

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANA BİLİM DALI

**EPSTEIN-BARR VİRUS İLE ENFEKTE B LENFOSİTLERDE
İNSAN LÖKOSİT ANTİJEN-G EKSPRESYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ
Dr.Celalettin Öztuğ ÖNAL

Tez Danışmanı
Doç.Dr. Bilkay BAŞTÜRK

ANKARA
Temmuz, 2008

İÇİNDEKİLER

I.	GİRİŞ	1
II.	GENEL BİLGİLER	2
III.	GEREÇ ve YÖNTEM	12
IV.	BULGULAR	24
V.	TARTIŞMA	41
VI.	SONUÇ	45
VII.	TÜRKÇE ÖZET	46
VIII.	YABANCI DİLDE ÖZET	47
IX.	KAYNAKLAR	48
	ÖZGEÇMİŞ	55

EK 1:ETİK KURUL RAPORU

56

ŞEKİL1: Boyasız Periferik Kan Mononükleer Hücreler, akım sitometri histogramında lenfosit kapısında yer almaktadırlar.

24

ŞEKİL2: Periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonundan hemen sonra FITC ile işaretli anti-HLA-G monoklonal antikorla boyanmasını takiben, bu hücrelerin FL1 Log ekranında görünüşleri.

25

ŞEKİL3: Periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonundan hemen sonra PE ile işaretli anti-CD19 monoklonal antikorla boyanmasını takiben, FL2 Log ekranında görünüşleri.

25

ŞEKİL4: Periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonundan hemen sonra APC ile işaretli anti-CD5 monoklonal antikorla boyanmasını takiben, FL4 Log ekranında görünüşleri.

26

ŞEKİL5: 4 kadranlı histogramda periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonundan hemen sonra FITC ile işaretli anti-HLA-G monoklonal antikorla ve APC ile işaretli anti-CD5 monoklonal antikorla boyanmasını takiben görünüşleri. 26

ŞEKİL6: 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin EBV transfeksiyonuna ve/veya zamana bağlı HLA-G ekspresyonları. 27

ŞEKİL7: 2.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin EBV transfeksiyonuna ve/veya zamana bağlı HLA-G ekspresyonları. 27

27

GRAFİK 1: EBV transfeksiyonuna ve/veya zamana bağlı çözünür HLA-G seviyeleri. 28

ŞEKİL8: 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı CD5 ekspresyonları. 29

- ŞEKİL9:** 2.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı CD5 ekspresyonları. **29**
- ŞEKİL10:** 1.Grupa ait hücre kültürlerinden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı olarak aynı hücre yüzeyinde CD5 ve HLA-G ekspresyonları. **30**
- ŞEKİL11:** 2.Grupa ait hücre kültürlerinden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı olarak aynı hücre yüzeyinde CD5 ve HLA-G ekspresyonları. **30**
- ŞEKİL12:** CD5+HLA-G+ hücrelerin dağılımları. **31**
- ŞEKİL13:** 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı CD19 ekspresyonları. **32**
- ŞEKİL14:** 2.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı CD19 ekspresyonları. **32**
- ŞEKİL15:** 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı olarak aynı hücre yüzeyinde CD19 ve HLA-G ekspresyonları. **33**
- ŞEKİL16:** 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı olarak aynı hücre yüzeyinde CD19 ve HLA-G ekspresyonları. **33**
- ŞEKİL17:** 1. Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerden, CD2 + hücre ayrımını takiben EBV transfeksiyonu yapılmış grupta HLA-G+ hücre yoğunlukları. **34**
- ŞEKİL18:** 2. Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerden, CD2 + hücre ayrımını takiben EBV transfeksiyonu yapılmış grupta HLA-G+ hücre yoğunlukları. **35**
- ŞEKİL19:** CD2+ hücre ayrımının yapıldığı grupta CD19 ve HLA-G eksprese eden hücrelerin görünüşleri. **35**
- GRAFİK 1:** EBV transfeksiyonuna ve/veya zamana bağlı çözünür HLA-G seviyeleri. **36**
- GRAFİK 2:** CD2+ hücre ayrımının ve EBV transfeksiyonunun yapıldığı gruplarda sHLA-G seviyeleri. **36**
- ŞEKİL20:** 1. Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerden, CD2 + hücrelerin ayrılması ve EBV transfeksiyonu sonrası aynı hücre yüzeyinde CD5 ve HLA-G ekspresyonları. **37**

ŞEKİL21: 2.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerden, CD2 + hücrelerin ayrılması ve EBV transfeksiyonu sonrası aynı hücre yüzeyinde CD5 ve HLA-G ekspresyonları. **37**

ŞEKİL22: 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerden, CD2 + hücrelerin ayrılması sonrası hücre yüzeyinde aynı anda CD5 ve HLA-G ekspresyonları. **38**

ŞEKİL8: 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı CD5 ekspresyonları. **38**

ŞEKİL23: 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerden, CD2 + hücrelerin ayrılması sonrası hücre yüzeyinde CD19 ekspresyonları. **39**

ŞEKİL24: 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerden, CD2+ hücreler ayrıldığında, HLA-G+ CD19+ moleküllerini aynı anda yüzeylerinde eksprese eden hücrelerin yoğunlukları. **40**

ŞEKİL25: 2.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerden, CD2+ hücreler ayrıldığında, HLA-G+ CD19+ moleküllerini aynı anda yüzeylerinde eksprese eden hücrelerin yoğunlukları. **40**

SEMBOLLER, KISALTMALAR

HLA:	Human Leukocyte Antigen
MHC:	Major Histocompatibility Complex
HLA-G:	Human Leukocyte Antigen-G
EBV:	Epstein-Barr Virus
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
mRNA:	messenger-Ribonükleik Asit
NK:	Natural Killer
IFN- β :	İnterferon-beta
CTL:	Sitotoksik T Lenfosit
ILT-2:	İmmünglobulin Like Transkript-2
ILT-4:	İmmünglobulin Like Transkript-4

KIR2DL4:	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4
IL-10:	İnterlökin-10
PBMC:	Periferik Kan Mononükleer Hücre
TGF- β :	Transforming Growth Faktör
ELISA:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
PBS:	Phosphate Buffered Saline
FBS:	Fetal Bovine Serum
FITC:	Fluorescein Iso ThioCyanate
PE:	PhycoErythrin
APC:	Allophycocyanin

ÖNSÖZ

İmmünoloji doktorasına başladığım tarihten bugüne kadar her konuda destek olan Anabilim Dalı Başkanımız Sn. Prof. Dr. Cemalettin Aybay'a; sonsuz sabrı ve yardımları için tez danışmanım Sn. Doç. Dr. Bilkay Baştürk'e; tezimin bütün basamaklarında emeği olan Sn. Yard. Doç. Dr. Resul Karakuş'a teşekkürlerimi ve minnet duygularımı belirtmek isterim. Tezimin izleme komitesinde yer alan değerli hocalarım Doç. Dr. Ayşegül Atak ve Doç. Dr. Kayhan Çağlar'a; desteklerinden dolayı anabilim dalımızın değerli hocaları Sn. Prof. Dr. Vedat Bulut'a, Sn. Doç. Dr. E. Ümit Bağrıaçık'a ve doktora yeterlilik sınavımda Zonguldak'tan gelip, desteğini daima hissettiren Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Sn. Yard. Doç. Dr. İshak Özel Tekin'e tüm değerli

katkıları ve destekleri için teşekkürlerimi sunmak isterim. Çalışmalarım esnasında hiçbir konuda desteğini esirgemeyen Dr. Arzu Aral'a da en içten dileklerimle teşekkür etmek istiyorum.

Doktora çalışmalarım süresince verdiği destekten dolayı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanı Doç. Dr. Mustafa Ertek'e teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak her zaman yanımda olan eşim Işıl'a binlerce kez teşekkür ederim.

I.GİRİŞ:

İlk kez lökositlerde gösterilmiş olmaları nedeni ile İnsan Lökosit Antijenleri (Human Leukocyte Antigen-HLA) olarak adlandırılan HLA antijenleri, insanda 6. kromozomun kısa kolu üzerinde yer alan ve Büyük Doku Uyum Kompleksi (Major histokompatibility complex; MHC) olarak da adlandırılan gen bölgesinde kodlanır.

Yaşamın devam edebilmesi için zararlı mikroorganizmalar ve yabancı moleküllere karşı vücudun immünolojik yanıt oluşturabilmesi ve bu yanıt sırasında kendinden olanla yabancı olanı ayırt edebilmesi gerekmektedir. MHC gen bölgesinde kodlanan HLA molekülleri antijen sunumu ve kendinden olanla olmayanın ayrımının yapılabilmesi için gereklidir. Ancak organ nakli gibi immün yanıtın baskılanmasının tercih edildiği durumlarda antijen tanıma işleminin en azından nakledilmiş yabancı organ ya da dokuya karşı gerçekleşmemesi beklenmektedir.

HLA alt gruplarından olan İnsan Lökosit Antijen-G (Human Leukocyte Antigen-G, HLA-G) molekülleri klasik olmayan sınıf I molekülüdür. Son yıllarda HLA-G ile ilgili yapılan çalışmalar, bu molekülün immünolojik tolerans gelişiminde rol alabileceğini göstermiştir. HLA-G ile organ nakilleri, enfeksiyonlar ve kanser ilişkileri çeşitli çalışmalarla gösterilmiş olmakla birlikte, konu bir çok alanda çalışmaya açıktır.

Epstein-Barr Virus (EBV) gamma Herpes virus ailesinden çift sarmallı bir DNA virusudur. Tüm dünyadaki yetişkinlerin %90'ının, yaşamları süresince, EBV ile karşılaştığı bilinmektedir. EBV, ömür boyu sürebilen persistan bir enfeksiyona neden olabildiği için immünolojik

tolerans gelişiminin incelenmesinde uygun bir enfeksiyon ajanı olarak değerlendirilebilir.

EBV ile enfekte hücrelerin, kendilerine karşı oluşan immün yanıtta kaçabilmeleri ve EBV enfeksiyonunun persistansının sağlanması için bazı mekanizmalar geliştirdikleri bilinmektedir. EBV'nin persistansında, immün sistemin EBV'e karşı oluşturduğu immün yanıtın yetersizliğinin veya baskılanmasının rolü büyüktür.

Yapmayı planladığımız çalışmanın amacı, immünotolerajenik etkili olduğu bilinen HLA-G molekülünün, CD2+ hücrelerin varlığı ve yokluğu durumunda, EBV ile enfekte B hücreleri yüzeyinde, zamana bağlı olarak ekspresyonunu ve kültür ortamında çözünen ve dökülen HLA-G seviyesini belirlemek ve HLA-G'nin EBV enfeksiyonlarının etkisi ile değişiklik gösterip göstermediğini saptamaktır.

II.GENEL BİLGİLER

1.İnsan Lökosit Antijenleri:

İnsan Lökosit Antijenleri -Human Leukocyte Antigens- (HLA), organizmada Büyük Doku Uygunluk Kompleksi - Major Histocompatibility Complex (MHC) gen bölgesinin kontrolü altındadır. 6. kromozomun kısa kolu üzerinde yer alan bu gen bölgesi MHC Sınıf I (HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G), MHC Sınıf II (HLA-DR, -DP, -DQ, -DOA, -DM) ve MHC Sınıf III (C2, C4A, C4B, PF, TNF α , TNF β) antijenlerinin yer aldığı üç ana gruba ayrılmıştır. MHC gen bölgesinde her biri farklı HLA antijenlerinin kodlanmasından sorumlu allel genler yer almaktadır. HLA allel gen ürünleri HLA antijeni olarak ifade edilirler. HLA antijenleri eksprese oldukları hücrelerin yüzeylerinde sabit değildir. HLA antijenini herhangi bir

nedenle kaybetmiş lenfositler yaklaşık 6 saat içerisinde bunu yeniden sentezleyebilirler.

İmmün yanıt sırasında B lenfositler ve B lenfositlerin ürünleri olan antikorlar çözünür haldeki antijenleri tanıyabilirken, T lenfositler ise hedef hücre üzerinde yer alan antijenleri tanıyabilmektedir. Bu fonksiyonu gerçekleştiren proteinler HLA antijenleridir. Oldukça yüksek polimorfizm gösteren bu antijenler ilk olarak George Snell tarafından 1940 yılında farelerde gösterilmiş ve 17. kromozom üzerinde yer alan bu gen bölgesine H-2 adı verilmiş, daha sonra Jean Dausset'in, insanda böbrek ve kan nakillerinin başarısında, alıcıda, donörün antijenlerine karşı oluşan antikorların varlığı ile ilişkisini gösterdiği çalışmalarla H-2'nin insandaki eşdeğeri olan HLA'nın tanımlanması sağlanmıştır.

Sınıf I MHC molekülleri CD8+ T hücrelere antijen sunumu yapmakla görevli iken sınıf II MHC molekülleri CD4+ T hücrelere antijen sunmaktadır. MHC genleri insan genomundaki en fazla polimorfizme sahip genlerdir ve ekspresyonları codominant olarak yapılmaktadır. Bu sayede T hücrelere sunulabilecek peptidlerin sayısı en üst düzeyde olabilmektedir^{1,2}.

Sınıf I moleküller birbirine non-kovalan şekilde bağlanmış 2 polipeptid zincirinden oluşmuştur. α zinciri 44-47 kD ağırlığında olup membrana bağlıdır. β_2 mikroglobulin alt ünitesi ise 12 kD ağırlığındadır ve MHC gen bölgesi dışında kodlanmaktadır. α zincirinin $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ bölgeleri MHC gen bölgesinde kodlanmasına rağmen, $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ çok fazla polimorfizm gösteren peptid bağlayıcı bölgeyi oluştururken, $\alpha 3$ bütün sınıf I moleküllerinde sabit yapıdadır. Sınıf I moleküller tanımlanırken α , β zincirleri ile bunlara bağlı peptidin oluşturduğu bir heterotrimerik yapıdan bahsetmek gerekir. Sınıf I moleküllerde bulunan peptid bağlama bölgesi

8-11 aminoasit uzunluğundaki peptid yapıların bağlanmasına izin verecek büyüklüktedir^{1,3}.

Sınıf II molekülleri ise α ve β polipeptid zincirlerinden oluşmuştur ve her iki polipeptid zinciri de MHC gen bölgesinde kodlanmaktadır. 32-34 kD ağırlığındaki α zinciri ile 29-32 kD ağırlığındaki β zinciri birbirlerine non-kovalan şekilde bağlanmışlardır ve peptid bağlayan $\alpha 1$ ve $\beta 1$ bölgeleri ile hücreye bağlandıkları $\alpha 2$ ve $\beta 2$ bölgelerinden oluşmuşlardır. Sınıf I molekülün peptid bağlayan bölgesinin aksine α ve β polipeptid zincirlerinin oluşturduğu peptid bağlama oluşunun ucu açıktır ve 30 aminoasitten uzun peptidlerin bağlanmasına imkan sağlayabilmektedir.

HLA-A, HLA-B ve HLA-C klasik sınıf I molekülleri olarak tanımlanırken HLA-D, HLA-E, HLA-F ve HLA-G non-klasik sınıf I molekülleri olarak tanımlanmaktadır^{1,3}.

HLA antijenleri ile hastalık ilişkileri üzerinde sıklıkla çalışılan bir konudur. Belirli HLA tiplerinin bazı hastalıklarda yüksek sıklıkta görülmesi bunların bir risk faktörü olabileceğini göstermiştir. Bazı toplumlarda belli HLA gruplarının sıklığının artmış olduğu gösterilmiş ve etnik farklılıkların, hastalıkların oluşumunda etkili olabilecekleri ifade edilmiştir. Yapılan çalışmaların sonuçları insanların enfeksiyonlara yatkınlığında, konağın genetik faktörlerinin etkili olduğu, antijenlere karşı oluşan hücresel ve hümmoral immün cevapta kalıtımın etkisinin olabileceğini göstermiştir⁴.

