

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

**GOLGİ STRESİNİN FOLİKÜLER T VE B HÜCRE YÜZEYİNDE
HLA-G EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN

MİRAY KAVUZLU

DOKTORA TEZİ

ANKARA - 2024

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

**GOLGİ STRESİNİN FOLİKÜLER T VE B HÜCRE YÜZEYİNDE
HLA-G EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN

MİRAY KAVUZLU

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. BİLKAY BAŞTÜRK

ANKARA – 2024

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

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

Tez Savunma Tarihi: 11/09/2024

Tez Adı: Golgi Stresinin Foliküler T ve B Hücre Yüzeyinde HLA-G Ekspresyonuna Etkisinin Araştırılması

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

İmza

ONAY

Enstitü Müdürü

Tarih: ... / ... /

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 08/10/2024

Öğrencinin Adı, Soyadı: Miray KAVUZLU

Öğrencinin Numarası: 21910035

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Programı: Tıbbi Biyoloji Doktora Programı

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı:

Tez Başlığı: Golgi Stresinin Foliküler T ve B Hücre Yüzeyinde HLA-G Ekspresyonuna Etkisinin Araştırılması

Yukarıda başlığı belirtilen Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 100 sayfalık kısmına ilişkin, 08/10/2024 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6'dır. 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

Doku Tipleme Laboratuvarında çalışmaya başladığım günden itibaren hem bilimsel hem de kişisel gelişimimde desteğini hep üzerimde hissettiğim, akademik eğitimim sırasında beni sürekli destekleyen, hep daha ileriye gitmem için beni yüreklendiren ve benim için bir tez danışmanından daha fazlası olan tez danışmanım İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Bilkay BAŞTÜRK’e,

Doktora eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen, bilgi ve birikimleri ile katkı sağlayan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatma Belgin ATAÇ’a,

Başkent Üniversitesi Kurucusu Prof. Dr. Mehmet HABERAL’a,

Tez çalışmasında örneklerin elde edilmesinde destek olan Başkent Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalından Prof. Dr. Kenan ÇALIŞKAN’a,

Golgi’nin immünohistokimya yöntemi ile boyamasının yapılmasında bana destek olan Sabancı Üniversitesinden Prof. Dr. Özgür KÜTÜK’e,

Destekleri için Başkent Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Araş. Gör. Caner İNCEKAŞ’a,

Akademik eğitimim boyunca desteğini benden esirgemeyen, her anında yanımda olan, bir iş arkadaşından fazlası olan sevgili dostum Doku Tipleme Laboratuvarı Sorumlu Biyoloğu Bircan ZENGEL’e,

Her zaman birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Doku Tipleme Laboratuvarı çalışanlarına,

Hayat yolculuğum boyunca beni hep destekleyen, hep en iyisi için teşvik eden başta canım annem ve babam olmak üzere aileme,

Sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

ÖZET

Miray Kavuzlu, Golgi Stresinin Foliküler T ve B Hücre Yüzeyinde HLA-G Ekspresyonuna Etkisinin Araştırılması, Başkent Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Doktora Programı, 2024

Tez çalışmasının amacı foliküler B hücrelerinde Brefeldin A muamelesi ile meydana getirilen Golgi stresinin MHC Sınıf-II ve non-klasik HLA-G moleküllerinin ekspresyonuna etkisinin ve foliküler B hücrelerinde oluşturulan bu stresinin T foliküler yardımcı (T_{fh}) hücrelerin yüzeyindeki ve B hücre yüzeyindeki HLA-G molekülünün ekspresyonuna etkisini araştırmaktır. Nakillerde stres altında kalan adaptif immün sistem hücrelerinin yanıtlarına ve greft doku işlevselliğine ışık tutacak bulguların elde edilmesi amaçlandı. İmmün sistem kendinden olanı ve olmayanı tanıyarak yabancı antijenleri “Major Histokompatibilite Kompleksi (MHC)” ile T hücrelerine sunar. MHC molekülleri Sınıf I, II, III ve IV olmak üzere 4 sınıfa ayrılır. Sınıf-I MHC (HLA-A, -B, -C) ve Sınıf-II MHC (HLA-DR, -DP, -DQ) moleküllerinin birincil görevi antijen sunumuna katılmaktır. Klasik olmayan Sınıf-I MHC (HLA-E, -F, -G) molekülleri ise immünomodülatör moleküllerdir. Sınıf-I MHC molekülleri CD8⁺ sitotoksik T hücrelere, Sınıf-II MHC molekülleri ise CD4⁺ yardımcı T hücrelerine antijen sunarlar. B hücreleri aktive olduktan sonra MHC Sınıf-II moleküllerinin ekspresyonlarını arttırarak antijen sunan hücre görevi görebilirler. MHC Sınıf-II peptid kompleksi CD4⁺ T hücrelerine antijen sunmak için hücre yüzeyine taşınır. Non-klasik Sınıf-I HLA-G molekülleri bağışıklık sisteminin modülasyonunda görev alır. HLA-G için reseptör görevi üstlenen immünglobülin benzeri transkript 2 (ILT2: Ig-Like Transcript 2) B hücreleri, T hücreleri, NK (Natural Killer) hücreleri, dendritik hücreler ve diğer bağışıklık hücreleri tarafından eksprese edilir. ILT2'nin ligandları ile etkileşimi, T ve B hücrelerinin fonksiyonunu baskılar. Alıcı (konak), greft dokuyu yüzeyinde bulunan MHC molekülleri aracılığı ile tanır. Golgi, proteinlerin ve lipidlerin alınmasında, işlenmesinde, paketlenmesi ve taşınmasında merkezi bir rol oynar. Brefeldin A Golgi için bir stres indükleyicisidir ve golgi stres yollarını aktive edip golginin yapısının bozulmasına neden olarak protein taşınmasını bloke eder.

Bu çalışma 3 farklı kişiden alınan sekonder lenfoid doku örneklerinin (dalak örnekleri) kullanıldığı deneysel bir çalışmadır. Dalak örneklerinden manyetik boncuk yöntemi ile T hücre ve B hücre izolasyonu yapıldı. T:B hücre ko-kültürü yapılarak akım sitometri yöntemi

ile 0. saat immünofenotipleme çalışması yapıldı. B hücrelerinde Brefeldin A ile muamelesi ile golgi stresi indüklendi. B hücrelerde golgi stresi immünohistokimya yöntemiyle anti-GM130 boyaması yapıldıktan sonra immünofloresan mikroskopta görüntülenmesi ve akım sitometri yöntemi ile HLA-DR ekspresyon oranının değişiminin belirlenmesi ile gösterildi. Hücre kültürü yöntemi ile T:B hücre ko-kültürü yapıldı ve steroid muamelesi uygulandı. Hücre kültüründe zamana (6/12/24. saat), golgi stresine ve steroid etkisine bağlı olarak Tfh hücreler ile foliküler B hücrelerinin hücre yüzey belirteçlerinin değişimleri akım sitometri yöntemiyle değerlendirildi. B hücrelerinde Brefeldin A muamelesi ile oluşturulan golgi stresine bağlı olarak MHC Sınıf-II molekülü (HLA-DR) ekspresyonun azaldığı, steroid muamelesiyle Tfh hücre ve B hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonunun arttığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: HLA-G, foliküler B hücre, T foliküler yardımcı hücre, Golgi stresi

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: KA22/308) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

ABSTRACT

Miray Kavuzlu, Investigation of the Effect of Golgi Stress on HLA-G Expression on Follicular T and B Cell Surface, Başkent University, Institute of Health Sciences, Department of Medical Biology, PhD Program in Medical Biology, 2024

The aim of thesis study is to investigate the effect of golgi stress induced by Brefeldin A treatment on the expression of MHC Class-II and non-classical HLA-G molecules in follicular B cell. We are going to investigate the impact of golgi stress of B follicular cells on HLA-G molecules expression on the cell surfaces of T follicular helper (Tfh). The immune system recognizes self and non-self antigens, and present foreign antigens to T cells through “Major Histocompatibility Complex (MHC)”. MHC have been classified into four classes: class-I, II, III and IV. The primary function of MHC Class-I (HLA-A, -B, -C) and MHC Class-II (HLA-DR, -DP, -DQ) molecules is to participate in antigen presentation. Non-classical Class-I MHC (HLA-E, -F, -G) molecules are immunomodulatory molecules. Class-I HLA molecules present antigens to CD8⁺ cytotoxic T cells while Class-II molecules present to CD4⁺ hepler T cells. After B cells are activated, it can act as antigen-presenting cells by increasing the expression of MHC Class-II molecules. The MHC Class-II peptide complex is transported to the cell surface to present antigen to CD4⁺ T cells. Non-classical Class-I HLA-G molecules function in the modulation of the immune system Immunoglobulin-like transcript 2 (ILT2), which acts as a receptor for HLA-G, is expressed by B cells, T cells, NK cells, dendritic cells, and other immune cells. Interaction of ILT2 with its ligands suppresses the function of T and B cells. The recipient recognizes the graft tissue with the MHC molecules on its surface. The Golgi plays a central role in the uptake, processing, packaging and transport of proteins and lipids. Brefeldin A is a stress inducer for golgi. It activates the golgi stress pathways, disrupts the structure of golgi and blocks protein transport. This is an experimental study in which secondary lymphoid tissue samples (spleen samples) from 3 different individuals were used. T cells and B cells were isolated from spleen samples by magnetic bead method. T:B cell co-culture was performed and 0. hour immunophenotyping study was performed by flow cytometry method. Golgi stress was induced in B cells by treatment with Brefeldin A. Golgi stress in B cells was demonstrated by immunohistochemistry using anti-GM130 staining followed by immunofluorescence microscopy and flow cytometry to determine the change in HLA-DR expression ratio. T:B

cell co-culture was performed by cell culture method and steroid treatment was applied. Changes in cell surface markers of Tfh cells and follicular B cells depending on time (6/12/24 hours), golgi stress and steroid effect in cell culture were evaluated by flow cytometry method. In B cells isolated from secondary lymphoid organs, golgi stress induced by Brefeldin A treatment decreased the expression of HLA-DR, an MHC Class-II molecule on the cell surface. Steroid treatment increased HLA-G expression on the surface of Tfh cells and B cells.

Keywords: HLA-G, Follicular B cell, T follicular helper cell, Golgi stress

This study was approved by Baskent University Institutional Review Board and Ethics Committee (Project no: KA22/308) and supported by Baskent University Research Fund.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	x
RESİMLER LİSTESİ	xiii
GRAFİKLER LİSTESİ	xv
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Bağışıklık Sistemi	2
2.1.1. Doğal bağışıklık	2
2.1.2. Adaptif (Edinsel) bağışıklık	3
2.2. Lenfoid Organlar	3
2.2.1. Primer (santral) lenfoid organlar.....	4
2.2.2. Sekonder (periferik) lenfoid organlar.....	4
2.3. Germinal Merkezler.....	7
2.3.1. Germinal merkez oluşumu	7
2.4. B Hücreleri (B Lenfositleri).....	11
2.4.1. B hücrelerinin sınıflandırılması	11
2.4.2. B hücre gelişimi.....	11
2.5. CD4+ T Hücre Farklılaşması	13
2.6. Büyük Doku Uyumluluk Kompleksi ve Antijen Sunumu	15
2.6.1. MHC Sınıf-I Antijen Sunumu	16
2.6.2. MHC Sınıf-II Antijen Sunumu.....	18
2.7. Golgi	19
2.7.1. Golgi Stres Yanıtı	21
2.7.2. Golgi ve Brefeldin A	22
2.7.3. Golgi ve MHC ilişkisi	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24

3.1. ÖRN160524 İsimli Örnek ile Yapılan Çalışmalar	24
3.2. ÖRN010324 İsimli Örnek ile Yapılan Çalışmalar	25
3.3. ÖRN070624 İsimli Örnek ile Yapılan Çalışmalar	25
3.4. Dalak Örneğin Parçalanması ve Lenfosit İzolasyonu.....	26
3.5. Manyetik Boncuk Yöntemi ile T ve B Hücre İzolasyonu.....	28
3.6. Akım Sitometri Yöntemi ile Saflık Belirleme	30
3.7. Akım Sitometri Yöntemi ile 0. Saat İmmünojenotipleme Çalışması.....	32
3.7.1. Hücre yüzey çalışması	33
3.8. B Hücrelere BFA Muamelesi ile Golgi Stresi Oluşturma	34
3.8.1. Hücre kültürü yöntemi ile B hücrelere BFA muamelesi	34
3.8.2. İmmünohistokimya yöntemi ile anti-GM130 boyaması ve immüno floresan mikroskopta görüntülenmesi.....	35
3.8.3. Akım sitometri yöntemi ile B hücre yüzeyinde HLA-DR ekspresyonunun oranı belirlenmesi	37
3.8.4. B hücrelerinin BFA (+) besiyerinden uzaklaştırılması	39
3.9. Hücre Kültürü Yöntemi.....	40
3.9.1. Hücre kültüründe T ve B hücreler ile ko-kültür oluşturma	41
3.10. Akım Sitometri Yöntemi ile İmmünojenotipleme Çalışması.....	42
3.10.1. 6. saat akım sitometri çalışması.....	42
3.10.2. 12. saat akım sitometri çalışması.....	42
3.10.3. 24. saat akım sitometri çalışması.....	43
3.11. ÖRN010324'e ait Lenfositlerin Dondurulması	43
3.12. ÖRN010324'e ait Donmuş Lenfositlerin Çözdürülmesi	44
3.13. İstatiksel Analiz.....	45
3.14. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. BFA ve Steroid Muamelesinin Foliküler T Hücre Yüzeyinde İfade Edilen Moleküllere Etkisi.....	46
4.1.1. Foliküler CD4+ T yardımcı hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonu	47
4.1.2. CXCR5+ hücrelerde HLA-G ekspresyonu.....	54
4.1.3. PD-1+ hücrelerde HLA-G ekspresyonu	62
4.1.4. ICOS+ hücrelerde HLA-G ekspresyonu	70
4.2. BFA ve steroid muamelesinin B hücre yüzeyinde ifade edilen moleküllere etkisi	

4.2.1. Foliküler CD19+ B hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonu.....	77
4.2.2. Foliküler CD19+ B hücre yüzeyinde HLA-DR ekspresyonu.....	85
5. TARTIŞMA	93
KAYNAKLAR	99



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Germinal merkez reaksiyonu	10
Şekil 2.2. T hücreleri ve B hücreleri arasındaki karşılıklı etkileşimler	13
Şekil 2.3. MHC Sınıf II antijen sunumu	19



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 3.1. İmmünofenotipleme için çalışma tablosu.....	33
Tablo 3.2. Kullanılan monoklonal antikorlar.....	34
Tablo 3.3. T hücre ve B hücre ko-kültürü.....	40
Tablo 3.4. Cihaz listesi	45
Tablo 4.1. BFA muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)	47
Tablo 4.2. BFA muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	47
Tablo 4.3. Steroid muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi).....	50
Tablo 4.4. Steroid muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	50
Tablo 4.5. BFA ve steroid muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)	52
Tablo 4.6. BFA ve steroid muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	52
Tablo 4.7. BFA muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)...	55
Tablo 4.8. BFA muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	55
Tablo 4.9. Steroid muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)	58
Tablo 4.10. Steroid muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	58
Tablo 4.11. BFA ve steroid muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi).....	60
Tablo 4.12. BFA ve steroid muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	60
Tablo 4.13. BFA muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)	63
Tablo 4.14. BFA muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	63
Tablo 4.15. Steroid muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)	65

Tablo 4.16. Steroid muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	65
Tablo 4.17. BFA ve steroid muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi).....	67
Tablo 4.18. BFA ve steroid muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	68
Tablo 4.19. BFA muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)	70
Tablo 4.20. BFA muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	70
Tablo 4.21. Steroid muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)	73
Tablo 4.22. Steroid muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	73
Tablo 4.23. BFA ve steroid muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi).....	75
Tablo 4.24. BFA ve steroid muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	75
Tablo 4.25. BFA muamelesinin CD19+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)	78
Tablo 4.26. BFA muamelesinin CD19+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	78
Tablo 4.27. Steroid muamelesinin CD19+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)	81
Tablo 4.28. Steroid muamelesinin CD19+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	81
Tablo 4.29. BFA ve steroid muamelesinin CD19+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi).....	83
Tablo 4.30. BFA ve steroid muamelesinin CD19+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	83
Tablo 4.31. BFA muamelesinin CD19+ HLA-DR ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)	86
Tablo 4.32. BFA muamelesinin CD19+ HLA-DR ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	86
Tablo 4.33. Steroid muamelesinin CD19+ HLA-DR ekspresyonuna etkisi (Friedman testi).....	88

Tablo 4.34. Steroid muamelesinin CD19+ HLA-DR ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	88
Tablo 4.35. BFA ve steroid muamelesinin CD19+ HLA-DR ekspresyonuna etkisi (Friedman testi).....	91
Tablo 4.36. BFA ve steroid muamelesinin CD19+ HLA-DR ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)	91



RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1. Dalak örneğinin fiziksel olarak parçalanması	27
Resim 3.2. ÖRN160524 isimli örneğe ait dalaktan izole edilen lenfositlerin invert mikroskop görüntüsü	27
Resim 3.3. ÖRN010324 isimli örneğe ait dalaktan izole edilen lenfositlerin invert mikroskop görüntüsü	27
Resim 3.4. ÖRN070624 isimli örneğe ait dalaktan izole edilen lenfositlerin invert mikroskop görüntüsü	28
Resim 3.5. Manyetik boncuk yöntemi ile T hücre ve B hücre izolasyonu	29
Resim 3.6. ÖRN160524 isimli örnekten izole edilen T hücre ve B hücre invert mikroskop görüntüsü	30
Resim 3.7. ÖRN010324 isimli örnekten izole edilen T hücre ve B hücre invert mikroskop görüntüsü	30
Resim 3.8. ÖRN070624 isimli örnekten izole edilen T hücre ve B hücre invert mikroskop görüntüsü	30
Resim 3.9. ÖRN160524' e ait T hücre ve B hücre saflık oranı akım sitometri görüntüsü	31
Resim 3.10. ÖRN010324' e ait T hücre ve B hücre saflık oranı akım sitometri görüntüsü	32
Resim 3.11. ÖRN070624' e ait T hücre ve B hücre saflık oranı akım sitometri görüntüsü	32
Resim 3.12. ÖRN160524' e ait BFA muamelesi öncesi ve sonrası CD19+HLA-DR ekspresyon oranları	38
Resim 3.13. ÖRN010324' e ait BFA muamelesi öncesi ve sonrası CD19+HLA-DR ekspresyon oranları	39
Resim 3.14. ÖRN070624' e ait BFA muamelesi öncesi ve sonrası CD19+HLA-DR ekspresyon oranları	39
Resim 3.15. ÖRN010324 isimli lenfosit örneklerinin dondurulma aşamaları	44
Resim 3.16. ÖRN010324 isimli lenfosit örneklerinin çözündürme aşamaları	44
Resim 4.1. BFA muamelesinde örneklerle ait CD4+HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	49

Resim 4.2. Steroid muamelesinde örneklere ait CD4+HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	51
Resim 4.3. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait CD4+HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	54
Resim 4.4. BFA muamelesinde örneklere ait CXCR5+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	57
Resim 4.5. Steroid muamelesinde örneklere ait CXCR5+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	59
Resim 4.6. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait CXCR5+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	62
Resim 4.7. BFA muamelesinde örneklere ait PD-1+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	64
Resim 4.8. Steroid muamelesinde örneklere ait PD-1+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	67
Resim 4.9. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait PD-1+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	69
Resim 4.10. BFA muamelesinde örneklere ait ICOS+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	72
Resim 4.11. Steroid muamelesinde örneklere ait ICOS+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	74
Resim 4.12. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait ICOS+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	77
Resim 4.13. BFA muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	80
Resim 4.14. Steroid muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	82
Resim 4.15. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	85
Resim 4.16. BFA muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-DR ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	87
Resim 4.17. Steroid muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-DR ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	90
Resim 4.18. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-DR ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri	92

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 4.1. BFA muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi	48
Grafik 4.2. BFA muamelesinde örneklere ait CD4+HLA-G ekspresyon oranları.....	48
Grafik 4.3. Steroid muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi	50
Grafik 4.4. Steroid muamelesinde örneklere ait CD4+HLA-G ekspresyon oranları	51
Grafik 4.5. BFA ve steroid muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi.....	53
Grafik 4.6. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait CD4+HLA-G ekspresyon oranları	53
Grafik 4.7. BFA muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi	56
Grafik 4.8. BFA muamelesinde örneklere ait CXCR5+ HLA-G ekspresyon oranl	56
Grafik 4.9. Steroid muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi.....	58
Grafik 4.10. Steroid muamelesinde örneklere ait CXCR5+ HLA-G ekspresyon oranları	59
Grafik 4.11. BFA ve steroid muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi	61
Grafik 4.12. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait CXCR5+ HLA-G ekspresyon oranları	61
Grafik 4.13. BFA muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi	63
Grafik 4.14. BFA muamelesinde örneklere ait PD-1+ HLA-G ekspresyon oranları.....	64
Grafik 4.15. Steroid muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi	66
Grafik 4.16. Steroid muamelesinde örneklere ait PD-1+ HLA-G ekspresyon oranları	66
Grafik 4.17. BFA ve steroid muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi.....	68
Grafik 4.18. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait PD-1+ HLA-G ekspresyon oranları	69
Grafik 4.19. BFA muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi.....	71
Grafik 4.20. BFA muamelesinde örneklere ait ICOS+ HLA-G ekspresyon oranları	71
Grafik 4.21. Steroid muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi	73
Grafik 4.22. Steroid muamelesinde örneklere ait ICOS+ HLA-G ekspresyon oranları.....	74
Grafik 4.23. BFA ve steroid muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi	76
Grafik 4.24. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait ICOS+ HLA-G ekspresyon oranları	76
Grafik 4.25. BFA muamelesinin CD19+ HLA-G ekspresyonuna etkisi	79
Grafik 4.26. BFA muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-G ekspresyon oranları.....	79

Grafik 4.27. Steroid muamelesinin CD19+ HLA-G ekspresyonuna etkisi	81
Grafik 4.28. Steroid muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-G ekspresyon oranları	82
Grafik 4.29. BFA ve steroid muamelesinin CD19+HLA-G ekspresyonuna etkisi.....	84
Grafik 4.30. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait CD19+HLA-G ekspresyon oranları	84
Grafik 4.31. BFA muamelesinin CD19+ HLA-DR ekspresyonuna etkisi.....	86
Grafik 4.32. BFA muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-DR ekspresyon oranları.....	87
Grafik 4.33. Steroid muamelesinin CD19+ HLA-DR ekspresyonuna etkisi	89
Grafik 4.34. Steroid muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-DR ekspresyon oranları...	89
Grafik 4.35. BFA ve steroid muamelesinin CD19+HLA-DR ekspresyonuna etkisi	91
Grafik 4.36. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait CD19+HLA-DR ekspresyon oranları	92

KISALTMALAR LİSTESİ

ASH	Antijen Sunan Hücreler
BCL-6	B Hücreli Lenfoma 6 (B Cell Lymphoma-6)
BCR	B Hücresi Reseptörü (B Cell Receptor)
BFA	Brefeldin A
Blimp1	B Lymphocyte Induced Maturation Protein 1
CCL19	C-C Kemokin Ligand 19
CCL21	C-C Kemokin Ligand 21
CD	Cluster of Differentiation
CIITA	MHC II Transaktivatörü
CSR	Sınıf Değiştirme Rekombinasyonu (Class Switch Recombination)
CTLA	Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Protein- 4
CXCL13	C-X-C Kemokin Ligand 13
CXCR4	C-X-C Kemokin Reseptörü Tip 4
CXCR5	C-X-C Kemokin Reseptörü Tip 5
FDH	Foliküler Dendritik Hücreler
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
ICOS	İndüklenebilir Ko-stimülatör (Inducible Costimulator)
ICOS-L	İndüklenebilir Kostimülatör Ligand (Inducible Costimulator Ligand)
IFN	İnterferon
IgV	İmmüoglobulin Değişken (Immunoglobulin Variable)
IL	İnterlökin
ILT2	İmmüoglobülin (Ig) Benzeri Transkript 2 (Ig-Like Transcript 2)
ITIM	İmmünoresptör Tirozin Bazlı İnhibitör Reseptör Motif
LT- α 1 β 2	Lenfotoksin- α 1 β 2
MHC	Büyük Doku Uyumluluk Kompleksi (Major Histocompatibility Complex)
MIIC	MHC Sınıf-II Bölmesi
NK	Natural Killer
PALS	Periarteriyolar Lenfoid Kılıf
PD-1	Programlı Ölüm 1 (Programmed Death 1)
PD-L1	Programlı Ölüm Ligandı 1 (Programmed Death Ligand 1)
SHP-1	Src-Homology 2 Alanı İçeren Tirozin Fosfataz 1

STAT	Signaling Transducer and Activator of Transcription
Tfh	T foliküler yardımcı (T follicular helper)
Tfr	T foliküler regülatör (T follicular regulator)
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktör-Beta (Transforming Growth Factor-Beta)
Th	T yardımcı (T helper)
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TNFR1	TNF Reseptörü 1



1. GİRİŞ

Tez çalışmasının amacı foliküler B hücresinde Brefeldin A muamelesi ile oluşturulan golgi stresinin MHC Sınıf-II ve non-klasik HLA-G moleküllerinin ekspresyonuna, foliküler B hücresinde oluşturulan bu stresinin T foliküler yardımcı (Tfh) hücrelerin ve foliküler B hücre yüzeyindeki HLA-G molekül ekspresyonunu etkisinin araştırılmasıdır. Bununla birlikte dalak dokusundan izole edilen B ve T hücrelerinin ko-kültür ortamında fenotip değişiminin de araştırılması amaçlanmıştır.

Foliküler B hücrelerde Brefeldin A muamelesi ile indüklenen golgi stresine bağlı olarak transplantasyon olan hastada oluşan hücre stresini taklit ederek hücre yüzeyindeki MHC Sınıf-II moleküllerinin ekspresyonunun azalacağı düşünülmektedir. Kortikosteroid etkisi ile Tfh ve B hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonunun artması beklenilmektedir.

Tez çalışması insan sekonder lenfoid doku örneklerinin (dalak örnekleri) kullanıldığı bir çalışmadır. Çalışmada beyin ölümü gerçekleşmiş ve organ bağışında bulunmuş 2 farklı donör adayının Lenfosit Cross Match testi için alınmış dalak örneğinden rutin testler yapıldıktan sonra kalan ve tıbbi atık olarak kabul edilen dokular ve hastanemize tedavi için başvurup ameliyat olan ve dalağı alınan 1 hastanın tıbbi atık olarak değerlendirilen dalak örneği kullanılmıştır. Dalak dokusundan alınan ve izole edilen hücreler hastaya ait bir materyal olması, hasta ve etik kurul izni gerektirmesi nedeniyle elde edilmesi zor örneklerdir. Dalak dokusundan izole edilen T ve B hücreleri hücre hattı gibi uzun süreli canlılığa sahip olmayıp ve canlılık oranları hızlı bir şekilde düşmektedir. Bu özellik insan foliküler hücreler ile yapılan çalışmaları sınırlandırmaktadır.

Yapılan literatür taramasında golgi stresinin MHC Sınıf-II molekül ekspresyonuna etkisi hakkında sınırlı sayıda çalışma olmakla birlikte adaptif immün sistemin naif hücrelerinin incelendiği foliküler T ve B lenfositlerle golgi stresi ve HLA-G ilişkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tez çalışması bu açıdan golgi stresine bağlı olarak foliküler B hücre ve foliküler B hücre etkisindeki T hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun değişimini gösteren ilk çalışma olacaktır. Foliküler hücrelerdeki golgi stresine bağlı fenotip değişimi ilk defa bu çalışma ile gösterilecektir. Bu yönüyle çalışmanın özgün bir çalışma olup literatüre ve daha sonra yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bağışıklık Sistemi

Bağışıklık bilimi (immünoloji) genel olarak enfeksiyon hastalıklarına karşı direnç gelişimi olarak tanımlanır. Enfeksiyonlara karşı savunmayı sağlayan hücreler, dokular ve organlar bağışıklık sistemini oluşturur (1).

Bağışıklık sisteminin temel amacı mikroorganizmaya karşı savunma sağlamaktır. Yabancı olarak tanınan yapılar, hasarlı hücreler ve tümör gibi kötü huylu hücrelerin ürünleri de bağışıklık tepkisini başlatabilir.

Mikroplara karşı savunma, doğal ve adaptif bağışıklık olarak adlandırılan sıralı ve koordineli yanıtlarla sağlanır. Doğal bağışıklık, adaptif bağışıklık yanıtları gelişmeden önce, enfeksiyondan sonraki ilk birkaç saat veya gün içinde mikroplara karşı savunma için gereklidir. Adaptif immün yanıtlar ise daha sonra gelişir ve lenfositlerin aktivasyonunu gerektirir (2).

2.1.1. Doğal bağışıklık

Enfeksiyonlara karşı oluşan ilk savunma mekanizması doğal bağışıklık olarak adlandırılır (1). Doğal bağışıklık sistemi mikroplara ve hasarlı hücrelere hızla tepki verir ve tekrarlanan karşılaşmalar da aynı doğal bağışıklık tepkilerine neden olur. Doğal bağışıklığın reseptörleri, ilgili mikrop gruplarında ortak olan yapılar için spesifiktir ve mikroplar arasındaki farklılıkları ayırt etmez.

Doğal bağışıklığın temel bileşenleri arasında fiziksel ve kimyasal bariyerler, fagositik hücreler (nötrofiller, makrofajlar), dendritik hücreler, mast hücreleri, doğal öldürücü (Natural Killer: NK) hücreler ve kan proteinleri (kompleman sisteminin bileşenleri ve diğer inflamasyon mediyatörleri) bulunur (2).

2.1.2. Adaptif (Edinsel) bağışıklık

Adaptif bağışıklık tepkisine lenfositler bunların ürünleri aracılık eder. Lenfositler, çok sayıda antijeni tanıyabilen oldukça çeşitli reseptörler ifade eder (2). Beyaz kan hücreleri olan lenfositler T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü hücreleri içerir. Bu hücreler; antikor üretiminden, virüsle enfekte olmuş ve tümör hücrelerinin doğrudan hücre aracılı öldürülmesinden ve bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinden sorumludur (3).

Lenfositler, vücutta her biri farklı bir antijenik determinant için spesifik olan klonal olarak dağılmış antijen reseptörlerini ifade eden tek hücrelerdir. T lenfositlerin ve B lenfositlerin her bir klonu, diğer tüm klonlardaki reseptörlerin özgüllüklerinden farklı olan tek bir özgüllüğe sahip antijen reseptörlerini ifade eder. Sağlıklı bir yetişkindeki toplam lenfosit sayısı yaklaşık 5×10^{11} dir. Bunların yaklaşık % 2' si kanda, % 4' ü deride, % 10' u kemik iliğinde, % 15' i gastrointestinal ve solunum yollarının mukozal lenfoid dokularında ve % 65' i de lenfoid organlarda (esas olarak dalak ve lenf düğümleri) bulunur.

Lenfositler farklı işlevlere ve protein ürünlerine sahip farklı sınıflardan oluşur. Antikor üreten hücreler olan B lenfositleri, kuşlarda Bursa Fabricius adı verilen bir organda olgunlaştıkları tespit edildiği için bu şekilde adlandırılmıştır. Memelilerde ise B hücresi olgunlaşmasının erken aşamaları kemik iliğinde gerçekleşir. Hücresel bağışıklığın aracıları olan T lenfositleri ise timusa göç eden ve timusta olgunlaşan kemik iliğindeki öncü hücrelerden ortaya çıkar (2).

2.2. Lenfoid Organlar

Lenfoid organlar, lenfosit gelişiminin ve bağışıklık tepkilerinin önemli düzenleyicileridir.

Lenfoid organlar genel olarak 3 işlevi yerine getirirler. Bunlardan birincisi, lenfoid hücrelerin gelişimi için uygun stromal nişler sağlarlar. İkinci olarak lenfoid organlar self-toleranslı antijen-reseptör repertuarlarının hazırlanmasını sağlayan kalite kontrol adımlarını düzenlerler. Üçüncü olarak, lenfoid organlar bağışıklık tepkilerinin etkinliğini ve kesinliğini düzenlemek için işlev görür ve bu da nihayetinde çeşitli lenfoid hücre türlerinin düzenlenmiş etkileşimine bağlıdır (4).

Anatomik olarak, bu işlevler farklı lenfoid organlar tarafından gerçekleştirilir. Kemik iliği ve timustan meydana gelen primer (santral) lenfoid organlar T ve B lenfositlerin olgunlaştığı ve antijene yanıt verecek hale ulaştığı bölgelerdir. Lenf nodu ve dalağın oluşturduğu sekonder (periferik) lenfoid organlarda ise patojenlere karşı kazanılmış immün yanıtın başlatılır.

2.2.1. Primer (santral) lenfoid organlar

Kemik iliği ve timusu primer (santral) lenfoid organlardır. Lenfositlerin ilk olarak antijen reseptörlerini ifade ettiği ve fenotipik ve işlevsel olgunluğa eriştiği bölgelerdir.

B lenfositleri kemik iliğinde olgunlaşırlar ve dolaşıma girerek olgunlaşmalarını tamamlayacakları dalağa göç ederler. T lenfositleri ise timusta olgunlaşır, sonra dolaşıma girerek sekonder lenfoid organlara göç eder.

Primer lenfoid organlar, lenfosit olgunlaşması için gereken büyüme faktörlerini ve diğer moleküler sinyalleri sağlar ve olgunlaşan lenfositlerin seçimi için kendi antijenlerini sunarlar (2).

2.2.2. Sekonder (periferik) lenfoid organlar

Periferik lenfoid organlar olarak da adlandırılan sekonder lenfoid organlar antijen, antijen sunan hücreler ve lenfositler arasındaki iletişimi düzenleyerek adaptif (edinsel) immünitinin gelişimini sağlar.

Lenf düğümleri, dalak ve mukozal bağışıklık sisteminin bileşenlerini içeren sekonder (veya periferik) lenfoid organlar, yabancı antijenlere karşı lenfosit yanıtlarının başlatıldığı ve geliştirildiği bölgelerdir. Lenf düğümleri tüm vücuda yayılan lenfatik kanalların etrafında yer alan lenfoid dokuların bir araya gelmesinden oluşan nodüler yapılardır. Dalak karın boşluğunda bulunan ve kan kaynaklı antijenlere karşı immün yanıtı oluşturulan bir organdır (2).

Dalak

Karın bölgesinde, diyaframın hemen altında yer alan dalak vücudun en büyük kan filtresidir (5). Dalak vücuttaki en büyük ikincil lenfoid organdır ve bu nedenle hematopoez ve kırmızı kan hücresi temizlenmesindeki rollerinin yanı sıra çok çeşitli immünolojik işleve sahiptir. İşlev ve yapısına göre kan dolaşımının daha fazla olduğu kırmızı pulpa ve lenfoid hücrelerle dolu beyaz pulpa olarak ikiye ayrılır ve bu iki bölge arasında insanlarda perifoliküler alan yer alır. Tüm hücreler ve antijenler dalağa kan yoluyla girer (6).

Kırmızı pulpa yaşlı, ölü veya opsonize hücrelerin dolaşımdan temizlendiği yerdir (6). Patojenler ve hücresel artıkların yanı sıra yaşlanan eritrositler, bu alanda bol miktarda bulunan makrofajlar tarafından kandan etkin bir şekilde uzaklaştırılır. Makrofajlar daha sonra eritrositlerdeki demiri geri dönüştürürler (5). Sistemik antijenlere karşı adaptif immün yanıtlar beyaz pulpada başlatılsa da, immün efektör fonksiyonu genellikle kırmızı pulpada gerçekleşir. Nötrofiller, monositler, dendritik hücreler, gamma delta ($\gamma\delta$) T hücreleri ve makrofajlar dahil olmak üzere doğal bağışıklık işlevlerine sahip birçok lökosit kırmızı pulpada bulunur (7).

