood*, 116(26), 5867–5874. doi:10.1182/blood-2010-03-274241
79. Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: an update Serge N. Manié, Justine Lebeau, and Eric Chevet *American Journal of Physiology-Cell*

80. Osorio, F., Lambrecht, B. N., & Janssens, S. (2018). Antigen presentation unfolded: identifying convergence points between the UPR and antigen presentation pathways. *Current Opinion in Immunology*, 52, 100–107. doi:10.1016/j.coi.2018.04.020
81. Turner, M. J., DeLay, M. L., Bai, S., Klenk, E., & Colbert, R. A. (2006). HLA-B27 up-regulation causes accumulation of misfolded heavy chains and correlates with the magnitude of the unfolded protein response in transgenic rats: Implications for the pathogenesis of spondylarthritis-like disease. *Arthritis & Rheumatism*, 56(1), 215–223. doi:10.1002/art.22295
82. Fischer, E. M. (1999). Expression of CD21 is developmentally regulated during thymic maturation of human T lymphocytes. *International Immunology*, 11(11), 1841–1849. doi:10.1093/intimm/11.11.1841
83. Masilamani, M., Kassahn, D., Mikkat, S., Glocker, M. O., & Illges, H. (2003). B cell activation leads to shedding of complement receptor type II (CR2/CD21). *European Journal of Immunology*, 33(9), 2391–2397.
84. Zhong, J. (2013). Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. *Type 1 Diabetes*. doi:10.5772/52644
85. Pelletier, N., Casamayor-Palleja, M., De Luca, K., Mondiere, P., Saltel, F., Jurdic, P., ... Defrance, T. (2006). The Endoplasmic Reticulum Is a Key Component of the Plasma Cell Death Pathway. *The Journal of Immunology*, 176(3), 1340–1347. doi:10.4049/jimmunol.176.3.1340
86. Sheikh, A. A., Cooper, L., Feng, M., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Lafouresse, F., Duckworth, B. C., ... Groom, J. R. (2019). Context-Dependent Role for T-bet in T Follicular Helper Differentiation and Germinal Center Function following Viral Infection. *Cell Reports*, 28(7), 1758–1772.e4. doi:10.1016/j.celrep.2019.07.034
87. Solinas, C., Gu-Trantien, C., & Willard-Gallo, K. (2020). The rationale behind targeting the ICOS-ICOS ligand costimulatory pathway in cancer immunotherapy. *ESMO Open*, 5(1), e000544. doi:10.1136/esmoopen-2019-000544
88. Chou CW, Yang RY, Chan LC, Li CF, Sun L, Lee HH, Lee PC, Sher YP, Ying H, Hung MC. The stabilization of PD-L1 by the endoplasmic reticulum stress protein GRP78 in triple-negative breast cancer. *Am J Cancer Res*. 2020 Aug 1;10(8):2621-2634. Erratum in: *Am J Cancer Res*. 2020 Oct 01;10(10):3507. PMID: 32905506; PMCID: PMC7471351.

89. Carter, L., Fouser, L., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Wood, C., Collins, M., Honjo, T., Freeman, G. and Carreno, B. (2002), PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4+ and CD8+ T cells and is overcome by IL-2. *Eur. J. Immunol.*, 32: 634-643. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200203\)32:3<634::AID-IMMU634>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200203)32:3<634::AID-IMMU634>3.0.CO;2-9)