2. İnsan Lökosit Antijen-G:

HLA-G molekülü, HLA-E ve HLA-F' nin de içinde olduğu klasik olmayan sınıf I HLA grubu içinde yer almakta ve klasik HLA moleküllerinden farklı olarak daha az polimorfizm göstermektedir. HLA-G molekülünün bugüne kadar tanımlanmış 23 alleli ve 7 farklı izoformu bulunmaktadır. HLA-G'nin primer transkriptinin alternatif bölünmelerle 7 farklı mRNA oluşturmaları sonucu 4 tanesi membrana bağlı (HLA-G1, G2, G3, G4), 3 tanesi ise çözünür (HLA-G5, G6, G7) formda olmak üzere 7 farklı izoformu vardır^{2,5}.

İlk çalışmalar HLA-G'nin fetusa ait dokularda ekspresyona olan bir molekül olduğunu desteklerken, son yıllarda yapılan çalışmalar HLA-G ekspresyonunun bilinenden daha yaygın olduğunu ve erişkinde ait timus medullasında, korneada, tırnak matriksinde, immatür eritroid hücrelerde, ve pankreasta da ekspresyonu olduğunu göstermiştir⁵.

Normalde bulunduğu yerler dışında bazı patolojik durumlarda da HLA-G ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Özellikle transplantasyon, bazı kötü huylu tümörler, multipl skleroz gibi otoimmün hastalıklar ve bazı viral enfeksiyonlar HLA-G ekspresyon artışının gösterildiği patolojik durumların başında yer almaktadır. Bu ve benzeri durumlarda HLA-G artışının, immün sistemin etkenine karşı oluşturduğu yanıtın azalmasına ve belki de tolerans oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir⁶.

HLA-G ekspresyonunun ilk gösterildiği doku olan plasentada, trofoblastik hücreler, sınıf I moleküllerini ya hiç bulundurmazlar ya da düşük olarak ekspresyona ederler. HLA-A⁺, HLA-B⁺, HLA-C^{düşük} trofoblastik hücrelerin klasik olmayan sınıf I moleküllerden HLA-G ekspresyona ettikleri

gösterilmiştir. HLA-G'nin sitotrofoblastik hücrelerdeki ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalarla, anneye ait Doğal Öldürücü (NK) hücrelerinin hedef hücre üzerinde etkili olması beklenen sitolitik fonksiyonlarının baskılandığı ve böylece fetusun, annenin fetusa karşı oluşturacağı immün yanıtı korunabileceğini göstermiştir. Hemoliz, yükselmiş karaciğer fonksiyonları ve azalmış trombosit sayısı ile seyreden HELLP sendromlu gebelerde görülen preterm eylemle, çözünür HLA-G arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir⁷.

Gebelikte, fetusun en büyük allogreft oluşu fikrinden yola çıkılarak, HLA-G ve transplantasyon ilişkilerinin araştırıldığı bir çok çalışma yapılmış ve doku ya da organ nakli sonrasında serumdaki çözünür HLA-G düzeyleri ve doku greftlerindeki membrana bağlı HLA-G ekspresyonları artışıyla, özellikle karaciğer ve kalp nakilleri sonrasında, doku reddi ihtimali arasında ters orantılı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. HLA-G'nin, transplantasyon sonrası, akut rejeksiyon olasılığının değerlendirilmesinde ve takiplerinde kullanılarak, hastaların aldıkları immün supresif tedavi dozunun azaltılabileceği düşünülmektedir^{6,8,9}.

Sadece transplantasyon ve gebelikte değil, bazı otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarda da HLA-G ekspresyonu incelenmiş ve bu grup hastalıkların bir kısmında HLA-G'nin varlığı gösterilmiştir. İnflamatuvar barsak hastalıklarından ülseratif kolitte, barsak epitelinde, kript ve mukoza düzeyinde HLA-G ekspresyonu gözlenirken, Crohn hastalarında, HLA-G ekspresyonu saptanmadığı ve bu iki hastalığın ayırıcı tanısında HLA-G düzeyinin kullanımının söz konusu olabileceği bildirilmiştir. Romatoid artritli hastaların sinoviyal sıvılarında çözünür HLA-G seviyesinin arttığı, multipl sklerozlu hastaların monositlerinde ise HLA-G ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir. Multipl sklerozlu hastalara tedavide verilen İnterferon- β 'nin

(IFN- β), monosit yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun arttırdığı, HLA-G'nin immün regülatör etkisinin artması veya azalması sonucunda bazı otoimmün ve inflamatuvar patolojilere yol açabildiği bildirilmiştir^{10,11}.

HLA-G molekülünün pek çok tümör dokusu tarafından eksprese edildiği ve tümör mikroçevre etkisi ile de tümörün immün yanıtta kaçmasında rolünün olduğu bilinmektedir. Tümör dokusu içinde sınıf I molekülleri eksprese eden ve etmeyen hücre grupları vardır. Bu hücrelerden sınıf I moleküllerini eksprese eden tümör hücreleri tümöre spesifik sitotoksik T hücreler tarafından lizis ile yok edilirken sınıf I moleküllerini eksprese etmeyen hücreler tümöre spesifik CTL etkisinden kaçabilir ve çoğalmaya devam ederler. Bu arada immünoinhibitör özelliği bilinen HLA-G molekülünü yüzeyinde taşıyan tümör hücreleri de özellikle NK hücrelerinin oluşturması beklenen immün yanıtı baskılayarak çoğalmaya devam ederler. Tümör dokusu sınıf I moleküllerini ya tamamen ya da kısmen eksprese etmeyen ve aynı zamanda inhibitör etkili HLA-G moleküllerini eksprese eden hücreler haline geldiğinde tümöre karşı oluşan immün yanıtın etkisi iyice azalacaktır. Yapılan bilimsel çalışmalarda da kanserli hastaların tümör dokularında, periferik kanlarında ve asit sıvısı gibi tümör mikroçevresindeki sıvılarda HLA-G varlığı saptanmıştır. HLA-G ile ilişkili kanserler arasında basal hücreli kanser, malin melanom, mol hidatiform, akciğer kanseri, primer cilt lenfomaları, glioblastom, oligoastrositom, renal hücreli kanser, meme kanseri ve over kanseri sayılabilir. Bazı tümörlerin prognozu ile HLA-G ilişkisi olabileceği de gösterilmiştir¹²⁻²⁵.

Sekans homoloji çalışmaları ve kristalografik çalışmalarla, HLA-G'nin HLA-A2 ve HLA-E'ye benzediği gösterilmiş ve bu yapısal

benzerliğin sonucunda sınırlı bir peptid repertuarı olabileceği düşünülmüştür².

HLA-G'nin bağlandığı 3 inhibitör reseptör tanımlanmıştır. Bu inhibitör reseptörlerden “immünglobulin like transcript-2” (ILT-2) ve ILT-4 diğer sınıf I moleküller tarafından bağlanabilirken, “killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4” (KIR2DL4), yalnızca HLA-G tarafından bağlanabilmektedir. NK hücreleri KIR2DL4 ve ILT-2'yi eksprese ederken, T ve B lenfositlerin tamamında ILT-2 ekspresyonu olmaktadır. Dendritik hücreler, monositler ve makrofajlar da ILT-2 ve ILT-4'ü eksprese etmektedirler. Membrana bağlı ve çözünebilir HLA-G' ye bağlanan bu reseptörlerden ILT-2 ve ILT-4 diğer sınıf I moleküllere de bağlanabilirken, KIR2DL4 sadece HLA-G'ye bağlanmaktadır^{2,6}.

Diğer sınıf I moleküllerde olduğu gibi HLA-G de, T hücrelere CD8 üzerinden bağlanarak, Fas-Fas ligand bağımlı bir mekanizma ile bu hücrelerin apoptozunu indüklemektedir. CD8+ T hücrelerin sitolitik fonksiyonlarının, hedef hücre üzerinde eksprese olan HLA-G tarafından inhibe olduğu bilinmektedir⁶.

3. Epstein Barr Virus:

1800'lü yılların sonlarında halsizlik, lenfadenopati, ateş, karın ağrısı ve hepatosplenomegali gibi bulgularla seyreden bir hastalık tablosu tanımlanmış ve adına “Drusenfiebers” denmiştir. 1921 yılında mononükleer lenfositoz ile bu tablo arasında bir ilişki olabileceği düşünülmüş ardından 1958 yılında Burkitt tarafından, baş ve boyun bölgesini tutan bir lenfoma tanımlanmıştır. Hastalığın Afrikada sivrisinek kökenli hastalıklarla aynı bölgelerde görülmesi viral bir hastalık temelinde gelişebileceği fikrini aklına getirmiş ve 1964 yılında Epstein, Burkitt Lenfomalı hastaların

biyopsilerinden hazırladığı doku kültürlerinde herpes viruslara benzeyen partiküller tespit etmiştir. Bugün Epstein-Barr virus (EBV) olarak bilinen virusun Enfeksiyöz Mononükleoz ve Burkitt Lenfoma dışında pek çok hastalıkla ilişkisi bilinmektedir.

EBV, gamma Herpes virus ailesinden çift sarmallı DNA'ya sahip bir virustur. EBV enfeksiyonu tüm dünyadaki yetişkinlerin %90'ında ömür boyu süren persistan enfeksiyona neden olmaktadır. 17-25 yaş arası seropozitif bireylerin %50'sinde EBV enfeksiyonuna bağlı Enfeksiyöz Mononükleozis tablosu ortaya çıktığı, ayrıca Burkitt lenfoma, "Oral Hairy Lökoplaki", B lenfoproliferatif hastalık, nasofaringeal kanser gibi hastalıklarla da ilişkisi olduğu gösterilmiştir.

Tüm dünyadaki yetişkinlerin %90-95'inin, EBV yönünden seropozitif olduğu tahmin edilmektedir. Duyarlı kişilerin asemptomatik EBV taşıyıcıları ile teması sonucunda bulaş gerçekleşmekte ve çoğu enfeksiyon asemptomatik ve subklinik seyretmektedir. Hastalık tablosu iyileştikten sonra, 18 aya kadar, orofarinksten EBV kültürü yapılabilmekte ve tükürükle bulaşın sık olduğu bilinmektedir ve orofarinks mukozal epitelinin enfeksiyonun yerleştiği ilk bölge olduğu düşünülmektedir. EBV orofarinkse infiltre olan B lenfositlere geçtikten sonra ömür boyu kişinin B lenfositleri içinde varlığını sürdürür.

EBV'nin konak hücreleri B hücreler, T hücreler, epitelyal hücreler ve myositlerdir. EBV, insanlar ve az sayıda primat için patojendir. Diğer herpes viruslardan farklı olarak transplantasyon geçirmiş hastalar dışında yaşamın ilerleyen dönemlerinde reaktivasyona bağlı hastalık görülmez. Bununla birlikte konak hücrelerini transforme edebilme özelliğine sahiptir. Bazı T ve B hücreli lenfomalara, Hodgkin hastalığı,

Burkitt lenfoma gibi hastalıklara sebep olduğu bilinmekle beraber, “Oral Hairy Lökoplaki”, B lenfoproliferatif hastalık, leiomyosarkomlar, tükürük bezi kanserleri, diferansiye olmamış mide kanserleri ile de ilişkisinin olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur.

EBV ile enfekte hücrelerin, kendilerine karşı oluşan immün yanıttan kaçabilmeleri ve EBV enfeksiyonunun persistansının sağlanması için bazı mekanizmalar geliştirdikleri bilinmektedir. EBV'nin persistansında, immün sistemin EBV'e karşı oluşturduğu immün yanıtın yetersizliğinin veya baskılanmasının rolü büyüktür²⁶⁻²⁹.

4. İnterlöklin-10:

İnterlöklin-10 (IL-10), antijen sunucu hücreler, makrofajlar ve dendritik hücreler üzerindeki inhibitör etkisi nedeni ile ilk olarak bir sitokin sentez inhibitör faktörü olarak tanımlanmıştır. Th2 hücrelerden salgılanarak Th1 tipi hücrelerin sitokin sentezini inhibe etmektedir.

EBV'ye karşı ortaya çıkan immün yanıtta sitokinlerin rolü büyüktür. B lenfositlerin EBV ile enfeksiyonu sonrasında lenfosit proliferasyonu oluşur ve IL-10 üretimi ile birlikte salgılanması da artar. EBV'nin IL-10 homoloğu olan bir molekül ürettiği bilinmektedir. Bu molekül viral IL-10 (vIL-10) diye tanımlanmakta ve insan IL-10 (hIL10) ile fonksiyonel benzerlikler göstermektedir. hIL-10, B lenfosit proliferasyonunu sağlayan, antiinflamatuvar bir sitokindir. Aynı zamanda antijen spesifik T lenfositlerin aktivasyonunu da baskıladığı bilinmektedir²⁹⁻³².

hIL-10 ve vIL-10 arasında %84'lük bir homoloji bulunmaktadır. Fonksiyonel olarak hem hIL-10, hem de fare IL-10 (mIL-10) ile benzerlikler göstermektedir. Immünosupresif bir etki gösteren IL-10, insan periferik kan mononükleer hücrelerinden (PBMC) IL-2 ve IFN-γ

salınımını inhibe etmekte, vIL-10, antijen spesifik T lenfositlerin proliferasyonunu azaltmakta, monositler üzerindeki sınıf II MHC moleküllerinin ekspresyonunu azaltmak suretiyle antijen sunumunu baskılamaktadır^{32,34-42}.

5.TGF Beta

Transforming Growth Faktör-Beta'nın (TGF- β) immün sistemde en belirgin etkisi, lenfositlerin ve diğer lökositlerin aktivasyonunu ve çoğalmasını baskılamaktadır. Antijenle uyarılmış T hücrelerinden, LPS ile aktive olmuş mononükleer fagositlerden ve diğer hücrelerden TGF- β salgılanır. TGF- β üreten T lenfositleri sıklıkla IL-10 ve/veya IL-4 de üretirler ve her iki sitokin de immünosüpresif aktiviteleri nedeni ile TGF- β 'ya benzerler. Regülatuvar hücrelerin bu grubuna Th3 alt grubu adı verilir. Genelde immün ve enflamatuvar cevabın inhibisyonundan sorumlu olan TGF- β immün sistem dışında farklı etkilere sahiptir. Epitelyal hücreler başta olmak üzere bazı hücrelerin çoğalmasını baskılarken, bazılarının çoğalmasını uyarır²⁴.

TGF- β 'nın hücre dışındaki ligandı reseptöre bağlanarak büyümeyi, farklılaşmayı ve apoptozu regüle eden sinyali başlatır. Birçok kanser tipinde TGF- β sinyalinde bir bozukluk olduğu ve buna bağlı olarak kanser hücrelerinin TGF- β aracılı büyüme süpresyonuna dirençli olduğu gösterilmiştir²⁵.