Beyaz pulpa, adaptif immün yanıtların başladığı oldukça organize bir lenfoid bölgedir. T hücreleri ve B hücreleri için ayrı alanlardan oluşur ve bu alanlar makrofajların ve B hücrelerinin ayrı alt kümelerini içeren bir bölge olan marjinal bölge ile çevrilidir (5). Beyaz pulpayı, dalağın parankiminden yani kırmızı pulpadan ayırmak için bir kapsül bulunmaz. Bunun yerine doğal bağışıklık hücrelerinden oluşan hücresel bir sınır beyaz pulpanın sınırlarını belirler. Bir kapsül olmamasına rağmen, 60 kDa'dan büyük antijenler beyaz pulpaya serbestçe geçemez ve bunun yerine marjinal bölge hücreleri tarafından taşınır (8). Kan marjinal bölgeden serbestçe akarken, beyaz pulpa kan dolaşımından hariç tutulur (5).

Marjinal bölge, doğal ve adaptif bağışıklık yanıtı arasında bir köprü oluşturur, çünkü bu bölgedeki spesifik kalıp tanıma reseptörlerini ifade eden makrofajlar, kan yoluyla taşınan patojenleri etkili bir şekilde alabilir. Bu bölgedeki B hücrelerinin spesifik alt kümesi olan marjinal bölge B hücreleri, bu makrofajlar tarafından aktive edilebilir veya kan yoluyla taşınan patojenlere doğrudan yanıt verebilir, ardından antijen sunan hücreler veya IgM üreten plazma hücreleri haline gelirler (5).

Beyaz pulpa içerisinde antijen sunan hücreler (ASH), T lenfositler ve B lenfositler anatomik olarak organize edilmiştir. T hücre bölgesi, beyaz pulpa içerisinde geçen merkezi arteriyolün etrafında olduğu için periarteriolar lenfoid kılıf (PALS) olarak da adlandırılır. B hücre bölgeleri, B hücrelerinin aktivasyonu ve hayatta kalması için önemli bir hücre karışımı içeren foliküllerdir (9). T hücresi bölgesindeki T hücreleri dendritik hücreler ve B hücreleri ile etkileşime girerken, B hücresi foliküllerinde, aktive B hücrelerinin klonal genişlemesi gerçekleşir ve izotip değişimine yol açar.

Beyaz pulpanın organizasyonu, T ve B lenfositleri kendi alanlarına çekerek beyaz pulpa içinde belirli bölgeler oluşturan spesifik kemokinler tarafından kontrol edilir. Kemokinler kemotaktik fonksiyona sahip sitokin ailesinin en büyük üyesidir ve G-protein-bağlı reseptörlere bağlanarak etki ederler (10). B hücrelerinin B hücre foliküllerine göç etmesi için C-X-C kemokin ligand 13 (CXCL13) ve reseptörü C-X-C kemokin reseptörü tip 5 (CXCR5) gerekir (11). Bunun yanı sıra C-C kemokin ligand 19 (CCL19) ve CCL21 ve reseptörleri CCR7 ise T hücrelerinin ve dendritik hücrelerin beyaz pulpanın T hücre bölgesine çekilmesinde rol oynar. Bu kemokinlerin ekspresyonu lenfotoksin- α 1 β 2 (LT- α 1 β 2) ve tümör nekroz faktörü (TNF) tarafından kontrol edilir. LT- β reseptörü (LT- β R) veya TNF reseptörü 1 (TNFR1) aracılığıyla sinyalizasyon eksik olduğunda, dalakta homeostatik kemokinler CXCL13, CCL19 ve CCL21 seviyeleri azalır ve beyaz pulpa bölgelerinin düzensizleşmesine neden olur.

B hücrelerini, B hücresi foliküllerine çekmek için çok önemli rol oynayan CXCL13, CD35+ (Cluster of Differentiation: Başkalaşım Kümesi) foliküler dendritik hücreler (FDH'ler) ve bu FDH'lere komşu olan stromal hücreler tarafından üretilir. B hücreleri, B hücresi foliküllerine doğru göçlerine aracılık eden reseptör CXCR5'i ifade eder. Buna ek olarak, CXCR5 üzerinden sinyalizasyon, B hücrelerinin yüzeyinde LT- α 1 β 2 ifadenmesini indükler, bu da FDH'lerin farklılaşmasını ve CXCL13 ekspresyonunu indükler ve böylece pozitif bir geri besleme döngüsüne aracılık eder.

Beyaz pulpada yer alan germinal merkez B hücrelerin somatik hipermutasyona uğradığı, B hücrelerinin seçiminin yapıldığı ve olgunlaştığı sekonder lenfoid organlar içerisinde özelleşmiş bir yapıdır. Antijeni tanıyan B hücresi germinal merkez reaksiyonlarına yanıt olarak aktive olur ve bunun sonucunda antikor üretimi gerçekleşir. Beyaz pulpa foliküllerinde bulunan naif foliküler B hücreleri aktive edildikten sonra germinal merkezin

açık ve koyu boyanan bölgeleri arasında hızla döngü yapar. CXCR5, B hücrelerini T hücreleri ile karşılaşacakları açık boyanan bölgeye yönlendirirken, CXCR4 onları çoğalma, sınıf değiştirme ve somatik hipermutasyona uğradıkları koyu bölgeye yönlendirir (12).

2.3. Germinal Merkezler

Sekonder lenfoid organlarda B hücrelerin seçiminin yapıldığı ve olgunlaştığı bölgeye germinal merkez denir. Germinal merkezler ilk olarak 1884 yılında Walther Flemming tarafından bölünen hücreleri içeren sekonder lenfoid organların belirgin mikroskopik bölgeleri olarak tanımlanmıştır (13). Germinal merkez reaksiyonu, enfeksiyona karşı T hücrelerine bağlı antikor yanıtlarında klonal genişleme, somatik mutajenez, afiniteye dayalı seçim ve farklılaşma olaylarını, afinite açısından olgunlaşmış plazma hücreleri veya bellek B hücreleri üretmek için sıkıca paketlenmiş ancak oldukça dinamik bir mikroskopik ortamda birleştirmesi açısından benzersizdir. Germinal merkez reaksiyonu son derece dinamik bir süreçtir ve sıkı bir şekilde kontrol edilir. Germinal merkezde bulunan B hücreleri hem T hücreleri hem de antijen ile kısa ve dinamik etkileşimlere girerler.

2.3.1. Germinal merkez oluşumu

Germinal merkezler, sekonder lenfoid organlarda foliküler dendritik hücrelerden oluşan bir ağ içeren B hücresi foliküllerinde gelişir (13,14). Germinal merkezler antijenlere yanıt olarak oluşurlar. Bu nedenle naif B hücreleri sekonder lenfoid organ içerisinde sürekli dolaşarak antijen ararlar. B hücre foliküllerindeki antijene özgü naif B hücreleri T bağımlı antijenlerle karşılaştığı zaman hem B hücreleri ve T hücre bölgelerindeki CD4⁺ T hücreleri aktive olur (13). Aktive olan hücreler T hücre bölgesi - B hücre bölgesi (T-B) sınırına göç ederler. Bu hareket, antijen aktivasyonu sonucunda kemokin reseptörü CCR7'nin hızla yukarı yönlü düzenlenmesiyle yönlendirilir (14). T-B sınırında bulunan T hücreleri, T foliküler yardımcı (T follicular helper: Tfh) hücrelerinin öncüleri (pre-Tfh) olarak kabul edilir (15). T-B sınırında B hücreleri B hücresi reseptörü (B cell receptor: BCR) aracılığıyla antijeni aynı kökenden gelen CD4⁺ T yardımcı hücrelerine sunar ve eş-uyarıcı (ko-stimülatör) sinyalini alır. B hücreleri tarafından sürekli olarak ifade edilen ve ko-stimülatör olan CD40 ile aktive edilmiş CD4⁺ T yardımcı hücreleri tarafından ifade edilen ve CD40'ın ligandı olan CD40L'nin (CD154) etkileşimi ile B hücre çoğalmasını gerçekleştirir ve böylece germinal merkez yanıtları indüklenir (14). Klonal olarak genişleyen bu B hücrelerinin

bazıları kısa ömürlü plazma hücrelerine veya erken hafıza B hücrelerine farklılaşırken bazıları da antikör afinite olgunlaşmasının gerçekleştiği germinal merkezleri oluşturmak için folikülün merkezine göç ederler (16).

Olgun germinal merkezlerde histolojik görünümüne dayanarak koyu boyanan bölge ve açık boyanan bölge olarak adlandırılan işlevsel olarak farklı 2 bölge vardır. Koyu boyanan bölge T hücre alanlarının proksimalinde yer alır ve sentroblast olarak bilinen yoğun bir şekilde paketlenmiş, yüzey immünoglobulin ekspresyonu azalmış büyük ve çoğalan B hücrelerinden oluşur (13,14). Açık boyanan bölgede, koyu boyanan bölgeye göre daha az miktarda B hücre bulunur ve Tfh hücreleri, T foliküler regülatör (T follicular regulator: Tfr) hücreleri, foliküler dendritik hücreler ve makrofajlar dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinin varlığı ile karakterize edilir (17). B hücreleri, açık boyanan bölgede afiniteye dayalı seçilimden geçerek afinitesi artırılmış hafıza B hücreleri ve plazma hücrelerini oluşturur (16).

Germinal merkezde B hücrelerinin açık ve koyu boyanan bölgelere ayrılması, bu bölgelerdeki kemokin CXCL12 ve CXCL13'ün miktarına ve CXCR4'ün sentrositler ve sentroblastlar üzerindeki düzenlenmiş ifadesine bağlıdır. Sentroblastlar, sentrositlerden daha yüksek seviyelerde CXCR4 ifade eder ve bu kemokin reseptörünün ligandı olan CXCL12, germinal merkez koyu boyanan bölgelerinde açık boyanan bölgelere kıyasla daha bol miktarda bulunur (18).

Koyu boyanan bölgede B hücreleri proliferasyona ve somatik hipermutasyona uğrar. B hücreleri germinal merkezde çoğaldıkça, somatik hipermutasyon ile immünoglobulin değişken (Immunoglobulin Variable: IgV) bölge genlerinde yüksek oranda mutasyon gerçekleşir (14,16). Somatik hipermutasyon sonucunda antijene karşı daha yüksek afiniteye sahip antikörler, antijene karşı daha düşük afiniteye sahip antikörler ve antijene karşı afinitede hiçbir değişikliğe sahip olmayan antikörler üretilir.

Koyu boyanan bölgede gerçekleşen somatik hipermutasyonun ardından yüksek afiniteli B hücreler yüzeyinde ifade ettiği kemokin reseptörü CXCR5 ile ligandı olan CXCL13'e bağlanarak açık boyanan bölgeye geçer (15). Germinal merkezde pozitif seçilime uğrayan B hücre klonları hafıza B hücresi olarak veya plazma hücresi olarak germinal merkezden çıkarlar ya da yeniden germinal merkezin koyu boyanan bölgesine giderek

burada daha fazla somatik hipermutasyona uğrarlar ve çoğalırlar. Eğer BCR afinitesi düşükse B hücreleri hayatta kalma (survival) sinyallerini alamazlar ve apoptoza uğrarlar (19).

Açık boyanan bölgeye geçen B hücreler Tfh hücreleri, Tfr hücreleri ve foliküler dendritik hücreleri ile etkileşim halindedir. B hücreleri yüzeylerinde bulunan BCR yardımı ile foliküler dendritik hücre yüzeyindeki antijeni yakalar ve germinal merkez Tfh hücrelerine sunar (20). B hücresi yüzeyinde ifade edilen CD40, indüklenabilir ko-stimülatör-ligand (Inducible Costimulator Ligand: ICOS-L) ve programlı ölüm ligandı 1 (Programmed Death Ligand 1: PD-L1) / L2 sırasıyla Tfh hücresi yüzeyinde ifade edilen CD40L, ICOS ve PD-1 etkileşime girer (15). Germinal merkez B hücreleri, ko-stimülatör ve ko-inhibitör molekül aracılığıyla T hücreleriyle etkileşim oluşturur ve bu etkileşim B hücrelerinin hayatta kalmasında önemli rol oynar (21). Tfh hücreleri yüzeylerinde ifade edilen CD40L, ICOS ve PD-1 moleküllerinin germinal merkez gelişimi ve devamlılığı için gereklidir (14). CD40-CD40L etkileşimi germinal merkez için çok önemlidir, CD40 veya ligandının eksikliği germinal merkez B hücrelerinin tamamen kaybolmasına neden olabilir (22). Tümör nekroz faktörü ailesinin bir üyesi olan CD40L, Tfh hücrelerinde yukarı yönlü düzenlenirken, CD40 germinal merkez B hücrelerinde sürekli olarak ifade edilir (23). Ayrıca germinal merkezde B hücreleri ile Tfh hücreleri arasındaki etkileşim, ICOS-L-ICOS sinyali ile artmaktadır. CD40L-CD40 sinyalleme, transkripsiyonel olarak ICOS-L ekspresyonunu aktive eder (24). Germinal merkezlerdeki Tfh hücreleri, seçim sıklığını korumak için sınırlayıcı olmak zorundadır. Germinal merkez B hücreleri, T hücresi reseptör sinyalini azaltmak için Tfh hücreleri üzerindeki PD-1'e bağlanan ve böylece pozitif seçim eşiğini yükselten inhibitör ligandlar PD-L1'i ifade eder. PD-1 reseptörü ayrıca foliküler manto lokalizasyonlu Tfh hücrelerini germinal merkezlere yönlendirmek için de işlev görür (25). Antijen sunan B hücreleri ile sürekli etkileşim, Tfh hücreleri üzerindeki yardımcı inhibitör molekül PD1'in yukarı regülasyonuna neden olur. PD-1 için ligand olan PD-L1, esas olarak germinal merkezdeki antijen sunan hücrelerde bulunur, Tfh hücre çoğalmasını ve uyarıcı sitokinlerin üretimini sınırlar, bu da T hücre anerjisine katkıda bulunur ve kendinden olan tolerans sağlar (26,27)

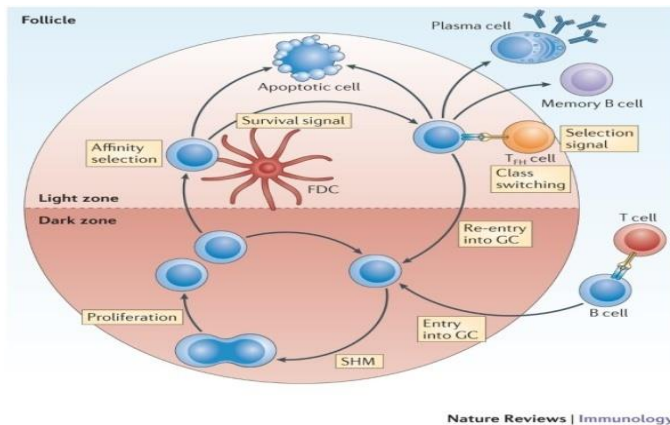
CD4+ T yardımcı hücreleri olan Tfh hücreleri ve Tfr hücreleri B hücresi yanıtını düzenlemede önemli bir rol oynar. Tfh hücreleri, germinal merkezlerin oluşumu ve humoral bağışıklığın gelişimi için B hücrelerine benzer yardım sağlama konusunda uzmanlaşmıştır.

Tfr hücreleri timik düzenleyici T (Treg) hücrelerinden türetilir (28). Tfr hücreleri, Tfh hücre aktivasyonunu baskılayarak veya otoreaktif B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmasını engelleyerek germinal merkez yanıtının özgüllüğünü sağlamaya yardımcı olur. Tfr, germinal merkez oluşumunu baskılar (29).

Naif CD4⁺ T hücreleri dendritik hücreler tarafından aktive edilir ve CXCR5'i upregüle ederek B hücre foliküllerine göç etmelerini sağlar (30).

Tfh hücreleri B hücrelerini önemli ölçüde etkileyen sitokinler salgılar. Tfh hücreleri tarafından salgılanan başlıca sitokinlerden ikisi İnterlökin (IL)-4 ve IL-21'dir. Bu sitokinler B hücresi çoğalmasımı, CSR'yi ve plazma hücrelerine veya germinal merkez B hücrelerine farklılaşmayı teşvik eder (31).

Açık boyanan bölgede Tfh hücreleri, Tfr hücreleri ve foliküler dendritik hücrelerin yardımıyla B hücreleri sınıf değiştirme rekombinasyonu geçirir ve afinitelerine göre pozitif olarak seçilir. Yüksek afiniteli klonlar germinal merkezlerden çıkarak hafıza B hücrelerine ve uzun ömürlü plazma hücrelerine farklılaşır (14,32). CSR antikor izotip değişimine aracılık eden DNA düzeyindeki bir mekanizmadır. Sınıf değişimi, germinal merkez içindeki Tfh hücreleri tarafından salgılanan sitokinler tarafından kontrol edilir. İmmünglobulin izotip değiştirme süreci B hücresi aktivasyonundan sonraki günler içerisinde başlayabilir. Aktive edilmiş B hücresi tarafından üretilen antikorun ağır zincir sınıfının IgM ve IgD'den IgG, IgA veya IgE'ye değiştiği bir süreçtir. Süreç esas olarak germinal merkezler içinde gerçekleşir.



Şekil 2.1. Germinal merkez reaksiyonu (19)

2.4. B Hücreleri (B Lenfositleri)

B hücreleri memelilerde humoral bağışıklıktan sorumlu olan ve adaptif bağışıklık yanıtında görev alan hücrelerdir. 1965 yılında tanımlanan (Cooper ve ark. 1965) B hücreleri, antikör adı verilen proteinler üreterek vücudu enfeksiyonlara karşı korurlar. B hücrelerinin, kendinden olan ve olmayan antijenleri tanıma ve hafıza özelliği olmak üzere 2 önemli görevi vardır (33).

2.4.1. B hücrelerinin sınıflandırılması

B lenfositleri, B hücre soyunun öncüsü olarak kabul edilen hematopoetik kök hücrelerden üretilir. Erken gelişim fetal karaciğerde ve doğumdan sonra ise kemik iliğinde gerçekleşir (33).

B-2 hücreleri kemik iliğinden türetilir ve foliküler B hücre ve marjinal bölge B hücreleri olarak 2 sınıfa ayrılır. Adaptif humoral tepkilere aracılık eder ve antikör üretiminden sorumludurlar. T hücrelerine antijen sunumunda ve proinflamatuvar sitokin salgılanmasında görev alırlar (34). Vücutta en çok sayıda bulunan B hücresi türü olan foliküler B hücreleri lenfoid dokularda ve kanda bulunur. Hücre yüzeyi antijen reseptörleri ve adaptif humoral bağışıklığın temel salgılanan efektör molekülleri olarak görev yapan oldukça çeşitli, klonal olarak dağılmış antikör setlerini ifade ederler. Foliküler B hücreleri, insanları aynı mikropların tekrarlayan enfeksiyonlarından koruyan yüksek afiniteli antikörlerin ve hafıza B hücrelerinin çoğuna yol açar (2). Olgun naif B2 hücreleri yaşamlarının büyük bir bölümünü antijen arayışı içinde sekonder lenfoid organlar arasında dolaşarak geçirirler. Marjinal bölge B hücreleri kemirgenlerde sadece dalakta bulunur ancak insan dolaşımında bulunabilir (35).

2.4.2. B hücre gelişimi

B lenfositlerin olgunlaşmasındaki adımlar, Ig genlerinin kesin bir sırayla yeniden düzenlenmesi ve ifade edilmesi, antijen öncesi reseptör kontrol noktasında gelişen B hücrelerinin seçilmesi ve çoğalması ve olgun B hücre repertuarının seçilmesidir.

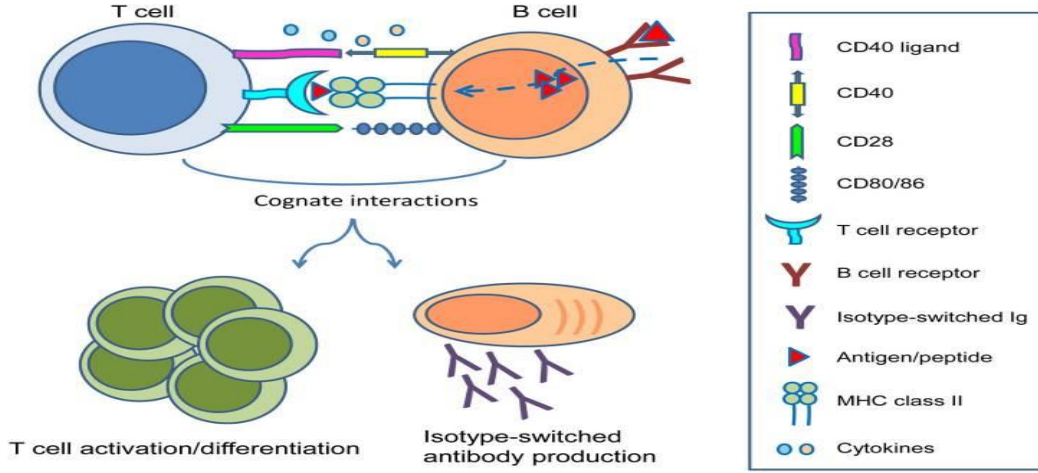
B hücresi aktivasyonu

Bir B hücresinin bir protein antijeni tarafından aktivasyonu, B hücresinin bir ASH olarak işlev görmesini ve MHC sınıf II tarafından sunulan protein epitoplarını yardımcı T hücrelerine sunmasını gerektirir, bu nedenle bu mekanizmaya T hücresine bağlı aktivasyon adı verilmiştir. Ancak, polisakkaritler, lipopolisakkaritler ve diğer protein olmayan antijenler, antijen işlenmesi ve T hücrelerine sunulması olmadan B hücrelerini aktive edebildikleri için T bağımsız antijenler olarak kabul edilir (33).

Antijen sunumunda B hücrenin rolü ve T hücre ile ilişkisi

B hücreleri antikor üretme yeteneğinin yanı sıra antijen sunan hücreler olarak da işlev görür (36). Aktive olan B hücrelerin yüzeyinde MHC Sınıf-II ve eş-uyaran molekül ekspresyonları artar. Bu haliyle B hücre reseptörleri ile antijenleri yakalama kapasiteleri ve klonal büyüme yetenekleri, B hücrelerini güçlü bir ASH yapar (37).

B hücresinin yabancı antijeni tanıyıp CD4⁺ T hücresine iletmesi için 2 farklı sinyal gerekir. Periferik lenfoid organ içindeki B hücreleri BCR ile antijeni tanır. Bu tanıma 1. sinyaldir ve CD19 kompleksi üzerinden bir aktivasyon sinyali sağlar. Oluşan antijen/BCR kompleksini endositoz yoluyla içselleştirilir ve antijeni işleyerek peptid yapılı hale getirir ve MHC Sınıf-II molekülüyle CD4⁺ T hücreye sunmak için T hücre açısından zengin alana gider. Burada Tfh hücreleriyle etkileşime giren B hücreleri, daha fazla aktivasyon sinyali alır. B hücresi aktivasyonu için ikinci sinyal, eş-uyaran sinyalidir. Yardımcı T hücreleri yüzeylerinde bulunan CD28 ile B hücrelerin yüzeyinde bulunan B7-1 (CD80) ve B7-2 (CD86) eş-uyaran molekülleri tanır. CD4⁺ T hücre aktive olur, CD40L eksprese eder ve sitokin salgılar. CD40L B hücre yüzeyindeki CD40 ile birleşerek sitokinleri aktive eder. Böylece hem B hücrelerinin hem de T hücrelerinin efektör ve bellek hücrelerine farklılaşması gerçekleşir (38–40).



Şekil 2.2. T hücreleri ve B hücreleri arasındaki karşılıklı etkileşimler (37)

2.5. CD4+ T Hücre Farklılaşması

Naif CD4+ T hücreleri, aktive olduktan sonra, spesifik sitokinler üreten T yardımcı (T helper: Th) hücre alt gruplarına farklılaşır. T yardımcı hücrelerinin farklılaşması, belirli transkripsiyon faktörlerini aktive eden ve/veya up-regüle eden polarize sitokinler tarafından tetiklenen T hücre reseptör (T Cell Receptor: TCR) sinyallerine bağlıdır. Sitokinler, bağışıklık sisteminde hücreler arası iletişimi sağlayan salgısal yapılardır ve CD4+ T yardımcı hücreleri, sitokin üreten hücrelerdir (41).

T yardımcı hücre farklılaşması sitokin uyarımı ile başlar. Sitokin stimülasyonunu takiben, farklı “Signaling Transducer and Activator of Transcription (STAT)” ailesi proteinleri aktive edilir ve T yardımcı hücre farklılaşmasını yönlendirir.

- **Th1:** Th1 hücreleri, makrofajların ve sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonunda yer alan pro-inflamatuvar efektör T hücreleridir. IL-12 etkisiyle STAT4 aktivasyonu meydana gelir, ana düzenleyici T-bet (T-box expressed in T cells)'in ekspresyonu gerçekleşir ve Th1 grubunun etkin sitokini olan interferon (IFN)- γ salgılanır (42). Th1 hücrelerinin oluşturduğu desteklediği enflamasyonun baskılanmasında ve hücrelerin Th2 fenotipine dönüşümünde rol oynar.

- **Th2:** Th2 hücre efektör işlevleri, helmintlere karşı bağışıklık tepkilerini harekete geçirir ve alerjik reaksiyonlarda merkezi konumdadır. IL-4 etkisiyle STAT6 aktivasyonu

başlar, ana düzenleyici GATA3'ün ekspresyonu indüklenir ve belirgin sitokinleri olan IL-4, IL-5 ve IL-13 salgılanır (42).

- **Tfh:** Tfh hücreleri, yüksek afiniteli B hücrelerinin seçiminin yapıldığı bölge olan germinal merkezlerin oluşumu ve B hücrelerinin hafıza hücrelerine veya uzun ömürlü plazma hücrelerine farklılaşması için gereklidir. Germinal merkezde açık boyanan bölgede bol miktarda bulunan Tfh hücreler, antijene özgü B hücrelerine önemli sinyaller sağlayarak, somatik hipermutasyon, izotip dönüşümü (class switch), hücresel etkileşimler ve sitokin salgılayarak afinite maturasyonu oluşmasına katılır (43).

CXCR5, ICOS, PD-1, BCL-6 ve IL-21'in ekspresyonu Tfh hücrelerin tanınmasını sağlayan yüzey molekülleridir (44). CXCR7^{lo}, CXCR5^{hi} yüzey ekspresyonu olan Tfh hücreler germinal merkeze gider ve burada kalırlar (43). PD-1-ICOS (ko-inhibisyonu) sinyal etkileşimi ile T hücre gelişimi baskılanabilir. Tfh hücrelerdeki ICOS ekspresyonu germinal merkez oluşumu, bellek B hücre ve antikor salgılayan plazma hücresi gelişimi için önemlidir (45).

BCL-6, Tfh hücre gelişimi için anahtar bir transkripsiyon faktörü olarak bilinmektedir. IL-6 sinyali üzerine STAT3 aktivasyonu gerçekleşir, ana regülatör BCL-6'nın ekspresyonu tetikler (42). Blimp1 (B lymphocyte induced maturation protein 1), BCL-6 faktörünün baskılanması yoluyla Tfh hücrelerinin üretimini doğrudan sınırlar. Blimp1'in aşırı ekspresyonu, hem Tfh hücre gelişimini ciddi şekilde azaltır hem de germinal merkez reaksiyonlarını ve antikor tepkilerini zayıflatır. Blimp1, CD4⁺ T hücrelerinde IL-2 tarafından indüklenir. STAT5 aracılığıyla IL-2 sinyali, Tfh hücre farklılaşmasını sınırlayan BLIMP1 ekspresyonuna yol açar (44).

- **Treg:** Regülatör T hücreleri immünolojik homeostasin ve self toleransın korunması ve düzenlenmesinde görev alır. Transkripsiyon faktörü Foxp3 (Forkhead transcription factor P3), Treg hücre gelişimi ve işlevinde önemli bir rol oynar. IL-10 ve TGF- β sitokinlerini salgılayarak T hücrelerinin efektör fonksiyonlarını baskılar.

IL-2 sinyali etkisiyle STAT5 aktivasyonu ana düzenleyici Foxp3 'ün ekspresyonuna neden olur. IL-2 T hücrelerinin proliferasyonu olmasında rol oynar ve Treg sağkalımını kontrol eder. IL-2R α (CD25) naif ve efektör T hücrelerde geçici olarak eksprese edilirken Treg'lerde

her zaman eksprese edilir. Foxp3⁺ Treg'lerin çoğu, timus tarafından immün baskılama için özelleşmiş ve işlevsel olarak olgun bir T hücresi alt popülasyonu olarak üretilir. Foxp3⁺ Treg hücrelerinin ana görevi inflamasyon bölgelerine göç etmek ve çeşitli efektör T hücre alt gruplarını (Th1, Th2, Th17, Tfh) baskılamaktır. Foxp3 X kromozomu tarafından kodlanır ve Treg hücrelerinin gelişiminde ve işlevinde önemli rol oynar (42,46).

2.6. Büyük Doku Uyumluluk Kompleksi ve Antijen Sunumu

İnsanlarda ilk kez lökositlerde gösterildiği için “İnsan Lökosit Antijeni (HLA)” olarak bilinen “Büyük Doku Uyumluluk Kompleksi (Major Histocompatibility Complex: MHC)” hücre yüzeyinde eksprese edilen ve edinilmiş bağışıklık sistemi tarafından kendinden olmayan moleküllerin tanınması için önemli olan spesifik bir molekül grubu oluşturur. Bu nedenle MHC moleküllerinin temel işlevi, patojenlerden kaynaklanan antijenleri peptid yapıya hale getirip hücre yüzeyinde T lenfositlerine sunmaktır (47). İnsanda 6. kromozomun kısa kolunda (6p21) yer alan HLA gen bölgesi yaklaşık 4 Mb büyüklüğünde 200'den fazla genin yer aldığı oldukça polimorfik bir bölgedir (48).

HLA molekülleri HLA Sınıf-I (HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G), HLA Sınıf-II (HLA-DR, -DP, -DQ, -DO, -DM, -DN, TAP1, TAP2), HLA Sınıf-III (C2, C4A, C4B, PF, TNF- α , - β) ve HLA Sınıf-IV (Hsp70, B144, LTB, TNF, LTA, MICA, MICB) olmak üzere 4 gruba ayrılır. HLA Sınıf-I molekülleri HLA -A, -B, -C gibi klasik; -E, -F, -G gibi non klasik molekülleri içerir. HLA -A, -B, -C molekülleri antijen sunumunda rol oynarken non-klasik olan HLA molekülleri immünomodülatör olarak görev yaparlar. HLA -DQ, -DR, -DP'yi içeren Sınıf-II molekülleri ise T yardımcı hücreleri tarafından tanınmak üzere işlenmiş antijenik peptitleri sunan proteinleri kodlarken; TAP1, TAP2 ve HLA-DM ve -DO tarafından kodlanan moleküller, antijen işlenmesi ve sunuma hazırlanmasında görev yaparlar. Sınıf-III ve -IV HLA molekülleri ise asıl olarak enflamasyonda ve otoimmün hastalıklarda önemlidirler (49).

Sınıf-I HLA molekülleri α ve β 2 mikroglobulin zincirinden oluşur. 15. kromozomda kodlanan β 2 mikroglobulin ve polimorfik özellik gösteren α 1, α 2 ve α 3 zincirleri birbirlerine kovalent olmayan bağlarla bağlıdır. HLA Sınıf-II molekülleri ise polimorfik olan bir α ve β zincirinden oluşur. Bunlarda birbirlerine Sınıf I moleküllerinde olduğu gibi kovalent olmayan bağlarla bağlanmıştır (50).

HLA Sınıf-I antijenleri, çekirdekli hücrelerin yüzeyinde eksprese edilirken Sınıf-II antijenler ise dendritik hücreler, aktive makrofajlar ve B lenfositler gibi, antijen sunucu hücrelerin yüzeyinde eksprese edilirler (51).

MHC Sınıf-I molekülleri CD8+ T hücrelerine peptid sunumu yaparken ve Sınıf-II molekülleri CD4+ T hücrelerine peptid sunumu yapar. Bu peptitler, MHC Sınıf-I molekülleri için hücre içi (endojen) ve MHC Sınıf-II molekülleri için eksojen olmak üzere farklı kaynaklardan kaynaklanır ve farklı yollarla elde edilir (51).

2.6.1. MHC Sınıf-I Antijen Sunumu

MHC Sınıf-I molekülleri tarafından hücre içi antijenik peptitlerin sunulabilmesi için antijenler proteazom tarafından küçük peptidlere parçalanarak Endoplazmik Retikulum (ER) da peptitleri bekleyen MHC Sınıf-I moleküllerine erişmeleri gerekir. Peptitler TAP yoluyla ER lümenine geçer. Peptit taşıyıcı TAP, sitosolik peptitleri ER lümenine pompalar. TAP ayrıca bir veya daha fazla tapasin molekülüne bağlanarak MHC Sınıf-I moleküllerinin katlanması için bir platform görevi görür. ER'de MHC Sınıf-I molekülleri, kalretikülin ve ERp57 ve muhtemelen peptit bağlayıcı şaperon PDI tarafından kısmen katlanır ve stabilize edilir. Kalretikülin, N-glikosile MHC Sınıf-I moleküllerini bağlayan bir lektindir ve bu, MHC Sınıf-I molekülleri ve tapasin arasında daha kararlı bir etkileşim ile sonuçlanır. TAP, tapasin, MHC Sınıf-I, ERp57 ve kalretikülin kompleksine peptit yükleme kompleksi (PLC) denir. PLC, MHC Sınıf-I moleküllerine verimli peptit yüklemesi sağlar. Yeterli afiniteye sahip bir peptide bağlandıktan sonra, MHC Sınıf-I kompleksi şaperonlardan salınır ve ER kalite kontrol sisteminden geçer. ER'de kalite kontrol işleminden geçmeyen peptid yüklü MHC Sınıf-I molekülleri ERAD yolu tarafından çıkarılırlar ve yıkım veya yeni bir TAP translokasyonu ve MHC Sınıf-I değerlendirmesi için sitozole yeniden girerler. ER'de kalite kontrol işleminden geçen peptid yüklü MHC Sınıf-I molekülleri CD8+ T hücrelerine antijen sunumu için plazma membranına taşınır (52).

HLA-G molekülü

Non-klasik HLA-G molekülleri, klasik HLA-A, HLA-B ve HLA-C moleküllerinden farklı özellikler gösterir. Bunlar sınırlı protein değişkenliği, mRNA'nın alternatif eklenmesiyle oluşturulan çoklu izoformların (zara bağlı ve çözünür izoformlar) varlığı,

bağışıklık sisteminin modülasyonu (bastırılması) ve esas olarak fetal sitotrofoblastta sınırlı doku ekspresyonudur. Yüksek polimorfik olan klasik HLA Sınıf-I genlerinin aksine, HLA-G gen polimorfizmi çok sınırlıdır. On dokuz farklı tam HLA-G proteini ve üç null alel bulunmuştur. Dört tanesi membrana bağlı izoformlar ve geri kalan çözünür izoformlar olmak üzere, mRNA'nın alternatif uç birleştirmesiyle oluşturulan 7 HLA-G transkripti (izoformu) bilinmektedir.

HLA-G'nin bağışıklık tepkisinin baskılanmasında önemli bir rol oynayan, tolerojenik bir molekül olarak rolünü desteklemiştir. Genel olarak, molekülün tüm bölümleri bu yeteneğe katkıda bulunabilir. Kısa sitoplazmik kuyruk, HLA-G'yi endoplazmik retikulumda daha uzun süre tutar ve endositoz motifinin olmaması nedeniyle molekülün hücre yüzeyindeki yarı ömrünü uzatır ve bağışıklık sisteminin hücreleri ile çoklu etkileşimlere izin verir.

HLA-G, inhibitör özelliği olan reseptör olarak immünglobülin (Ig) benzeri transkript 2 (ILT2: Ig-Like Transcript 2) ve ILT4, inhibitör olmayan reseptör olarak CD8 ve CD160 ve KIR2DL4 reseptörlerini içerir. ILT2 (ayrıca CD85j ve LILRB1 olarak da bilinir) ve ILT4 (ayrıca CD85d ve LILRB2 olarak da bilinir) periferik bağışıklık hücreleri üzerindeki ana HLA-G reseptörleridir. ILT2 monositler, dendritik hücreler, B hücreleri ve doğal öldürücü ve T hücrelerinin alt grupları üzerinde eksprese edilirken, ILT4 neredeyse sadece miyelomonositik kökenli hücreler tarafından eksprese edilir. Hem ILT2 hem de ILT4, sitoplazmik kuyruklarında, SHP-1 (Src-homology 2 alanı içeren tirozin fosfataz 1) gibi fosfatazları alarak hücrel tepkileri inhibe eden immünoresptör tirozin bazlı inhibitör reseptör motifleri (ITIM'ler) içerir.

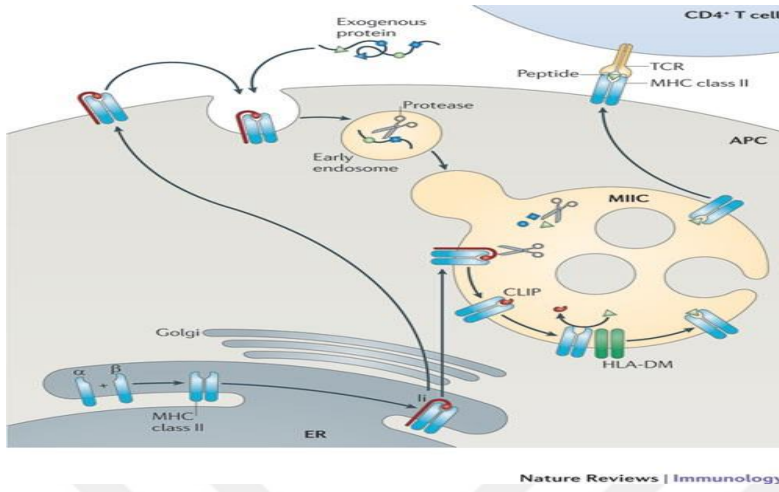
Nakillerde, HLA-G'nin birincil işlevi, çeşitli efektör hücrelerde bulunan inhibitör reseptörler ILT2, ILT4 ve KIR2DL4 ile etkileşimi yoluyla konakçı immün yanıtını baskılamaktadır. Bağışıklık toleransı ve dolayısıyla uzun süreli allogreft sağ kalımı, hem doğrudan hem de dolaylı mekanizmalar yoluyla gerçekleşir. Doğrudan inhibisyon, HLA-G'nin ILT2 ve ILT4 ile etkileşiminden kaynaklanır. Ki bu da CD8⁺ T lenfositlerin, NK ve CD4⁺ T lenfositlerin alloproliferasyonunun inhibe olmasına neden olur. HLA-G'nin B-lenfositleri üzerindeki humoral inhibitör mekanizmasına bakıldığında da ILT2 reseptör bağlanması yoluyla aktive edilmiş B lenfositlerden proliferasyonu, farklılaşmayı ve antikor salgılanmasını inhibe ettiğini göstermektedir (53).

2.6.2. MHC Sınıf-II Antijen Sunumu

MHC Sınıf-II lokusunun transkripsiyonu, ana regülatör CIITA tarafından kontrol edilir. MHC II transaktivatörünün (CIITA) etkiyle transkribe olan MHC Sınıf-II genleri ER'ye translokasyondan sonra, değişmez zincir (Ii) ve α ve β zincirleri, bir nonamerik ($\alpha\beta I_i$)₃ kompleksi halinde birleşir. Bu birleşmenin kesin sırası açık değildir, Ii'nin MHC Sınıf-II ile birleşmeden önce ya önceden birleştirilmiş $\alpha\beta$ kompleksleri olarak ya da tek α - ve β -zincirleri ile başlangıçta trimerler halinde birleşmesi (54) ve MHC Sınıf-II moleküllerinin ER'den ayrılmadan önce mutlaka Ii ile bir kompleks oluşturması gereklidir. Ii'nin dört farklı varyantı mevcuttur. Bunlar sitoplazmik kuyrukta buluna p33 ve p35 varyantı ile p43 ve p45 varyantlarıdır. MHC Sınıf II'nin α - ve β -zincirleri ER'de tutulurken, birleştirilmiş MHC Sınıf-II $\alpha\beta$ heterodimer ER'den yavaşça ayrılmaya başlar ve bu, Ii'nin bağlanmasıyla daha da hızlanır. Ii'nin buradaki görevi CLIP (Sınıf II ile ilişkili Değişmez Zincir Peptid) bölgesinin MHC Sınıf-II peptit bağlama oluşunu bloke etmesi ve böylece ER'deki diğer peptitlerin bu oyuğa bağlanmasını engellemesidir. Ii'nin sitoplazmik kuyruğu, MHC Sınıf-II moleküllerini endozomal bölmelere yönlendiren iki klasik di-lösin ayırma motifi içerir. Bu ayırma motifleri, AP1 (bir trans-Golgi ağ adaptörü) ve AP2 (bir plazma zarı adaptörü) ayırma adaptörleri tarafından tanınır. Bu nedenle Ii, MHC Sınıf-II moleküllerini doğrudan trans-Golgi ağından veya plazma zarından endositoz yoluyla "MHC Sınıf-II bölmesi (MIIC)"ne olarak adlandırılan geç bir endozomal bölmeye taşınır. Ii, MHC Sınıf-II moleküllerinin yaşamındaki çeşitli adımlar için gereklidir (52).

Ii/MHC II komplekslerinin endositik yola Golgi üzerinden mi yoksa doğrudan hücre yüzeyi yoluyla mı gittiği hala tartışmalıdır. MIIC'ye girdikten sonra Ii katepsinler olarak adlandırılan yerleşik proteazlar tarafından sindirilir ve yerine CLIP adı verilen 24 aminoasitlik bir fragman gelir. Aynı bölmede, hücre dışı protein antijenleri, peptit yüklemesine izin vermek için endo-lizozomal proteazlar tarafından parçalanır. Bu adım için, MHC Sınıf-II molekülleri, CLIP'in peptit bağlama oluşundan çıkarılmasını ve bunun spesifik antijen türevli peptitlerle değişimini katalize eden peptit değişim faktörü HLA-DM'yi gerektirir. HLA-DM ayrıca MHC Sınıf-II molekülleri için optimal afiniteye sahip peptitlerin seçilmesine yardımcı olur. Bu işlemdeki bir başka ilgili molekül, ER'de ve endositik yol boyunca HLA-DM ile sıkı bir şekilde birleşen ve böylece HLA-DM aktivitesini daha asidik bölmelerle sınırlayan HLA-DO'dur. Son olarak, peptit/MHC Sınıf-

II kompleksleri plazma zarına taşınır ve CD4⁺ T lenfosit aktivasyonunu ve T yardımcı hücre aracılı bağışıklık tepkilerini tetikler (55,56).



Şekil 2.3. MHC Sınıf II antijen sunumu (57)

2.7. Golgi

Golgi, yeni sentezlenmiş zar ve salgı proteinleri ve lipidlerin taşınması, işlenmesi ve sınıflandırılmasında kilit işlevlere sahip, hücre içi zara bağlı merkezi bir organeldir. Spesifik yapısı nedeniyle ayırt edici bir organel olan Golgi, salgısal yolağın merkezinde yer alır (58). Golgi'nin bu işlevlerine ek olarak mitoz, DNA onarımı, stres tepkileri, otofaji, apoptoz ve inflamasyon dahil olmak üzere bir dizi hücresel sürecin düzenlenmesine katkıda bulunduğu kabul edilmektedir (59).

Golgi yapısı dinamiktir ve sıkı bir şekilde düzenlenir. Golgi, hücre tipine ve organizmaya bağlı olarak sayısı 3 ile 12 arasında değişen düz sarnıçlardan (cisternae) oluşan bir yığından (stacks) meydana gelir. Memeli hücrelerinde her hücre, sentrozomun yakınında lokalize olan Golgi şeridini (ribbon) oluşturmak üzere birbirine bağlanan bu türden yüzlerce yığın içerir (60). Golgi, zarlarla ayrılmış ve belirgin sarnıçlar oluşturan cis-Golgi ağı, cis-Golgi, medyal-Golgi, trans-Golgi ve trans-Golgi ağı gibi çeşitli fonksiyonel bölgelere sahiptir (61). Golgi yığınları polarizedir. Endoplazmik retikulumda yeni sentezlenmiş protein ve lipidler golgiye cis-sisterna tarafından alınırlar ve trans-Golgi ağından (TGN) endozomlar ve lizozomlar gibi diğer hücre içi zarlara aktarılırlar (58).

Golgi'de salgı ve zar proteinleri, glikozilasyon, sülfatlama ve fosforilasyon dahil olmak üzere çeşitli translayon sonrası modifikasyona uğrarlar. Ayrıca N-glikozilasyon, proteoglikan tipi glikozilasyon, proteinlerin musin tipi glikozilasyonu ve lipidlerin glikozilasyonu gibi çeşitli glikozilasyon tipleri golgide gerçekleşir. Endoplazmik retikulumda sentezlenen lipidler ve proteinler golgi yığınlarından geçerken şekerler, lipidler veya proteazlar eklenerek işlenirler. Golgi yığınlarının alt bölmeleri, glikoproteinlerin ve glikolipidlerin sentezinden sorumlu bir dizi glikozidaz ve glikoziltransferaz barındırır. TGN'de birçok salgı proteini lümenal proteinazlar tarafından proteolitik olarak parçalanır (58,60).

Son on yılda, golgi membran mimarisini ve işlevini düzenleyen moleküler mekanizmaları ortaya çıkarmak için önemli miktarda çalışmalar yapılmıştır. Golgi şeridinin oluşumu Golgi matris proteinlerine ve sağlam bir mikrotübül organizasyonuna bağlıdır. Sitozolik dinein (kimyasal enerjinin hareket enerjisine dönüşmesiyle hareket eden bir taşıyıcı motor proteindir), golgi zarlarını sentrozomdan türetilen mikrotübüller boyunca mikrotübüllerin negatif yüklü ucuna doğru hareket ettirir. Daha sonra, Golgi yönelimli mikrotübüller Golgi yığınlarını yakın tutar ve aralarındaki tübüller arası bağlantıları kolaylaştırır (58).

Golgi Matriks Proteinleri

GRASPs (Golgi Reassembly Stacking Proteins): Golgi matriks proteinlerinin arasında GRASP65 (ağırlıklı olarak cis yüzündeki sarnıçlarda bulunur) ve GRASP55 (ortadaki ve trans yüzündeki sarnıçlarda daha çok bulunur) en çok çalışılan ve en detaylı bilinen proteinlerin başında gelmektedirler.

Golginler: Veziküllerin bağlanması ve Golgi bütünlüğünün korunması için gerekli sarmal yapıda golgi zar proteinleridir. Farklı golginler Golgi kompleksinin farklı bölgelerinde lokalize olurlar.

GM130 ilk tanımlanan golgi matriks proteindir ve GRASP65 ile stabil bir kompleks oluşturarak ağırlıklı olarak cis-Golgi yüzeyinde bulunur (58). 130 kDa'lık Golgi matriks proteini olan GM130 cis-Golgi'nin en iyi bilinen belirteçlerinden biridir. GM130, ER ve Golgi zarlarından tomurcuklanan taşıma vezikülleri arasındaki füzyon, Golgi üzerindeki

mikrotübüllerin çekirdeklenmesi, iğ düzeneği ve hücre bölünmesi ve Golgi'nin kompartımanlaşma organizasyonunun düzenlenmesi dahil olmak üzere birçok işlemin anahtarıdır (62).

2.7.1. Golgi Stres Yanıtı

Endoplazmik retikulumda salgı ve membran proteinlerinin sentezi arttığında ve bu durum golginin kapasitesini aştığında bu proteinler düzgün bir şekilde modifiye edilemez veya taşınmaz ve Golgi stresi oluşur. Golgi stresiyle başa çıkmak için hücreler, Golgi stres yanıtı olarak bilinen hücresel ihtiyaçlara uygun olarak Golginin kapasitesini artıran homeostatik mekanizmaları etkinleştirir.

Golgi stres yanıtının moleküler mekanizması: (a) Golgi işlevinin yetersizliğini tespit eden bir sensör molekülü; (b) Golgi ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu indükleyen bir transkripsiyon faktörü; (c) transkripsiyon faktörünün bağlandığı bir transkripsiyonel arttırıcı eleman; ve (d) glikozilasyon enzimleri ve veziküler taşıma bileşenleri gibi Golgi ile ilişkili proteinleri kodlayan hedef genler'den oluşur (61).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda Golgi stres yanıtı ER stres yanıtı kadar net karakterize edilememiştir ancak Golgi fonksiyonlarının kapasitelerini düzenleyen bazı mekanizmalar tanımlanmıştır. Günümüzde memeli hücreleri için Golgi stres yanıtı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir ve bunlar TFE3, proteoglikanlar, CREB3 ve HSP47 yolları olarak sıralanabilir. TFE3 yolağı N-glikozilasyon ve veziküler taşıma gibi Golgi'nin genel işlevini düzenler. Proteoglikan yolağı proteoglikanlar için glikozilasyon enzimlerinin ekspresyonunu artırır. CREB3 yolağı pro-apoptotik işlevleri düzenlerken HSP47 yolağı ise anti-apoptotik işlevleri düzenler (61).

Golgi yapısı ve işlevi, DNA hasarı, enerji ve besin yoksunluğu ve pro-apoptotik koşullar gibi stres koşulları altında bozulabilir. Bu, mikrotübül organizasyonunun bozulmasına veya Golgi yapısal proteinlerinin fosforilasyonuna, bozulmasına veya bölünmesine neden olabilir. Ayrıca, birçok sinyal molekülünün Golgi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle Golgi'nin stres sinyallerini algılayabildiği ve iletebildiği ve bu nedenle hücresel sinyalleşme ağında bir merkez görevi gördüğü öne sürülmüştür (58).

2.7.2. Golgi ve Brefeldin A

Brefeldin A, memeli hücreleri üzerinde dramatik etkileri olan toksik mantarlar tarafından üretilen küçük bir hidrofobik bileşiktir. Brefeldin A muamelesinden sonra Golgi kompleksi parçalanır. ER'den tomurcuklanan ve proteinleri taşıyan veziküller Golgi zarıyla kaynaşarak kargolarını bırakırlar. Salgılanması gereken proteinler, sisternal olgunlaşma ve/veya Golgi yoluyla anterograd veziküler taşıma ile ilerler, ER'ye alınması gereken proteinler ise geri dönüşüm için retrograd veziküllere ayrılır. Aktif GTP-bağlı formu olan Arf (ADP-ribosilasyon faktörleri) ailesinin küçük G proteinleri kargo molekülünün taşınması için donör zarlarından küçük zar veziküllerinin tomurcuklanmasını sağlamak amacıyla yapı iskelesi görevi gören protein komplekslerini toplar ve birleştirir. Brefeldin A, Arf'yi aktive eden bazı proteinleri ve guanin nükleotid değişim faktörlerini inhibe eder. Arf1'in inhibisyonu, birçok periferik membran proteininin sitozole salınmasına ve sonuçta Golgi'nin çökmesine neden olur (63).

2.7.3. Golgi ve MHC ilişkisi

Golgide sitoplazmik sinyallerden bağımsız olarak integral zar proteinleri için de taşıma mekanizmaları vardır. T. Nilsson ve arkadaşları Golgi tutma (retention) mekanizmasını, iki entegre zar proteininden oluşan bir dizi kimera yaparak araştırmışlardır. Bu kimera bir Golgi lokalize proteini (β -1,4-galaktosiltransferaz (GT)) ve bir endozomal proteini (insan değişmez zinciri (Ii)) içerir. GT'nin transmembran alanı ve Ii'nin sitoplazmik ve lümenal alanından oluşan kimera Golgi'de tutulur, bu da tek başına transmembran alanının Golgi lokalizasyonuna aracılık edebileceğini gösterir (64).

Ii/MHC II komplekslerinin endositik yola Golgi üzerinden mi yoksa doğrudan hücre yüzeyi yoluyla mı gittiği hala tartışmalı olsa da yine ER'de sentezlenen ve antijen sunumunda görevli olan MHC Sınıf-II molekülleri HLA-DM ve -DO MIIC'a golgi üzerinden giderler (65).

Tez Çalışmasının Amacı

Tez çalışmasının amacı foliküler B hücresinde Brefeldin A muamelesi ile oluşturulan golgi stresinin MHC Sınıf-II ve non-klasik HLA-G moleküllerinin ekspresyonuna, foliküler

B hücresinde oluşturulan bu stresinin T foliküler yardımcı (Tfh) hücrelerin ve foliküler B hücre yüzeyindeki HLA-G molekül ekspresyonunu etkisinin araştırılmasıdır. Bununla birlikte dalak dokusundan izole edilen B ve T hücrelerinin ko-kültür ortamında fenotip değişiminin de araştırılması amaçlanmıştır.

Foliküler B hücrelerde Brefeldin A muamelesi ile indüklenen golgi stresine bağlı olarak organ nakil olan hastada oluşan hücre stresini taklit ederek hücre yüzeyindeki MHC Sınıf-II moleküllerinin ekspresyonunun azalacağı düşünülmektedir. Kortikosteroid etkisi ile Tfh ve B hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonunun artması beklenilmektedir.

Tez Çalışmasının Özgün Değeri

Yapılan literatür taramasında golgi stresinin MHC Sınıf-II molekül ekspresyonuna etkisi hakkında sınırlı sayıda çalışma olmakla birlikte adaptif immün sistemin naif hücrelerinin incelendiği foliküler T ve B lenfositlerle golgi stresi ve HLA-G ilişkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tez çalışması bu açıdan golgi stresine bağlı olarak foliküler B hücre ve foliküler B hücre etkisindeki T hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun değişimini gösteren ilk çalışma olacaktır. Foliküler hücrelerdeki golgi stresine bağlı fenotip değişimi ilk defa bu çalışma ile gösterilecektir. Bu yönüyle çalışmanın özgün bir çalışma olup literatüre ve daha sonra yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması 3 farklı kişiden alınan sekonder lenfoid doku örneklerinin (dalak örnekleri) kullanıldığı bir çalışmadır. Çalışmada beyin ölümü gerçekleşmiş ve organ bağışında bulunmuş 2 farklı donör adayının Lenfosit Cross Match testi için alınmış dalak örneğinden rutin testler yapıldıktan sonra kalan ve tıbbi atık olarak kabul edilen dokular ve hastanemize tedavi için başvurup ameliyat olan ve dalağı alınan 1 hastanın tıbbi atık olarak değerlendirilen dalak örneği kullanılmıştır.

Çalışmaya, beyin ölümü gerçekleşmiş ve organları bağışlanmış donör yakınlarının gönüllü olarak imzaladığı Başkent Üniversitesi Adana Dr. Turgut Noyan Uygulama ve Araştırma Merkezi Bilimsel Araştırma Onam Formu ve hastaların gönüllü olarak imzaladığı Başkent Üniversitesi Adana Dr. Turgut Noyan Uygulama ve Araştırma Merkezi Bilimsel Araştırma Hasta Onam Formu alınan sekonder doku örnekleri dahil edildi.

Tez ile ilgili laboratuvar deneyleri Başkent Üniversitesi Adana Dr. Turgut Noyan Uygulama ve Araştırma Merkezi Doku Tipleme Laboratuvarı ve İmmünoloji Anabilim Dalı Moleküler İmmünoloji Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmıştır (Proje no: KA22/308).

3.1. ÖRN160524 İsimli Örnek ile Yapılan Çalışmalar

ÖRN160524 isimli beyin ölümü gerçekleşmiş ve organları bağışlanmış donöre ait dalak örneği ile yapılan çalışmalar şu şekildedir:

- Dalak örneğinin fiziksel olarak parçalanması ve ficol dansite gradient yöntemi ile lenfosit izolasyonu
- İzole edilen lenfositler kullanılarak manyetik boncuk yöntemi ile T hücre ve B hücre izolasyonu
- İzole edilen T hücre ve B hücrenin akım sitometri yöntemi ile saflık oranının belirlenmesi
- T hücre ve B hücre ile yapılan ko-kültürün 0. saat immünofenotipleme çalışması
- B hücrelere Brefeldin A (BFA) muamelesi ile golgi stresi meydana getirilmesi

- Hücre kültürü yöntemi ile 6., 12. ve 24. saat için T hücre ve B hücre ko-kültürü çalışması
- Akım sitometri yöntemi ile 6., 12. ve 24. saat immünofenotipleme çalışması

3.2. ÖRN010324 İsimli Örnek ile Yapılan Çalışmalar

ÖRN010324 isimli hastanemize başvurarak ameliyat olan hastaya ait olan ve tıbbi atık olarak değerlendirilen dalak örneği ile yapılan çalışmalar şu şekildedir:

- Dalak örneğinin fiziksel olarak parçalanması ve dansite gradient yöntemi ile ficol kullanılarak lenfosit izolasyonu
- İzole edilen lenfosit örneklerinin dondurulması
- Çalışma için dondurulan lenfosit örneklerinin çözündürülmesi
- Çözödürlen lenfositler kullanılarak manyetik boncuk yöntemi ile T hücre ve B hücre izolasyonu
- İzole edilen T hücre ve B hücrenin akım sitometri yöntemi ile saflık oranının belirlenmesi
- T hücre ve B hücre ile yapılan ko-kültürün 0. saat immünofenotipleme çalışması
- B hücrelere BFA muamelesi ile golgi stresi meydana getirilmesi
- Hücre kültürü yöntemi ile 6., 12. ve 24. saat için T hücre ve B hücre ko-kültürü çalışması
- Akım sitometri yöntemi ile 6., 12. ve 24. saat immünofenotipleme çalışması

3.3. ÖRN070624 İsimli Örnek ile Yapılan Çalışmalar

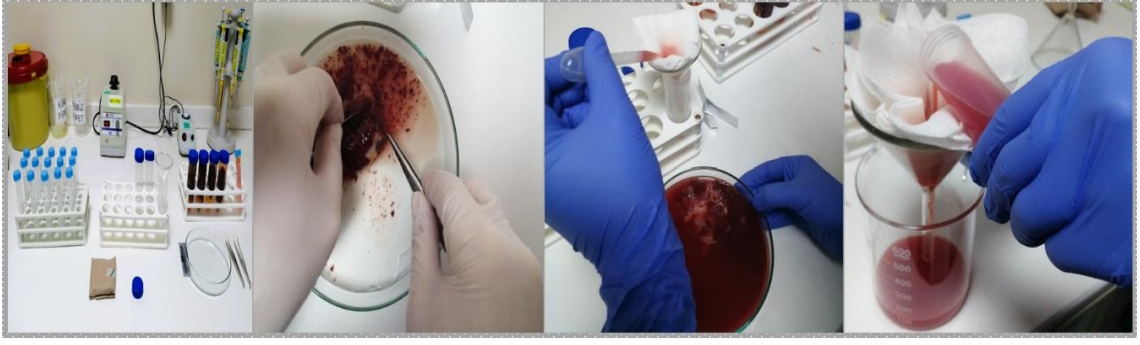
ÖRN070624 isimli beyin ölümü gerçekleşmiş ve organları bağışlanmış donöre ait dalak örneği ile yapılan çalışmalar şu şekildedir:

- Dalak örneğinin fiziksel olarak parçalanması ve dansite gradient yöntemi ile ficol kullanılarak lenfosit izolasyonu
- İzole edilen lenfositler kullanılarak manyetik boncuk yöntemi ile T hücre ve B hücre izolasyonu
- İzole edilen T hücre ve B hücrenin akım sitometri yöntemi ile saflık oranının belirlenmesi
- T hücre ve B hücre ile yapılan ko-kültürün 0. saat immünofenotipleme çalışması
- B hücrelere Brefeldin A (BFA) muamelesi ile golgi stresi meydana getirilmesi
- Hücre kültürü yöntemi ile 6., 12. ve 24. saat için T hücre ve B hücre ko-kültürü çalışması
- Akım sitometri yöntemi ile 6., 12. ve 24. saat immünofenotipleme çalışması

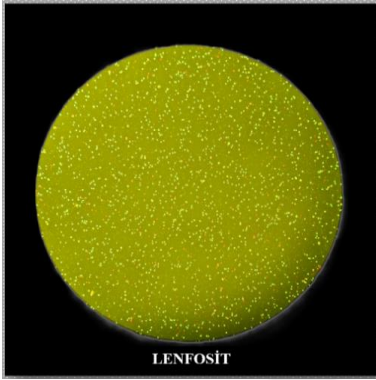
3.4. Dalak Örneğin Parçalanması ve Lenfosit İzolasyonu

Elde edilen doku örneği (dalak örneği) ilk önce Fosfat Buffer Salin (PBS) (Gibco, Kat. No: 10010-015) içerisinde bistüri yardımıyla yaklaşık 2 mm² olacak şekilde fiziksel olarak parçalandı.

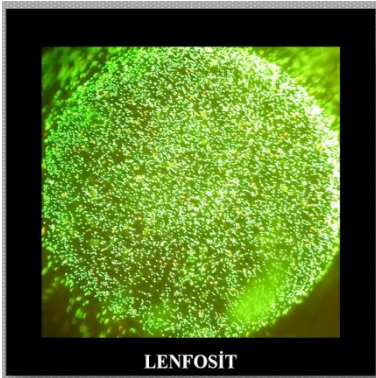
- PBS içerisinde süspanse halde bulunan dokular gazlı bez yardımıyla süzülerek hücre süspansiyonu elde edildi (Resim 3.1.).
- 15 ml'lik falkon tüp içerisine 4 ml fıkol (Stemcell Technologies, Kat. No:07851) eklendi.
 - ÖRN160524 için 20 adet falkon tüp kullanıldı.
 - ÖRN010324 için 30 adet falkon tüp kullanıldı.
 - ÖRN070624 için 18 adet falkon tüp kullanıldı.
- Hücre süspansiyonu yavaşça fıkol üzerine yayılarak 2140 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Santirüj sonrasında fıkolün üst kısmında oluşmuş olan lenfosit fazı pastör pipet yardımıyla 15 ml'lik yeni bir falkona toplandı.
- Lenfositlerin üzerine 1:1 oranında olacak şekilde PBS eklendi ve 2-3 defa falkon tüp alt üst edilerek karıştırılması sağlandı.
- 1700 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Bu aşama 2 defa tekrarlandı.
- Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve kalan pellet PBS ile dilüe edildi.
- Cell-dyn cihazında okutularak lenfosit sayısı belirlendi.
 - ÖRN160524 için lenfosit miktarı 9×10^6 hücre / ml olarak saptandı.
 - ÖRN010324 için lenfosit miktarı 85×10^6 hücre / ml olarak saptandı.
 - ÖRN070624 için lenfosit miktarı 17.9×10^6 hücre / ml olarak saptandı.
- Acredin orange-propidium iodide kullanılarak invert floresan mikroskopta hücrelerin canlılık oranı saptandı.
 - ÖRN160524'ün canlılık oranı %90 olarak saptandı (Resim 3.2.).
 - ÖRN010324'ün canlılık oranı %90 olarak saptandı (Resim 3.3.).
 - ÖRN070624'ün canlılık oranı %85 olarak saptandı (Resim 3.4.).



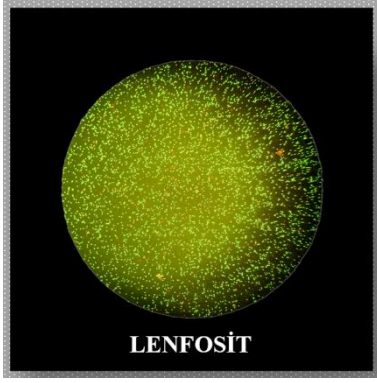
Resim 3.1. Dalak örneğinin fiziksel olarak parçalanması



Resim 3.2. ÖRN160524 isimli örneğe ait dalaktan izole edilen lenfositlerin invert floresan mikroskop görüntüsü



Resim 3.3. ÖRN010324 isimli örneğe ait dalaktan izole edilen lenfositlerin invert floresan mikroskop görüntüsü



Resim 3.4. ÖRN070624 isimli örneğe ait dalaktan izole edilen lenfositlerin invert floresan mikroskop görüntüsü

3.5. Manyetik Boncuk Yöntemi ile T ve B Hücre İzolasyonu

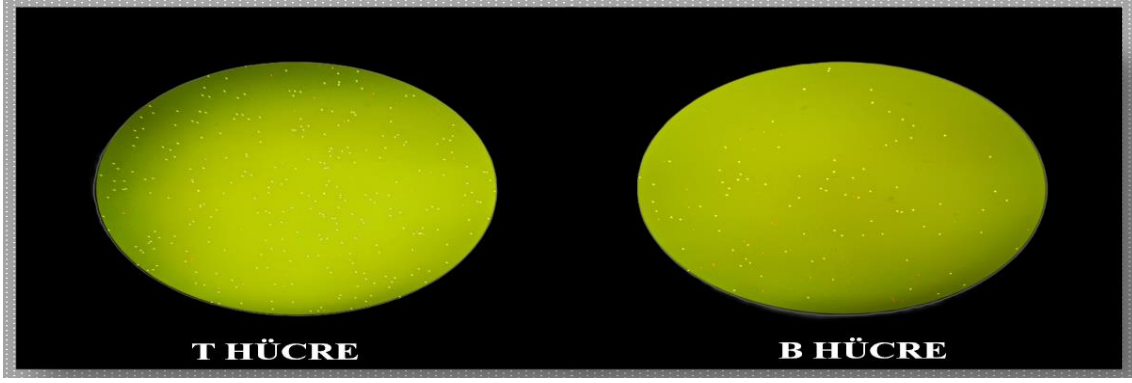
İzole edilen lenfositler kullanılarak T hücre (Stemcell Technologies-Easysep, Kat. No: 19671) ve B hücre (Stemcell Technologies-Easysep, Kat. No:19684) izolasyonu manyetik boncuk yöntemi kullanılarak negatif seleksiyon ile yapıldı.

- T hücre ve B hücre izolasyonu yapıldı.
 - ÖRN160524 için 63 adet T hücre ve 63 adet B hücre izolasyonu yapıldı.
 - ÖRN010324 için 50 adet T hücre ve 100 adet B hücre izolasyonu yapıldı.
 - ÖRN070624 için 24 adet T hücre ve 24 adet B hücre izolasyonu yapıldı.
- T hücre ve B hücre izolasyonu için ayrı ayrı 5 ml'lik polistren tüpler isimlendirildi.
- İsimlendirilen tüplere 1 ml lenfosit eklendi.
- T hücre izolasyonu için ilgili tüplere 50 μ L hücre kokteyli ve 50 μ L manyetik boncuk, B hücre izolasyonu için ilgili tüplere 50 μ L hücre kokteyli ve 50 μ L manyetik boncuk pipetlendi.
- Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında her bir tüpe 500 μ L PBS eklenerek tekrar vortekslendi.
- Manyetik sporda 10 dakika inkübe edildi.
- Süre sonunda tüpler manyetik spordan çıkarılmadan süpernatant pastör pipet yardımıyla yeni tüplere alındı.
- Manyetik sporda 7 dakika inkübe edildi.
- Süre sonunda tüpler manyetik spordan çıkarılmadan süpernatant pastör pipet yardımıyla yeni tüplere alındı.

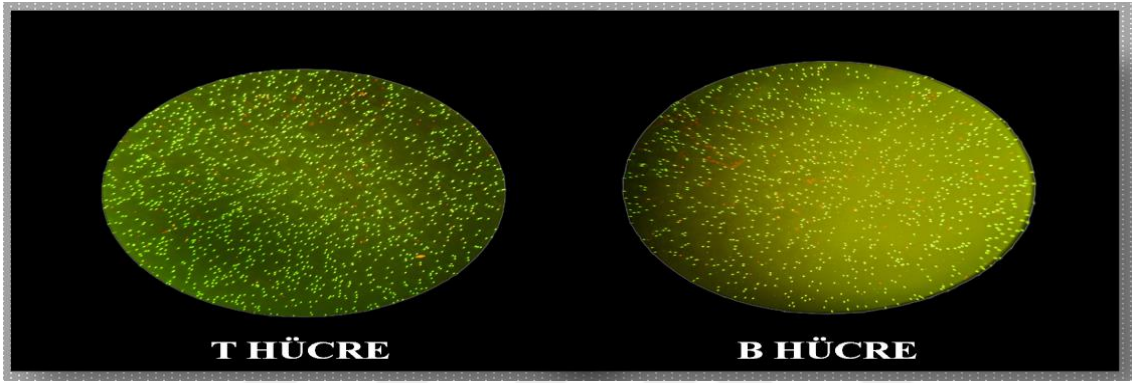
- 2300 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant, tüpün alt kısmına çöken hücrelere zarar vermeden pipet yardımıyla alındı.
- Tüpün alt kısmında bulunan pellet 500 µL PBS ile dilüe edildi.
- Cell-dyn cihazında okutularak lenfosit sayısı belirlendi.
 - ÖRN160524 için T hücre sayısı 5.96×10^6 hücre / ml olarak ve B hücre sayısı 5.5×10^6 hücre / ml olarak saptandı.
 - ÖRN010324 için T hücre sayısı 831×10^3 hücre / ml olarak ve B hücre sayısı 468×10^3 hücre / ml olarak saptandı.
 - ÖRN070624 için T hücre sayısı 5.40×10^6 hücre / ml olarak ve B hücre sayısı 4.57×10^6 hücre / ml olarak saptandı.
- Acredin orange-propidium iodide kullanılarak invert floresan mikroskopta hücrelerin canlılık oranı saptandı.
 - ÖRN160524’ün T hücre canlılık oranı %90 olarak ve B hücre canlılık oranı %90 olarak saptandı (Resim 3.6.).
 - ÖRN010324’ün T hücre canlılık oranı %90 olarak ve B hücre canlılık oranı %90 olarak saptandı (Resim 3.7.).
 - ÖRN070624’ün T hücre canlılık oranı %90 olarak ve B hücre canlılık oranı %90 olarak saptandı (Resim 3.8.).