TGF- β 'nın over kanseri, meme kanseri, mesane kanseri gibi hastalıklarda etkisinin olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır⁴³⁻

III.GEREÇ ve YÖNTEM

1.MATERYAL

1.1.Kullanılan Cihaz Listesi

ELISA okuyucu (Sunrise Remote/Touch Screen, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria)

ELISA yıkayıcı (Columbus Plus, Tecan, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria)

Santrifüjler (1-15, Sartorius, Sigma, Göttingen, Germany; 3K15 ve 6K15, Sigma, Osterode am Herz, Germany)

Masaüstü santrifüj (3K15, Sigma, Osterode am Herz, Germany)

Mikrosantrifüj (1-15, Sartorius, Sigma, Göttingen, Germany)

Derin dondurucu (Sanyo, MDF-U51865, Japan)

Güvenlik kabini, laminair flow (Holten LaminAir, MS 2010 Model 1.8, Allerod, Denmark)

İnkübatör (%5 CO₂'li inkübatör) (Sanyo MCO-18AIC, Gunma-Ken, Japan)

Inverted Mikroskop (Leica DM IL, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany)

Hassas terazi (Shimadzu, AY120, SPM)

Su banyosu (Termostatlı, ısıtmalı, rotorlu su banyosu) (Heto-Holten A/S OBN 18, Heto HMT 200, Allerod, Denmark)

Sıvı azot tankı

MS Office Excell, Office 2003

Vorteks (Labnet International, Woodbridge, USA)

1.2. Kullanılan Gereç Listesi

Costar Stripette, Corning Incorporated, Corning, New York 14831, USA
Orange Scientific 25 cm² Tissue Culture Flask
Orange Scientific 75 cm² Tissue Culture Flask
FL Medical Eppendorf tüp 1,5 ml, Torreglia, Italy
Konik tabanlı 50 mL'lik tüp (Greiner Bio-One GmbH, Germany)
15 mL'lik Tüp (Greiner Bio-One GmbH, Germany)
Dilüsyon Plağı (96 çukurlu, U tabanlı, steril, kapaklı mikropak)
Tek kullanımlık 0,20 µm por çaplı, steril, enjektör filtresi (Corning Incorporated, Corning, New York)
5 mL'lik serolojik polipropilen tüp (ISOLAB, Laborgerate GmbH, Germany)
1,5 mL'lik eppendorf tüp (LP, Italiana, SPA)
26 Gauge uçlu enjektör (Hayat Tıbbi Aletler, İstanbul, Türkiye)
20 mL'lik steril enjektör (Hayat Tıbbi Aletler, İstanbul, Türkiye)
10 mL'lik steril enjektör (Hayat Tıbbi Aletler, İstanbul, Türkiye)

1.3. Kullanılan Biyolojik ve Kimyasal Maddeler

PBS- Dulbecco, Biochrom AG, Berlin, Germany
RPMI-1640, GIBCO, New York, USA
Biocoll Separating Solution, Biochrom AG, Berlin, Germany
FBS (Foetal Bovine Serum), GIBCO, New York, USA
L-Glutamine 200mM, GIBCO, New York, USA
Penicillin-Streptomycin, GIBCO, New York, USA
Anti-Human HLA-G monoklonal Antikor FITC işaretli, Novus, CO, USA
Anti-Human CD5 monoklonal Antikor APC işaretli, BioLegend, CA, USA
Anti-Human CD19 monoklonal Antikor PE işaretli, BioLegend, CA, USA
FITC Mouse IgG1, κ Isotype Control, eBioscience, CA, USA
PE Mouse IgG1, κ Isotype Control, BioLegend, CA, USA

APC Mouse IgG1, κ Isotype Control, BioLegend, CA, USA

sHLA-G ELISA, Biovendor, Czech Republic

hIL-10 ELISA, Biosource, CA, USA

TGF- β 1 ELISA, Biosource, CA, USA

2.YÖNTEMLER

2.1. Çalışmanın etik olarak onaylanması

Yapmayı planladığımız çalışmanın etik olarak uygunluğu, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş ve 14-06-2006 tarih ve 197 sayılı karar ile onaylanmış ve periferik kanları incelenecek olan gönüllülere gerekli bilgiler verilmiş ve gönüllü onay belgeleri imzalatılmıştır.

2.2. EBV Üreten Hücre Dizisinin Açılması ve İdamesi

Çalışmada EBV kaynağı olarak kullanılacak olan B95-8 hücre dizisi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalında Prof. Dr. Cemalettin Aybay'ın hücre bankasından temin edilmiştir. Sıvı azot içinde muhafaza edilen hücre dizisi sıvı azot içinden çıkarıldıktan sonra 37°C'de çözünmesi sağlanmış ve 15 ml PBS içinde 1200 rpm'de 10 dakika boyunca sentrifüj edilmiştir. Üstte yer alan PBS biyo-güvenlik kabini içinde atıklar için kullanılan %10 luk hipoklorit dolu kaba aktarıldıktan sonra, hücreler tekrar 10 ml PBS içinde homojenize edilmiş ve bir kez daha 1200 rpm'de 10 dakika boyunca sentrifüj edilmiştir. Çalışmanın sonraki basamaklarında da EBV içeren bütün atıklar %10'luk hipoklorit çözeltisi içinde tutulduktan sonra atılmıştır. Üstte yer alan PBS atıldıktan sonra daha önceden 37°C'ye getirilmiş %10 FBS ve L-Glutamin ile zenginleştirilmiş 20 ml RPMI-1640 besi yeri içinde homojenize edilerek 75 cm² ' lik hücre kültür flaskına konulmuş ve 37°C, %5 CO₂ konsantrasyona ayarlanmış etüve konulmuştur. Hücreler 3 gün boyunca etüvde tutulup yeterli hücre yoğunluğuna ulaşmaları beklenmiştir⁵⁰.

2.3. Periferik Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu

B95-8 hücre dizisi hücre kültürü ortamında yeterli yoğunluğa ve canlılığa ulaştığında transformasyona tabii tutulacak periferik kan mononükleer hücreler izole edilmiştir. Bunun için ficoll dansite gradient yöntemi kullanılarak, EBV IgM negatif sağlıklı gönüllülerden alınan, 20 ml periferik kandan lenfosit izolasyonu yapılmıştır.

Çalışmada toplam 4 gönüllüden kan alınmış ve her birisinden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücreler transforme edilerek hücre kültürü yapılmış ve çalışmanın sonraki basamaklarına dahil edilmiştir. Çalışma sırasında oluşan kontaminasyonlar nedeni ile iki gönüllü örnekleri tüm basamakları ile tamamlanabilmiştir. 2 gönüllünün örnekleri GRUP1 (Bayan, 35 yaşında, EBV IgM (-)) ve GRUP2 (Erkek, 30 yaşında, EBV IgM (-)) olarak adlandırılmış olup raporun sonraki bölümleri ve tablolarda grup isimleri ile adlandırılacaklardır. 50 ml'lik konik uçlu tüplere 200µl koruyucusuz heparin konulmuş ve içi heparinle yıkanmış 20 ml'lik enjektör kullanılarak gönüllülerden toplam 20 ml periferik kan alınmıştır. Üzerine 20 ml Ca^{++} ve Mg^{++} içermeyen PBS ilave edilmiş ve homojenize olması sağlanmıştır. Gönüllülerden elde edilen bu karışım 50 ml'lik konik uçlu tüplere konulmuş 5 ml ficoll üzerine gradient oluşturulacak şekilde damla damla yayılmıştır.

Periferik kan mononükleer hücrelerinin diğer kan elemanlarından ayrılabilmesi için 30 dakika boyunca 1500 rpm'de santrifüj edilmesini takiben ficoll tabakasının üzerinde beyaz bir bulut görüntüsündeki (buffy coat) lenfosit, monosit ve NK hücrelerden oluşan hücre tabakası dikkatli bir şekilde steril pastör pipetleri ile alınmıştır. Elde edilen bu hücreler yaklaşık 2 katı PBS içinde toplanarak, içeriğindeki ficoll ve heparinden arındırılmak için 15 dakika boyunca 1200 rpm'de santrifüj

edilmiştir. Üstte kalan PBS döküldükten sonra geriye kalan hücreler homojenize edilerek sayılmak üzere 20µl alınmış ve 80 µl %0,4' lük tripan mavisi ile karıştırılmıştır.

Neu Bauer lamında sayılan hücreler, 10 milyon/ml olacak şekilde seyreltildikten sonra, ısısı 37°C olarak hazırlanmış olan, 20 ml RPMI-1640 içeren, 75 cm²' lik hücre kültür flasklarına 1 milyon hücre / flask olacak şekilde dağıtılmıştır. Bu hücreler EBV transformasyonu yapılmayan kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir⁵⁰.

2.4.Periferik Mononükleer Hücrelerden T lenfositlerin Atılması

Çalışmada transforme olan hücre kültürlerinde T lenfosit yanıtının araştırılabilmesi için, izole edilen periferik kan mononükleer hücrelerinden T lenfositler ayrılmış ve bu şekilde yeni bir hücre kültürü grubu da çalışmaya dahil edilmiştir.

CD2+ lenfositlerin izolasyonu için manyetik boncuklarla işaretli anti-CD2 monoklonal antikorlar kullanılmıştır. 1 µ'dan daha küçük olan bu manyetik partiküle bağlı olan anti-CD2 monoklonal antikor, CD2+ lenfositler üzerindeki E-rozet reseptörüne bağlandıktan sonra mıknatıs yardımı ile diğer periferik kan mononükleer hücrelerinden ayrılmaktadır.

CD2+ lenfosit izolasyonu için, üretici firmanın önerisi doğrultusunda 1 ml periferik kan mononükleer hücre dolu olan 15 ml konik uçlu tüpün içine, 100µl FluoroBeads®-T (One Lambda, CA, USA) ilave ederek oda ısısında 3 dakika boyunca elde çevrilerek karışması sağlandı ve mıknatısa yerleştirip 1 dakika boyunca bekletildi. Bu aşamada CD2 yüzey molekülü taşıyan T hücrelerin ve NK hücrelerinin tüpün çeperine

manyetik alan doğrultusunda yapışması sağlandı. 1 dakikanın sonunda tüpü mıknatıstan ayırmadan, periferik kan mononükleer hücreler, hücre kültüründe kullanılabilmesi için, tüpün içinden boşaltılarak alındı. Böylece T ve NK hücrelerinden fakir, B hücrelerinden zengin periferik kan mononükleer hücreler elde edildi.

2.5. Periferik Mononükleer Hücrelerin Transforme Edilmesi

B95-8 hücre dizisinin 3 günlük inkübasyon sonrası yeterli hücre yoğunluğuna ulaştığını inverted mikroskopta gözledikten sonra bu flasktan alınan süpernatant 10 dakika boyunca 1200 rpm’de santrifüj edilmiş, yıkama sonrası elde edilen süpernatant 0,45 µm çapındaki filtreden geçirilip EBV transformasyonu için belirlenmiş hücre kültür flasklarına 1’er ml olacak şekilde eklenmiştir⁵¹.

2.6. Hücre Kültürü

EBV transformasyonu yapılan ve yapılmayan hücreler %10 FBS ile zenginleştirilmiş L-Glutamin içeren RPMI-1640 içinde steril 75cm²’lik hücre kültür flasklarına konulduktan sonra 37°C ve %5 CO₂ ortamına ayarlanmış etüvde 24, 48 ve 72 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır⁵¹.

2.7. Hücrelerin İşaretli Monoklonal Antikorlarla Boyanması

24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda hücre kültür flasklarının içeriği 50 ml’lik konik tabanlı tüplere alınarak 1200 rpm’de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş, üstte kalan kısım atılarak

Çöken hücreler homojenize edilmiş ve tekrar 15 ml PBS içinde 1200 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Üstte kalan kısım atıldıktan sonra hücreler Neu Bauer lamında sayılıp, işaretli monoklonal antikorların optimum bağlanma konsantrasyonu olarak üretici firmalar tarafından önerilen ml'de 10 milyon hücre olacak şekilde seyreltilmiştir. İncelenmesi planlanan bütün hücre grupları FITC ile işaretli anti human HLA-G monoklonal antikor, PE ile işaretli anti human CD-19 monoklonal antikor ve APC ile işaretli anti human CD-5 monoklonal antikor ile boyanmıştır.

2.8. Akım Sitometri Cihazında Hücrelerin İncelenmesi

Hücrelerin boyamaları yapıldıktan sonra, akım sitometri cihazında incelenmeleri yapılmıştır. Bu işlem akım sitometri cihazının çalışma prensiplerine uygun şekilde her çalışma öncesi, hücrelerin geçeceği kanalların yıkanması ve daha önceden yaptığımız akım sitometri çalışmalarıyla belirlediğimiz protokollerin aktif hale geçirilmelerini takiben başlatılmıştır. Akım sitometride incelenecek her hücre grubu için morfolojilerinin değerlendirilebilmesi amacıyla boyanmamış hücreler cihazdan geçirilmiş ve akım sitometri cihazının ekranında lenfosit kapısında yer aldıkları doğrulanmıştır. FITC ile işaretli anti-HLA-G monoklonal antikorlar FL1 Log, PE ile işaretli anti-CD19 monoklonal antikorlar FL2 Log, APC ile işaretli anti-CD5 monoklonal antikorlar ise FL4 Log kapılarında yer almışlardır. Araştırmak istediğimiz yüzey moleküllerinden ikisini ya da üçünü birlikte taşıyan hücrelerin tespiti, FL1 Log, FL2 Log ve FL4 Log kapılarında yer alan hücrelerin 4 kadranlı histogramda incelenmeleri ile elde edilmiştir.

Akım sitometri cihazında incelediğimiz her bir hücre grubunda en az 10.000 hücre sayılabilecek şekilde çalışma yapılmıştır.

CD-2+ hücrelerin ayrıldığı gruplarda bu sayıya ulaşamadığımız durumlarda ise sayılabilen en fazla miktarda hücre değerlendirilmeye alındı. Sonuçların değerlendirilmesinde araştırılan hücrelerin, toplam hücreler içindeki yüzde oranları kullanıldı.

Akım sitometri cihazında yapılması planlanan incelemelerin ön deneyleri yaklaşık 2 aylık bir zamanda gerçekleştirilmiştir. Bu süre boyunca işaretli monoklonal antikorlarla boyanacak hücrelerin hangi konsantrasyonda optimum şekilde boyandıkları ve aynı anda 3 farklı monoklonal antikorun bağlanmasının inceleme sonuçlarını değiştirip değiştirmediği değerlendirildi. Ayrıca deneyin bütün basamakları, optimum şartların belirlenebilmesi için bu süre zarfında 2 şer kez tekrar edilmiştir. Toplamda 4 farklı gönüllüden alınan periferik kan mononükleer hücreler kullanılmış ve deneyler tamamlanmıştır; ancak hücre kültür basamakları esnasında yaşanan kontaminasyonlar sebebiyle yalnızca 2 gönüllüye ait deney gruplarının sonuçları rapor edilmiştir. Ön deneylerde elde ettiğimiz sonuçlar ile asıl deneylerin sonuçları birbirleri ile uyumlu bulunmuştur.

2.9. ELISA

Çalışmanın ELISA basamağında, hücre kültür süpernatantlarındaki sHLA-G, TGF- β ve IL-10 düzeyleri incelenmiştir. Bu işlem için her bir hücre kültür süpernatantı 1200 rpm'de 10 dakika çevirdikten sonra hücrelerden arındırıldı ve üstte kalan süpernatant ayrılarak -20°C'de saklandı. Bütün örneklerin tamamlanmasından sonra çalışma aşamasında oda ısısında çözünmelerini sağlayıp ELISA plağının kuyucuklarına daha önceden belirlediğimiz konfigürasyonda dağıtıldı. ELISA çalışmasının tamamlanması sonrasında 450 nm'de optik dansiteleri belirlendi ve Microsta® yazılım programı ile sonuçlar hesaplandı.

2.9.1. sHLA-G ELISA

Kültür süpernatantlarındaki sHLA-G düzeylerinin incelenebilmesi için kullanıma hazır sHLA-G ELISA (Biovendor®, Modrice, Czech Republic) kiti kullanılmıştır. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda 200 U/ml konsantrasyondan 1:2 azalan dilüsyonlarla 3.125 U/ml konsantrasyona kadar standart solüsyonlar kuyucuklara dağıtıldı, son kuyucuğa ise standart solüsyon konulmadı ve bu kuyucukla 0 U/ml olarak negatif standardımız oluşturuldu.