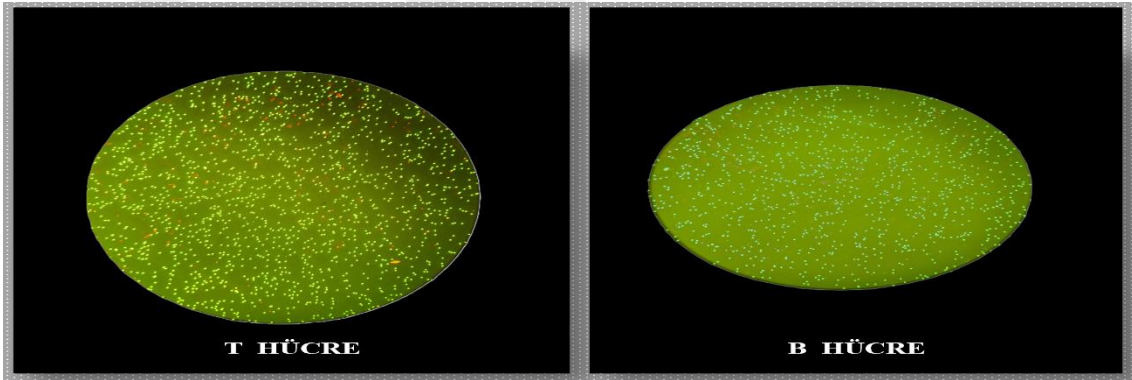
Resim 3.5. Manyetik boncuk yöntemi ile T hücre ve B hücre izolasyonu



Resim 3.6. ÖRN160524 isimli örnekten izole edilen T hücre ve B hücre invert floresan mikroskop görüntüsü



Resim 3.7. ÖRN010324 isimli örnekten izole edilen T hücre ve B hücre invert floresan mikroskop görüntüsü

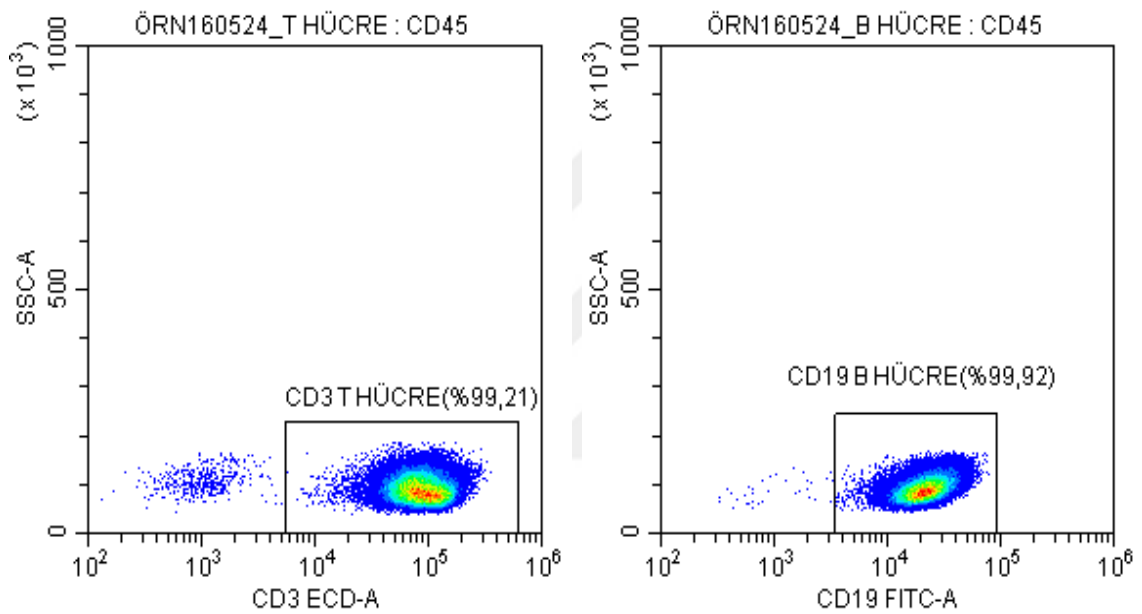


Resim 3.8. ÖRN070624 isimli örnekten izole edilen T hücre ve B hücre invert floresan mikroskop görüntüsü

3.6. Akım Sitometri Yöntemi ile Saflık Belirleme

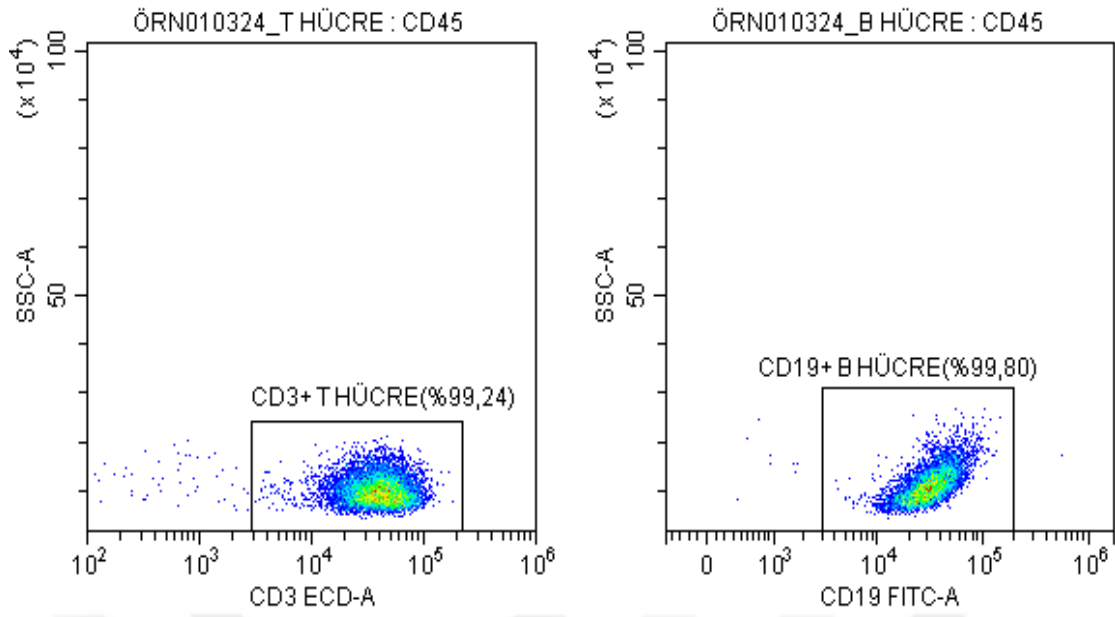
- 2 adet 5 ml polistren tüp T hücre ve B hücre için isimlendirildi.
- T hücre tüpüne; 50µl T hücre, 5µl CD45 ve 5µl CD3 monoklonal antikorları eklendi.
- B hücre tüpüne; 50µl B hücre, 5µl CD45 ve 5µl CD19 monoklonal antikorları eklendi.
- Hafifçe vortekslendi ve oda sıcaklığında, karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.

- Süre sonunda tüplere 2 ml %1 Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, Kat. No:10500-064) içeren PBS eklendi ve 2300 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant pipet yardımıyla ayrıldı ve pellet üzerine 500 µl %1 FBS içeren PBS eklendi.
- Tüpler hafifçe vortekslendi ve akımsitometri cihazında (DxFlex) okutuldu.
- Okutma sonrasında CytExpert software programında hücre saflıklarının değerlendirilmesi yapıldı.
 - ÖRN160524’ün T hücre saflık oranı %99,21 olarak ve B hücre saflık oranı %99,92 olarak saptandı (Resim 3.9.).



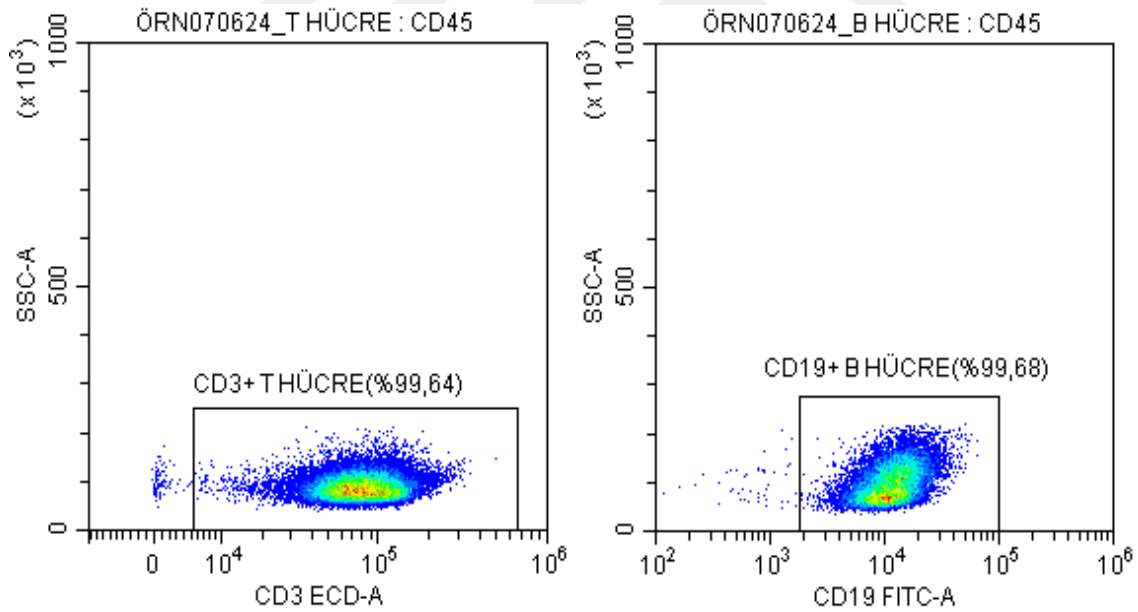
Resim 3.9. ÖRN160524’ e ait T hücre ve B hücre saflık oranı akım sitometri görüntüsü

- ÖRN010324’ün T hücre saflık oranı %99,24 olarak ve B hücre saflık oranı %99,80 olarak saptandı (Resim 3.10.).



Resim 3.10. ÖRN010324' e ait T hücre ve B hücre saflık oranı akım sitometri görüntüsü

- ÖRN070624'ün T hücre saflık oranı %99,64 olarak ve B hücre saflık oranı %99,68 olarak saptandı (Resim 3.11.).



Resim 3.11. ÖRN070624' e ait T hücre ve B hücre saflık oranı akım sitometri görüntüsü

3.7. Akım Sitometri Yöntemi ile 0. Saat İmmünofenotipleme Çalışması

İzole edilen T hücre ve B hücre 1:1 oranında ko-kültüre edildi ve immünofenotipleme çalışması yapıldı. Böylece hücre kültürü öncesi in-vitro ortamda ko-kültüre edilen T hücre ve B hücrenin hücre yüzey ekspresyonları belirlenmiş oldu.

3.7.1. Hücre yüzey çalışması

- 5 ml'lik akım sitometri tüpleri Tablo 3.1.'e göre isimlendirildi.
- HLA-G monoklonal antikoru PBS kullanılarak 1/50 oranında dilüe edildi. Tablo 3.2.'de kullanılan monoklonal antikorlar, marka ve katalog numaraları açıklandı.
- Tablo 3.1.'e göre tüplerin içerisine 50 µl ko-kültür edilen hücre ve monoklonal antikorlar eklendi.
- Tüpler hafifçe vortekslendi, oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
- Süre sonunda tüplere 2 ml %1 FBS içeren PBS eklendi ve 2300 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant pipet yardımıyla ayrıldı ve pellet üzerine 500 µl %1 FBS içeren PBS eklendi.
- Tüpler hafifçe vortekslenip ve akım sitometri cihazında (DxFlex) okutuldu.
- Okutma sonrasında CytExpert software programında hücre yüzey ekspresyonlarının analizi yapıldı.

Tablo 3.1. İmmünofenotipleme için çalışma tablosu

Hücre Yüzey Çalışma Tablosu					
Tüpler	FITC	PE	ECD	PC5	PC7
Tüp 1	CD4 (5µL)	HLA-G (10µL)	CD3 (3µL)	CD185 (5µL)	CD279 (5µL)
Tüp 2	CD4 (5µL)	HLA-G (10µL)	CD3 (3µL)	CD185 (5µL)	CD278 (1µL)
Tüp 3	CD4 (5µL)	CD85J (5µL)	–	CD45 (2µL)	–
Tüp 4	CD19 (5µL)	CD85J (5µL)	–	CD45 (2µL)	–
Tüp 5	CD19 (5µL)	HLA-G (10µL)	–	CD45 (2µL)	HLA-DR (3µL)
Tüp 6	CD19 (5µL)	CD40 (5µL)	–	CD45 (2µL)	HLA-DR (3µL)
Tüp 7	CD19 (5µL)	IGM (5µL)	–	CD45 (2µL)	–

Tablo 3.2. Kullanılan monoklonal antikörler

Monoklonal Antikörün Adı	Monoklonal Antikörün Görevi	Monoklonal Antikörün Markası ve Katalog Numarası
CD3	T hücre için yüzey belirteci	Beckman Coulter, Kat. No: A07748
CD4	T yardımcı hücre için yüzey belirteci	Beckman Coulter, Kat. No: A07750
CD19	B hücre için hücre yüzey belirteci	Beckman Coulter, Kat. No: A07768
CD40	Antijen sunan hücreler için ko-stimülatör	Beckman Coulter, Kat. No: IM1936U
CD45	Lenfosit hücre yüzey belirteci	Beckman Coulter, Kat. No: A07785
CD85J	ILT2 için yüzey belirteci	Beckman Coulter, Kat. No: A07408
CD185	CXCR5 için yüzey belirteci	Invitrogen, Kat. No: 15-9185-42
CD278	ICOS için yüzey belirteci	Invitrogen, Kat. No: 25-9948-42
CD279	PD-1 için yüzey belirteci	Beckman Coulter, Kat. No: A78885
HLA-G	Klasik olmayan sınıf I HLA-G için yüzey belirteci	Invitrogen, Kat. No: 12-9957-42
HLA-DR	Sınıf II HLA-DR için yüzey belirteci	Beckman Coulter, Kat. No: B49180
IGM	İmmünglobulin M için yüzey belirteci	Beckman Coulter, Kat. No: B30657

3.8. B Hücrelere BFA Muamelesi ile Golgi Stresi Oluşturma

Golgi stresi oluşturulacak B hücrelere hücre kültürü yöntemi kullanılarak Brefeldin A (BFA) muamelesi uygulandı. Golgi stresi akım sitometri yöntemi ile B hücre yüzeyinde HLA-DR ekspresyonunun oranı belirlendi.

3.8.1. Hücre kültürü yöntemi ile B hücrelere BFA muamelesi

50 ml FBS ve 10 ml penisilin/streptomisin (Gibco, Kat. No: 15070-063) 500 ml RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Gibco, Kat. No: 21875-034) içerisine eklenerek kullanılacak besiyeri hazırlandı. Bütün hücre kültürü aşamalarında hazırlanan bu besiyeri kullanıldı.

- Hazırlanan besiyeri 37 °C olan su banyosunda 30 dakika inkübe edildi.
- 1 adet 7 ml'lik flask isimlendirildi.
- Flask içerisine besiyeri, B hücre ve 35.7 µM BFA (Thermo Fisher Scientific, Kat. No: B7450) pipetaj yapılarak eklendi.
 - ÖRN160524 için 5 ml besiyeri, 14.715x10⁶ B hücre ve 35.7 µM BFA pipetaj yapılarak eklendi.
 - ÖRN010324 için 3 ml besiyeri, 2.24x10⁶ B hücre ve 35.7 µM BFA pipetaj yapılarak eklendi.
 - ÖRN070624 için 3 ml besiyeri, 9.14x10⁶ B hücre ve 35.7 µM BFA pipetaj yapılarak eklendi.
- 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 3 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında golgi stresi akım sitometri yöntemi ile B hücre yüzeyinde HLA-DR ekspresyonunun oranı belirlenerek tespit edildi.

3.8.2. İmmünohistokimya yöntemi ile anti-GM130 boyaması ve immünfloresan mikroskopta görüntülenmesi

BFA muamelesinden sonra B hücreler sitosantrifüj kullanılarak ile lam üzerine yapıştırıldı. %4 formaldehit ile lam üzerine yapıştırılan hücreler fikse edildi. İmmünohistokimya yöntemi kullanılarak anti-GM130 ile boyandı ve immünfloresan mikroskopta görüntülenerek golgi stresi tespit edildi.

BFA (+) B hücreleri lam üzerine yapıştırma:

- BFA muamele edilen B hücreleri lam üzerine yapıştırmak için Cytospin cihazı kullanıldı.
- Kaset bölümüne isimlendirilmiş lam yerleştirildi.
- Kolon kısmına ise 100 µL BFA (+) B hücre eklendi.
- 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süre sonunda kaset bölümünden alınan lamda hücrelerin yapıştırıldığı alan asetatlı kalem ile çerçeve içerisine alındı.

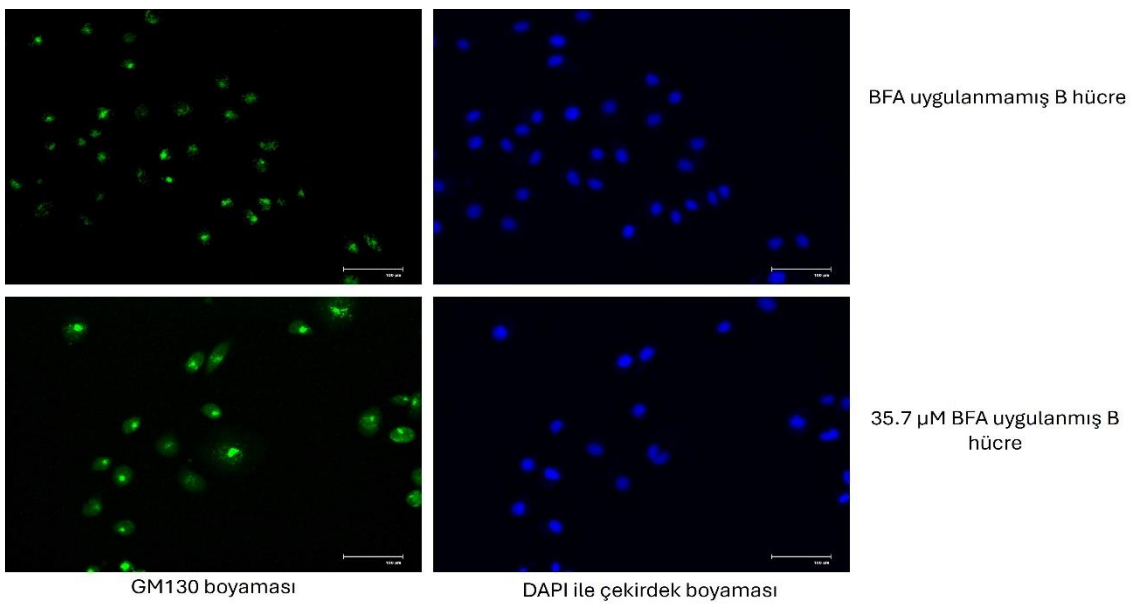
%4 formaldehit kullanılarak lam üzerindeki hücrelerin fiksasyonu:

- Üzerine hücre yapıştırılmış olan lam içerisinde %4 formaldehit olan şale içerisine alındı.

- Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
- Süre sonunda yıkama için lam içerisinde soğuk PBS olan şale içerisinde alındı.
- Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- Yıkama işlemi 3 defa tekrarlandı.

Anti-GM130 boyaması:

- Fikse edilen lam petri içine alındı.
- Permeabilizasyon için lam üzerine %0.05 Tritonx100 eklendi.
- Karıştırıcıda 15 dakika inkübe edildi.
- Süre sonunda Tritonx100 pipetle toplandı.
- Lam 1ml soğuk PBS ile yıkandı. Petri karıştırıcıda iken PBS pastör pipet ile toplandı.
- Petri içerisine 3 ml %0.1 Bovine Serum Albumin (BSA) eklendi.
- 30 dakika karıştırıcıda inkübe edildi.
- 1/200 oranında dilüe edilen GM130 Alexa 488 primer antikoru eklendi.
- Petrinin üzeri alimünyum folyo ile kapatıldı ve karıştırıcıda oda sıcaklığında 4 saat inkübe edildi.
- Süre sonunda primer antikor pipet yardımıyla petriden toplandı.
- 2 ml PBS ile yıkama yapıldı. Yıkama işlemi 2 defa tekrarlandı.
- Prolong Antifade medyum eklendi. Çekirdekler DAPI ile boyandı.
- İmmünfloresan mikroskopta görüntülendi.



Resim 3.12. BFA muamelesi öncesi ve sonrası B hücre immünfloresan mikroskop görüntüsü

3.8.3. Akım sitometri yöntemi ile B hücre yüzeyinde HLA-DR ekspresyonunun oranı belirlenmesi

B hücrelere BFA muamelesi uygulamadan önce akım sitometri yöntemi ile B hücrenin HLA-DR ekspresyon oranı belirlendi. B hücreleri BFA ile 3 saat boyunca inkübe edildikten sonra yine akım sitometri yöntemi ile B hücrenin HLA-DR ekspresyon oranı belirlendi. Böylece golgi stresinin oluşup oluşmadığı gözlenmiş oldu.

BFA muamelesi öncesi akım sitometri çalışması:

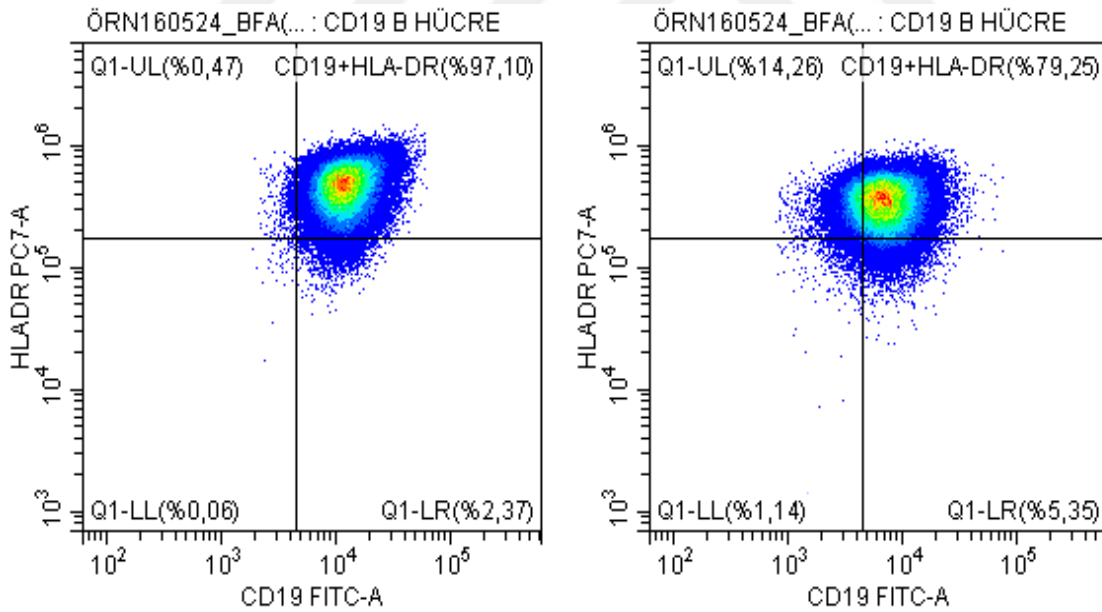
- 1 adet akım sitometri tüpü isimlendirildi.
- 50 µl B hücre, 5µl CD45, 5µl CD19 ve 5µl HLA-DR monoklonal antikorları eklendi.
- Hafifçe vortekslendi ve oda sıcaklığında, karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
- Süre sonunda tüplere 2 ml %1 FBS içeren PBS eklendi ve 2300 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 500 µl %1 FBS içeren PBS eklendi.
- Tüpler hafifçe vortekslendi ve akımsitometri cihazında (DxFlex) okutuldu.
- Okutma sonrasında CytExpert software programında CD19⁺ B hücre yüzeyindeki HLA-DR ekspresyonunun oranı belirlendi.
 - ÖRN160524 için HLA-DR ekspresyon oranı %97.10 olarak saptandı (Resim 3.12.).
 - ÖRN010324 için HLA-DR ekspresyon oranı %97.51 olarak saptandı (Resim 3.13.).
 - ÖRN070624 için HLA-DR ekspresyon oranı %93 olarak saptandı (Resim 3.14.).

BFA muamelesi sonrası akım sitometri çalışması:

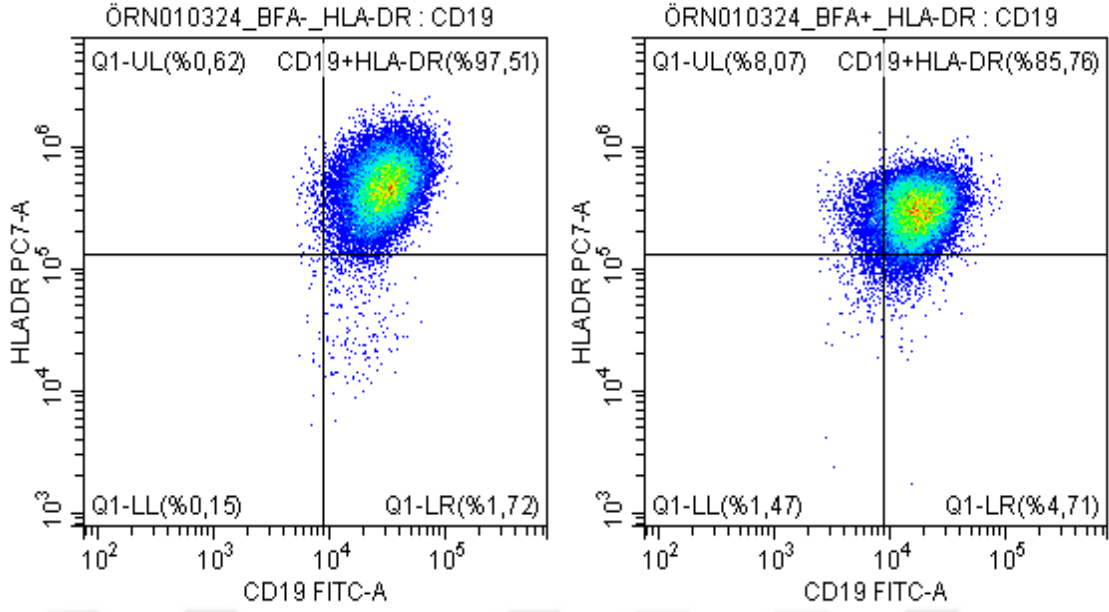
- 3. saatin sonunda flask etüvden alındı ve isimlendirilen 15 ml’lik falkona toplandı.
- Cell-dyn cihazında B hücre sayısı belirlendi.
 - ÖRN160524 için B hücre sayısı 575×10^3 hücre / ml olarak saptandı.
 - ÖRN010324 için B hücre sayısı 45×10^3 hücre / ml olarak saptandı.
 - ÖRN070624 için B hücre sayısı 1.76×10^6 hücre / ml olarak saptandı.
- Acredin orange-propidium iodide kullanılarak invert floresan mikroskopta hücrelerin canlılık oranı saptandı.
 - ÖRN160524 için BFA (+) B hücrenin canlılık oranı %95 olarak saptandı.
 - ÖRN010324 için BFA (+) B hücrenin canlılık oranı %90 olarak saptandı.

- ÖRN070624 için BFA (+) B hücrenin canlılık oranı %95 olarak saptandı.

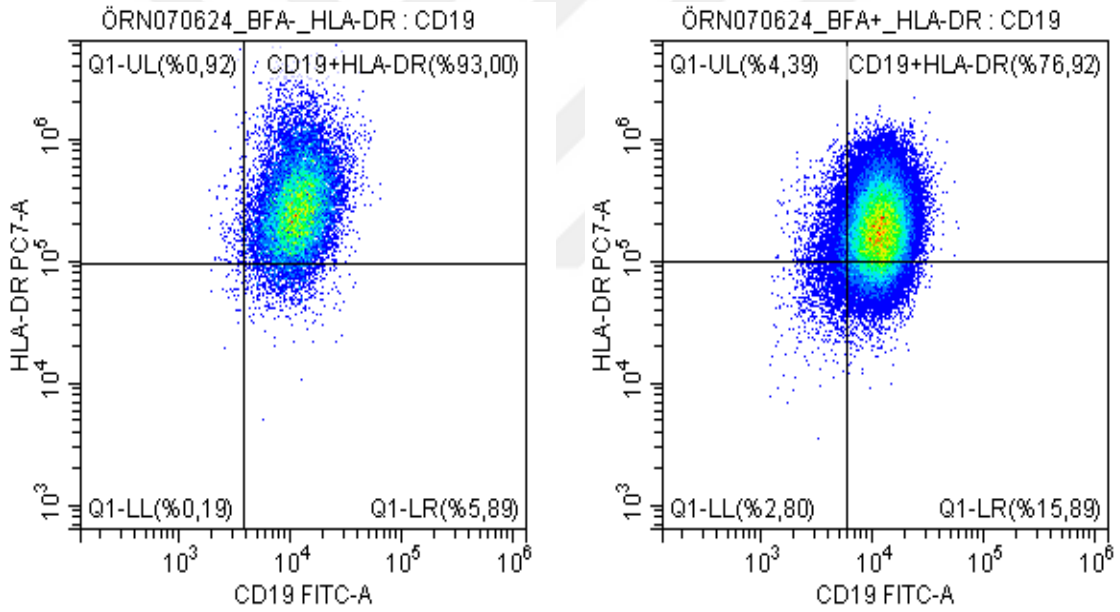
- 1 adet akım sitometri tüpü isimlendirildi.
- İsimlendirilen tüplere 50 µl B hücre, 5µl CD45, 5µl CD19 ve 5µl HL-DR monoklonal antikorları eklendi.
- Hafifçe vortekslendi ve oda sıcaklığında, karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
- Süre sonunda tüplere 2 ml %1 FBS içeren PBS eklendi ve 2300 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant pipet yardımıyla ayrıldı.
- Tüpün dibine çöken pellet üzerine 500 µl PBS eklendi.
- Tüpler hafifçe vortekslendi ve akım sitometri cihazında (DxFlex) okutuldu.
- Okutma sonrasında CytExpert software programında CD19⁺ B hücre yüzeyindeki HLA-DR ekspresyonun oranı belirlendi.
- ÖRN160524 için HLA-DR ekspresyon oranı %79.25 olarak saptandı (Resim 3.12.).
- ÖRN010324 için HLA-DR ekspresyon oranı %85.76 olarak saptandı (Resim 3.13.).
- ÖRN070624 için HLA-DR ekspresyon oranı %76.92 olarak saptandı (Resim 3.14.).



Resim 3.13. ÖRN160524' e ait BFA muamelesi öncesi ve sonrası CD19+HLA-DR ekspresyon oranları



Resim 3.14. ÖRN010324' e ait BFA muamelesi öncesi ve sonrası CD19+HLA-DR ekspresyon oranları



Resim 3.15. ÖRN070624' e ait BFA muamelesi öncesi ve sonrası CD19+HLA-DR ekspresyon oranları

3.8.4. B hücrelerinin BFA (+) besiyerinden uzaklaştırılması

- BFA(+) B hücreler 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 5 ml RPMI ile yeniden süspanse edildi.
- Cell-dyn cihazında B hücre sayısı belirlendi.
 - ÖRN160524 için B hücre sayısı 1.73×10^6 hücre / ml olarak saptandı.
 - ÖRN010324 için için B hücre sayısı 184×10^3 hücre / ml olarak saptandı.

- ÖRN070624 için için B hücre sayısı 2.67×10^6 hücre / ml olarak saptandı.

3.9. Hücre Kültürü Yöntemi

B hücrelerde BFA muamelesi ile golgi stresinin tespitinden sonra B hücreler BFA (+) besiyerinden uzaklaştırıldı. Hücre kültürü yöntemi ile Tablo 3.3.'e göre 1:1 oranında T hücre ve B hücre ko-kültürü oluşturuldu. 6., 12. ve 24. saat inkübasyonu için CO₂'li inkübatöre kondu. ÖRN160524 isimli örnekle ile yapılan çalışmada doza bağlı streoid (20 µg/µL ve 40 µg/µL) muamelesi uygulandı. Çalışma sonrasında software programında yapılan analizlerde 20 µg/µL ve 40 µg/µL steroid muamelesi arasında tekrarlanan çalışmalar sonucu belirgin bir fark saptanmamıştır. Bu nedenle ÖRN010324 ve ÖRN070624 isimli örneklerle yapılan çalışmada 20 µg/µL steroid dozu ile devam edildi.

Tablo 3.3. T hücre ve B hücre ko-kültürü

SAAT	BFA (-) B HÜCRE – T HÜCRE KO-KÜLTÜRÜ			BFA (+) B HÜCRE – T HÜCRE KO-KÜLTÜRÜ		
6.SAAT	BFA (-) B HÜCRE + T HÜCRE	BFA (-) B HÜCRE + T HÜCRE + 20 µg/µL STEROİD	BFA (-) B HÜCRE + T HÜCRE + 40 µg/µL STEROİD	BFA (+) B HÜCRE + T HÜCRE	BFA (+) B HÜCRE + T HÜCRE + 20 µg/µL STEROİD	BFA (+) B HÜCRE + T HÜCRE + 40 µg/µL STEROİD
12.SAAT	BFA (-) B HÜCRE + T HÜCRE	BFA (-) B HÜCRE + T HÜCRE + 20 µg/µL STEROİD	BFA (-) B HÜCRE + T HÜCRE + 40 µg/µL STEROİD	BFA (+) B HÜCRE + T HÜCRE	BFA (+) B HÜCRE + T HÜCRE + 20 µg/µL STEROİD	BFA (+) B HÜCRE + T HÜCRE + 40 µg/µL STEROİD
24.SAAT	BFA (-) B HÜCRE + T HÜCRE	BFA (-) B HÜCRE + T HÜCRE + 20 µg/µL STEROİD	BFA (-) B HÜCRE + T HÜCRE + 40 µg/µL STEROİD	BFA (+) B HÜCRE + T HÜCRE	BFA (+) B HÜCRE + T HÜCRE + 20 µg/µL STEROİD	BFA (+) B HÜCRE + T HÜCRE + 40 µg/µL STEROİD

3.9.1. Hücre kültüründe T ve B hücreler ile ko-kültür oluşturma

Hücre kültüründe BFA muamelesi yapılmış B hücre ile T hücre 1:1 oranında olacak şekilde ve BFA muamele edilmemiş B hücre ile T hücre 1:1 oranında olacak şekilde ko-kültür edildi. Yapılan ko-kültürlere miktara bağlı olarak steroid muamelesi uygulandı. Zamana bağlı olarak akım sitometri yöntemi ile hücrelerin yüzey ekspresyonları belirlendi.

- Besiyeri 37 °C olan su banyosunda 30 dakika inkübe edildi.
- Tablo 3.3.'e göre 7 ml'lik flasklar isimlendirildi.
- Her saat çalışması için flasklara aşağıdaki miktarlarda ve Tablo 3.3.'e göre besiyeri, T hücre, B hücre, BFA (+) B hücre ve steroid eklendi.
 - ÖRN160524 için hazırlanan flasklar:
 - 1.Flask (kontrol flaskı): 8 ml besiyeri + 3×10^6 BFA(-) B hücre + 3×10^6 T hücre
 - 2. Flask: 8 ml besiyeri + 3×10^6 BFA(-) B hücre + 3×10^6 T hücre + 20 µg/µL steroid
 - 3. Flask: 8 ml besiyeri + 3×10^6 BFA(-) B hücre + 3×10^6 T hücre + 40 µg/µL steroid
 - 4. Flask (kontrol flaskı): 8 ml besiyeri + 9.34×10^5 BFA(+) B hücre + 9.34×10^5 T hücre
 - 5. Flask: 8 ml besiyeri + 9.34×10^5 BFA(+) B hücre + 9.34×10^5 T hücre + 20 µg/µL steroid
 - 6. Flask: 8 ml besiyeri + 9.34×10^5 BFA(+) B hücre + 9.34×10^5 T hücre + 40 µg/µL steroid
 - ÖRN010324 için hazırlanan flasklar:
 - 1.Flask (kontrol flaskı): 5 ml besiyeri + 6.5×10^5 BFA(-) B hücre + 6.5×10^5 T hücre
 - 2. Flask: 5 ml besiyeri + 6.5×10^5 BFA(-) B hücre + 6.5×10^5 T hücre + 20 µg/µL steroid
 - 3. Flask (kontrol flaskı): 5 ml besiyeri + 1.25×10^5 BFA(+) B hücre + 1.25×10^5 T hücre
 - 4. Flask: 5 ml besiyeri + 1.25×10^5 BFA(+) B hücre + 1.25×10^5 T hücre + 40 µg/µL steroid
 - ÖRN070624 için hazırlanan flasklar:
 - 1.Flask (kontrol flaskı): 5 ml besiyeri + 1.2×10^6 BFA(-) B hücre + 1.2×10^6 T hücre
 - 2. Flask: 5 ml besiyeri + 1.2×10^6 BFA(-) B hücre + 1.2×10^6 T hücre + 20 µg/µL steroid
 - 3. Flask (kontrol flaskı): 5 ml besiyeri + 1×10^6 BFA(+) B hücre + 1×10^6 T hücre
 - 4. Flask: 5 ml besiyeri + 1×10^6 BFA(+) B hücre + 1×10^6 T hücre + 20 µg/µL steroid
- 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde zamana bağlı olarak inkübe edildi.

3.10. Akım Sitometri Yöntemi ile İmmünfenotipleme Çalışması

3.10.1. 6. saat akım sitometri çalışması

- 6. saatin sonunda flasklar inkübatörden alındı ve isimlendirilen 15 ml'lik falkonlara toplandı.
- Cell-dyn cihazında okutularak her bir flastaki hücre sayısı belirlendi.
- Acredin orange-propidium iodide kullanılarak invert floresan mikroskopta hücrelerin canlılık oranı saptandı.
- Falkonlar 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant pipet yardımıyla ayrıldı.
- Tüpün dibine çöken pellet üzerine 650 µl PBS eklendi ve hafifçe vortekslendi.
- Akım sitometri yöntemi ile 6. saat immünfenotipleme çalışması yapıldı.

Hücre yüzey çalışması:

- 5 ml'lik akım sitometri tüpleri Tablo 3.1.'e göre isimlendirildi.
- Hücre yüzey çalışması protokolü uygulandı.
- Akım sitometri cihazında (DxFlex) okutularak CytExpert software programında analizi yapıldı.

3.10.2. 12. saat akım sitometri çalışması

- 12. saatin sonunda flasklar etüvden alındı ve isimlendirilen 15 ml'lik falkonlara toplandı.
- Cell-dyn cihazında okutularak her bir flastaki hücre sayısı belirlendi.
- Acredin orange-propidium iodide kullanılarak invert mikroskopta hücrelerin canlılık oranı saptandı.
- Falkonlar 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant pipet yardımıyla ayrıldı.
- Tüpün dibine çöken pellet üzerine 650 µl PBS eklendi ve hafifçe vortekslendi.
- Akım sitometri yöntemi ile 12. saat immünfenotipleme çalışması yapıldı.

Hücre yüzey çalışması:

- 5 ml'lik akım sitometri tüpleri Tablo 3.1.'e göre isimlendirildi.

- Hücre yüzey çalışması protokolü uygulandı.
- Akım sitometri cihazında (DxFlex) okutularak CytExpert software programında analizi yapıldı.

3.10.3. 24. saat akım sitometri çalışması

- 24. saatin sonunda flasklar etüvden alındı ve isimlendirilen 15 ml’lik falkonlara toplandı.
- Cell-dyn cihazında okutularak her bir flastaki hücre sayısı belirlendi.
- Acredin orange-propidium iodide kullanılarak invert floresan mikroskopta hücrelerin canlılık oranı saptandı.
- Falkonlar 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant pipet yardımıyla ayrıldı.
- Tüpün dibine çöken pellet üzerine 650 µl PBS eklendi ve hafifçe vortekslendi.
- Akım sitometri yöntemi ile 24. saat immünfenotipleme çalışması yapıldı.

Hücre yüzey çalışması:

- 5 ml’lik akım sitometri tüpleri Tablo 3.1.’e göre isimlendirildi.
- Hücre yüzey çalışması protokolü uygulandı.
- Akım sitometri cihazında (DxFlex) okutularak CytExpert software programında analizi yapıldı.

3.11. ÖRN010324’e ait Lenfositlerin Dondurulması

İzole edilen lenfositler stok olarak saklanmak için donduruldu. Dondurma işlemi için RPMI, Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Invitrogen, Kat. No: D12345) ve FBS kullanıldı.

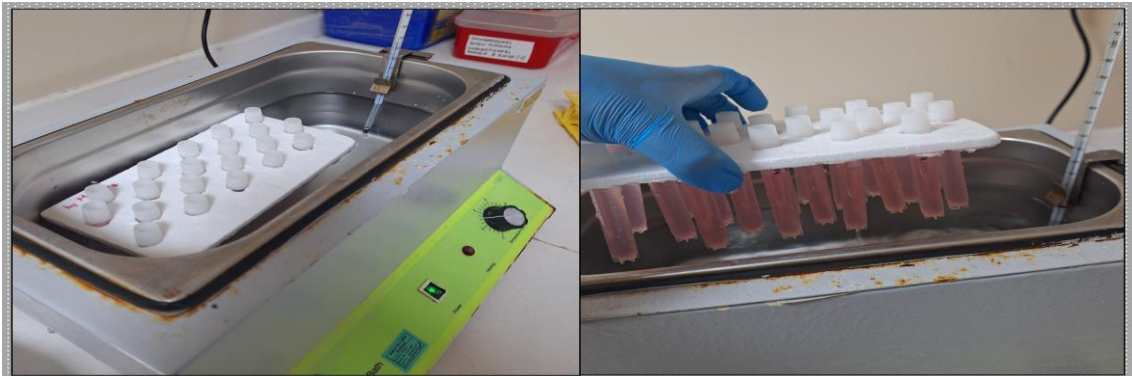
- 1 adet 50 ml’lik falkon tüp isimlendirildi.
- Falkon tüpe toplanan lenfositler 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi.
- Tüpün alt kısmına çöken hücrelere temas etmeden pipet yardımıyla süpernatant ayrıldı.
- Hücrelerin üzerine RPMI eklenip pipetaj yapılarak hücreler yeniden süspanse edildi.
- Hücrelerin üzerine %10 DMSO ve %20 FBS eklendi.
- İsimlendirilen cryovial tüplere 2 ml pasajlandı ve hızlı bir şekilde (-)80 °C dondurucuya konuldu.



Resim 3.16. ÖRN010324 isimli lenfosit örneklerinin dondurulma aşamaları

3.12. ÖRN010324'e ait Donmuş Lenfositlerin Çözdürülmesi

- RPMI 37 °C olan su banyosunda 30 dakika inkübe edildi.
- 15 ml'lik falkonlar isimlendirilerek içerisine 5 ml RPMI eklendi.
- Dondurulmuş hücreler (-)80 °C dondurucudan çıkarılarak 37 °C olan su banyosunda yaklaşık 1 dakika bekletilerek çözdürüldü.
- 2 ml çözdürülmüş hücre, içerisinde RPMI olan falkonlara pipetlendi.
- Falkonlar 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırılarak falkonlara 1 ml PBS eklendi ve dibe çöken hücreler PBS ile yeniden süspanse edildi.
- Cell-dyn cihazında okutularak lenfosit sayısı 1.3×10^6 hücre / ml olarak saptandı. Acredin orange-propidium iodide kullanılarak invert floresan mikroskopta hücrelerin canlılık oranı saptandı.



Resim 3.17. ÖRN010324 isimli lenfosit örneklerinin çözündürme aşamaları

3.13. İstatiksel Analiz

İstatistiksel analizler Statistical Package of Social Science (SPSS) sürüm 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Tanımlayıcı analizler sunulurken ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerleri kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen ikiden fazla bağımlı ölçüm değişkenleri değerlendirilirken Friedman Testi kullanıldı. Ölçümler arasındaki farklılıklar Durbin-Conover Testi ile belirlendi. p-değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi.

3.14. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Tablo 3.4.'de verilmiştir.

Tablo 3.4. Cihaz listesi

No	Cihazın Adı	Cihazın Markası / Modeli / Seri Numarası
1	Akım Sitometri Cihazı	Beckman Coulter / Dxflex / BE48171
2	Biyogüvenlik Kabini	Thermo Scientific / HeraSafe KS
3	CO ₂ İnkübatörü	New Brunswick / Galaxy 170S / CO17EN001994
4	Dijital Mikroskop (Fluorescence Imaging Station)	Life Technologies / EN61326 / H1115-FLD2-073
5	Hücre Sayım Cihazı	Abbott / Cell-Dyn / 70751BG
6	Invert Floresan Mikroskop	Olympus / U-LH100HG / 9L08280
7	Mikroskop	Leica / DMI1 / 392085
8	Mini Santrifüj / Vorteks	Biosan / FVL2400N / 010202-1203-0155
9	Santrifüj	Nüve / NF800 / 03-2180
10	Santrifüj	Eppendorf / 5702 / 5702EM085271
11	Su Banyosu	Bio-rad / 6 liter waterbath / -
12	Vorteks	Benchmak / BR2000 / 16010072
13	Vorteks	LMS / VTX300L / VTX09010106
14	(+4) Soğutucu	Beko / BK9610 NFY / 14-100883-04
15	(-20) Dondurucu	Beko / D7215SMF / 09-103434-11
16	(-80) Dondurucu	Wisecryo / MUF-400 / 40892600995001

4. BULGULAR

ÖRN160524, ÖRN010324 ve ÖRN070624 isimli donörlerin dalak örneklerinden T hücre ve B hücre izolasyonu yapıldı. B hücrelere golgi stresi oluşturmak için BFA muamelesi uygulandı. Hücre kültürü yöntemi ile T hücre ve B hücre ko-kültürü yapılarak steroid muamelesi uygulandı. B hücrelere uygulanan BFA ve steroid muamelesinin etkisini belirlemek için akım sitometri yöntemi ile 6., 12. ve 24. saat immünofenotipleme çalışması yapıldı.

ÖRN160524 isimli örnekle ile yapılan çalışmada doza bağlı steroid (20 µg/µL ve 40 µg/µL) muamelesi uygulandı. Çalışma sonrasında software programında yapılan analizlerde 20 µg/µL ve 40 µg/µL steroid muamelesi arasında tekrarlanan çalışmalar sonucu belirgin bir fark saptanmadı. Bu nedenle ÖRN010324 ve ÖRN070624 isimli örneklerle yapılan çalışmada 20 µg/µL steroid dozu ile devam edildi.

Örneklerin 24. saat hücre yüzey moleküllerinin akım sitometri analizleri yapıldığında 24. saat hücre yüzey moleküllerinin ekspresyon oranlarının tekrar 0. saat hücre yüzey moleküllerinin ekspresyon oranlarına dönüştüğü saptandı. Yapılan istatistiksel analizler 0. saat, 6. saat ve 12. saat sonuçlarını göstermektedir.

4.1. BFA ve Steroid Muamelesinin Foliküler T Hücre Yüzeyinde İfade Edilen Moleküllere Etkisi

Çalışmada T hücreleri belirlemek için T hücreler için ortak yüzey belirteci olan CD3 yüzey molekülüne spesifik anti-CD3 monoklonal antikoru kullanıldı. T hücre yüzeyinde ifade edilen CD4 yüzey molekülü için spesifik olan anti-CD4 monoklonal antikoru kullanılarak CD4⁺ T yardımcı hücreler belirlendi. CD4⁺ T yardımcı hücrenin alt popülasyonu olan T_{fh} hücreleri belirlemek için T_{fh} yüzeyinde eksprese olan CXCR5 yüzey molekülüne spesifik olan anti-CD185 monoklonal antikoru, ICOS yüzey molekülüne spesifik olan anti-CD278 monoklonal antikoru ve PD-1 yüzey molekülüne spesifik olan anti-CD279 monoklonal antikoru kullanıldı.

4.1.1. Foliküler CD4+ T yardımcı hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonu

Foliküler B hücrelerde oluşturulan golgi stresinin foliküler CD4+ T yardımcı hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonuna etkisi

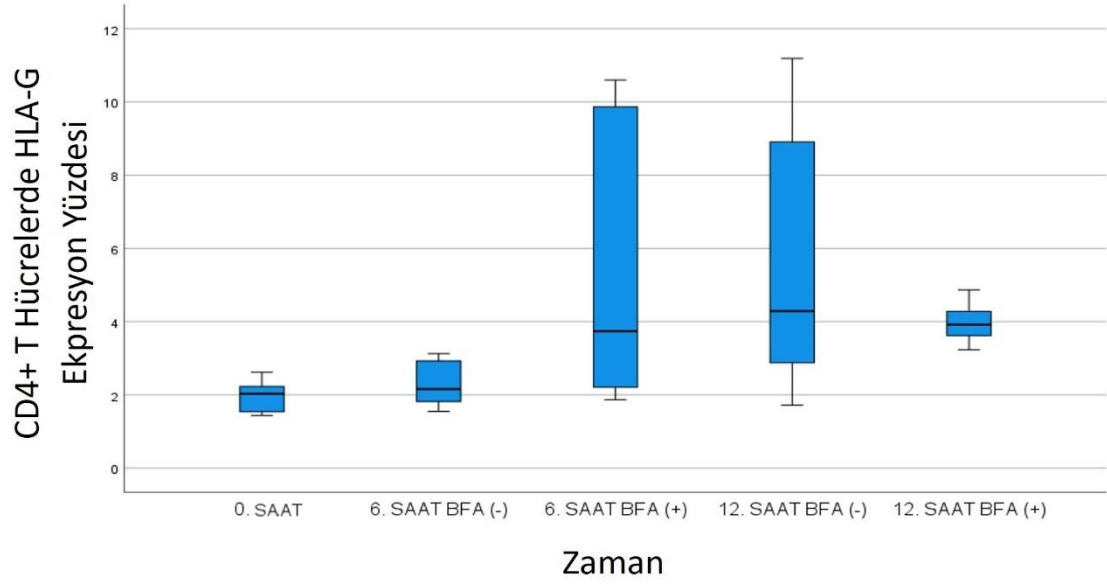
T hücre ve B hücre yüzeyinde eksprese edilen ve klasik olmayan MHC sınıf I ailesine ait olan HLA-G molekülü immün sistem toleransında önemli bir rol oynar. Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6.saat BFA (-), 6.saat BFA (+), 12. saat BFA (-) ve 12. saat BFA (+) flasklarına ait örneklerde CD4+ T hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,004$) (Tablo 4.1.). CD4+ T hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun BFA etkisinden bağımsız zamana bağlı olarak (0.saat-12.saat için $p<.001$ ve 6.saat-12.saat için $p=0.011$) arttığı saptandı. CD4+ T hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu BFA etkisine bağlı olarak 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. saatte arttığı saptandı (sırasıyla $p<.001$, $p<.001$). 6. saatte BFA (-) grup ile BFA (+) karşılaştırıldığında CD4+HLA-G yüzey ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı saptandı ($p=0.011$) (Tablo 4.2.).

Tablo 4.1. BFA muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

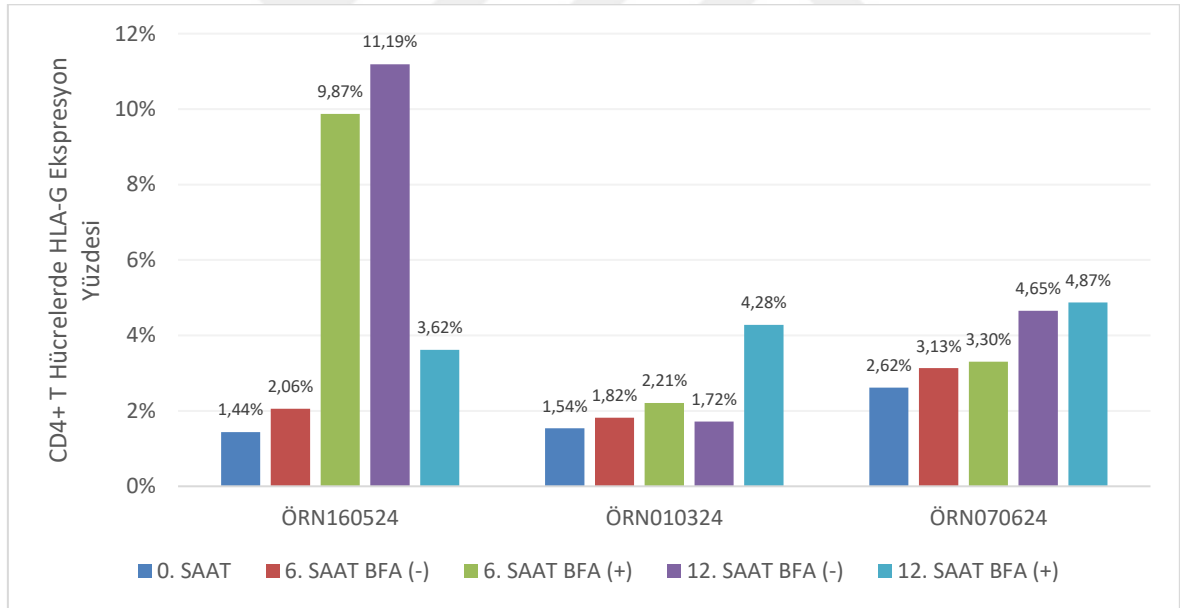
CD4+HLA-G	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0. SAAT	1,98	$\pm,44$	2,03	1,44	2,62	0,004
6. SAAT BFA (-)	2,29	$\pm,62$	2,16	1,55	3,13	
6. SAAT BFA (+)	5,34	$\pm 3,89$	3,74	1,87	10,6	
12. SAAT BFA (-)	5,55	$\pm 3,70$	4,29	1,72	11,19	
12. SAAT BFA (+)	3,97	$\pm,59$	3,92	3,23	4,87	

Tablo 4.2. BFA muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

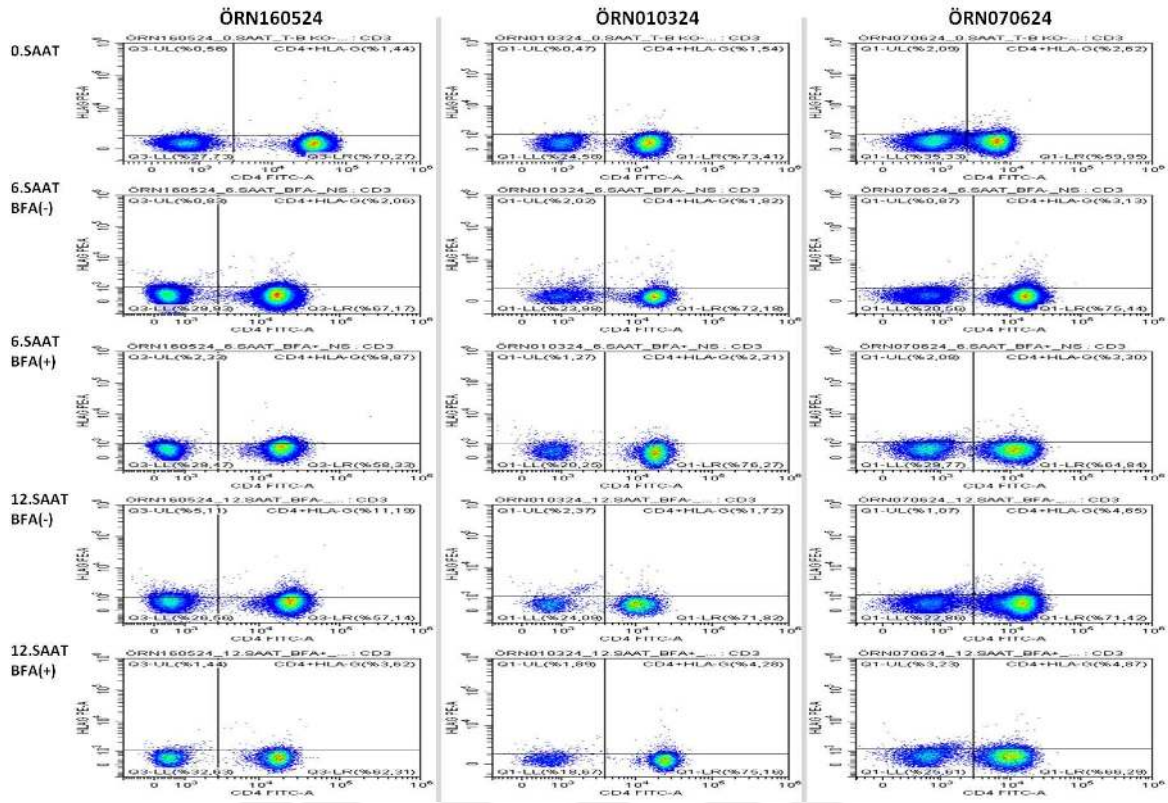
CD4+HLA-G			İstatistik	p
0. SAAT	-	6. SAAT BFA (-)	1.12	0.277
0. SAAT	-	6. SAAT BFA (+)	3.91	<.001
0. SAAT	-	12. SAAT BFA (-)	3.91	<.001
0. SAAT	-	12. SAAT BFA (+)	5.03	<.001
6. SAAT BFA (-)	-	6. SAAT BFA (+)	2.80	0.011
6. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (-)	2.80	0.011
6. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (+)	3.91	<.001
6. SAAT BFA (+)	-	12. SAAT BFA (-)	0.00	1.000
6. SAAT BFA (+)	-	12. SAAT BFA (+)	1.12	0.277
12. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (+)	1.12	0.277



Grafik 4.1. BFA muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi



Grafik 4.2. BFA muamelesinde örneklere ait CD4+HLA-G ekspresyon oranları



Resim 4.1. BFA muamelesinde örneklere ait CD4+HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

Steroid muamelesinin foliküler CD4+ T yardımcı hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonuna etkisi

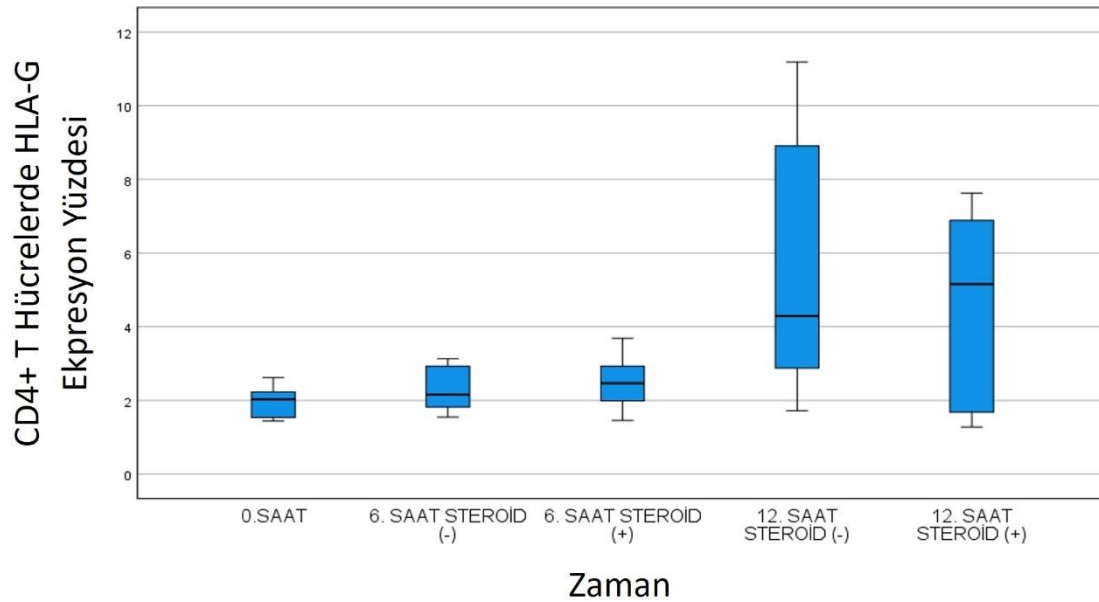
Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6.saat steroid (-), 6.saat steroid (+), 12. saat steroid (-) ve 12. saat steroid (+) flasklarına ait örneklerde CD4+ T hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,034$) (Tablo 4.3.). CD4+ T hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun steroid etkisinden bağımsız zamana bağlı olarak (0.saat-12.saat için $p=0.001$) arttığı saptandı. CD4+ T hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu steroid etkisine bağlı olarak 0. saat ile karşılaştırıldığında 12. saatte arttığı saptandı ($p=0.015$) (Tablo 4.4.).

Tablo 4.3. Steroid muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

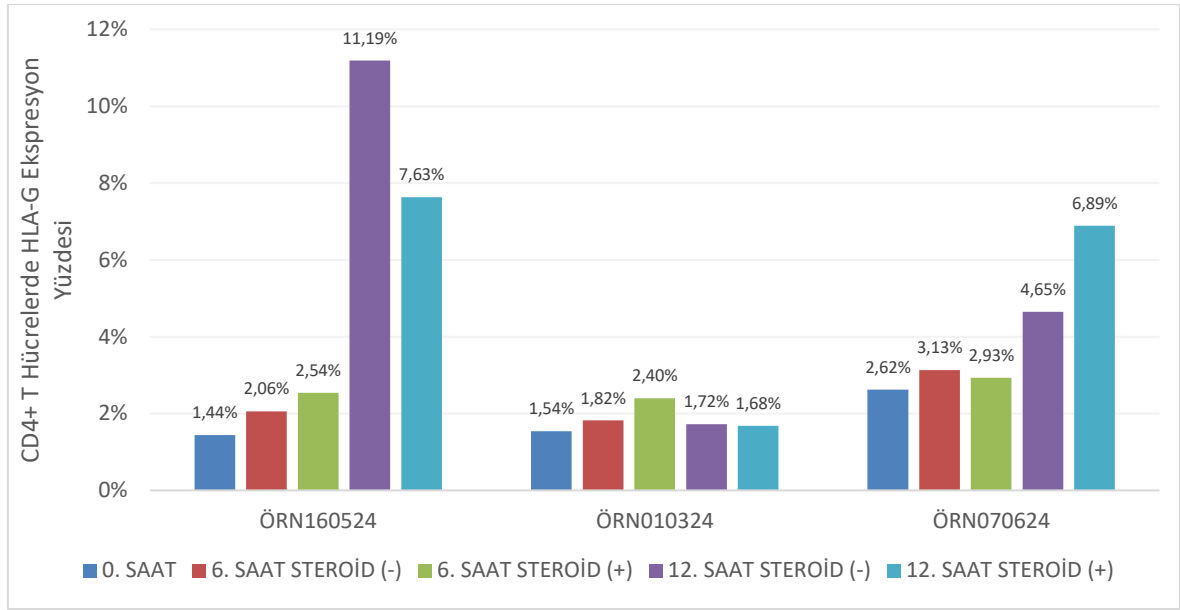
CD4+HLA-G	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0.SAAT	1,98	±,44	2,03	1,44	2,62	0,034
6. SAAT STEROİD (-)	2,29	±,62	2,16	1,55	3,13	
6. SAAT STEROİD (+)	2,5	±,77	2,47	1,46	3,69	
12. SAAT STEROİD (-)	5,55	±3,70	4,29	1,72	11,19	
12. SAAT STEROİD (+)	4,63	±2,77	5,15	1,28	7,63	

Tablo 4.4. Steroid muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

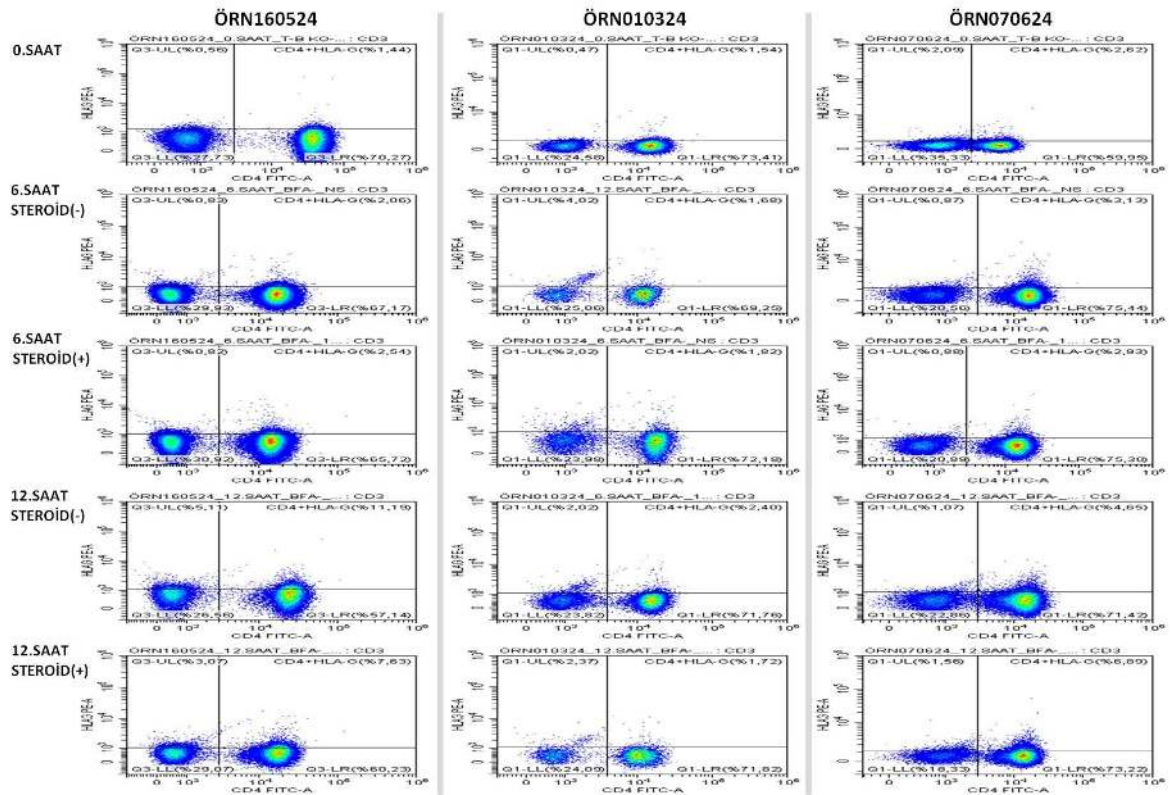
CD4+HLA-G	İstatistik	p
0. SAAT - 6. SAAT STEROİD (-)	1.771	0.092
0. SAAT - 6. SAAT STEROİD (+)	1.771	0.092
0. SAAT - 12. SAAT STEROİD (-)	3.764	0.001
0. SAAT - 12. SAAT STEROİD (+)	2.657	0.015
6. SAAT STEROİD (-) - 6. SAAT STEROİD (+)	0.000	1.000
6. SAAT STEROİD (-) - 12. SAAT STEROİD (-)	1.993	0.060
6. SAAT STEROİD (-) - 12. SAAT STEROİD (+)	0.886	0.386
6. SAAT STEROİD (+) - 12. SAAT STEROİD (-)	1.993	0.060
6. SAAT STEROİD (+) - 12. SAAT STEROİD (+)	0.886	0.386
12. SAAT STEROİD (-) - 12. SAAT STEROİD (+)	1.107	0.281



Grafik 4.3. Steroid muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi



Grafik 4.4. Steroid muamelesinde örneklere ait CD4+HLA-G ekspresyon oranları



Resim 4.2. Steroid muamelesinde örneklere ait CD4+HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

BFA ve steroid muamelesinin foliküler CD4+ T yardımcı hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonuna etkisi

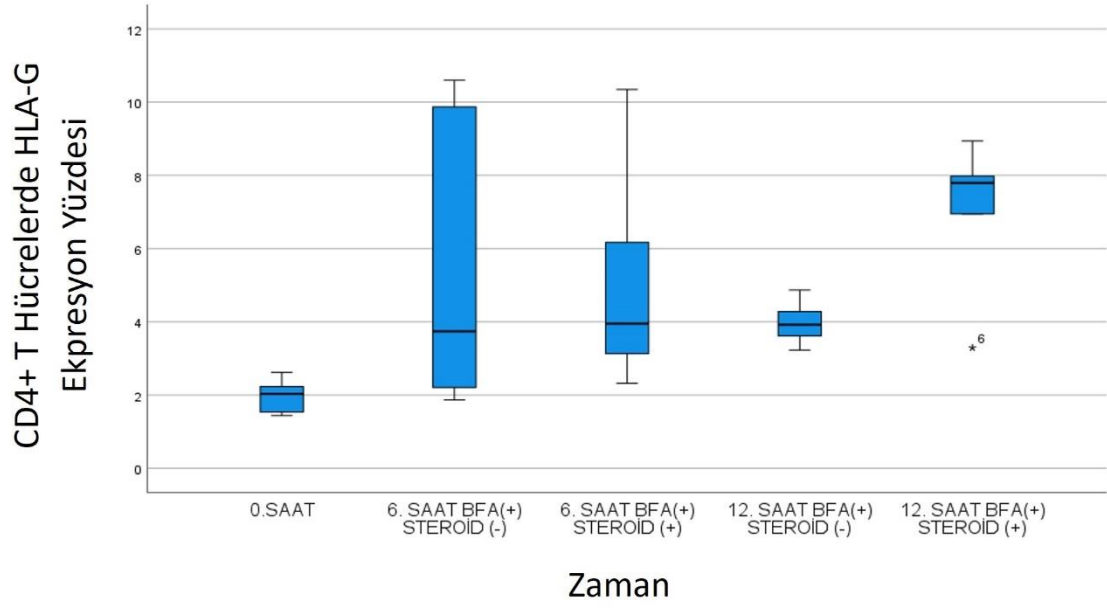
Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6.saat BFA (+) steroid (-), 6.saat BFA (+) steroid (+), 12. saat BFA (+) steroid (-) ve 12. saat BFA (+) steroid (+) flasklarına ait örneklerde CD4+ T hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,008$) (Tablo 4.5.). CD4+ T hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun BFA varlığında steroid etkisinden bağımsız olarak 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. saatte anlamlı olarak arttığı saptandı (sırasıyla $p=0.018$, $p=0.006$). Hem BFA hem de steroid varlığında CD4+ T hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. saatte anlamlı olarak arttığı saptandı (sırasıyla $p=0.003$, $p<.001$). 12. saatte BFA varlığında CD4+HLA-G yüzey ekspresyonunun steroid etkisine bağlı olarak arttığı görüldü ($p=0.053$) (Tablo 4.6.).

Tablo 4.5. BFA ve steroid muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

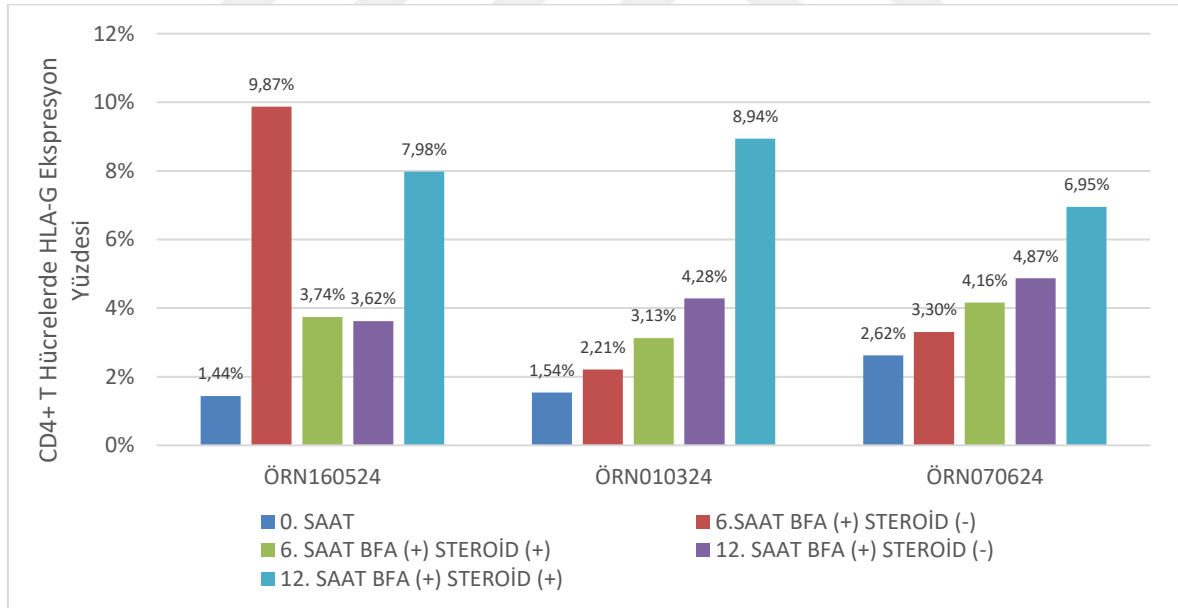
CD4+HLA-G	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0.SAAT	1,98	$\pm,44$	2,03	1,44	2,62	0,008
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	5,34	$\pm 3,89$	3,74	1,87	10,6	
6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	4,98	$\pm 2,93$	3,95	2,32	10,35	
12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	3,97	$\pm,59$	3,92	3,23	4,87	
12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	7,13	$\pm 1,98$	7,8	3,29	8,94	

Tablo 4.6. BFA ve steroid muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

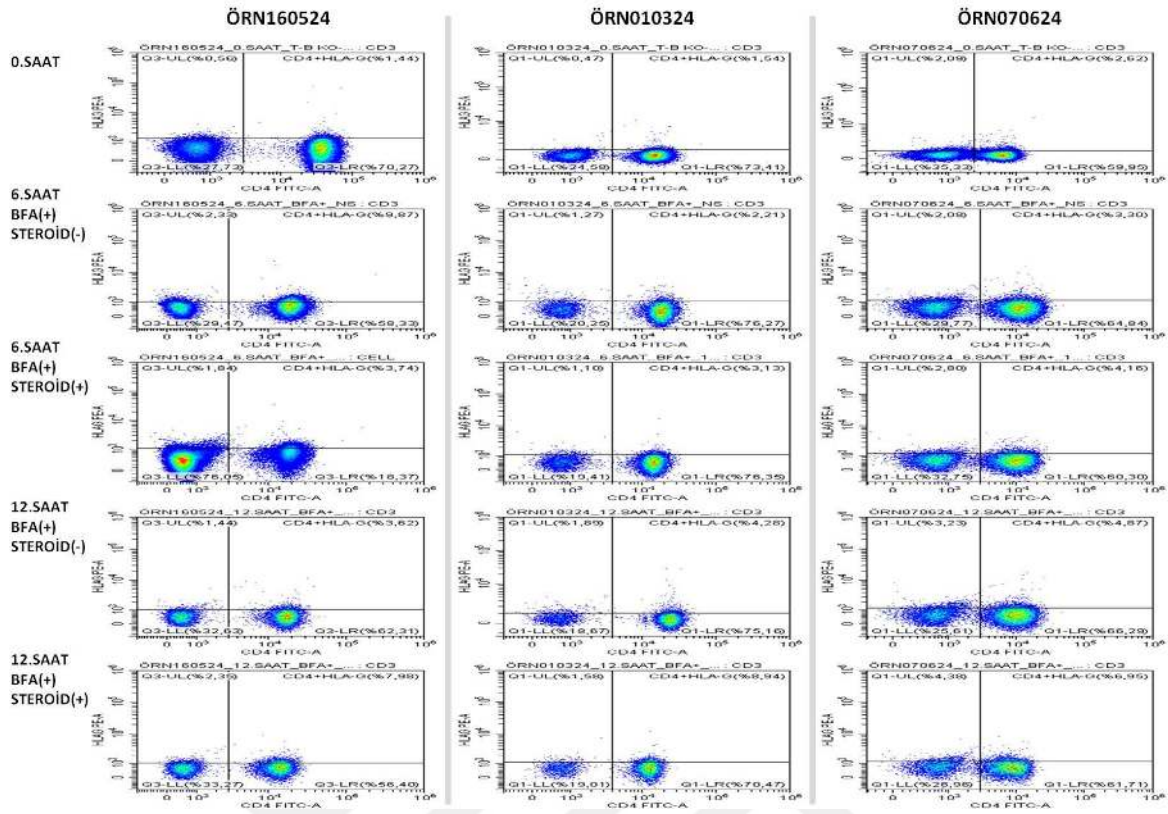
CD4+HLA-G	İstatistik	p
0. SAAT - 6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	2.565	0.018
0. SAAT - 6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	3.334	0.003
0. SAAT - 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	3.078	0.006
0. SAAT - 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	5.130	<.001
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-) - 6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	0.769	0.451
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-) - 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	0.513	0.614
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-) - 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	2.565	0.018
6. SAAT BFA (+) STEROİD (+) - 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	0.256	0.800
6. SAAT BFA (+) STEROİD (+) - 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	1.795	0.088
12. SAAT BFA (+) STEROİD (-) - 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	2.052	0.053



Grafik 4.5. BFA ve steroid muamelesinin CD4+HLA-G ekspresyonuna etkisi, (★, aşırı uç değeri göstermektedir)



Grafik 4.6. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait CD4+HLA-G ekspresyon oranları



Resim 4.3. BFA ve steroid muamelesinde örnekler için CD4+HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

4.1.2. CXCR5+ hücrelerde HLA-G ekspresyonu

T hücreleri yüzeyinde bulunan ve bir kemokin olan CXCR5 molekülü foliküler B hücre ile CD4+ T yardımcı hücrelerin ilişkisini destekleyen kemotaktik etki gösteren bir moleküldür.