İncelenmesi planlanan örneklerin ve standartların kuyucuklara dağıtılmasından önce her bir kuyucuğa 50µl dilüsyon buffer eklendikten sonra üzerine örnekler ve standartlar dağıtılıp, 1 saat oda ısısında bekletildi. Yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama yaptıktan sonra 100 µl konjugat solüsyonu ilave edildi ve tekrar 1 saat boyunca oda ısısında bekledikten sonra 3 defa yıkama solüsyonu ile yıkamaları yapıldı. 100 µl kromojen solüsyonundan koyduktan sonra karanlıkta, oda ısısında 10 dk bekletildi ve 100 µl stop solüsyonu ilave edilerek reaksiyonu durduruldu. Oluşan renk değişimleri 450 nm’de ELISA okuyucusunda okutulup optik dansitelerin yansıttığı gerçek değerler Microsta® yazılım programı ile belirlendi.

2.9.2. TGF-β ELISA

Kültür süpernatantlarındaki TGF-β düzeylerinin ölçülebilmesi için, TGF-β ELISA (Biosource® Camarillo, California, USA) kiti kullanılmıştır. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda 250 µl miktarda kültür süpernatantları polipropilen tüplerin içinde 50µl ekstraksiyon solüsyonu ile karıştırılıp 30 dakika boyunca 4°C’de inkübe edilmiş ve üzerine 250 µl dilüsyon buffer ilave edilerek süpernatantların ekstraksiyonları tamamlanmıştır. Daha sonra 2000 pg/ml konsantrasyonda

200 µl volümde 1:2 azalan dilüsyonlarla 31,2 pg/ml konsantrasyona kadar standart solüsyonlar kuyucuklara dağıtılmıştır. Son kuyucuğa ise standart solüsyon konulmadan ve 200 µl dilüsyon buffer konularak 0 pg/ml olarak negatif standart oluşturulmuştur. Ekstraksiyon sonrası elde edilen süpernatant örneklerinden, her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde, daha önceden belirlenmiş kuyucuklara ilave edildi. Standartların ve örneklerin üzerine 50 µl Biotin konjugat dağıtılıp oda ısısında 3 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Hazırladığımız yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkama yaptıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µl Streptavidin-HRP dağıtıldı. Standart koymadığımız negatif kontrol kuyucuğuna (0 pg/ml) Streptavidin-HRP ilave edilmedi. 30 dakikalık oda ısısında inkübasyon sonrası 4 kez yıkama yapıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl kromojen ilave edilip, 30 dakika boyunca oda ısısında ve karanlıkta inkübe edildi. 100 µl stop solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durdurulduktan sonra 450 nm’de optik dansitelerin okutulup, gerçek değerlere dönüşümü için Microsta® yazılım programı kullanılmıştır.

2.9.3. IL-10 ELISA

Kültür süpernatantlarındaki IL-10 düzeylerinin ölçülebilmesi için, IL-10 ELISA (Biosource® Camarillo, California, USA) kiti kullanılmıştır. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda standart solüsyonlar 500 pg/ml konsantrasyondan 7,8 pg/ml konsantrasyona kadar 1:2 azalan değerlerle kuyucuklara 50 µl volümde dağıtıldı. Standartların yer aldığı kuyucukların en sonuncusuna ise 0 pg/ml konsantrasyonda negatif kontrol olacak şekilde 50 µl volümde standart dilüsyon buffer ilave edildi. Kültür süpernatantları da daha önceden belirlenmiş kuyucuklara 50 µl volümde dağıtıldıktan sonra oda ısısında 2 saat boyunca inkübe edildi. Çalışma öncesinde hazırlanmış yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkama yapılmasını takiben 0 pg/ml konsantrasyondaki negatif kontrol kuyucuğu hariç bütün

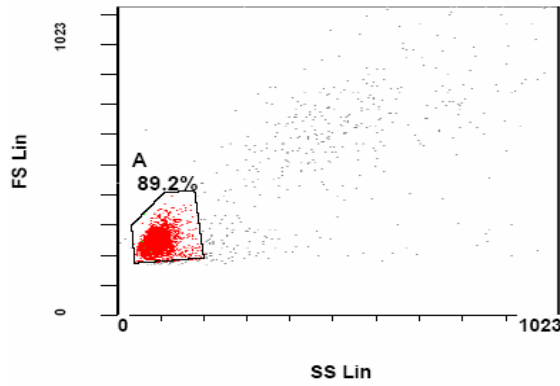
kuyucuklara 100 µl Biotin konjugat ilave edildi ve 2 saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 4 kez yıkama yapıldıktan sonra 0 pg/ml konsantrasyondaki kuyucuk hariç tüm kuyucuklara 100 µl Streptavidin-HRP ilave edildi. 30 dakika oda ısısında inkübasyon sonrası 4 kez yıkama yapıldı ve herbir bir kuyucuğa 100 µl kromojen ilave edildi. 30 dakika boyunca oda ısısında ve karanlıkta inkübasyon sonrası reaksiyon 100 µl stop solüsyonun kuyucuklara dağıtılması ile sonlandırıldı. 450 nm'de optik dansiteler okutulduktan sonra optik dansitelerin gerçek değerlere dönüşümü için Microsta® yazılım programı kullanıldı.

2.10. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmanın sonuçları değerlendirilirken, hücre yüzeyinde eksprese edilen yüzey molekülleri bireysel farklılıklar gösterdiği için her grup kendi içinde değerlendirilip, önemlilik testi yapılmamış yalnızca tanımlayıcı istatistik şeklinde yüzde değerleri sunulmuştur.

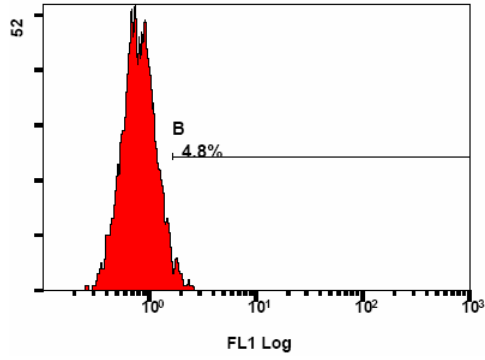
IV.BULGULAR

Periferik kan mononükleer hücrelerin, akım sitometri histogramında lenfosit kapısında yer aldığı, her hücre grubu için gösterilmiştir. Toplamda sayılan hücrelerin %89,2'si lenfosit kapısında yer almaktadır (Şekil 1).

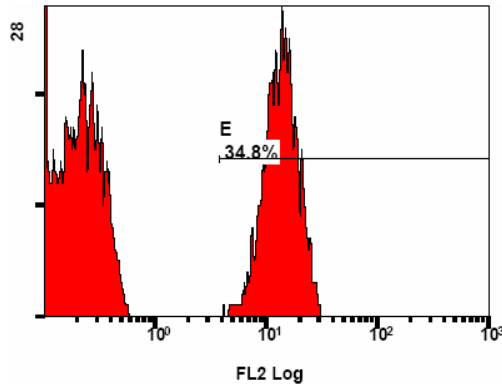


ŞEKİL1: Boyasız PBMC, akım sitometri histogramında lenfosit kapısında yer almaktadırlar. Her hücre grubu için bu doğrulama yapılmıştır. Toplamda sayılan hücrelerin %89,2'si lenfosit kapısında yer almaktadır

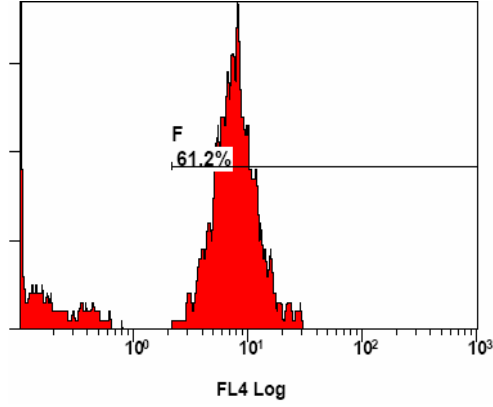
FITC ile işaretli anti-HLA-G monoklonal antikorla boyanmış hücrelerin FL1 Log ekranında görünüşü (Şekil 2), PE ile işaretli anti-CD19 monoklonal antikorla boyanmış hücrelerin FL2 Log ekranında görünüşü (Şekil 3), APC ile işaretli anti-CD5 monoklonal antikorla boyanmış hücrelerin FL4 Log ekranında görünüşü (Şekil 4), ve 4 kadranlı histogramda FL1 Log ve FL4 Log' da yer alan hücrelerin görüntüsü (Şekil 5) belirlenmiştir.



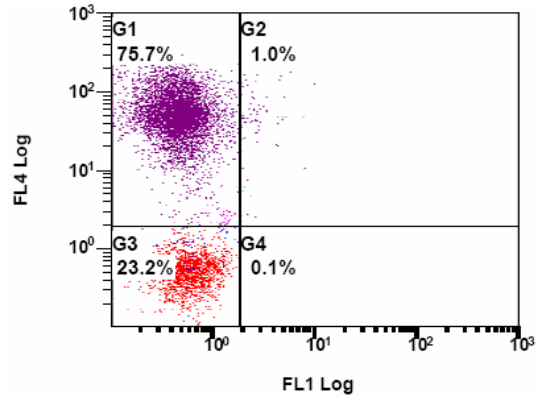
ŞEKİL2: Periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonundan hemen sonra FITC ile işaretli anti-HLA-G monoklonal antikorla boyanmasını takiben, bu hücrelerin FL1 Log ekranında görünüşü yukarıdaki gibidir.



ŞEKİL3: Periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonundan hemen sonra PE ile işaretli anti-CD19 monoklonal antikorla boyanmasını takiben, FL2 Log ekranında görünüşü yukarıdaki gibidir.

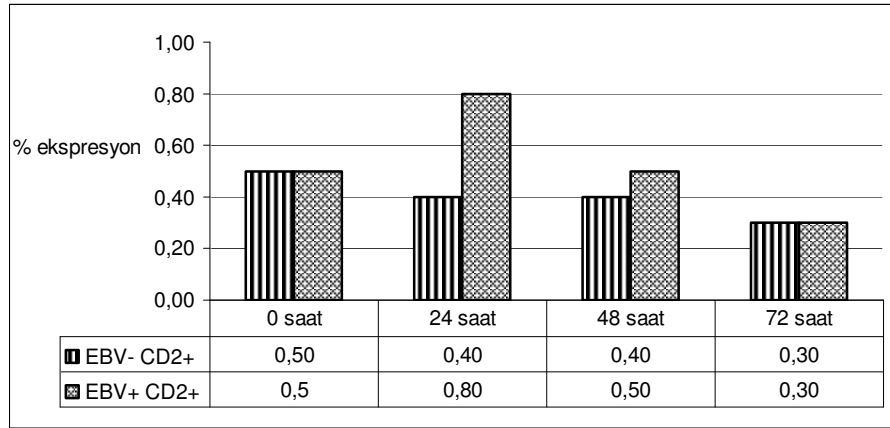


ŞEKİL4: Periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonundan hemen sonra APC ile işaretli anti-CD5 monoklonal antikorla boyanmasını takiben, FL4 Log ekranında görünüşü yukarıdaki gibidir

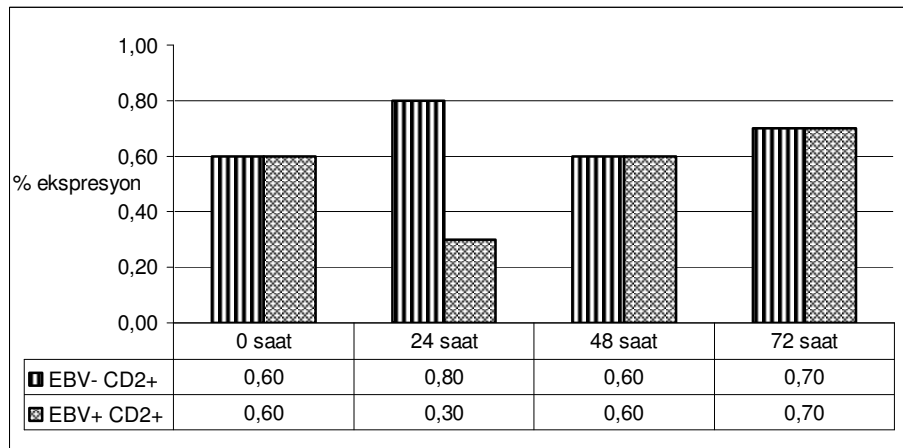


ŞEKİL5: 4 kadranlı histogramda periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonundan hemen sonra FITC ile işaretli anti-HLA-G monoklonal antikorla ve APC ile işaretli anti-CD5 monoklonal antikorla boyanmasını takiben görüntüleri yukarıdaki gibidir.

Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde her iki hücre kültüründe de, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, EBV transfeksiyonuna ve/veya zamana bağlı olarak kültür ortamındaki hücrelerin yüzeyinde, HLA-G ekspresyonunda bir değişiklik olmadığı saptanmıştır (Şekil 6, 7).

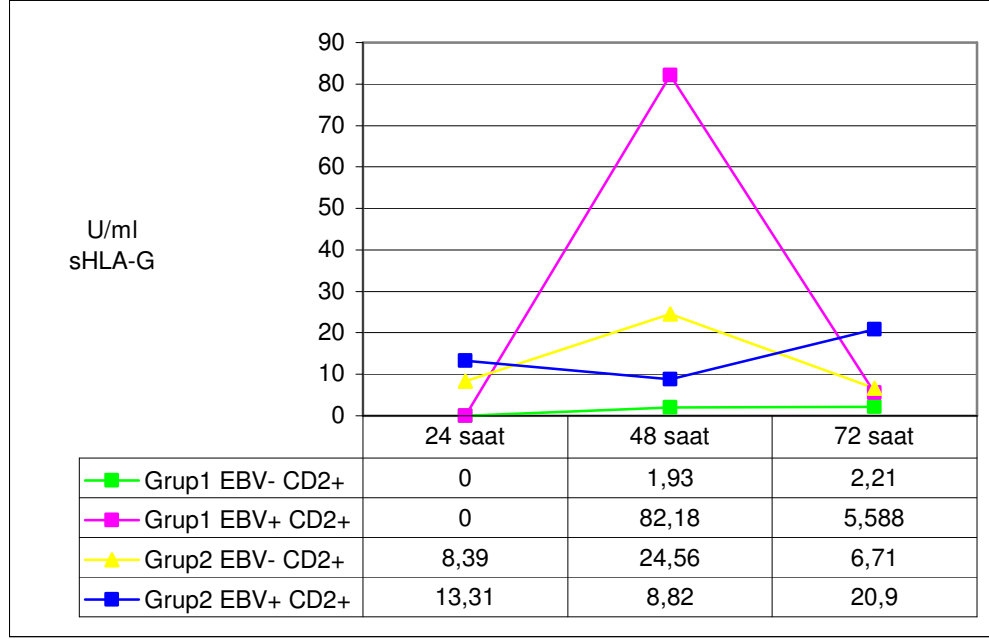


Şekil 6: 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin EBV transfeksiyonuna ve/veya zamana bağlı HLA-G ekspresyonları.