Foliküler B hücrelerde oluşturulan golgi stresinin CXCR5+ hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonuna etkisi

Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6.saat BFA (-), 6.saat BFA (+), 12. saat BFA (-) ve 12. saat BFA (+) flasklarına ait örneklerde CXCR5+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,012$) (Tablo 4.7.). CXCR5+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun BFA etkisinden bağımsız zamana bağlı olarak 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. saatte arttığı

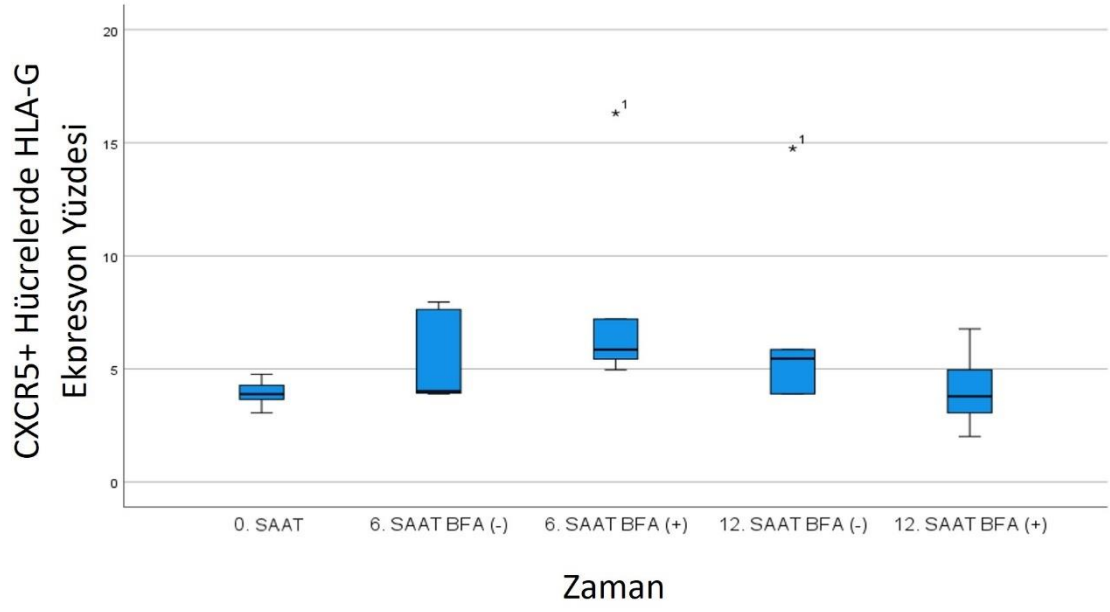
saptandı (sırasıyla $p=0.003$, $p=0.016$). CXCR5+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun BFA etkisine bağlı olarak 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. arttığı saptandı ($p=0.002$). 12. saatte BFA (-) grup ile BFA (+) karşılaştırıldığında CXCR5+HLA-G yüzey ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı saptandı ($p=0.012$) (Tablo 4.8.).

Tablo 4.7. BFA muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

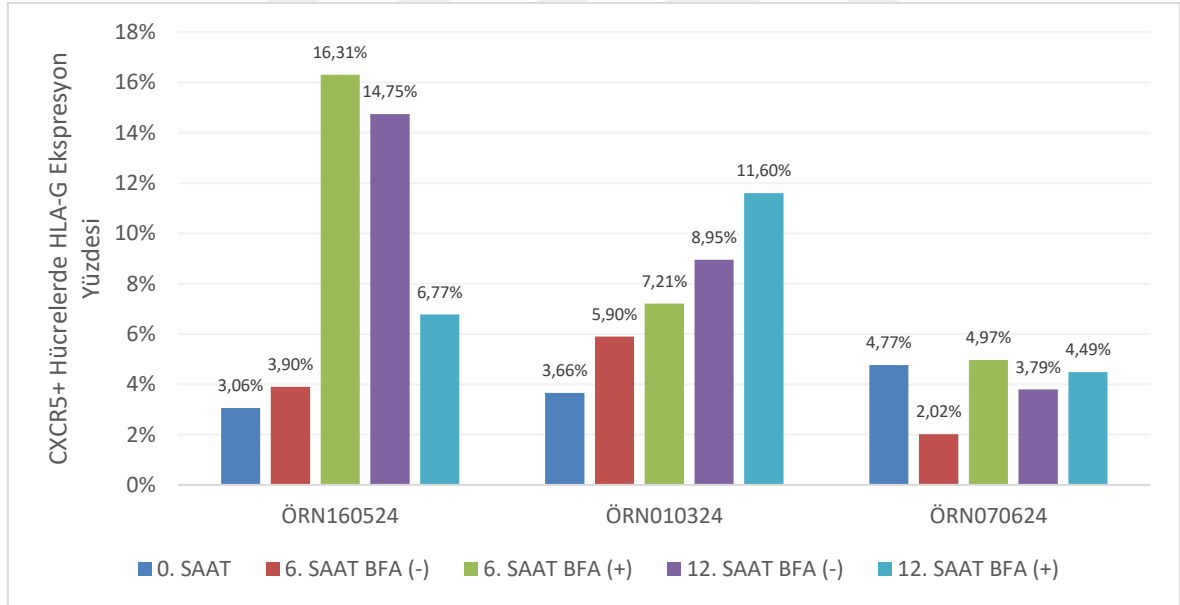
CXCR5+ HLA-G	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0. SAAT	3,93	$\pm,64$	3,89	3,06	4,77	0,012
6. SAAT BFA (-)	5,49	$\pm 2,11$	4,02	3,9	7,96	
6. SAAT BFA (+)	7,96	$\pm 4,74$	5,86	4,97	16,31	
12. SAAT BFA (-)	6,77	$\pm 4,55$	5,46	3,89	14,75	
12. SAAT BFA (+)	4,12	$\pm 1,83$	3,79	2,02	6,77	

Tablo 4.8. BFA muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

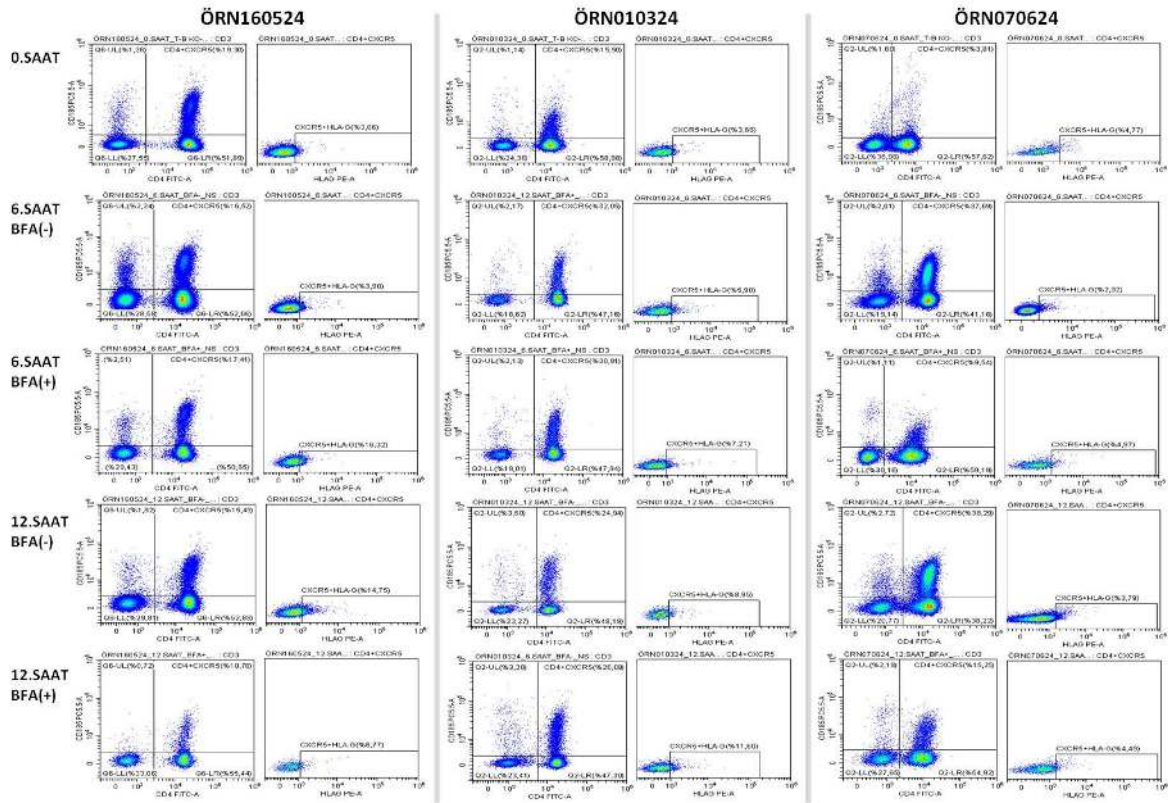
CXCR5+ HLA-G			İstatistik	p
0. SAAT	-	6. SAAT BFA (-)	3.448	0.003
0. SAAT	-	6. SAAT BFA (+)	3.748	0.002
0. SAAT	-	12. SAAT BFA (-)	2.698	0.016
0. SAAT	-	12. SAAT BFA (+)	0.150	0.883
6. SAAT BFA (-)	-	6. SAAT BFA (+)	0.300	0.768
6. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (-)	0.750	0.464
6. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (+)	3.598	0.002
6. SAAT BFA (+)	-	12. SAAT BFA (-)	1.049	0.310
6. SAAT BFA (+)	-	12. SAAT BFA (+)	3.898	0.001
12. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (+)	2.848	0.012



Grafik 4.7. BFA muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi, (★, aşırı uç değeri göstermektedir)



Grafik 4.8. BFA muamelesinde örneklere ait CXCR5+ HLA-G ekspresyon oranları



Resim 4.4. BFA muamelesinde örneklere ait CXCR5+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

Steroid muamelesinin CXCR5+ hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonuna etkisi

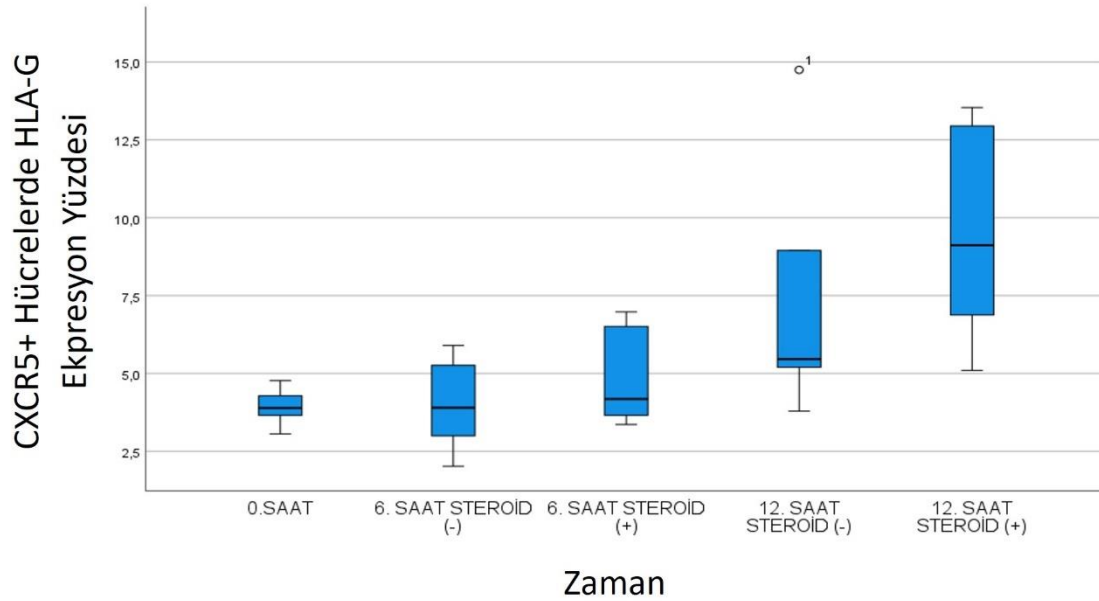
Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6.saat steroid (-), 6.saat steroid (+), 12. saat steroid (-) ve 12. saat steroid (+) flasklarına ait örneklerde CXCR5+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında farklılık saptanmadı ($p=0,086$) (Tablo 4.9.). İstatistiksel olarak yapılan devam çalışmasında Durbin-Conover testi ile yapılan ikili karşılaştırma sonuçlarına göre CXCR5+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun steroid etkisinden bağımsız zamana bağlı olarak (0.saat-12.saat için $p=0.021$ ve 6.saat-12.saat için $p=0.021$) arttığı saptandı. CXCR5+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu steroid etkisine bağlı olarak 0. saat ile karşılaştırıldığında 12. saatte arttığı saptandı ($p=0.053$) (Tablo 4.10.).

Tablo 4.9. Steroid muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

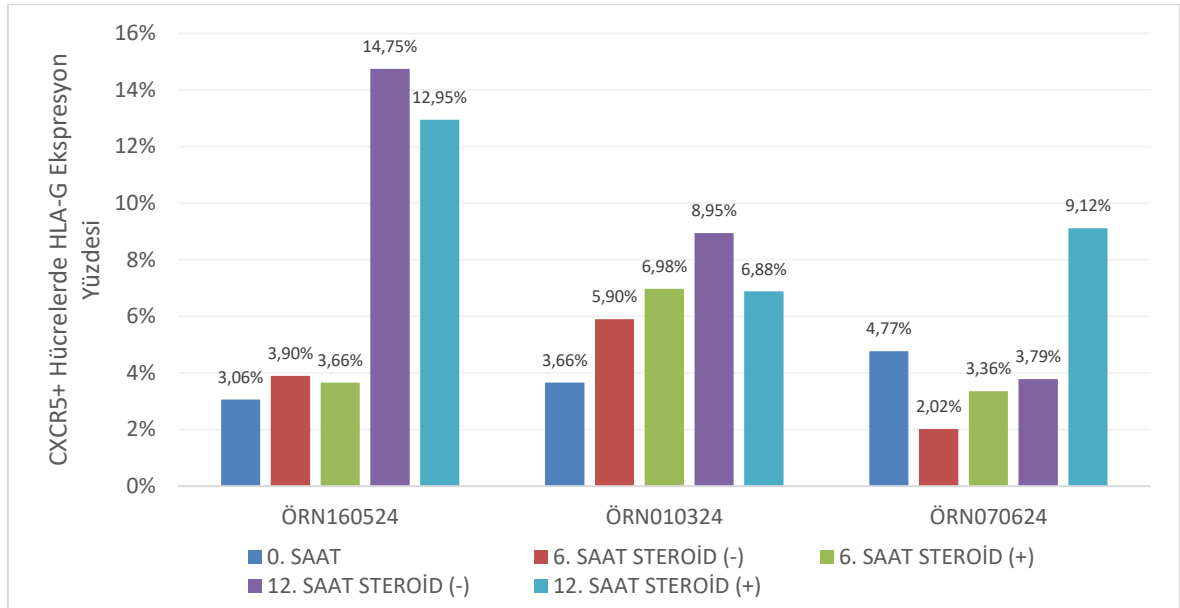
CXCR5+ HLA-G	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0.SAAT	3,93	±,64	3,89	3,06	4,77	0,086
6. SAAT STEROİD (-)	4,02	±1,59	3,9	2,02	5,9	
6. SAAT STEROİD (+)	4,94	±1,68	4,18	3,36	6,98	
12. SAAT STEROİD (-)	7,63	±4,41	5,46	3,79	14,75	
12. SAAT STEROİD (+)	9,52	±3,69	9,12	5,1	13,54	

Tablo 4.10. Steroid muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

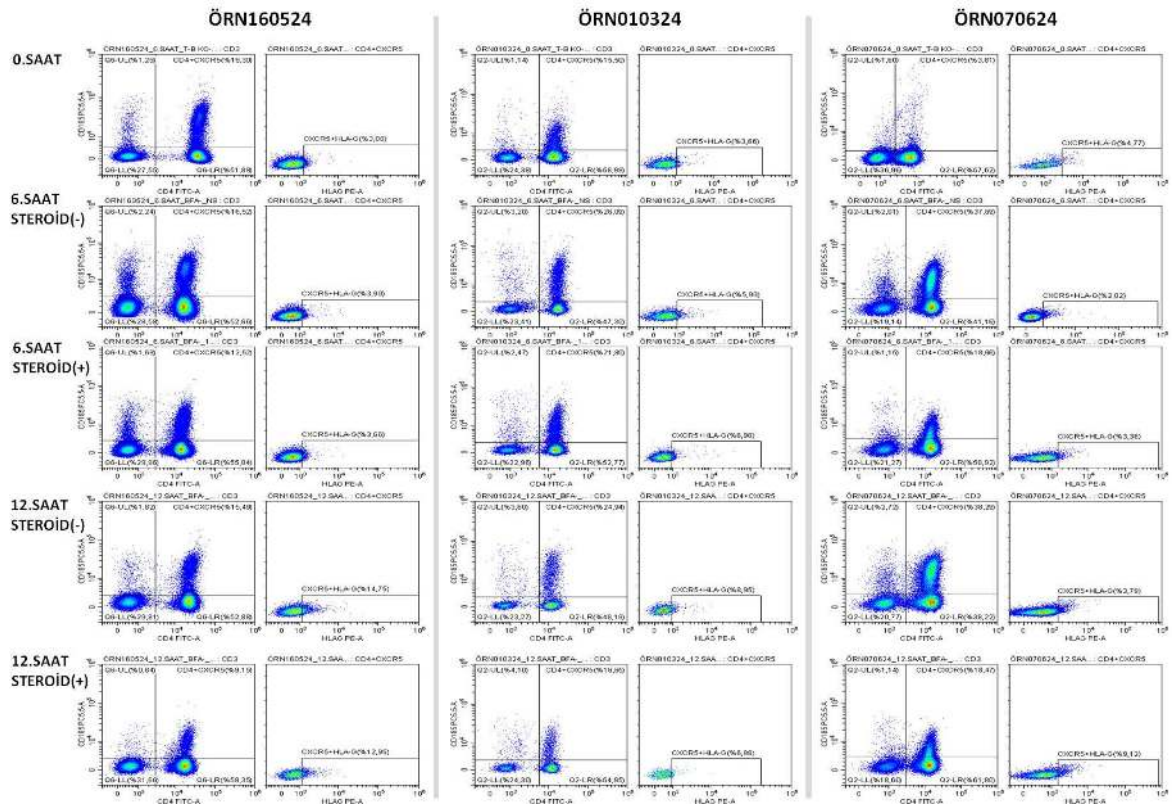
CXCR5+ HLA-G	İstatistik	p
0. SAAT - 6. SAAT STEROİD (-)	0.000	1.000
0. SAAT - 6. SAAT STEROİD (+)	1.162	0.262
0. SAAT - 12. SAAT STEROİD (-)	2.557	0.021
0. SAAT - 12. SAAT STEROİD (+)	2.092	0.053
6. SAAT STEROİD (-) - 6. SAAT STEROİD (+)	1.162	0.262
6. SAAT STEROİD (-) - 12. SAAT STEROİD (-)	2.557	0.021
6. SAAT STEROİD (-) - 12. SAAT STEROİD (+)	2.092	0.053
6. SAAT STEROİD (+) - 12. SAAT STEROİD (-)	1.395	0.182
6. SAAT STEROİD (+) - 12. SAAT STEROİD (+)	0.930	0.366
12. SAAT STEROİD (-) - 12. SAAT STEROİD (+)	0.465	0.648



Grafik 4.9. Steroid muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi, (°, uç değeri göstermektedir)



Grafik 4.10. Steroid muamelesinde örneklere ait CXCR5+ HLA-G ekspresyon oranları



Resim 4.5. Steroid muamelesinde örneklere ait CXCR5+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

BFA ve steroid muamelesinin CXCR5+ hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonuna etkisi

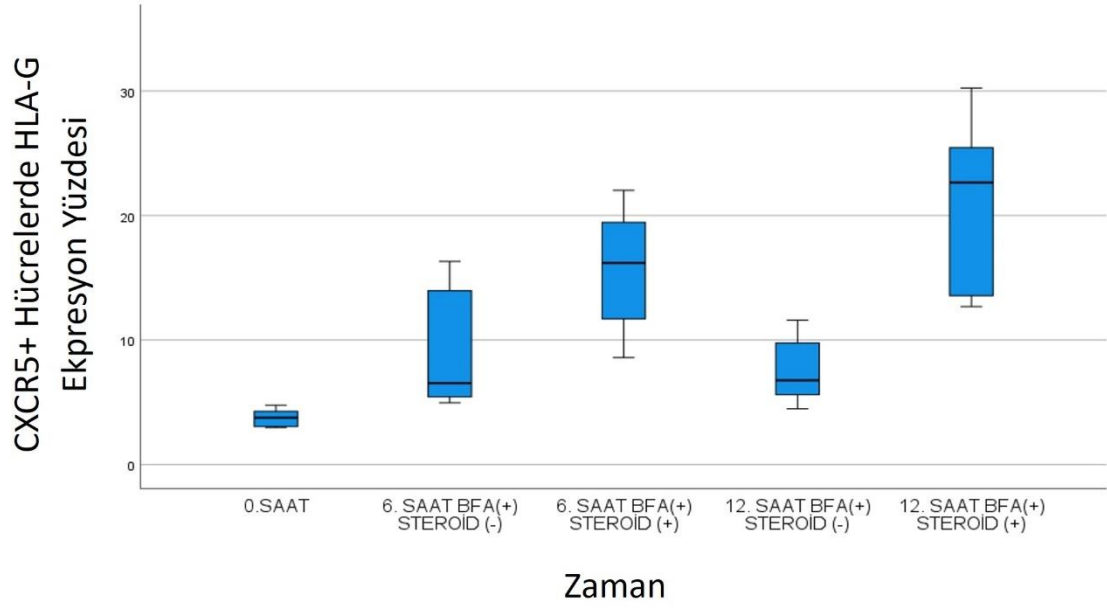
Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6.saat BFA (+) steroid (-), 6.saat BFA (+) steroid (+), 12. saat BFA (+) steroid (-) ve 12. saat BFA (+) steroid (+) flasklarına ait örneklerde CXCR5+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,004$) (Tablo 4.11.). CXCR5+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun BFA varlığında steroid etkisinden bağımsız olarak 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. saatte anlamlı olarak arttığı saptandı (sırasıyla $p=0.006$, $p=0.038$). Hem BFA hem de steroid varlığında CXCR5+ hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. saatte anlamlı olarak arttığı saptandı (sırasıyla $p<.001$, $p<.001$). 12. saatte BFA varlığında CXCR5+HLA-G yüzey ekspresyonunun steroid etkisine bağlı olarak arttığı saptandı ($p=0.006$) (Tablo 4.12.).

Tablo 4.11. BFA ve steroid muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

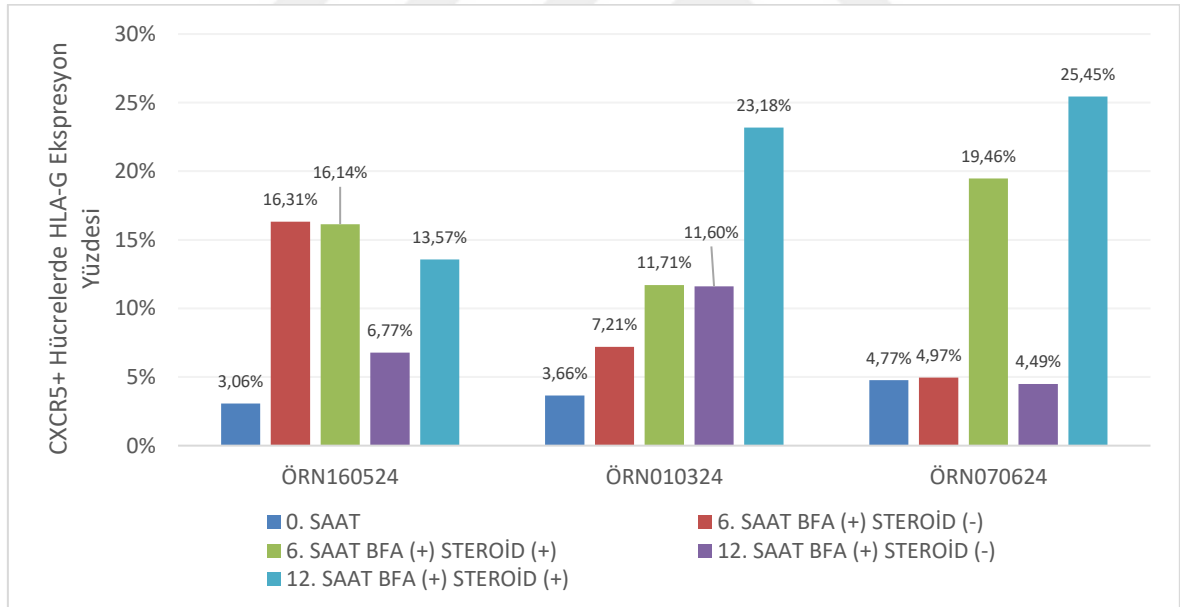
CXCR5+ HLA-G	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0.SAAT	3,77	$\pm,70$	3,78	2,97	4,77	0,004
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	8,96	$\pm 4,90$	6,54	4,97	16,31	
6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	15,7	$\pm 4,92$	16,2	8,59	22,02	
12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	7,51	$\pm 2,67$	6,78	4,49	11,6	
12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	21,21	$\pm 6,86$	22,65	12,69	30,24	

Tablo 4.12. BFA ve steroid muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

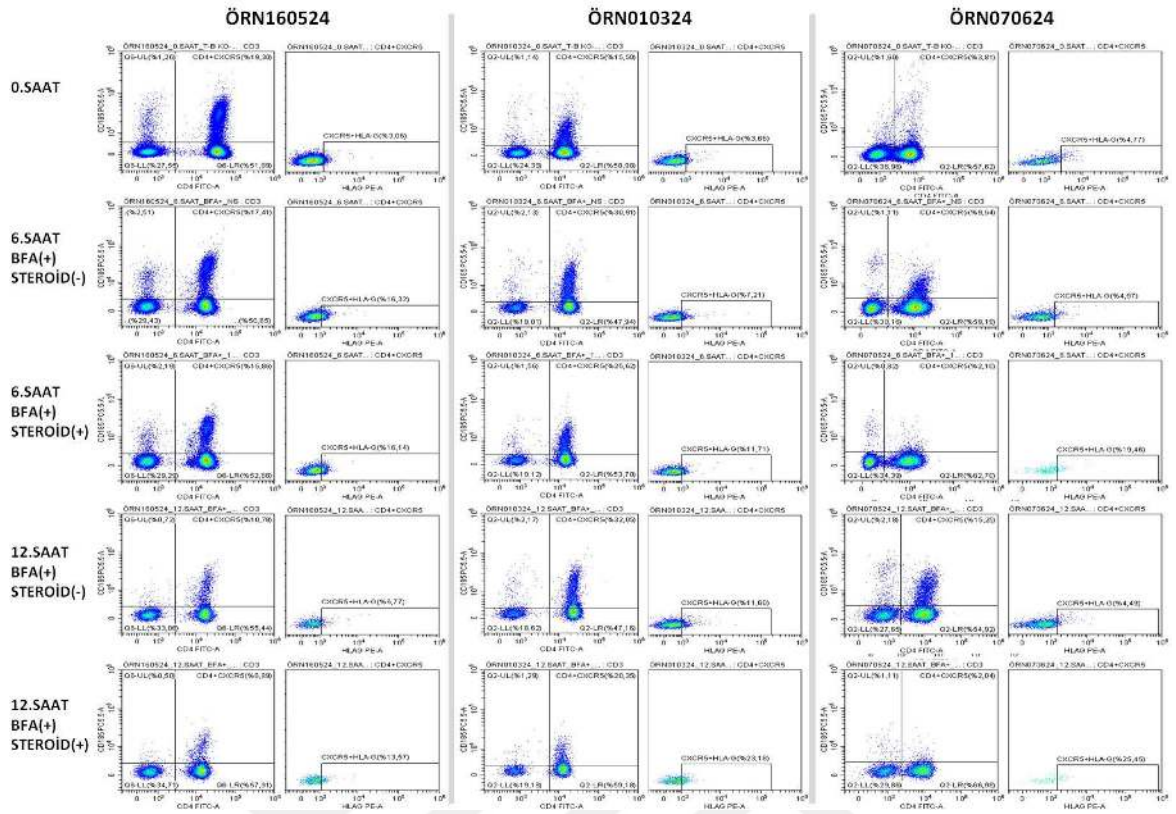
		İstatistik	p
0. SAAT	- 6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	3.051	0.006
0. SAAT	- 6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	4.715	<.001
0. SAAT	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	2.219	0.038
0. SAAT	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	5.270	<.001
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	1.664	0.112
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	0.832	0.415
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	2.219	0.038
6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	2.496	0.021
6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	0.555	0.585
12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	3.051	0.006



Grafik 4.11. BFA ve steroid muamelesinin CXCR5+ HLA-G ekspresyonuna etkisi



Grafik 4.12. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait CXCR5+ HLA-G ekspresyon oranları



Resim 4.6. BFA ve steroid muamelesinde örnekler ait CXCR5+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

4.1.3. PD-1+ hücrelerde HLA-G ekspresyonu

Foliküler B hücrelerde oluşturulan golgi stresinin PD-1+ hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonuna etkisi

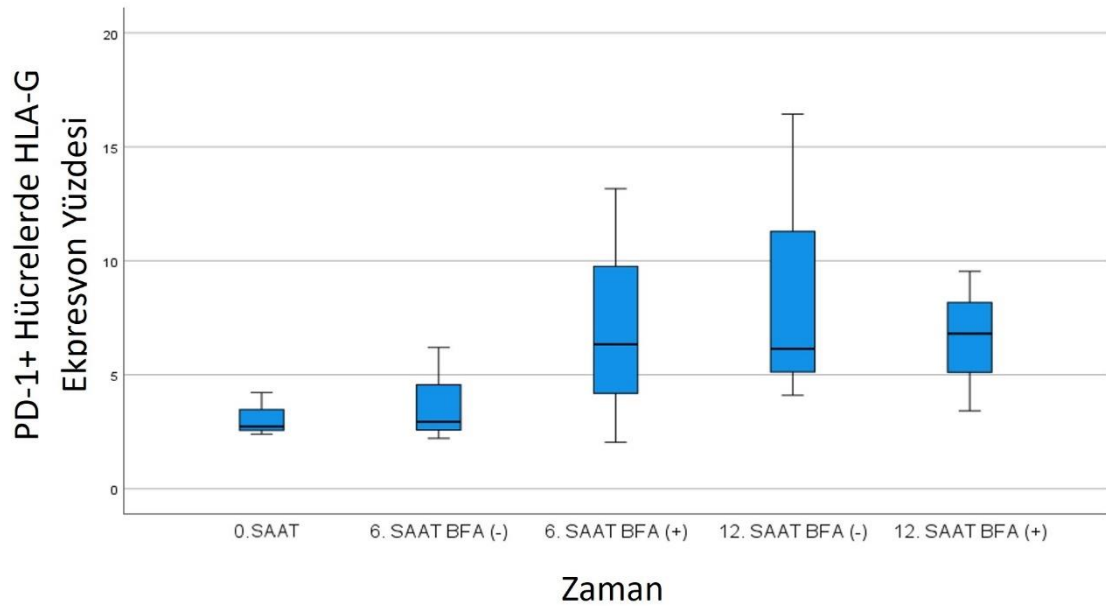
Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6.saat BFA (-), 6.saat BFA (+), 12. saat BFA (-) ve 12. saat BFA (+) flasklarına ait örneklerde PD-1+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında farklılık saptanmadı (Tablo 4.13. ve Tablo 4.14.).