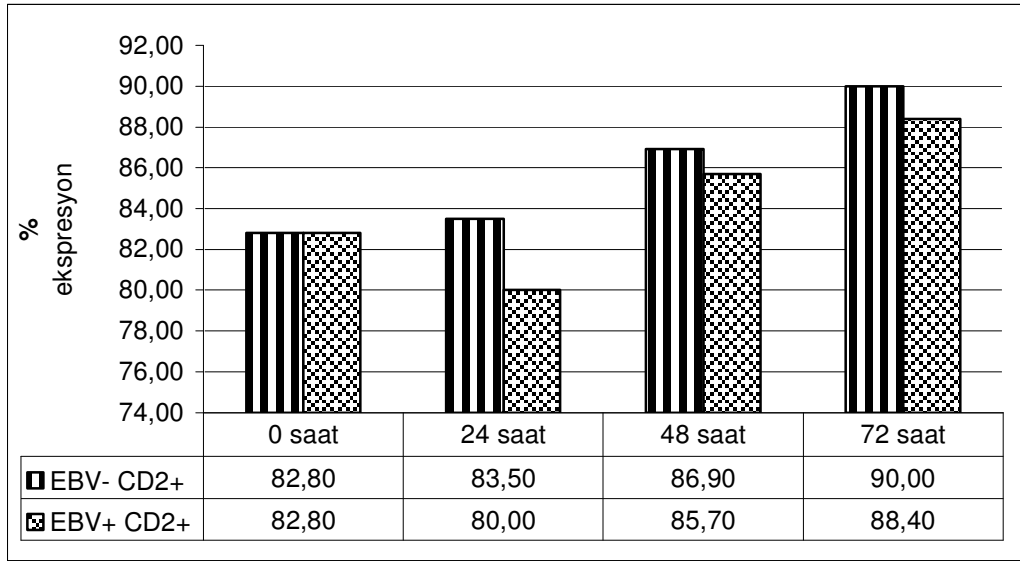
Şekil 7: 2.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin EBV transfeksiyonuna ve/veya zamana bağlı HLA-G ekspresyonu.

ELISA yöntemi ile kültür süpernatantında sHLA-G seviyeleri ölçümleri değerlendirildiğinde, EBV transfeksiyonu olan hücre kültürlerinde sHLA-G düzeylerinde zamana bağlı olmayan düzensiz bir artış olduğu belirlenmiştir (Grafik 1).(24.saat: 0 u/ml - 48.saat: 82.18 u/ml)

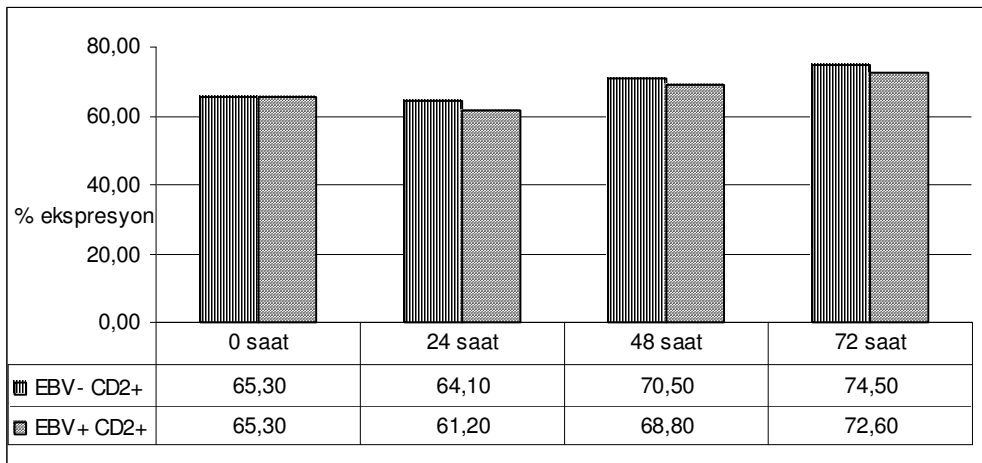


Grafik1: EBV transfeksiyonuna ve/veya zamana bağlı çözünür HLA-G seviyesi yukarıdaki gibidir.

Hücre kültür gruplarında CD5+ hücreler incelendiğinde kültür ortamında hem EBV transfeksiyonu olan hem de EBV transfeksiyonu olmayan kontrol kültürlerinde CD5+ hücrelerin yoğunluklarının zamana bağlı olarak az miktarda artış gösterdiği, bu artışta EBV transfeksiyonunun etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Şekil: 8, 9).

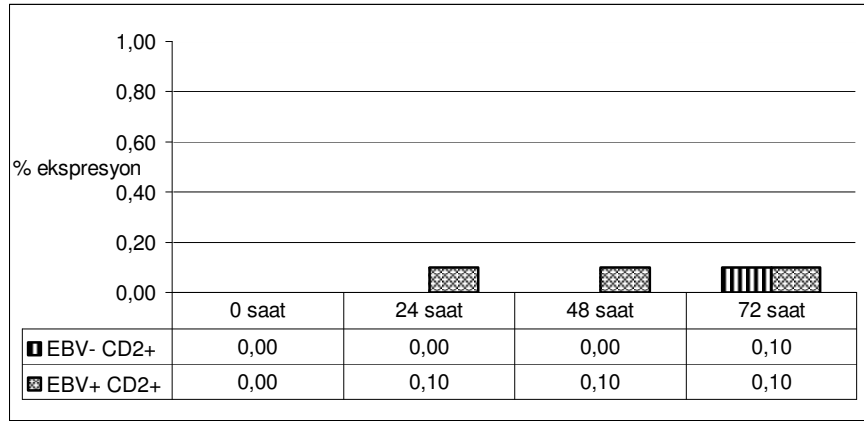


Şekil 8: 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı CD5 ekspresyonu.

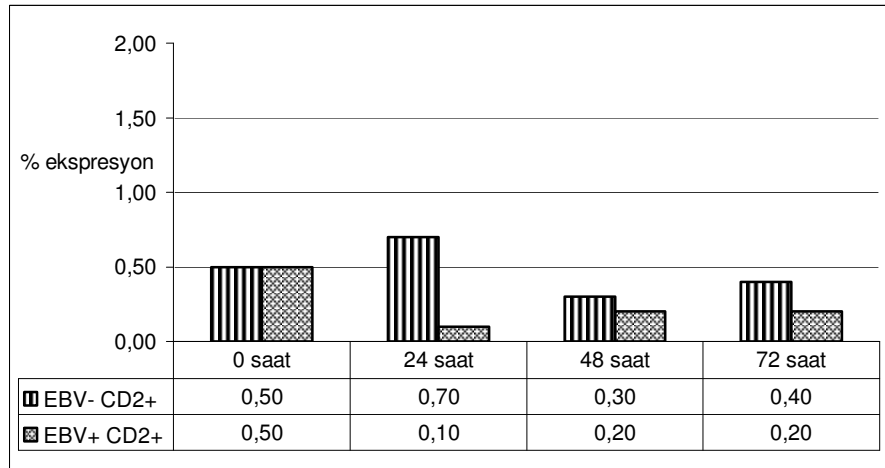


Şekil 9: 2.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı CD5 ekspresyonu.

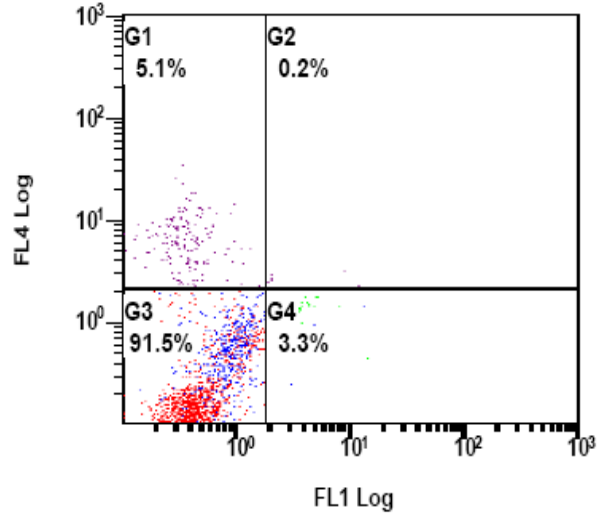
Akım sitometri ile CD5+ hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu incelendiğinde, bu hücrelerin HLA-G ekspresyonlarının çok düşük hatta saptanamayacak seviyelerde olduğu ve çok az bir artış olmakla birlikte EBV transfeksiyonunun CD5+HLA-G+ hücrelerin sayılarında belirgin bir artış yaratmadığı saptanmıştır (Şekil:10, 11, 12).



Şekil 10: 1.Gruba ait hücre kültürlerinden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı olarak aynı hücre yüzeyinde CD5 ve HLA-G ekspresyonu.

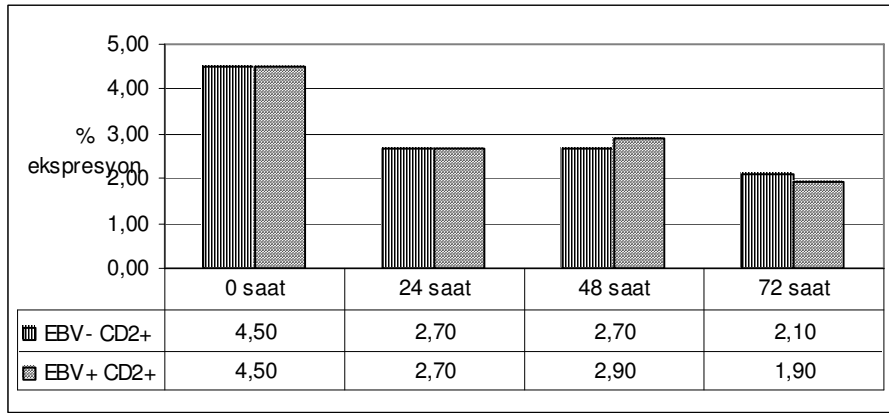


Şekil 11: 2.Gruba ait hücre kültürlerinden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı olarak aynı hücre yüzeyinde CD5 ve HLA-G ekspresyonu.

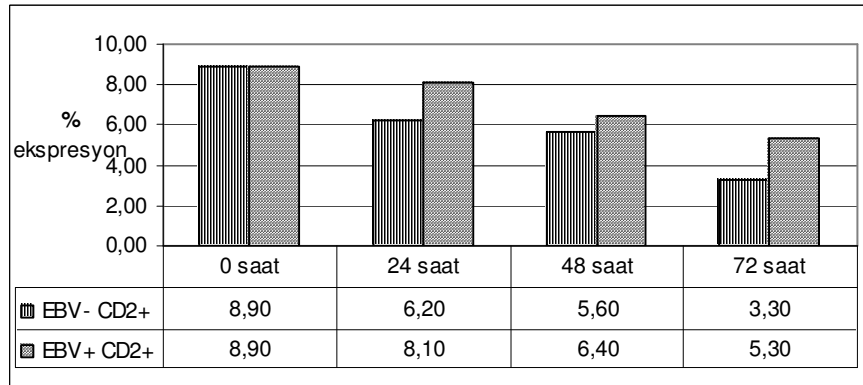


Şekil 12: CD5+HLA-G+ hücrelerin dağılımı yukarıdaki gibidir. G1 kadrnında CD5+ hücreler, G4 kadrnında HLA-G+ hücreler, G2 kadrnında ise aynı anda CD5+ ve HLA-G+ olan hücreler yer almaktadır.

Hücre kültür gruplarında CD19+ hücreler incelendiğinde kültür ortamında hem EBV transfeksiyonu olan hem de EBV transfeksiyonu olmayan kontrol kültürlerinde, CD5+ hücre gruplarının aksine, CD19+ hücrelerin yoğunluklarında zamana bağlı olarak azalma olduğu (*grup1 EBV- 0.saat: %4.5, 24.saat: %2.7, 48.saat: %2.7, 72 saat: %2.1; grup1 EBV+ 0.saat: %4.5, 24.saat: %2.7, 48.saat: %2.9, 72 saat: %1.9; grup2 EBV- 0.saat: %8.9, 24.saat: %6.2, 48.saat: %5.6, 72 saat: %3.3; grup2 EBV+ 0.saat: %8.9, 24.saat: %8.1, 48.saat: %6.4, 72 saat: %5.3*) ve bu azalmada EBV transfeksiyonunun etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Şekil: 13, 14).

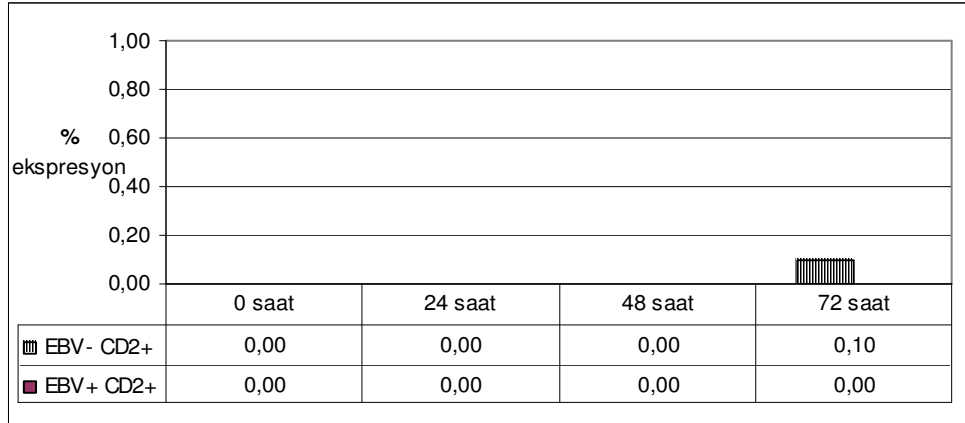


Şekil 13: 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı CD19 ekspresyonu.

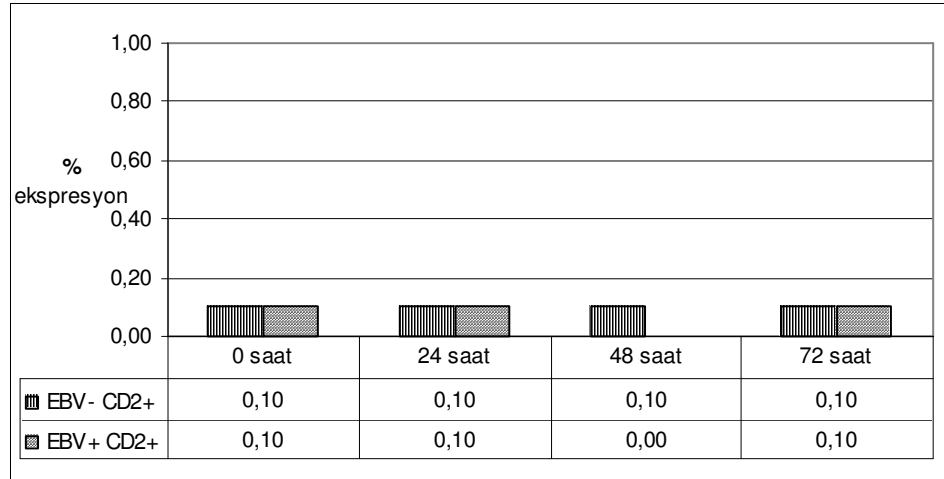


Şekil 14: 2.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı CD19 ekspresyonu

Akım sitometri ile CD19+ hücrelerin yüzeyinde HLA-G ekspresyonu incelendiğinde, CD19+HLA-G+ hücre sayısının, CD5+HLA-G+ hücreler gibi çok düşük hatta saptanamayacak seviyelerde olduğu ve EBV transfeksiyonunun CD19+ hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunda farklılık yaratacak bir artışa neden olmadığı saptanmıştır(Şekil:15,16).

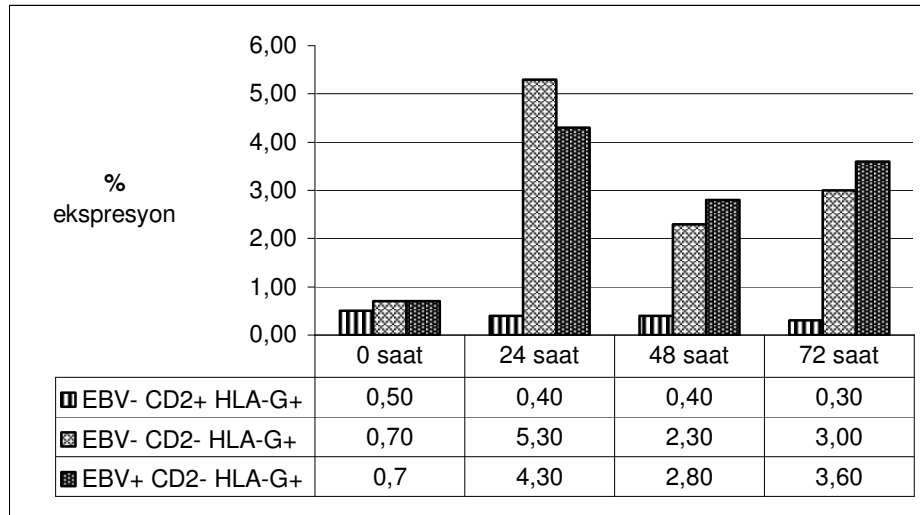


Şekil 15: 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı olarak aynı hücre yüzeyinde CD19 ve HLA-G ekspresyonu.

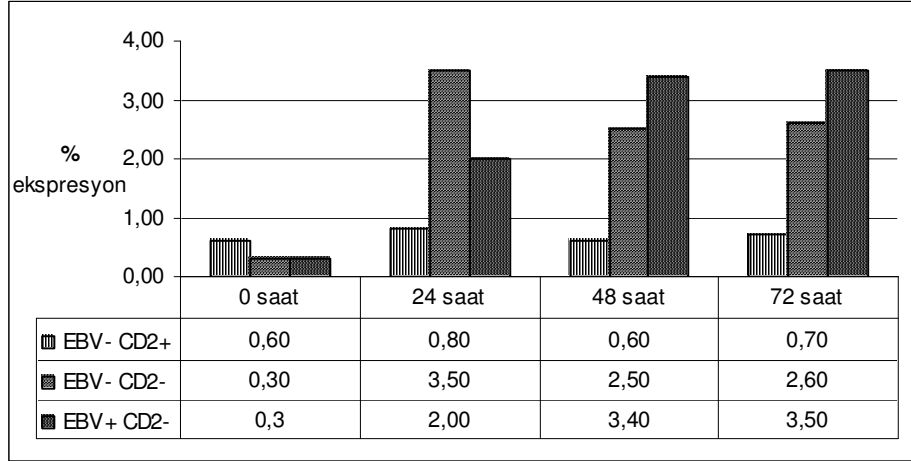


Şekil 16: 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı olarak aynı hücre yüzeyinde CD19 ve HLA-G ekspresyonu.

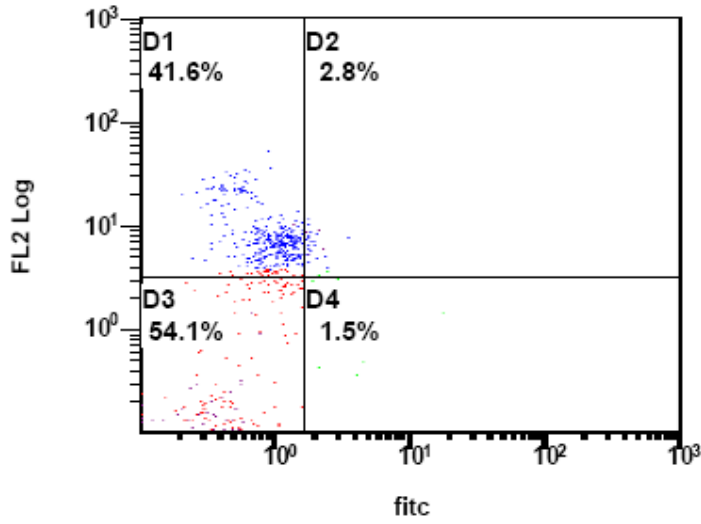
CD2+ yüzey molekülü taşıyan T hücrelerinin etkisini görebilmek amacıyla, CD2+ hücreler manyetik boncuklar kullanılarak, negatif seçim yoluyla ortamdan ayrıldıktan sonra, 24, 48 ve 72 saatlik hücre kültürleri değerlendirilmiştir. Akım sitometri yöntemi ile yapılan incelemede, CD2+ hücre ayrımının yapılmadığı grupta zaten oldukça az olan HLA-G eksprese eden hücre yoğunluğunun zamana bağlı olarak daha da azaldığı, bunun aksine CD2+ hücre ayrımının yapıldığı grupta HLA-G eksprese eden hücre sıklığının EBV transfeksiyonundan bağımsız, zamana bağlı olarak 5 ila 10 kat arasında değişen oranlarla arttığı gözlenmiştir (*grup1 EBV- T- 0.saat: %0.7, 24.saat: %5.3, 48.saat: %2.3, 72 saat: %3.0; grup1 EBV+ T- 0.saat: %0.7, 24.saat: %4.3, 48.saat: %2.8, 72 saat: %3.6; grup2 EBV- T- 0.saat: %0.3, 24.saat: %3.5, 48.saat: %2.5, 72 saat: %2.6; grup2 EBV+ T- 0.saat: %0.3, 24.saat: %2.0, 48.saat: %3.4, 72 saat: %3.5*) (Şekil: 17,18, 19)



Şekil 17: 1. Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerden, CD2 + hücre ayrımı ve EBV transfeksiyonu yapılmış grupta HLA-G+ hücre yoğunluğu.

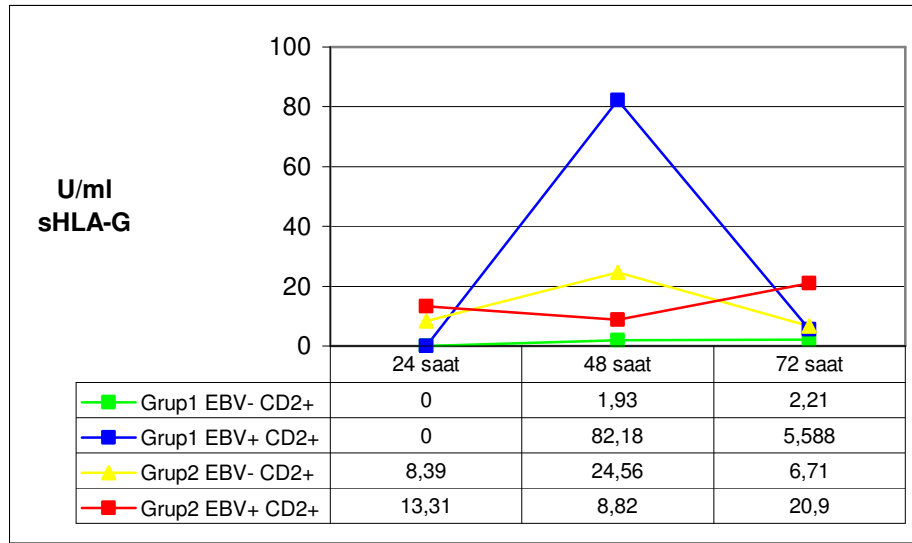


Şekil 18 : 2. Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerden, CD2 + hücre ayırımı ve EBV transfeksiyonu yapılmış grupta HLA-G+ hücre yoğunluğu.

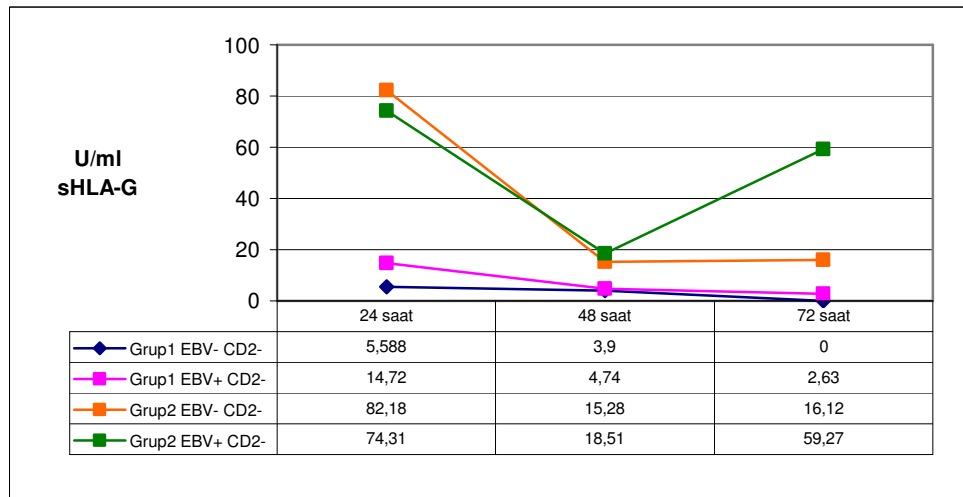


Şekil 19: CD2+ hücre ayırımının yapıldığı grupta CD19 ve HLA-G eksprese eden hücreler D2 kadrantında yer almaktadır.

Bu iki grubun ELISA yöntemi ile sHLA-G ölçümleri yapıldığında, CD2+ hücre ayrımının yapılmadığı grupta düşük seviyelerde olan sHLA-G seviyesinin az miktarlarda arttığı (Grafik: 1) ancak, CD2+ hücre ayrımının yapıldığı hem EBV transfeksiyonu olan hem de olmayan gruplarda, sHLA-G seviyesinde ilk 24 saat sonunda artış, 48 ve 72. saatlerin sonunda ise bir azalma olduğu gözlenmiştir (Grafik: 2).

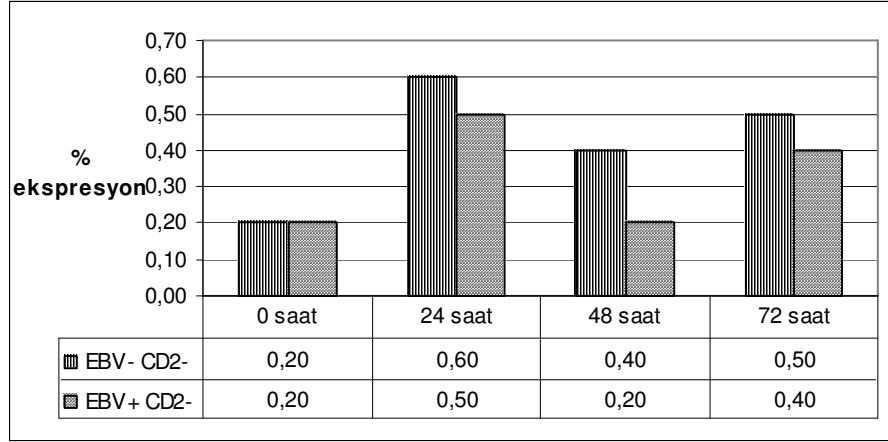


Grafik1: EBV transfeksiyonuna ve/veya zamana bağlı çözünür HLA-G seviyesi

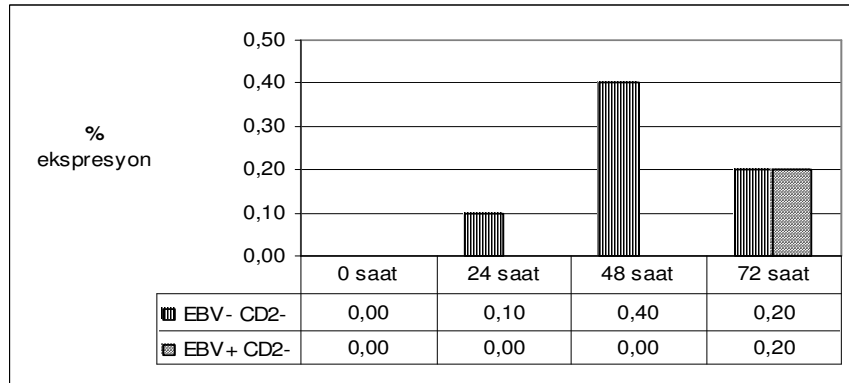


Grafik2: CD2+ hücre ayrımının ve EBV transfeksiyonunun yapıldığı gruplarda sHLA-G seviyesi

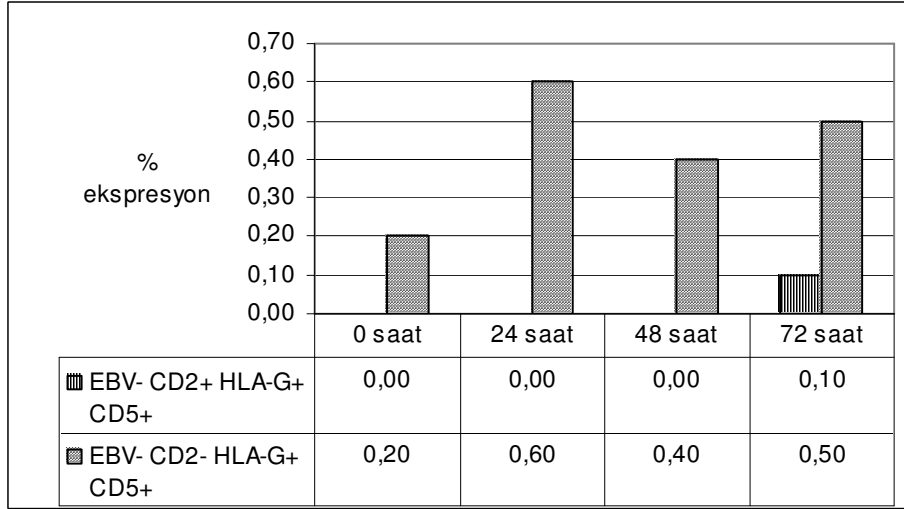
CD2+ hücrelerin negatif seçimle ayrıldığı hücre kültürlerinde CD5+HLA-G+ hücre yoğunluğu, EBV transfeksiyonuna ve zamana göre hafif bir artış göstermesine rağmen farklılık yaratacak bir değişiklik göstermemektedir (Şekil20, 21, 22).



Şekil 20: 1. Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerden, CD2 + hücrelerin ayrılması ve EBV transfeksiyonu sonrası aynı hücre yüzeyinde CD5 ve HLA-G ekspresyonu.

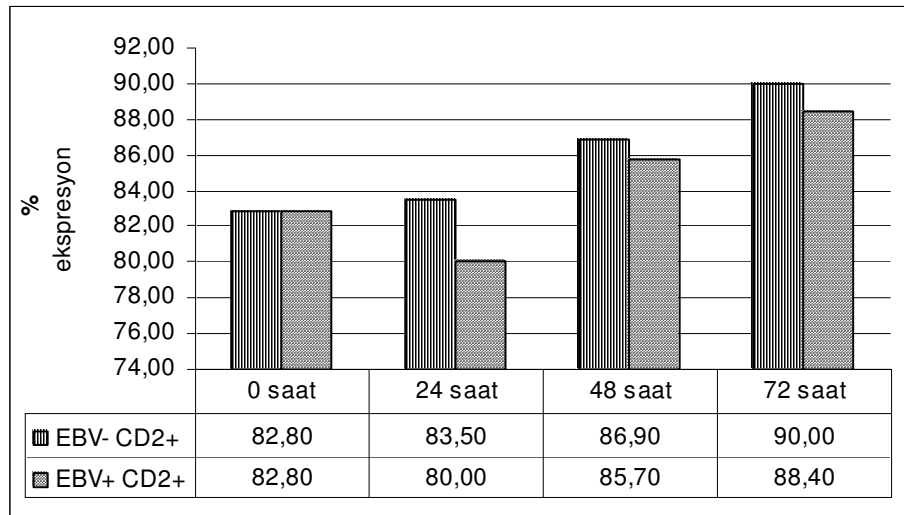


Şekil 21: 2.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerden, CD2 + hücrelerin ayrılması ve EBV transfeksiyonu sonrası aynı hücre yüzeyinde CD5 ve HLA-G ekspresyonu.