Tablo 4.13. BFA muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

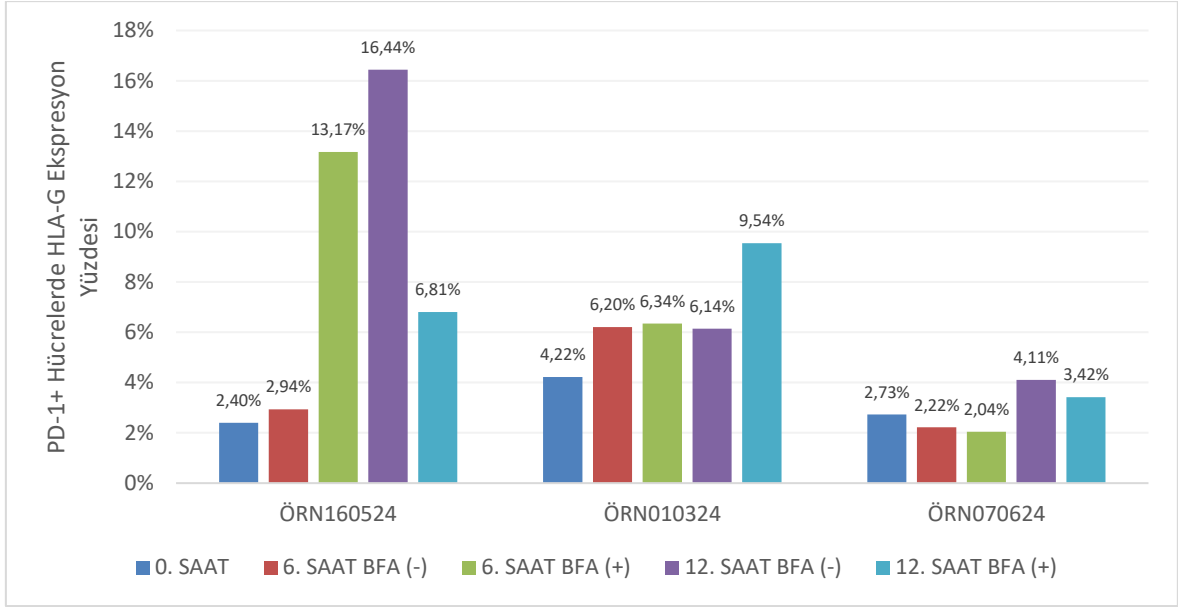
PD-1+HLA-G	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0. SAAT	3,12	±,97	2,73	2,4	4,22	0,281
6. SAAT BFA (-)	3,79	±2,12	2,94	2,22	6,2	
6. SAAT BFA (+)	7,18	±5,61	6,34	2,04	13,17	
12. SAAT BFA (-)	8,9	±6,61	6,14	4,11	16,44	
12. SAAT BFA (+)	6,59	±3,07	6,81	3,42	9,54	

Tablo 4.14. BFA muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

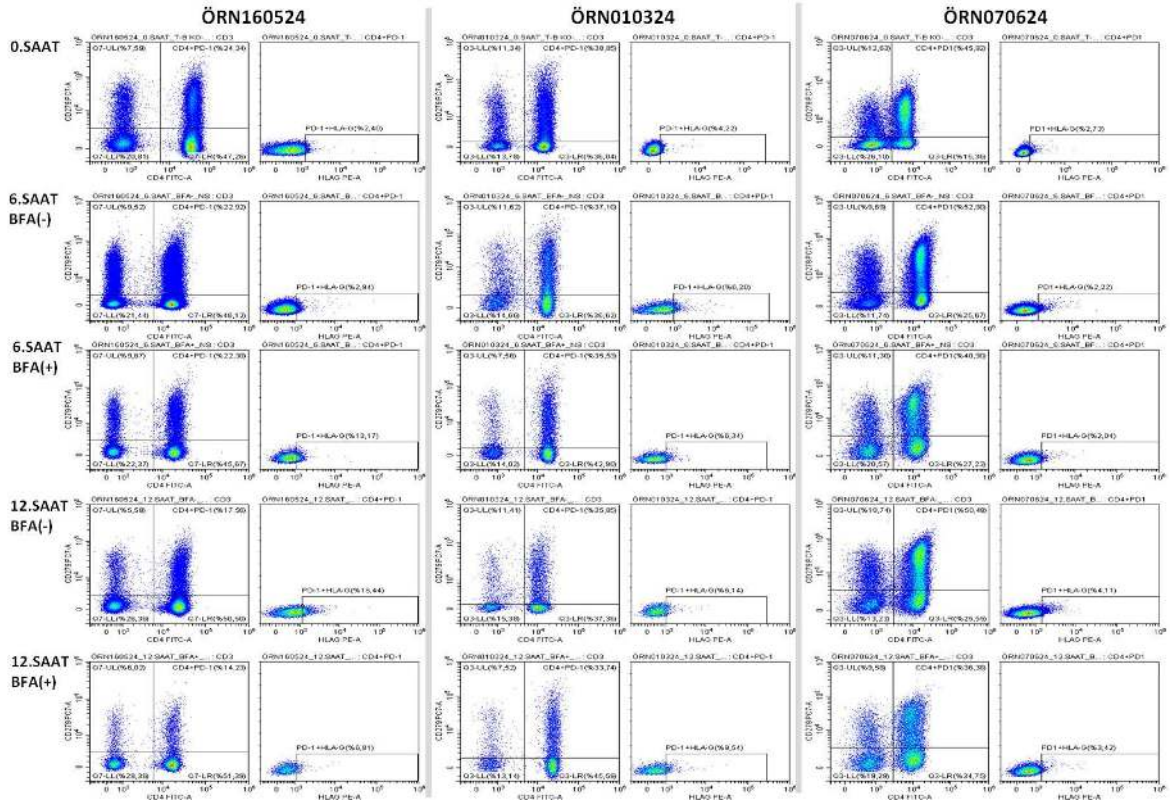
			İstatistik	p
0. SAAT	-	6. SAAT BFA (-)	0.555	0.594
0. SAAT	-	6. SAAT BFA (+)	1.109	0.299
0. SAAT	-	12. SAAT BFA (-)	1.941	0.088
0. SAAT	-	12. SAAT BFA (+)	1.941	0.088
6. SAAT BFA (-)	-	6. SAAT BFA (+)	0.555	0.594
6. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (-)	1.387	0.203
6. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (+)	1.387	0.203
6. SAAT BFA (+)	-	12. SAAT BFA (-)	0.832	0.430
6. SAAT BFA (+)	-	12. SAAT BFA (+)	0.832	0.430
12. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (+)	0.000	1.000



Grafik 4.13. BFA muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi



Grafik 4.14. BFA muamelesinde örneklere ait PD-1+ HLA-G ekspresyon oranları



Resim 4.7. BFA muamelesinde örneklere ait PD-1+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

Steroid muamelesinin PD-1+ hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonuna etkisi

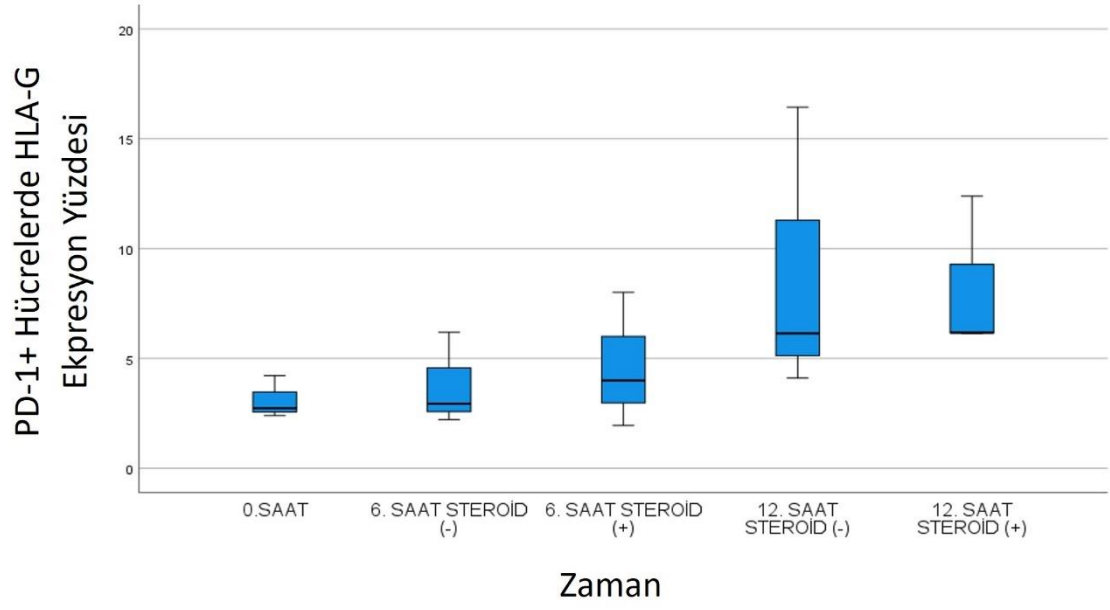
Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6.saat steroid (-), 6.saat steroid (+), 12. saat steroid (-) ve 12. saat steroid (+) flasklarına ait örneklerde PD-1+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında farklılık saptanmadı (Tablo 4.15. ve Tablo 4.16.).

Tablo 4.15. Steroid muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

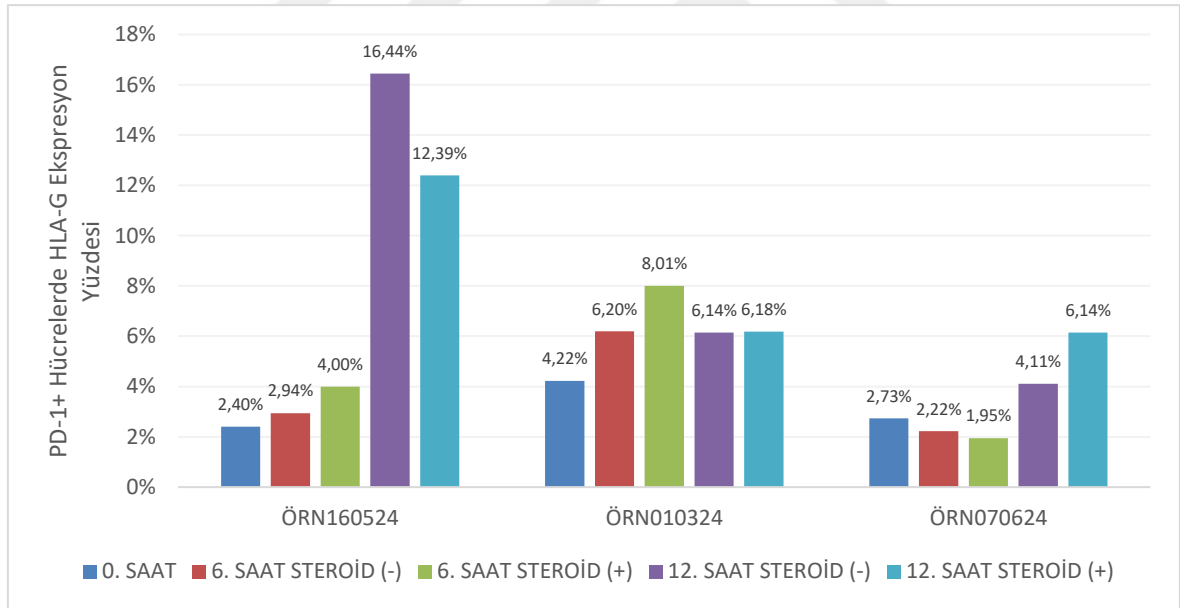
PD-1+HLA-G+	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0.SAAT	3,12	±,97	2,73	2,4	4,22	0,406
6. SAAT STEROİD (-)	3,79	±2,12	2,94	2,22	6,2	
6. SAAT STEROİD (+)	4,65	±3,08	4	1,95	8,01	
12. SAAT STEROİD (-)	8,9	±6,61	6,14	4,11	16,44	
12. SAAT STEROİD (+)	8,24	±3,60	6,18	6,14	12,39	

Tablo 4.16. Steroid muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

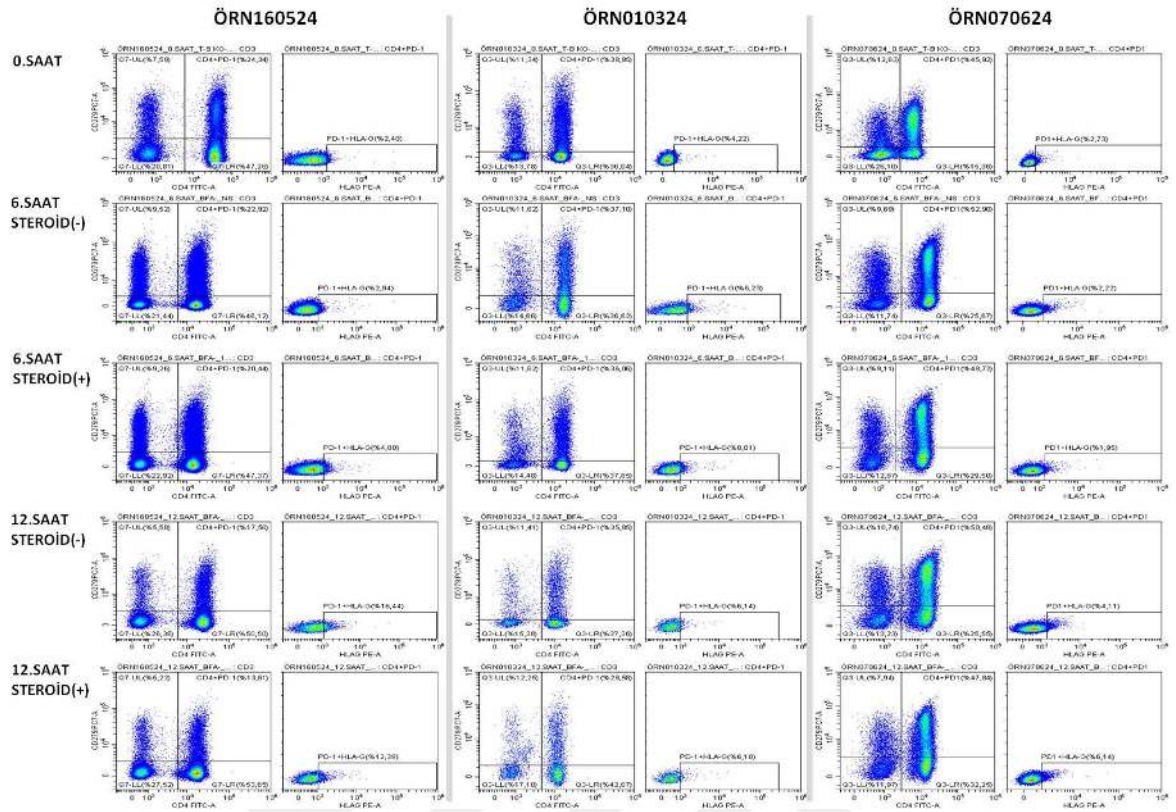
			İstatistik	p
0. SAAT	-	6. SAAT STEROİD (-)	0.775	0.461
0. SAAT	-	6. SAAT STEROİD (+)	1.033	0.332
0. SAAT	-	12. SAAT STEROİD (-)	1.549	0.160
0. SAAT	-	12. SAAT STEROİD (+)	1.807	0.108
6. SAAT STEROİD (-)	-	6. SAAT STEROİD (+)	0.258	0.803
6. SAAT STEROİD (-)	-	12. SAAT STEROİD (-)	0.775	0.461
6. SAAT STEROİD (-)	-	12. SAAT STEROİD (+)	1.033	0.332
6. SAAT STEROİD (+)	-	12. SAAT STEROİD (-)	0.516	0.620
6. SAAT STEROİD (+)	-	12. SAAT STEROİD (+)	0.775	0.461
12. SAAT STEROİD (-)	-	12. SAAT STEROİD (+)	0.258	0.803



Grafik 4.15. Steroid muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi



Grafik 4.16. Steroid muamelesinde örneklere ait PD-1+ HLA-G ekspresyon oranları



Resim 4.8. Steroid muamelesinde örnekler için PD-1+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

BFA ve steroid muamelesinin PD-1+ hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonuna etkisi

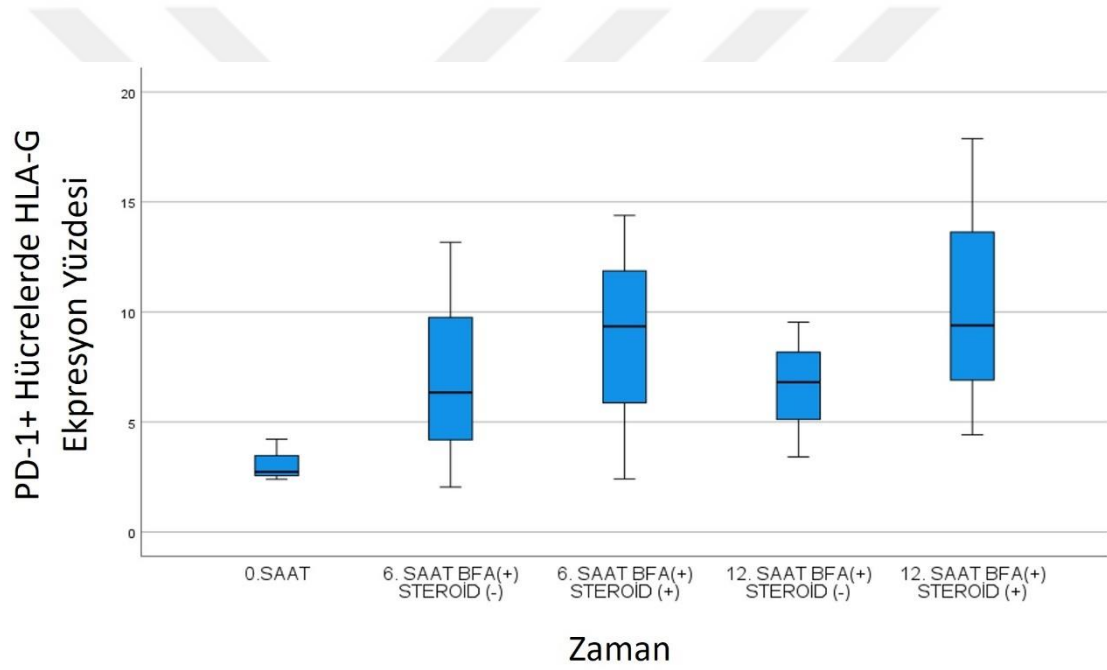
Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6. saat BFA (+) steroid (-), 6. saat BFA (+) steroid (+), 12. saat BFA (+) steroid (-) ve 12. saat BFA (+) steroid (+) flasksına ait örneklerde PD-1+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında farklılık saptanmadı (Tablo 4.17. ve Tablo 4.18.).

Tablo 4.17. BFA ve steroid muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

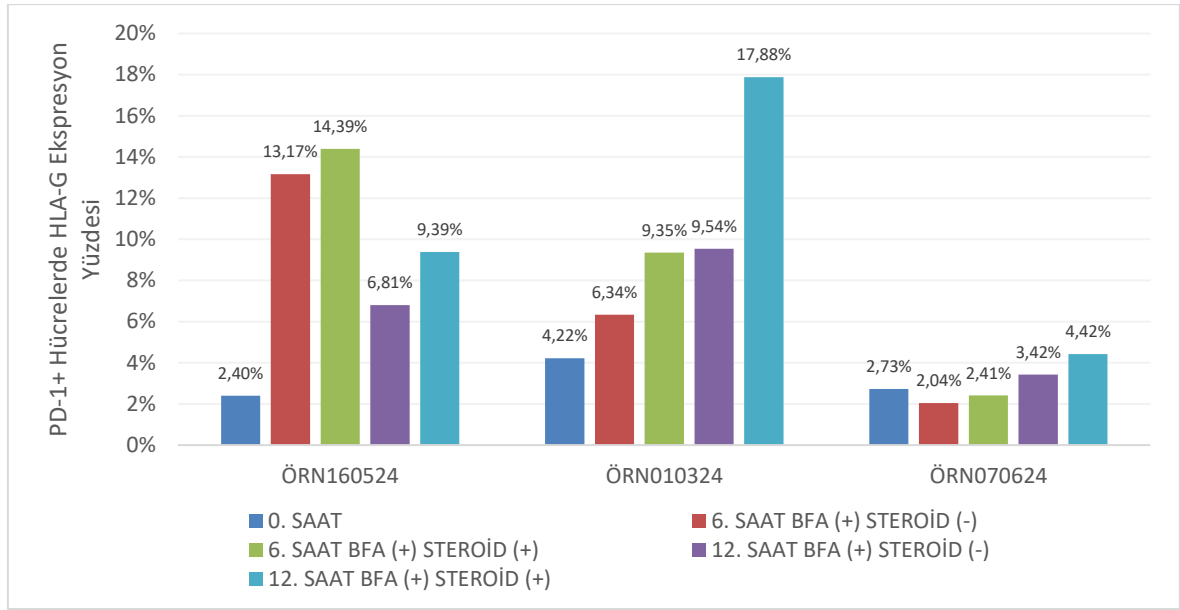
PD-1+ HLA-G	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0. SAAT	3,12	±,97	2,73	2,4	4,22	0,281
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	7,18	±5,61	6,34	2,04	13,17	
6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	8,72	±6,02	9,35	2,41	14,39	
12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	6,59	±3,07	6,81	3,42	9,54	
12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	10,56	±6,81	9,39	4,42	17,88	

Tablo 4.18. BFA ve steroid muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

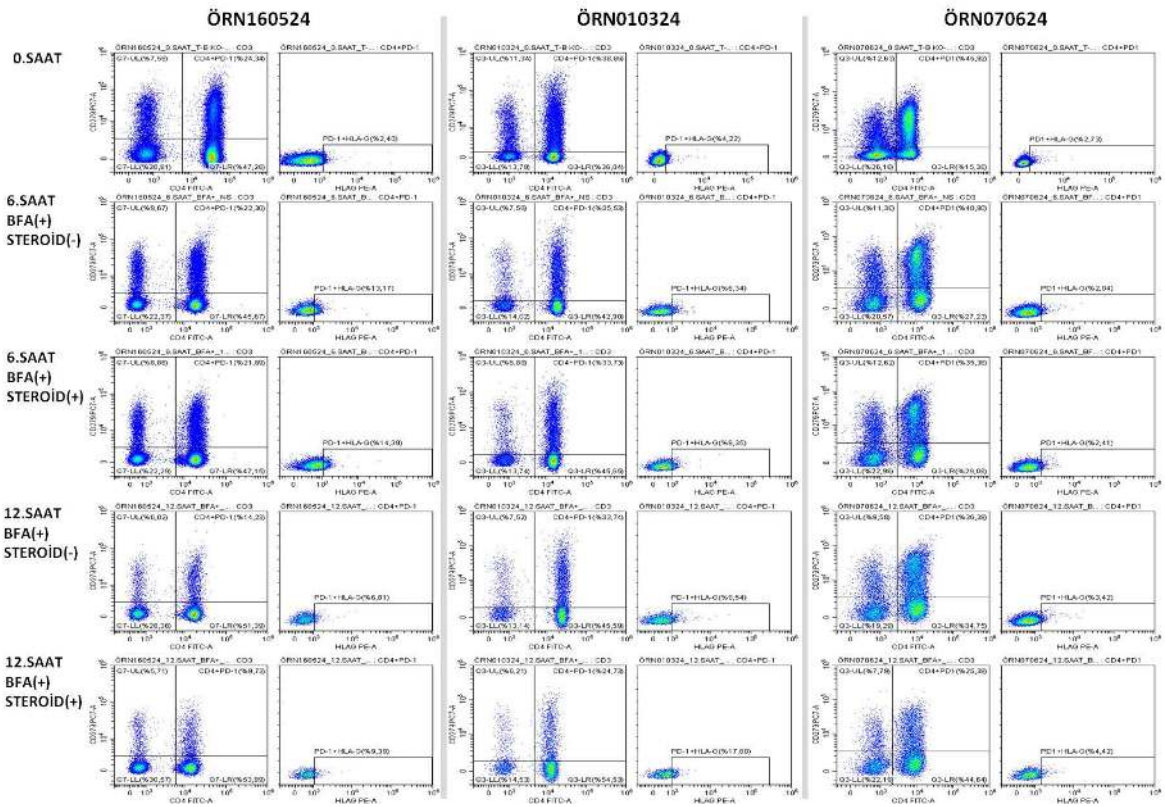
		İstatistik	p
0. SAAT	- 6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	0.555	0.594
0. SAAT	- 6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	1.387	0.203
0. SAAT	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	1.387	0.203
0. SAAT	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	2.219	0.057
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	0.832	0.430
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	0.832	0.430
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	1.664	0.135
6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	0.000	1.000
6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	0.832	0.430
12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	0.832	0.430



Grafik 4.17. BFA ve steroid muamelesinin PD-1+ HLA-G ekspresyonuna etkisi



Grafik 4.18. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait PD-1+ HLA-G ekspresyon oranları



Resim 4.9. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait PD-1+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

4.1.4. ICOS+ hücrelerde HLA-G ekspresyonu

Foliküler B hücrelerde oluşturulan golgi stresinin ICOS+ hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonuna etkisi

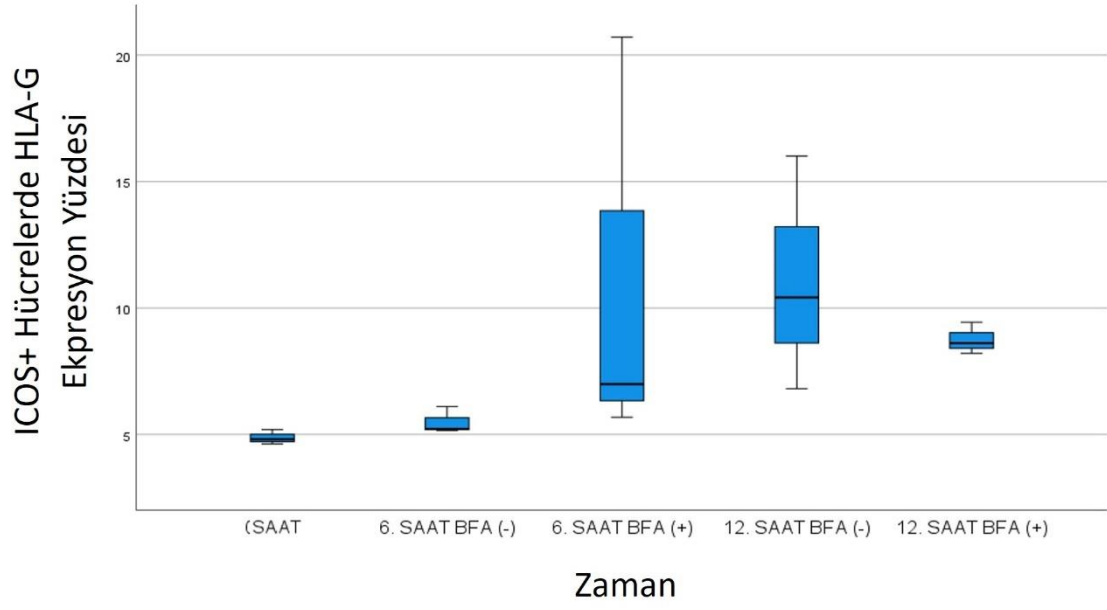
Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6.saat BFA (-), 6.saat BFA (+), 12. saat BFA (-) ve 12. saat BFA (+) flasklarına ait örneklerde ICOS+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,043$) (Tablo 4.19.). ICOS+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun BFA etkisinden bağımsız zamana bağlı olarak (0.saat-12.saat için $p=0.001$ ve 6.saat-12.saat için $p=0.008$) arttığı saptandı. ICOS+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun BFA etkisine bağlı olarak 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. saatte anlamlı olarak arttığı saptandı (sırasıyla $p=0.004$, $p=0.002$). 6. saatte BFA (-) grup ile BFA (+) karşılaştırıldığında ICOS+HLA-G yüzey ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı saptandı ($p=0.037$) (Tablo 4.20.).

Tablo 4.19. BFA muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

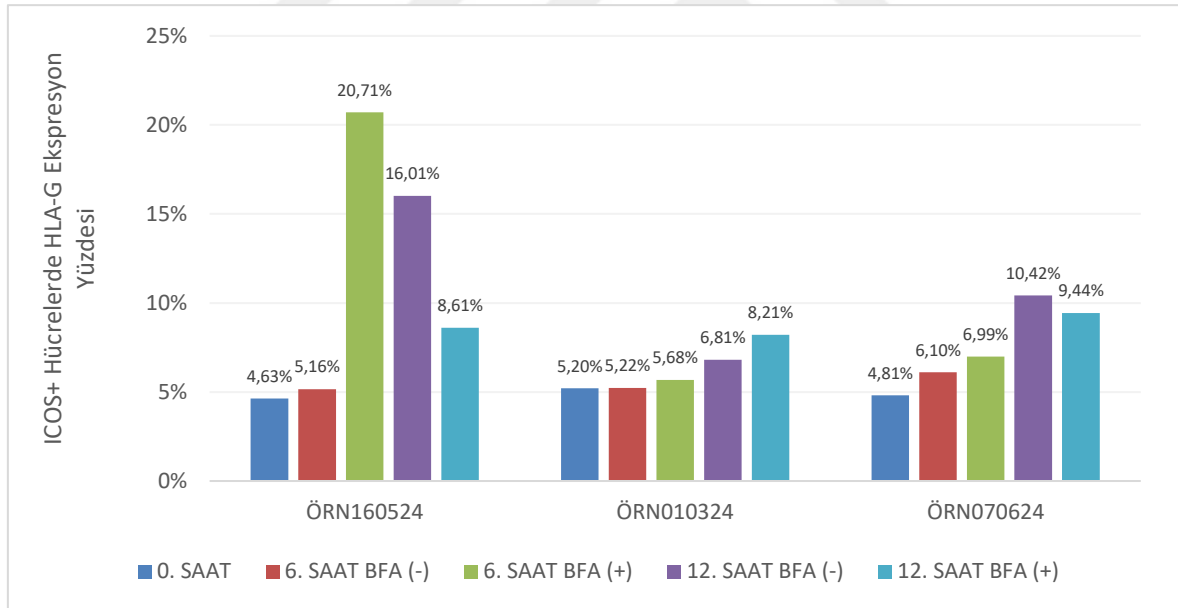
ICOS+HLA-G+	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0. SAAT	4,88	$\pm,29$	4,81	4,63	5,2	0,043
6. SAAT BFA (-)	5,49	$\pm,53$	5,22	5,16	6,1	
6. SAAT BFA (+)	11,13	$\pm 8,33$	6,99	5,68	20,71	
12. SAAT BFA (-)	11,08	$\pm 4,64$	10,42	6,81	16,01	
12. SAAT BFA (+)	8,75	$\pm,63$	8,61	8,21	9,44	

Tablo 4.20. BFA muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

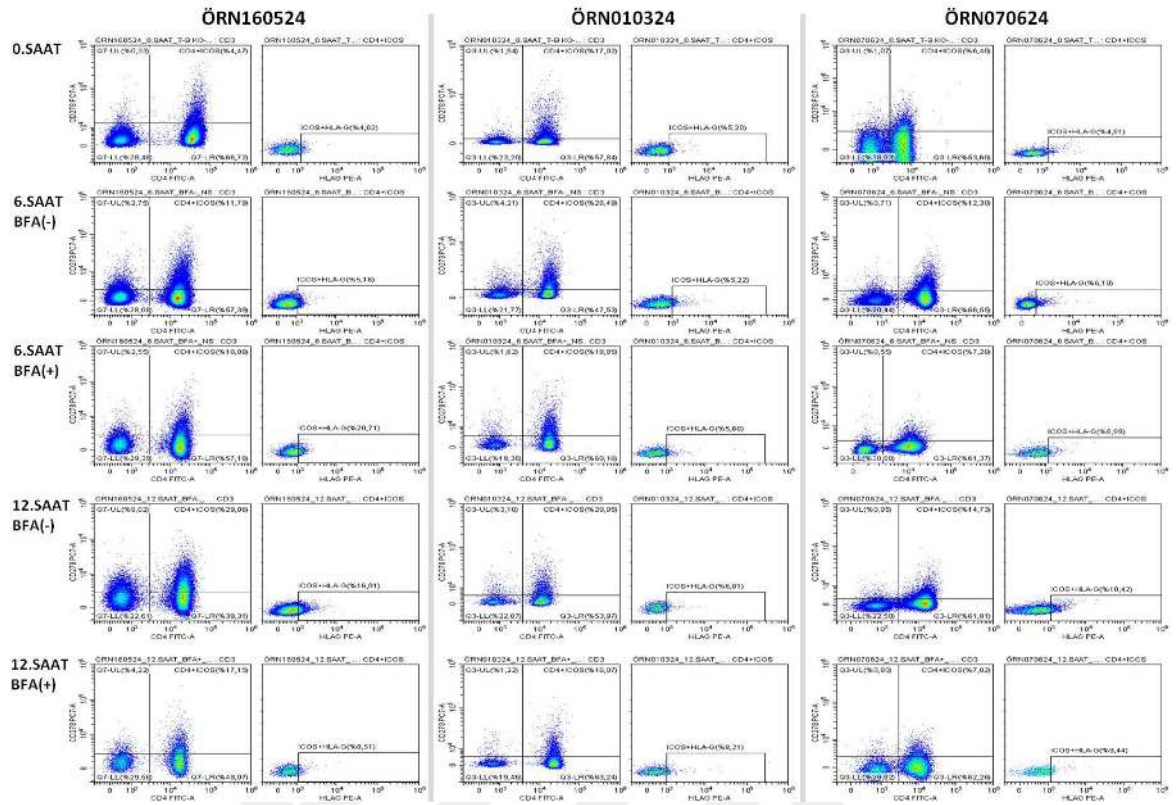
			İstatistik	p
0. SAAT	-	6. SAAT BFA (-)	1.500	0.172
0. SAAT	-	6. SAAT BFA (+)	4.000	0.004
0. SAAT	-	12. SAAT BFA (-)	5.000	0.001
0. SAAT	-	12. SAAT BFA (+)	4.500	0.002
6. SAAT BFA (-)	-	6. SAAT BFA (+)	2.500	0.037
6. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (-)	3.500	0.008
6. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (+)	3.000	0.017
6. SAAT BFA (+)	-	12. SAAT BFA (-)	1.000	0.347
6. SAAT BFA (+)	-	12. SAAT BFA (+)	0.500	0.631
12. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (+)	0.500	0.631



Grafik 4.19. BFA muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi



Grafik 4.20. BFA muamelesinde örneklere ait ICOS+ HLA-G ekspresyon oranları



Resim 4.10. BFA muamelesinde örneklere ait ICOS+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

Steroid muamelesinin ICOS+ hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonuna etkisi

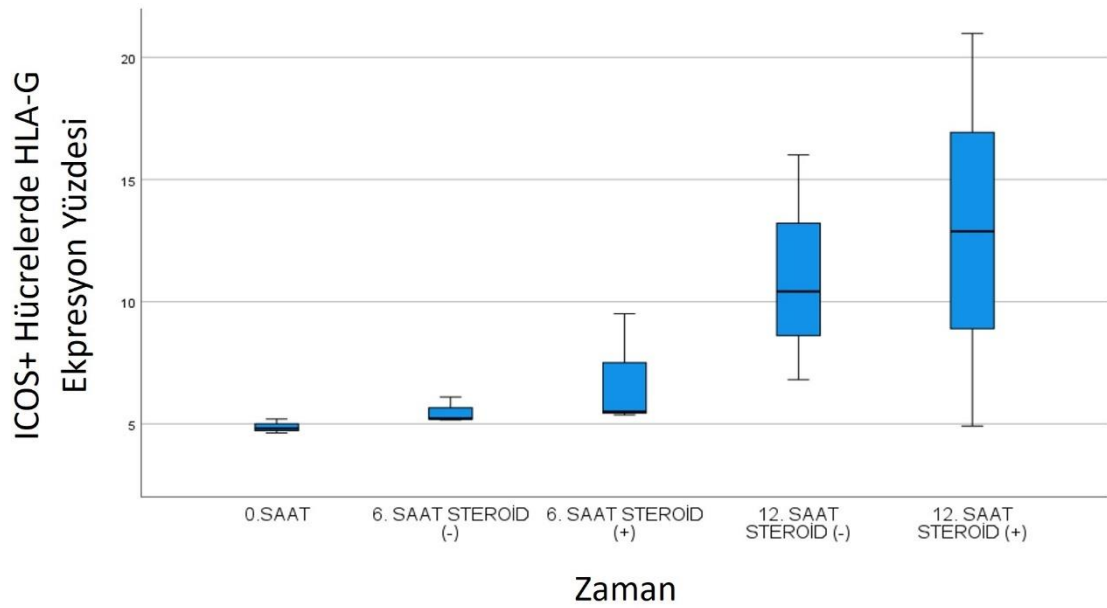
Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6.saat steroid (-), 6.saat steroid (+), 12. saat steroid (-) ve 12. saat steroid (+) flasklarına ait örneklerde ICOS+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında farklılık saptanmadı ($p=0,113$) (Tablo 4.21.). İstatistiksel olarak yapılan devam çalışmasında Durbin-Conover testi ile yapılan ikili karşılaştırma sonuçlarına göre ICOS+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun steroid etkisinden bağımsız zamana bağlı olarak (0.saat-12.saat için $p=0.009$ ve 6.saat-12.saat için $p=0.041$) arttığı saptandı. (Tablo 4.22.).