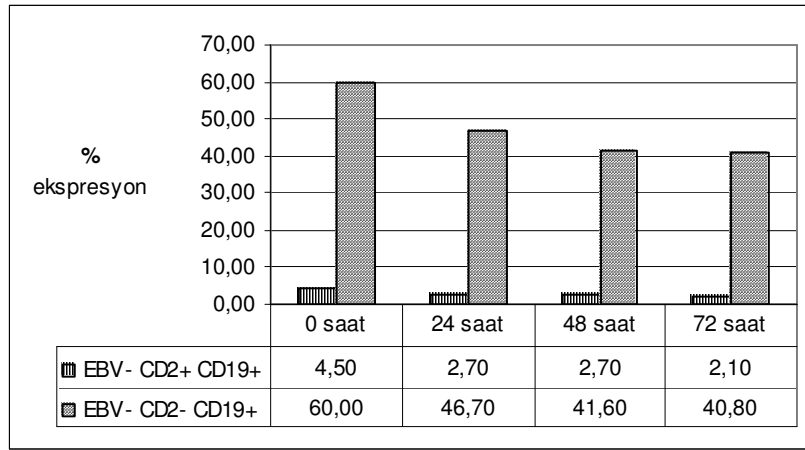
Şekil 22: 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerden, CD2 + hücrelerin ayrılması sonrası hücre yüzeyinde aynı anda CD5 ve HLA-G ekspresyonu.

CD2+ hücre varlığında CD5+ hücre yoğunlukları %80-90 düzeylerinde iken (Şekil:8), CD2+ hücrelerin negatif seçimi ile %10-%17 oranında değişen miktarlarda CD5+ hücre ortamdan uzaklaşmıştır.



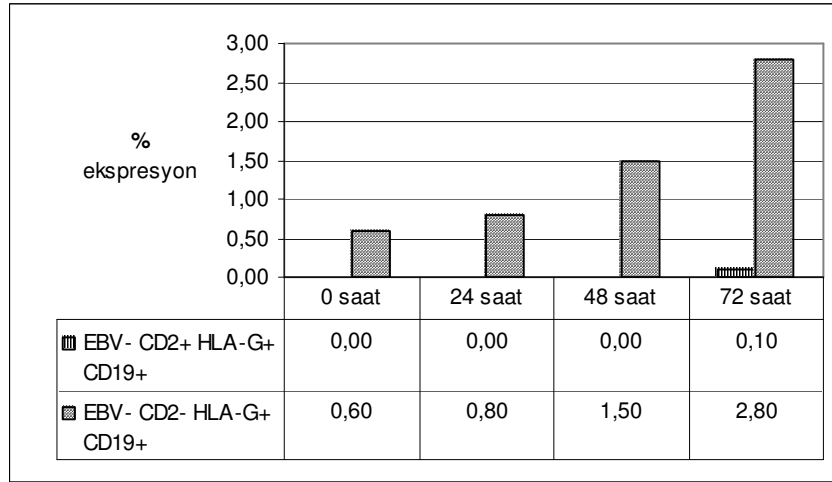
Şekil 8: 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerin, EBV transfeksiyonu ve zamana bağlı CD5 ekspresyonu

CD2+ hücrelerin negatif seçimle ayrıldığı hücre kültürlerinde, CD19+ hücre yoğunluğu EBV transfeksiyonundan bağımsız, zamana bağlı olarak, azalma göstermektedir (*grup1 EBV- T + 0.saat: %4.5, 24.saat: %2.7, 48.saat: %2.7, 72 saat: %2.1; grup2 EBV- T- 0.saat: %60, 24.saat: %46.7, 48.saat: %41.6, 72 saat: %40.8*) (Şekil 23).

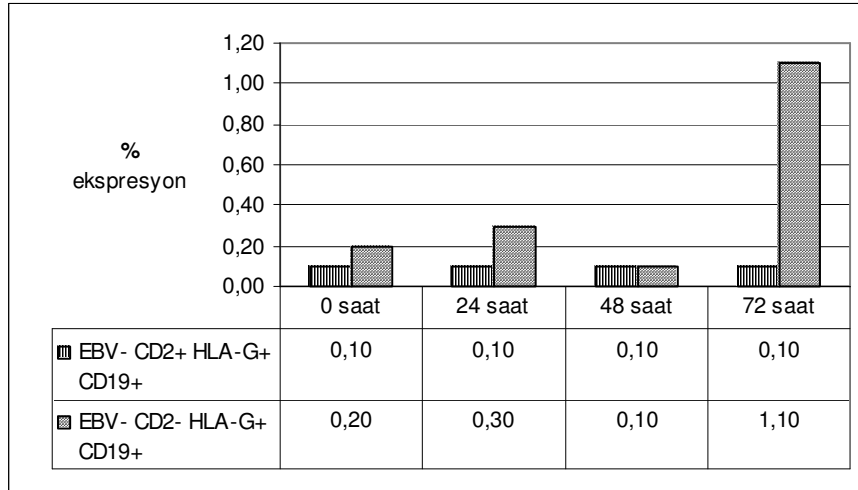


Şekil 23: 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerden, CD2 + hücrelerin ayrılması sonrası hücre yüzeyinde CD19 ekspresyonu.

CD19+ hücre yoğunluğu zamana bağlı olarak azalmasına rağmen CD19+HLA-G+ hücre grubu yoğunluğu zamana bağlı olarak artış göstermektedir (*grup1 EBV- T- 0.saat: %0.6, 24.saat: %0.8, 48.saat: %1.5, 72 saat: %2.8; grup2 EBV- T- 0.saat: %0.2, 24.saat: %0.3, 48.saat: %0.1, 72 saat: %1.1*)(Şekil: 24,25). CD2+ hücrelerin varlığında, CD19+ hücre yoğunluğu benzer şekilde zamana bağlı azalma göstermesine rağmen bu grupta CD19+ HLA-G+ hücrelerin yoğunluğunda bir değişiklik oluşmadığı ve belirlenemeyecek kadar düşük düzeylerde oldukları gözlenmiştir.



Şekil 24: 1.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerden, CD2+ hücreler ayrıldığında, HLA-G+ CD19+ moleküllerini aynı anda yüzeylerinde eksprese eden hücrelerin yoğunluğu.



Şekil 25: 2.Grup örneklerimizden izole ettiğimiz periferik kan mononükleer hücrelerden, CD2+ hücreler ayrıldığında, HLA-G+ CD19+ moleküllerini aynı anda yüzeylerinde eksprese eden hücrelerin yoğunluğu.

Tüm hücre kültürleri için zamana, EBV transfeksiyonuna, HLA-G ekspresyonuna ve CD2+ hücrelerin negatif seçimine bağlı olarak TGF- β ve IL-10 ölçümleri yapılmış, hesaplama sonucunda TGF- β ve IL-10 için anlamlı pozitif değerler saptanamamıştır.

V.TARTIŞMA

Hızla çoğalması ve uzun ömürlü olması nedeni ile, HLA-G ekspresyonu ve sHLA-G düzeylerindeki değişikliklerin incelenmesi amacıyla oluşturulan çalışmada, EBV ile transforme olan B hücreleri kullanılmıştır.

Bir çok hastalık durumu ile ilişkilendirilen HLA-G moleküllerinin, gebelik oluşumu sırasında fetusu annenin immün yanıtından korumasında ve benzer şekilde transplante edilen doku yada organın kabul yada reddedilmesinde ve kötü huylu tümörlerin immün sistemin kendilerine karşı oluşturduğu immün yanıtı kaçış mekanizmasında rolü olduğu gösterilmiştir. Gebelikte trofoblastlarda bulunan HLA-G ekspresyonu annenin NK hücrelerinin etkisinden fetusu korumada rol oynar. Bu dönemde mikroçevrenin ve salgılanan sitokin ve kemokinlerin de rolü olduğu bilinmektedir⁴².

Benzer şekilde kötü huylu tümörlerde de tümör hücrelerinin yada metastaz yapan hücrelerin HLA-G eksprese ettikleri ancak bu hücrelerin tümör ortamından uzaklaştıklarında bazılarında HLA-G mRNA saptanabilmesine rağmen, yüzeylerinde HLA-G eksprese etmedikleri gösterilmiştir¹⁵. Bu bulgular HLA-G ekspresyonunda yakın çevre etkisinin büyük rolü olduğunu göstermektedir. Bizim çalışma sonuçlarımıza göre, T hücrelerinin ve NK hücrelerinin ortamdaki ayrılması, B hücreleri yüzeyinde HLA-G ekspresyonunun artmasına neden olmaktadır. CD2 yüzey molekülü, T hücreleri, timositler ve NK hücreleri yüzeyinde eksprese olan, T hücre aktivasyonunda ve CTL ve NK hücre aracılı hücre lizisinde rol oynayan bir adezyon moleküldür. Bir çok hücre yüzeyinde bulunan CD58 (lenfosit fonksiyonları ile ilişkili antijen 3; LFA-3), CD2 için bir ligand olup

bu bağlanma, lökosit adezyonunda ve T lenfosit ko-stimülasyonunda etkili rol oynamaktadır¹.

CD2-CD58 bağlanması sonucunda T lenfositlerde aktivasyon ve Th1 tipi sitokin salınımı meydana gelmektedir. NK hücre aracılı sitolizde de Th1 tipi sitokin salınımı ön plandadır. Hücre kültür ortamından CD2+ hücrelerin ayrılmış olması Th1 tipi sitokinlerin de ortamdan uzaklaşmasına neden olmaktadır. Hücre-hücre teması veya sitokinlerin etkisi ile baskılanmış olan HLA-G ekspresyonu, CD2+ hücrelerin ortamdan ayrılması ile, CD19+ B hücrelerin yüzeyinde hızla artmaktadır.

Gebelikte, gebeliğin devamının sağlanmasında, kötü huylu tümörlerin kendilerine karşı oluşan immün sistem yanıtından kaçışında ve nakledilen doku yada organın yaşam şansının artışında Th1 tip immün yanıtın azalıp Th2 tip immün yanıtın artması önemlidir. Th2 tipi yanıtla, özellikle IL-10 gibi sitokinlerin artması sonucunda HLA-G ekspresyonunun arttığı ve Th1 tipi immün sistem yanıtının baskılandığı bilinmektedir.

Bu sonuçları yeni çalışmalarla tekrar görmek isteyen araştırmacılara B lenfositlerin transformasyonu sonrası, çoğalan hücre klonlarını monoklonal olacak şekilde pasajlayıp, her bir klonun ayrı ayrı incelenmesi önerilir. Eprahim Gazita ve arkadaşlarının 2007 yılında yayınladıkları “HLA-G expression is induced in Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines by culture conditions” başlıklı çalışmanın sonuçları ile bizim çalışmamızın sonuçlarını karşılaştırdığımızda farklılıklar görülmektedir. 2006 yılında planlanmış ve mali destek başvuruları aynı sene içinde yapılmış olan çalışmamızla büyük benzerlikler gösteren bu yayında, transforme olan hücrelerin 10 günlük hücre kültürleri yapılmış ve bu esnada çeşitli stres faktörleri ile hücreler uyarılmaya çalışılmıştır.

Azaltılmış oksijen konsantrasyonu, ve uzun süre tazelenmeyen besi ortamı gibi. CD2 ekspresyonu olan hücrelerin, kültür ortamından herhangi bir şekilde uzaklaştırılmadığı hücre kültür grupları, transformasyon sonrası, monoklonal olacak şekilde pasajlanmışlardır. Gazita'nın bulduğu sonuçlar 7-10 gün sonrasında hücrelerin eksprese ettiği HLA-G moleküllerinin miktarında bir artışa işaret etmektedir. Bizim sonuçlarımızda ise 72 saat boyunca kültür ortamında kalan hücrelerin eksprese ettikleri HLA-G molekülü yüzdesinde net bir artış izlenmemiştir.

EBV ile transforme edilmiş B lenfosit yüzeylerinde eksprese olan HLA-G molekülleriyle ilgili çalışmalar yapacak araştırmacılara hücre kültürlerinin inkübasyon sürelerini 10 güne kadar çıkarmaları önerilir. Ayrıca CD2 molekülü eksprese eden hücreleri ortamdaki uzaklaştırdıktan sonra zamana bağlı olarak ekspresyonu artan HLA-G molekülünün hangi nedene bağlı olarak arttığını araştırmak amacıyla ayrı ayrı gruplarda NK hücreleri ve T hücrelerinin ortamdaki uzaklaştırıp HLA-G ekspresyonunu incelemek elde edilen bilgilerin derinleşmesini sağlayacaktır. T lenfositlerle birlikte NK hücrelerinin de CD2 eksprese etmeleri sebebiyle bu etkilerinin ayrı ayrı incelenmesi, etkili mekanizmanın ortaya konulabilmesi için önerilir.

HLA-G ekspresyonunun kontrolü ile ilgili bilinenler, HLA-G ekspresyonu arttıkça hücrel yanıtın baskılandığı şeklindedir. Ancak yaptığımız çalışmanın sonuçları, hücrel yanıtın elemanlarından NK hücreleri ve T lenfositlerin ortamdaki uzaklaştırılması ile hücrelerin HLA-G ekspresyonlarında artış olduğunu göstermektedir. HLA-G ekspresyonu ile CD2 eksprese eden hücreler arasındaki bu karşılıklı ilişkinin temelinde T hücreler mi, NK hücreler mi, etkili? Bu sorunun cevabı, HLA-G ekspresyonunu kontrol eden faktörlerin ortaya konulabilmesinde önem taşımaktadır.²⁷

Bu bilgilerin ışığında, HLA-G ile immün sistem ilişkisinin sadece tek taraflı immün sistemin baskılanması yönünde olmadığı aynı zamanda immün sistemin de HLA-G üzerinde baskılayıcı etkisi olabileceği, immün sistem yanıtlarının beklenen denge içinde gittiği sürece HLA-G ekspresyonunun da artmayacağı düşünülebilir.

VI.SONUÇ

İmmünomodülatör etkisi olduğu bilinen, non klasik sınıf Ib molekülü olarak tanımlanan HLA-G molekülünün B hücreleri yüzeyindeki ekspresyonu, EBV ile transfeksiyonundan ve 24, 48 ve 72 saatlik kültür sonucuna göre zamandan bağımsız olarak sadece CD2+ hücrelerin varlığına ve yokluğuna bağlı olarak değişim göstermektedir. CD2+ hücre yokluğunda zamana bağlı olarak CD19+ hücrelerin yüzeyinde HLA-G ekspresyonu artmaktadır.

EBV ile transforme edilmiş ve edilmemiş olan periferik kan mononükleer hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonları, 0, 24, 48 ve 72.ci saatlerde incelendiğinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak bu hücre gruplarının tamamından CD2+ hücreleri uzaklaştırdığımızda, 0. saate kıyasla 24, 48 ve 72. saatlerde 5 ile 10 kat arasında artan HLA-G ekspresyonları gözlenmiştir.

Yüzeylerinde CD5 eksprese eden hücrelerin aynı anda eksprese ettikleri HLA-G düzeylerine bakıldığında da EBV transformasyonu ile bir ilişkisi gözlenmemiş ancak kültür ortamından CD2 eksprese eden hücreler uzaklaştırıldıktan sonra inkübe edilmeleri durumunda hafif bir artış gözlenmiştir.

Deneylere başlanıldığında deneylerin optimize edilmeleri için her basamak, 4 sağlıklı gönüllüde çalışılmıştır. Olası aksaklıkları tespit edebilmek ve hücrelerin monoklonal antikolar ile boyanmaları için gerekli olan optimum konsantrasyonları belirleyebilmek amacıyla yaptığımız bu deneylerin sonuçları, bu tez çalışmasında rapor ettiğimiz sonuçlarla uyumlu bulunmuştur.

VII.TÜRKÇE ÖZET

Klasik İnsan Lökosit Antijen sınıf I moleküllerine (HLA class I) kıyasla daha az polimorfizm gösteren insan lökosit antijen-G (HLA-G) molekülünün 7 farklı isoformu mevcuttur. HLA-G'nin başlangıçta trofoblastik hücrelerde eksprese edildiği düşünülmüş ancak sonradan immün sistemden korunmuş bölgelerde devamlı ekspresyonu olduğu, çözünebilir formlarının da belirlenebileceği gösterilmiştir. HLA-G' nin immün baskılanmaya neden olan bir molekül olduğu bilinmektedir.

Epstein-Barr Virus (EBV), persistan ve yaygın bir enfeksiyon etkeni olmasının yanında çeşitli kötü huylu tümörlerle de ilişkilendirilmiştir. EBV'nin bu inatçı persistansında, immün sistemin EBV'e karşı oluşturduğu immün yanıtın yetersizliğinin veya baskılanmasının rolü büyüktür.

Çalışmanın amacı HLA-G molekülünün, EBV ile transfeksiyonuna, zamana ve CD2+ hücrelerin varlığına/ yokluğuna bağlı olarak B hücreleri yüzeyindeki ekspresyonunun değişikliğini ve salgısal HLA-G seviyesindeki değişikliğin araştırılmasıdır.

Bu amaçla Gazi Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı hücre bankasında bulunan, EBV virionu üreten, B95-8 hücre kaynağı, B lenfositlerin transfeksiyonunda kullanılmıştır. CD2+ hücrelerin varlığında ve yokluğunda ve EBV transfeksiyonu varlığında ve yokluğunda 24, 48 ve 72 saatlik kültürler hazırlanmış, hücre yüzeylerindeki HLA-G ekspresyonu monoklonal antikorlar kullanılarak akım sitometri ile, çözünen HLA-G (sHLA-G) seviyeleri, interlökin-10 (IL-10) ve transforming büyüme faktörü-beta (TGF- β) seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçülmüştür.

Çalışma sonuçlarına göre CD19+ hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun, EBV transfeksiyonundan bağımsız, ancak CD2+ hücre yokluğunda zamana bağlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır.

Bu sonuçları ile proje çalışması literatüre ve bundan sonra yapılacak olan çalışmalara kaynak oluşturacak niteliktedir.

Anahtar kelimeler: HLA-G, EBV, B hücre

VIII.YABANCI DİLDE ÖZET

Denoting less polymorphism when compared to classical Human Leukocyte Antigen class I (HLA class I) molecules, the Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) molecule has 7 different isoforms. Initially, HLA-G was considered to be expressed in trophoblastic cells but it was later on proved to have permanent expression in immune privileged sites and to have determinable soluble forms. HLA-G is known as a molecule that causes immune suppression.

Epstein-Barr Virus (EBV) is associated with several malignant tumors besides being a persistent and common agent of infection. Either immune expression or immune response incompetence of the immune system against EBV has a major role in EBV's persistence.

The aim of the study was to search expression variance of the HLA-G molecule on the surface of B cells dependent on its transfection with EBV, time and presence / absence of CD2+ cells and to search variance of soluble HLA-G level. To this end, B95-8 cell source existent in cell bank of Gazi University Head Department of Immunology which produces EBV virion has been used in the transfection of B lymphocytes. In the presence and absence of CD2+ cells and in the presence and absence of EBV transfection; 24, 48 and 72-hour cultures have been prepared and HLA-G expression on the surface of cells have been measured by flow cytometry by using monoclonal antibodies and soluble HLA-G (sHLA-G) levels, interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor-beta (TGF- β) levels have been measured by ELISA method.

In respect of the study results, HLA-G expression on the surface of CD19+ cells was determined as independent from EBV transfection yet showing a time related increase in the absence of CD2+ cell.

By the results it reveals, the project study shall inherently be quoted as authority for literature and further studies.

Key words: HLA-G, EBV, B cell

IX.KAYNAKLAR

- 1-ABBAS A.K.,Lichtman A.H.:Cellular and Molecular Immunology, 5th Edition, Philadelphia, USA, Saunders Elsevier Science, 2003.Pp:65
- 2-FAVIER B, Lemaout J, Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, Carosella ED. Research on HLA-G: an update. Tissue Antigens; 2007; 69: 207-211.
- 3-KLEIN J, Sato A, et al. The HLA system. First of two parts. The New England Journal of Medicine. 2000; 10; 343: 702-709.
- 4-THOMSON G, HLA disease associations: models for the study of complex human genetic disorders. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2003; 2; 40: 117-149.
- 5-UROSEVIC M, Reinhard D. HLA-G-An ace up the sleeve? ASHI Quarterly. 2002; 3rd Quarter; 106-109.
- 6-LEMAOULT J, Le Discorde M, Rouas- Freiss N, Moreau P, Menier C, McCluskey J, Carosella ED. Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. Tissue Antigens; 2003; 62: 273-284.
- 7-ROUAS-FREISS N, Goncalves RM, Menier C. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 1997; 94: 11520-11525.
- 8-BASTURK B, Karakayali F, Emiroglu R. Human Leukocyte Antigen-G, a New Parameter in the Follow-up of Liver Transplantation. Transplantation Proceedings, 2006; 38: 571-574.
- 9-LILA N, Carpentier A, Amrein C. Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. Lancet; 2000; 355: 2138.

- 10-TORRES MI, Le Discorde M, Lorite P, Rios A, Gassull MA, Gil A, Maldonado J, Dausset J, Carosella ED. The differential expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease. *International Immunology*; 2004; 16; 4: 579-583.
- 11-WIENDL H, Mitsdoerffer M, Weller M. Express and protect yourself: the potential role of HLA-G on muscle cells and in inflammatory myopathies. *Human Immunology*; 2003; 64; 11: 1050-1056.
- 12-REBMANN V, Busemann A, Lindemann M, Grosse-Wilde H. Detection of HLA-G5 secreting cells. *Human Immunology*; 2003; 64; 11: 1017-1024.
- 13-BUKUR J, Rebmann V, Grosse-Wilde H, Luboldt H, Ruebben H, Drexler I, Sutter G, Huber C, Seliger B. Functional role of human leukocyte antigen-G up-regulation in renal cell carcinoma. *Cancer Research*; 2003; 63: 4107-4111.
- 14-BUKUR J, Malenica B, Huber C, Seliger B. Altered expression of nonclassical HLA class Ib antigens in human renal cell carcinoma and its association with impaired immune response. *Human Immunology*; 2003; 64; 11: 1081-1092.
- 15-MARINCOLA FM, Wang E, Herlyn M. Tumors as elusive targets of T-cell-based active immunotherapy. *Trends in Immunology* 2003; 24: 335-342.
- 16-CHANG CC, Murphy SP, Ferrone S. Differential in vivo and in vitro HLA-G expression in melanoma cells: potential mechanisms. *Human Immunology*; 2003; 64; 11: 1057-1063.
- 17-ROUAS-FREISS N, Moreau P, Menier C, Carosella ED. HLA-G in cancer: A way to turn off the immun system. *Seminars in Cancer Biology*; 2003; 13; 5: 325-336.

- 18-UROSEVIC M, Willers J, Mueller B. HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. *Blood*; 2002; 99: 609-617.
- 19-UROSEVIC M, Kurrer MO, Kamarashev J. Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. *American Journal of Pathology*; 2001; 159: 817-824.
- 20-UROSEVIC M, Dummer R. HLA-G in skin cancer: a wolf in sheep's clothing? *Human Immunology*; 2003; 64; 11: 1073-1080.
- 21-WIENDL H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immun escape. *Journal of Immunology*; 2002; 168: 4772-4780.
- 22-SEBTI Y, Le Fric G, Pangault C, Gros F, Drenou B, Guilloux V, Bernard M, Lamy T, Fauchet R, Amiot L. Soluble HLA-G molecules are increased in lymphoproliferative disorders. *Human Immunology*; 2003; 64; 11: 1093-1101.
- 23-ARACTINGI S, Kanitakis J, Euvrard S. Selective expression of HLA-G in malignant and premalignant skin specimens in kidney transplant recipients. *International Journal of Cancer*; 2003; 106: 232-235.
- 24-ROUAS-FREISS N, Moreau P, Ferrone S, Carosella ED. HLA-G Proteins in Cancer: Do They Provide Tumor Cells with an Escape Mechanism. *Cancer Research*; 2005; 65: 22: 10139-10144.
- 25-NUCKEL H, Rebmann V, Durig J, Duhrsen U, Grosse-Wilde H. HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 2005; 105: 1694-1688.

- 26-KANJANA S, Chonlakit K, Sairoong S, Wichai P, Narin V, Apiwat M, Epstein-Barr Virus DNA in Serum/Plasma as a Tumor Marker for Nasopharyngeal Cancer. *Clinical Cancer Research*; 2000; 6: 1046-1051.
- 27-EPHRAIM Gazita, Maya Sherfa, Elkana Balbina, Anna Muratova, Itamar Goldsteinb, Ron Loewenthala. HLA-G expression is induced in Epstein-Barr virus–transformed B-cell lines by culture conditions. *Human Immunology*; 2007; 68: 463-468.
- 28-NIEDOBITEK G, Young LS. Epstein-Barr virus persistence and virus-associated tumours. *Lancet*; 1994; 343:333.
- 29-HOUMANI JL. Intracellular Localization of Ribosomal Protein L22 in EBV-infected Cells May Be Determined by Competition Between RNA Ligands. The 12th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases; 2006.
- 30-RICKINSON AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 3d ed. Vol 2. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 2397-446.
- 31-ANDERSSON J, Clinical and Immunological Considerations in Epstein-Barr Virus-associated Diseases. *Scandinavian Journal Of Infectious Diseases. Supplementum* 1996; 100: 72-82.
- 32-MIYAZAKI BI, Cheung RK, Dosch HM. Viral interleukin-10 is critical for the induction of B cell growth transformation by Epstein-Barr virus. *Journal of Experimental Medicine*; 1993; 178: 439-47.
- 33-MOORE KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Viera P, Mossman TR. Interleukin-10. *Annual Review of Immunology*; 1993; 11:165-90.
- 34-FIORENTINO DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine

- production by Th1 clones. *Journal of Experimental Medicine*; 1989; 170: 2081-2095.
- 35-HO, A. S.-Y. Moore KW. Interleukin 10 and its receptor. *Therapeutic Immunology*; 1994; 1: 173-185.
- 36-MOORE KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCKF1. *Science*; 1990; 248: 1230-1234.
- 37-VIEIRA P, de Waal Malefyt K, Dang MN, Johnson KE, Kastelein R, Fiorentino DF, DeVries JE, Roncarolo MG, Mosmann TR, Moore KW. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF/IL-10) cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCKF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 1991; 88: 1172-1176.
- 38-HUDSON GS, Bankier AT, Satchwell SC, Barrell BG. The short unique region of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Virology*; 1985; 147: 81-98.
- 39-FIORENTINO DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TK, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *Journal of Immunology*; 1991; 146: 3444-3451.
- 40-TAGA K, and Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production, *Journal of Immunology*; 1992; 148:1143-1148.
- 41-DE WAAL Malefyt R, Hanen J, Spits H, Roncarolo M-G, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility

complex expression. *Journal of Experimental Medicine*; 1991; 174: 915-924.

42-MOREAU P, Adrian cebestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, Carosella ED. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *International Immunology*. 1999 ;11; 5:803-11.

43-ATANABE Y, Kinoshita A, Yamada T, Ohta T, Kishino T, Matsumoto N, Ishikawa M, Niikawa N, Yoshiura K. A catalog of 106 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and 11 other types of variations in genes for transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and its signaling pathway. *Journal of Human Genetics*. 2002;47; 9: 478-83.

44-GOGGINS M, Shekher M, Turnacioglu K, Yeocj, Hruban RH, Kern SE. Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Research*. 1998 Dec 1;58; 23:5329-32.

45-CARDILLO MR, Yap E, Castagna G. Molecular genetic analysis of TGF beta1 in breast cancer. : *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 1997 Mar;16; 1:57-63.

46-LUCKE CD, Philpott A, Metcalfe JC, Thompson AM, Hughes-Davies L, Kemp PR, Hesketh R. Inhibiting mutations in the transforming growth factor beta type 2 receptor in recurrent human breast cancer. *Cancer Research*. 2001 Jan 15;61; 2: 482-5.

47-ZIV E, Cauley J, Morinpa, Saiz R, Browner WS. Association between the T29-->C polymorphism in the transforming growth factor beta1 gene and breast cancer among elderly white women: The Study of Osteoporotic Fractures. *JAMA* 2001 Jun 13; 285; 22: 2859-63.

- 48-CRESWELL J, Wong KW, Henry M, Robertson H, Nealde, Kirby JA.
Adhesion of lymphocytes to bladder cancer cells:the role of $\alpha\text{E}\beta_7$
integrin. Springer Verlag, 2002, 175-82.
- 49-CHOI KC, Kang SK, Tai CJ, Auersperg N, Leung PC. The regulation of
apoptosis by activin and transforming growth factor-beta in early
neoplastic and tumorigenic ovarian surface epithelium.Journal of
Clinical Endocrinology and Metabolism. 2001 May;86; 5: 2125-35.
- 50-COLIGAN JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W.:
Current Protocols in Immunology, Volume1, USA, John
Wiley&Sons,Inc. 1994, 7.22.
- 51-COLIGAN JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W.:
Current Protocols in Immunology, Volume1, USA, John
Wiley&Sons,Inc. 1994, 7.1.

ÖZGEÇMİŞ:

Konya, 1975 yılı doğumluyum. İlköğretimimi Konya Devrim İlkokulu ve Barbaros İlkokulunda tamamlayıp, Konya Meram Anadolu Lisesi'nden 1993 yılında mezun oldum. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesinde eğitime başladım. 2001 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun olup Ankara'da çeşitli sağlık kuruluşlarında pratisyen hekim ve mesul müdür olarak çalıştım. 2003 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalında doktora eğitimime başladım. Halen Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı bünyesinde çalışmaktayım. Evliyim ve bir çocuğum var. İngilizce bilmekteyim.



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURULU

Tarih

14.06.2006

Sayı

197

Konu

Etik Kurul Kararı Hk.

Fakültemiz Öğretim Üyesi Prof.Dr.Cemalettin Aybay'ın sorumlu araştırmacısı olduğu **“Human Lökosit Antijen-G'nin Ebstein Barr Virus ile enfekte B Lenfositler Üzerindeki Ekspresyonu”** başlıklı araştırma projesi, Etik Kurulumuzca incelenerek bütçe haricinde uygun bulunmuştur.

Bütçe için Tübitak'tan onay geldikten sonra çalışmaya başlanabilir.


Prof.Dr.Türkiz GÜRSSEL
BAŞKAN

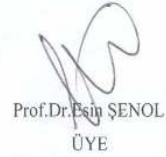

Prof.Dr.Leyla MEMİŞ
ÜYE

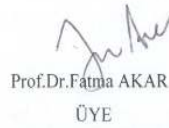

Prof.Dr.Ceyda KARADENİZ
ÜYE

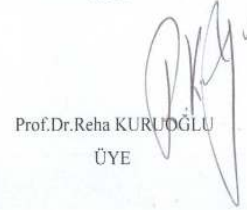
Prof.Dr.Candan TUNCER
ÜYE (Katılmadı)

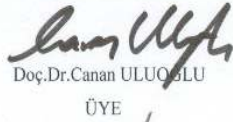

Prof.Dr.Aysel ARICIOĞLU
ÜYE


Prof.Dr.Ayla GÜLEKON
ÜYE


Prof.Dr.Esin ŞENOL
ÜYE

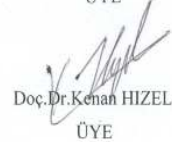

Prof.Dr.Fatma AKAR
ÜYE


Prof.Dr.Reha KURUOĞLU
ÜYE


Doç.Dr.Canar ULUOĞLU
ÜYE

Doç.Dr.Aykın ŞİMŞEK
ÜYE (Katılmadı)

Doç.Dr. Nesrin ÇOBANOĞLU
ÜYE (Katılmadı)


Doç.Dr.Kenan HİZEL
ÜYE