Tablo 4.21. Steroid muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

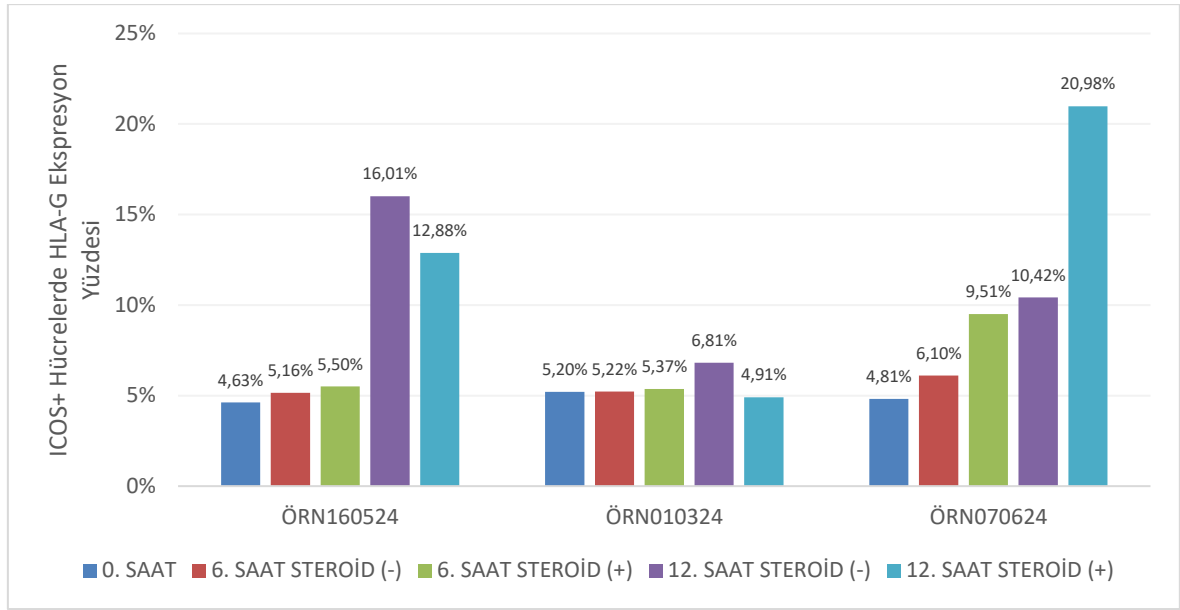
ICOS+HLA-G+	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0.SAAT	4,88	±,29	4,81	4,63	5,2	0,113
6. SAAT STEROİD (-)	5,49	±,53	5,22	5,16	6,1	
6. SAAT STEROİD (+)	6,79	±2,35	5,5	5,37	9,51	
12. SAAT STEROİD (-)	11,08	±4,64	10,42	6,81	16,01	
12. SAAT STEROİD (+)	12,92	±8,04	12,88	4,91	20,98	

Tablo 4.22. Steroid muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

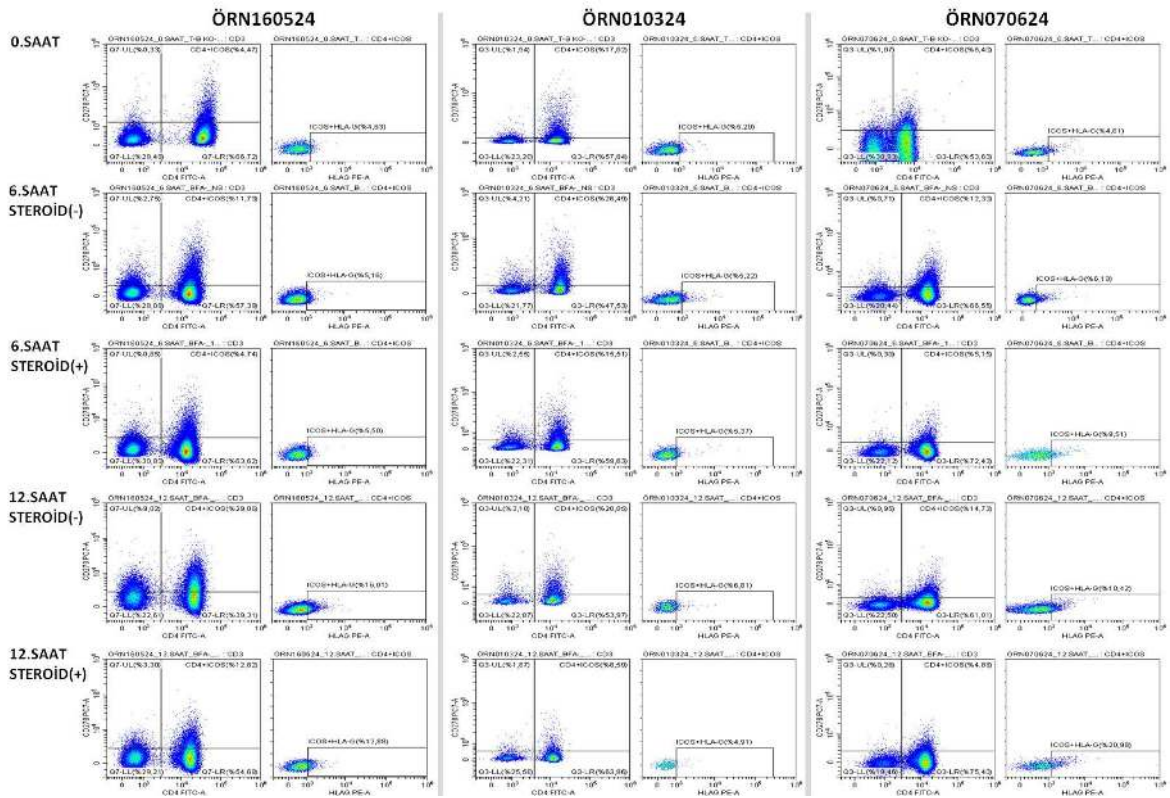
			İstatistik	p
0. SAAT	-	6. SAAT STEROİD (-)	1.03	0.334
0. SAAT	-	6. SAAT STEROİD (+)	2.06	0.074
0. SAAT	-	12. SAAT STEROİD (-)	3.43	0.009
0. SAAT	-	12. SAAT STEROİD (+)	2.06	0.074
6. SAAT STEROİD (-)	-	6. SAAT STEROİD (+)	1.03	0.334
6. SAAT STEROİD (-)	-	12. SAAT STEROİD (-)	2.40	0.043
6. SAAT STEROİD (-)	-	12. SAAT STEROİD (+)	1.03	0.334
6. SAAT STEROİD (+)	-	12. SAAT STEROİD (-)	1.37	0.207
6. SAAT STEROİD (+)	-	12. SAAT STEROİD (+)	0.00	1.000
12. SAAT STEROİD (-)	-	12. SAAT STEROİD (+)	1.37	0.207



Grafik 4.21. Steroid muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi



Grafik 4.22. Steroid muamelesinde örneklere ait ICOS+ HLA-G ekspresyon oranları



Resim 4.11. Steroid muamelesinde örneklere ait ICOS+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

BFA ve steroid muamelesinin ICOS+ hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonuna etkisi

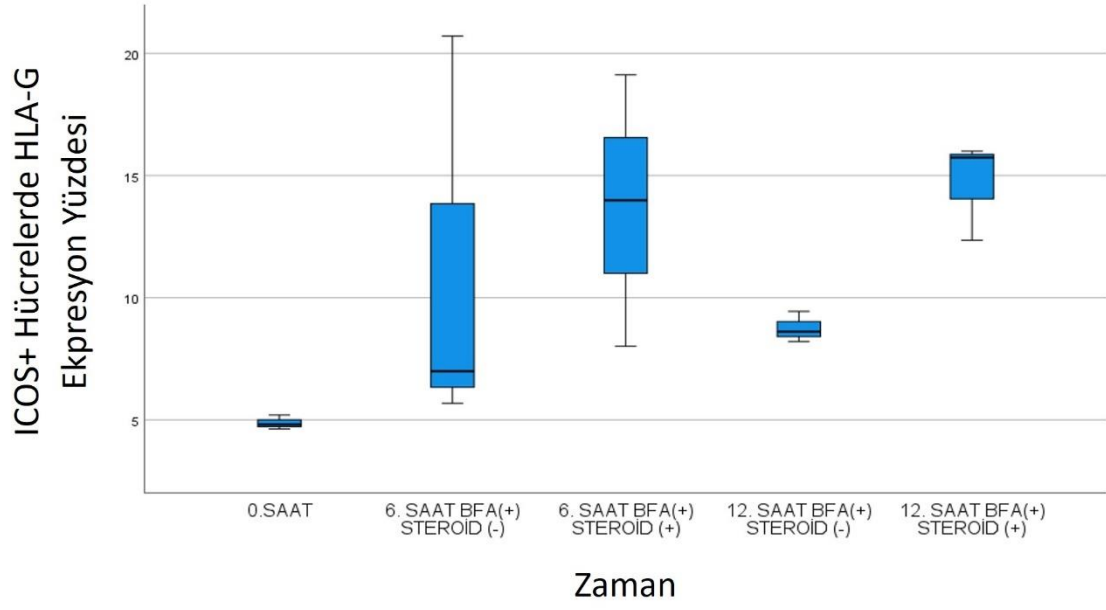
Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6.saat BFA (+) steroid (-), 6.saat BFA (+) steroid (+), 12. saat BFA (+) steroid (-) ve 12. saat BFA (+) steroid (+) flasklarına ait örneklerde ICOS+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında farklılık saptanmadı ($p=0,113$) (Tablo 4.23.). İstatistiksel olarak yapılan devam çalışmasında Durbin-Conover testi ile yapılan ikili karşılaştırma sonuçlarına göre hem BFA hem de steroid varlığında ICOS+ hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. saatte anlamlı olarak arttığı saptandı (sırasıyla $p=0.025$, $p=0.009$) (Tablo 4.24.).

Tablo 4.23. BFA ve steroid muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

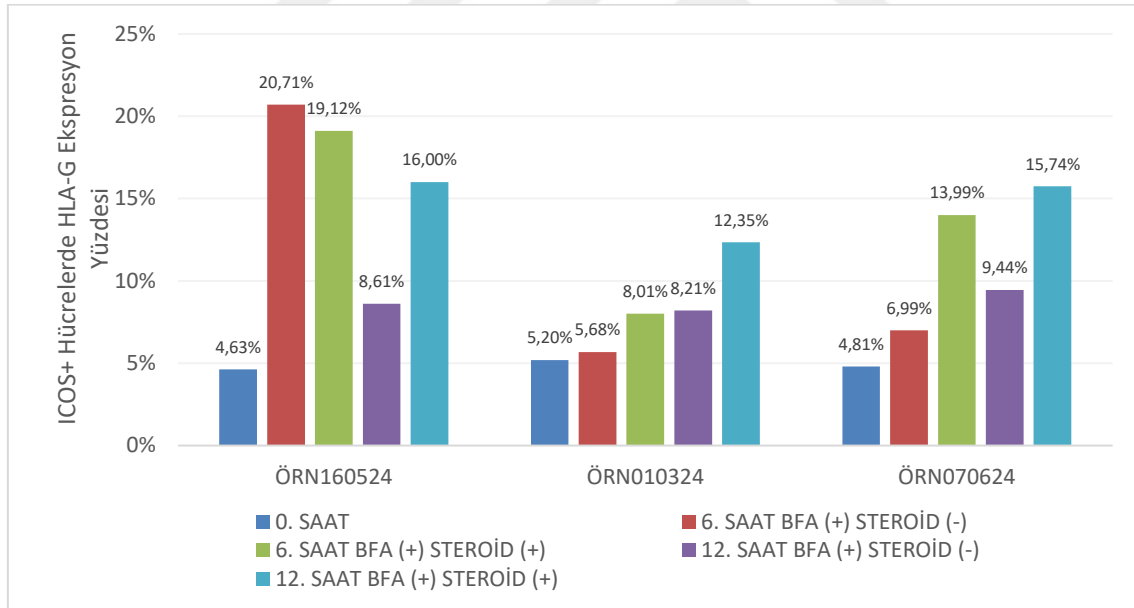
ICOS+HLA-G+	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0.SAAT	4,88	$\pm,29$	4,81	4,63	5,2	0,113
6. SAAT BFA(+) STEROİD (-)	11,13	$\pm 8,33$	6,99	5,68	20,71	
6. SAAT BFA(+) STEROİD (+)	13,71	$\pm 5,56$	13,99	8,01	19,12	
12. SAAT BFA(+) STEROİD (-)	8,75	$\pm,63$	8,61	8,21	9,44	
12. SAAT BFA(+) STEROİD (+)	14,7	$\pm 2,04$	15,74	12,35	16	

Tablo 4.24. BFA ve steroid muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

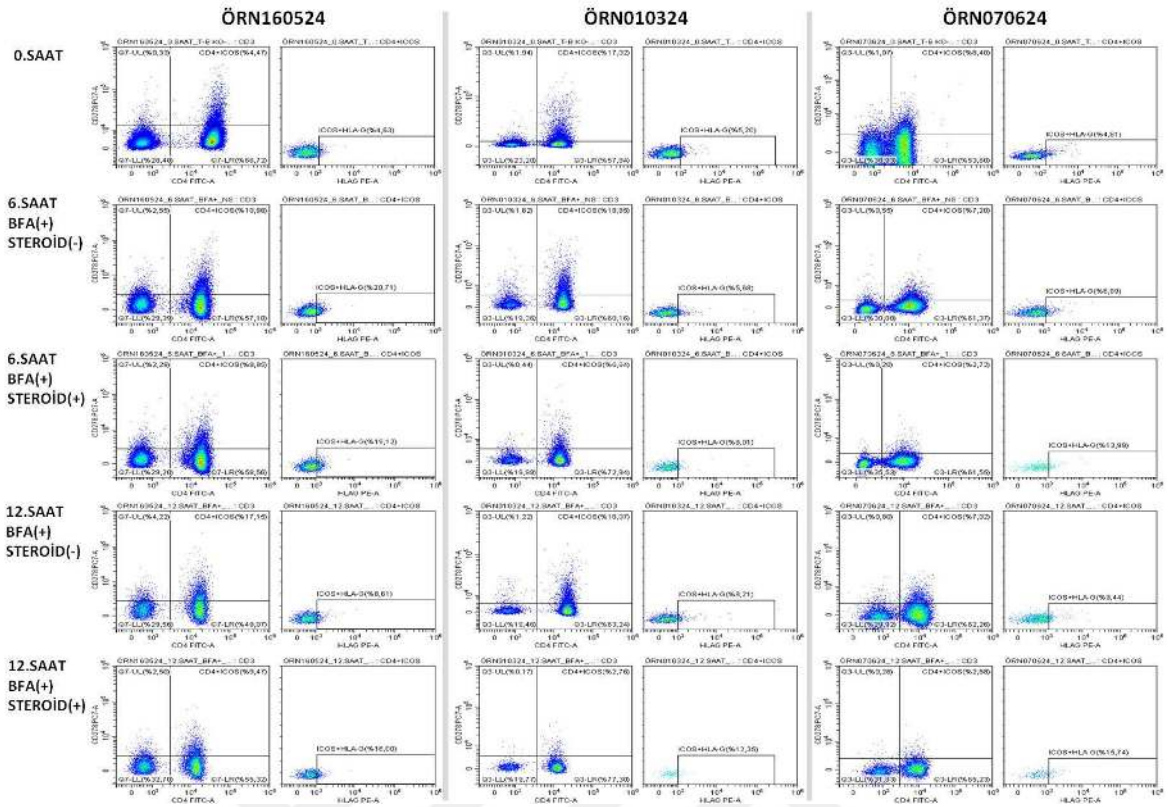
		İstatistik	p
0. SAAT	- 6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	2.058	0.074
0. SAAT	- 6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	2.744	0.025
0. SAAT	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	2.058	0.074
0. SAAT	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	3.430	0.009
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	0.686	0.512
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	0.000	1.000
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	1.372	0.207
6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	0.686	0.512
6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	0.686	0.512
12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	1.372	0.207



Grafik 4.23. BFA ve steroid muamelesinin ICOS+ HLA-G ekspresyonuna etkisi



Grafik 4.24. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait ICOS+ HLA-G ekspresyon oranları



Resim 4.12. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait ICOS+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

4.2. BFA ve steroid muamelesinin B hücre yüzeyinde ifade edilen moleküllere etkisi

Çalışmada B hücreleri belirlemek için B hücreler için ortak yüzey belirteci olan anti-CD19 monoklonal antikorunu kullanılarak B hücreler belirlendi.

4.2.1. Foliküler CD19+ B hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonu

Foliküler B hücrelerde oluşturulan golgi stresinin CD19+ B hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonuna etkisi

T hücre ve B hücre yüzeyinde eksprese edilen ve klasik olmayan MHC sınıf I ailesine ait olan HLA-G molekülü immün sistem toleransında önemli bir rol oynar. Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6.saat BFA (-), 6.saat BFA (+), 12. saat BFA (-) ve 12. saat BFA (+) flasklarına ait örneklerde CD19+ B hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,038$) (Tablo

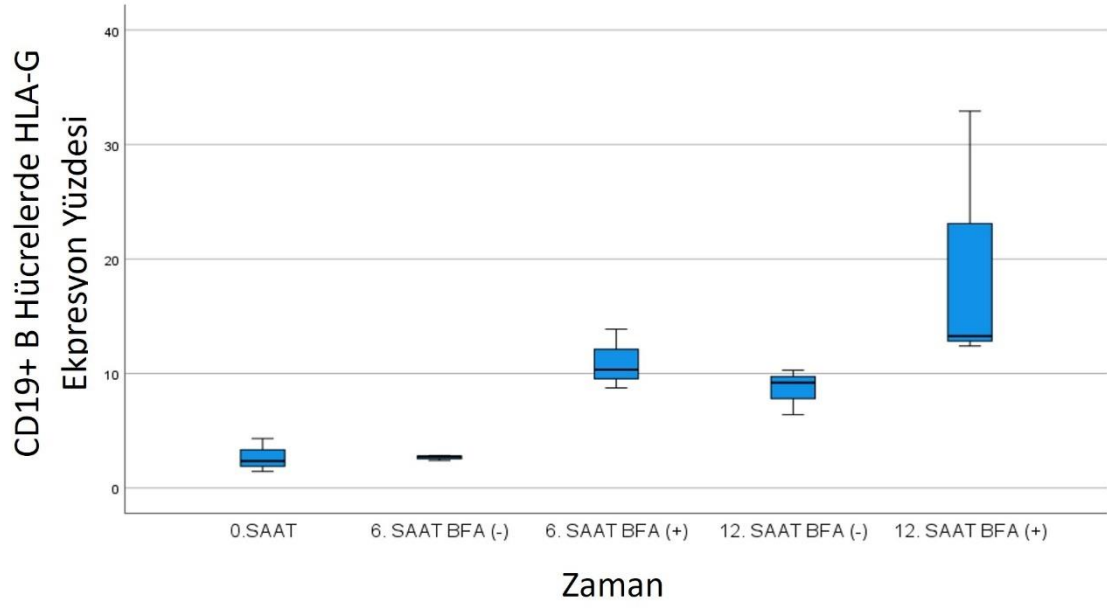
4.25.). CD19+ B hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun BFA etkisinden bağımsız zamana bağlı olarak (0.saat-12.saat için $p=0.012$ ve 6.saat-12.saat için $p=0.028$) arttığı saptandı. CD19+ B hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu BFA etkisine bağlı olarak 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. saatte arttığı saptandı (sırasıyla $p=0.003$, $p<.001$). 6. saatte BFA (-) grup ile BFA (+) karşılaştırıldığında CD19+HLA-G yüzey ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı saptandı ($p=0.006$) (Tablo 4.26.).

Tablo 4.25. BFA muamelesinin CD19+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

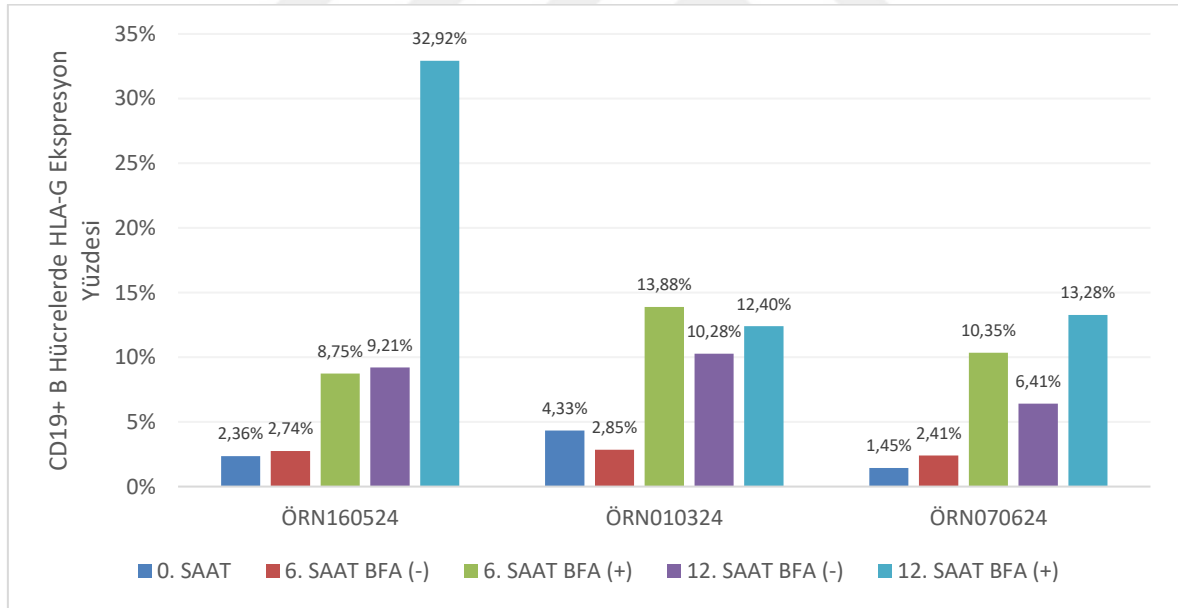
CD19+HLA-G+	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0.SAAT	2,71	$\pm 1,47$	2,36	1,45	4,33	0,038
6. SAAT BFA (-)	2,67	$\pm,23$	2,74	2,41	2,85	
6. SAAT BFA (+)	10,99	$\pm 2,62$	10,35	8,75	13,88	
12. SAAT BFA (-)	8,63	$\pm 2,00$	9,21	6,41	10,28	
12. SAAT BFA (+)	19,53	$\pm 11,60$	13,28	12,4	32,92	

Tablo 4.26. BFA muamelesinin CD19+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

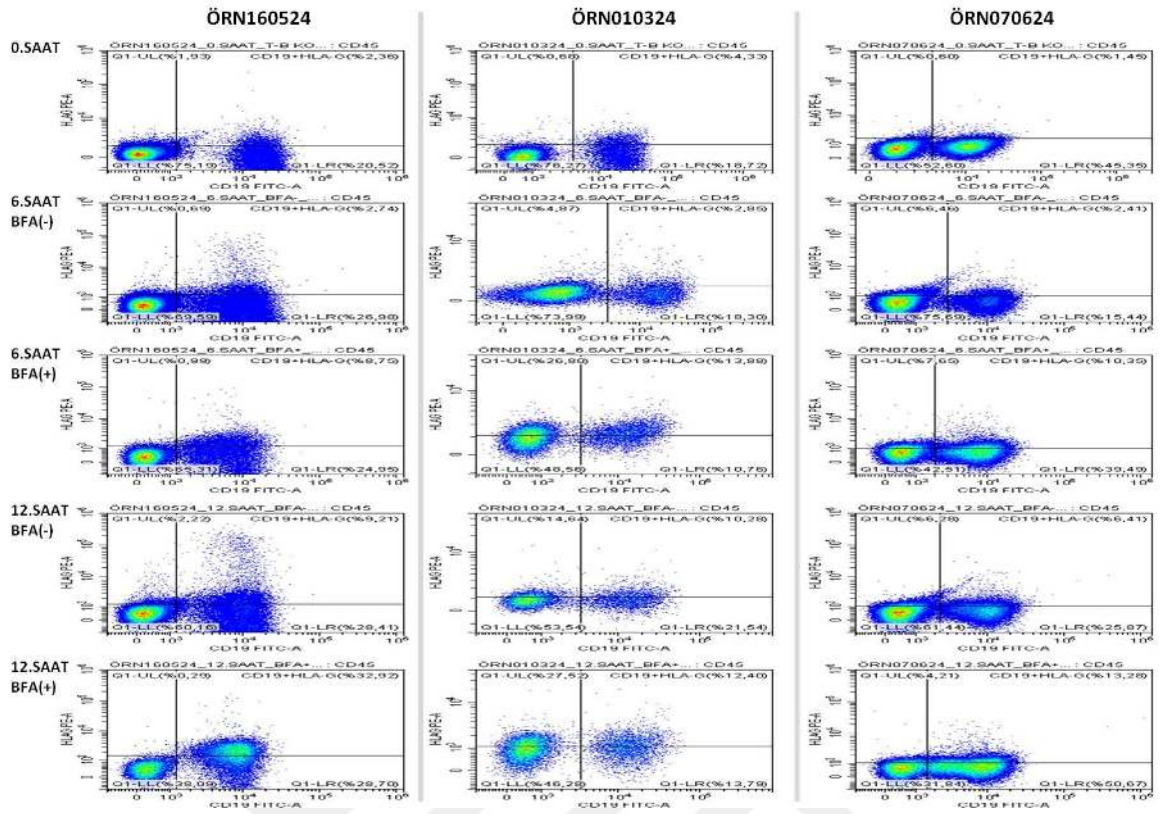
			İstatistik	p
0. SAAT	-	6. SAAT BFA (-)	0.535	0.608
0. SAAT	-	6. SAAT BFA (+)	4.276	0.003
0. SAAT	-	12. SAAT BFA (-)	3.207	0.012
0. SAAT	-	12. SAAT BFA (+)	5.345	<.001
6. SAAT BFA (-)	-	6. SAAT BFA (+)	3.742	0.006
6. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (-)	2.673	0.028
6. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (+)	4.811	0.001
6. SAAT BFA (+)	-	12. SAAT BFA (-)	1.069	0.316
6. SAAT BFA (+)	-	12. SAAT BFA (+)	1.069	0.316
12. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (+)	2.138	0.065



Grafik 4.25. BFA muamelesinin CD19+ HLA-G ekspresyonuna etkisi



Grafik 4.26. BFA muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-G ekspresyon oranları



Resim 4.13. BFA muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

Steroid muamelesinin foliküler CD19+ B hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonuna etkisi

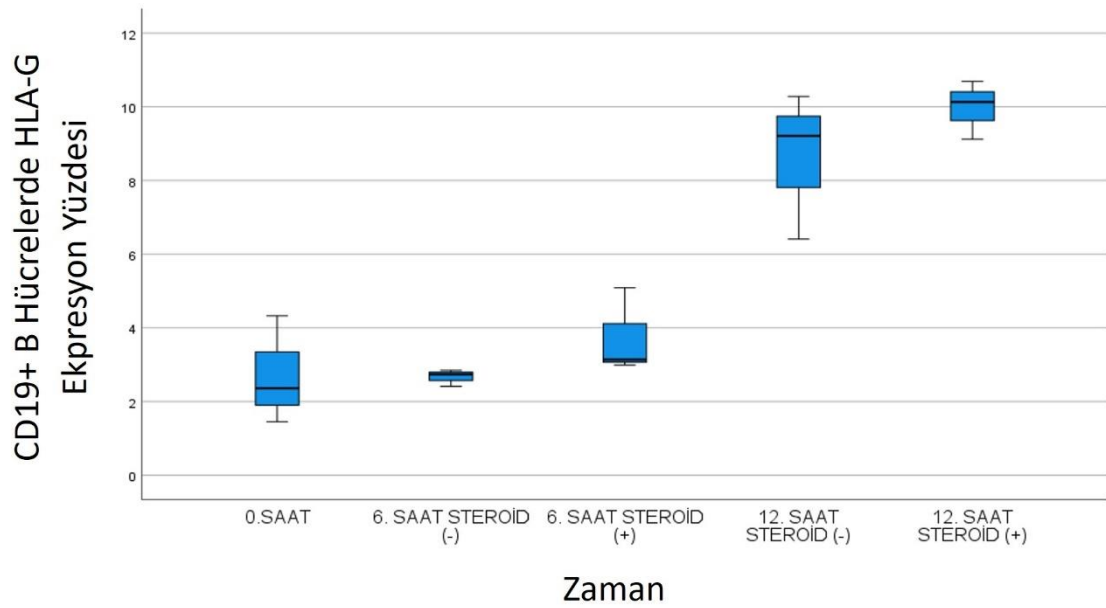
Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6.saat steroid (-), 6.saat steroid (+), 12. saat steroid (-) ve 12. saat steroid (+) flasklarına ait örneklerde CD19+ B hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p=0,043$) (Tablo 4.27.). CD19+ B hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun steroid etkisinden bağımsız zamana bağlı olarak (0.saat-12.saat için $p=0.004$ ve 6.saat-12.saat için $p=0.004$) arttığı saptandı. CD19+ B hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu steroid etkisine bağlı olarak 0. saat ile karşılaştırıldığında 12. saatte arttığı saptandı ($p=0.002$) (Tablo 4.28.).

Tablo 4.27. Steroid muamelesinin CD19+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

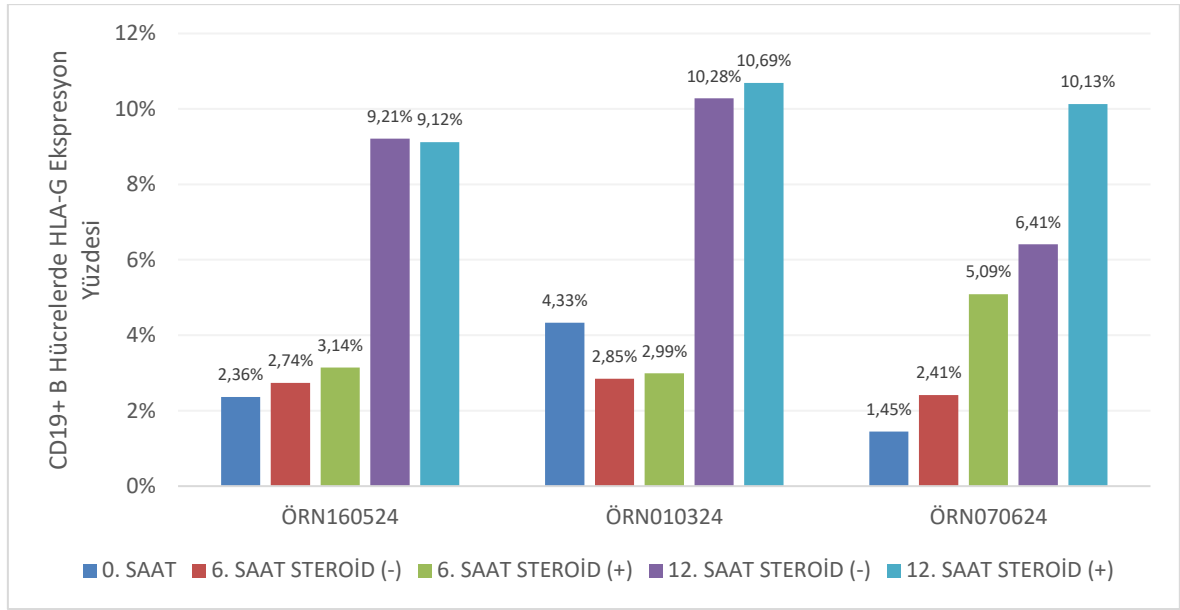
CD19+HLA-G+	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0.SAAT	2,71	±1,47	2,36	1,45	4,33	0,043
6. SAAT STEROİD (-)	2,67	±,23	2,74	2,41	2,85	
6. SAAT STEROİD (+)	3,74	±1,17	3,14	2,99	5,09	
12. SAAT STEROİD (-)	8,63	±2,00	9,21	6,41	10,28	
12. SAAT STEROİD (+)	9,98	±,80	10,13	9,12	10,69	

Tablo 4.28. Steroid muamelesinin CD19+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

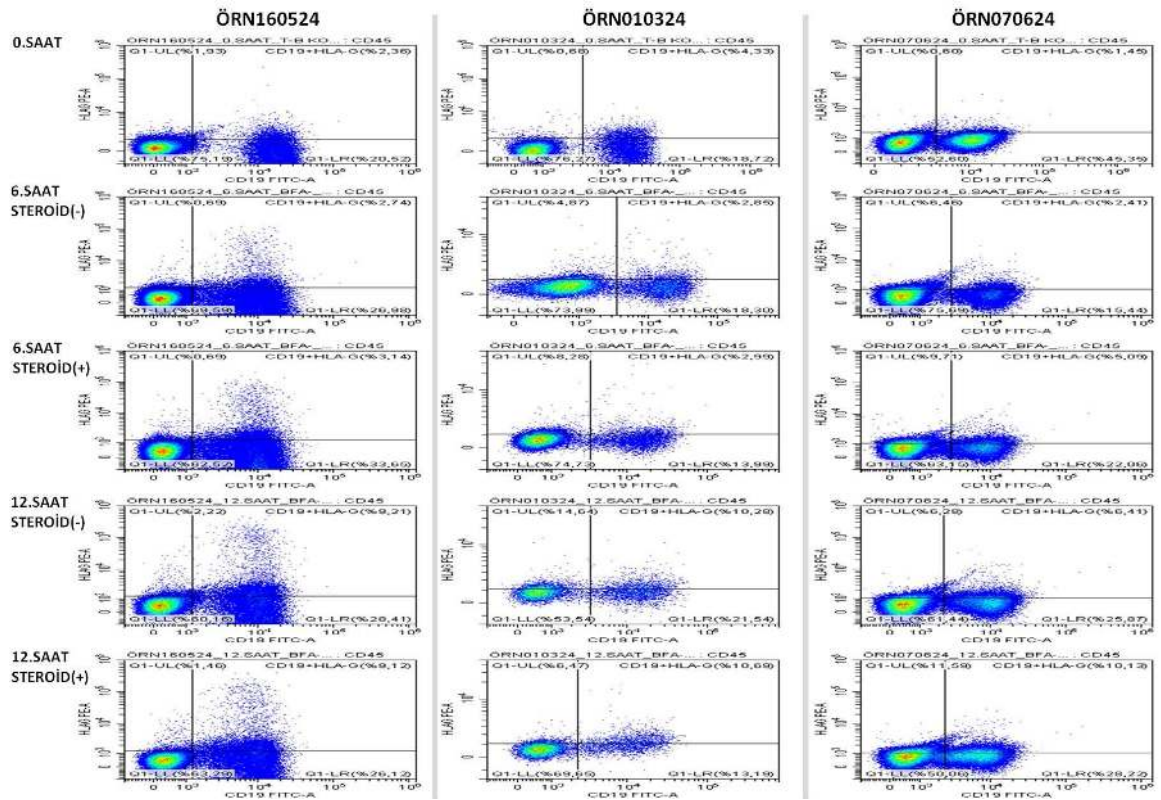
			İstatistik	p
0. SAAT	-	6. SAAT STEROİD (-)	0.000	1.000
0. SAAT	-	6. SAAT STEROİD (+)	1.500	0.172
0. SAAT	-	12. SAAT STEROİD (-)	4.000	0.004
0. SAAT	-	12. SAAT STEROİD (+)	4.500	0.002
6. SAAT STEROİD (-)	-	6. SAAT STEROİD (+)	1.500	0.172
6. SAAT STEROİD (-)	-	12. SAAT STEROİD (-)	4.000	0.004
6. SAAT STEROİD (-)	-	12. SAAT STEROİD (+)	4.500	0.002
6. SAAT STEROİD (+)	-	12. SAAT STEROİD (-)	2.500	0.037
6. SAAT STEROİD (+)	-	12. SAAT STEROİD (+)	3.000	0.017
12. SAAT STEROİD (-)	-	12. SAAT STEROİD (+)	0.500	0.631



Grafik 4.27. Steroid muamelesinin CD19+ HLA-G ekspresyonuna etkisi



Grafik 4.28. Steroid muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-G ekspresyon oranları



Resim 4.14. Steroid muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

BFA ve steroid muamelesinin foliküler CD19+ B hücre yüzeyinde HLA-G ekspresyonuna etkisi

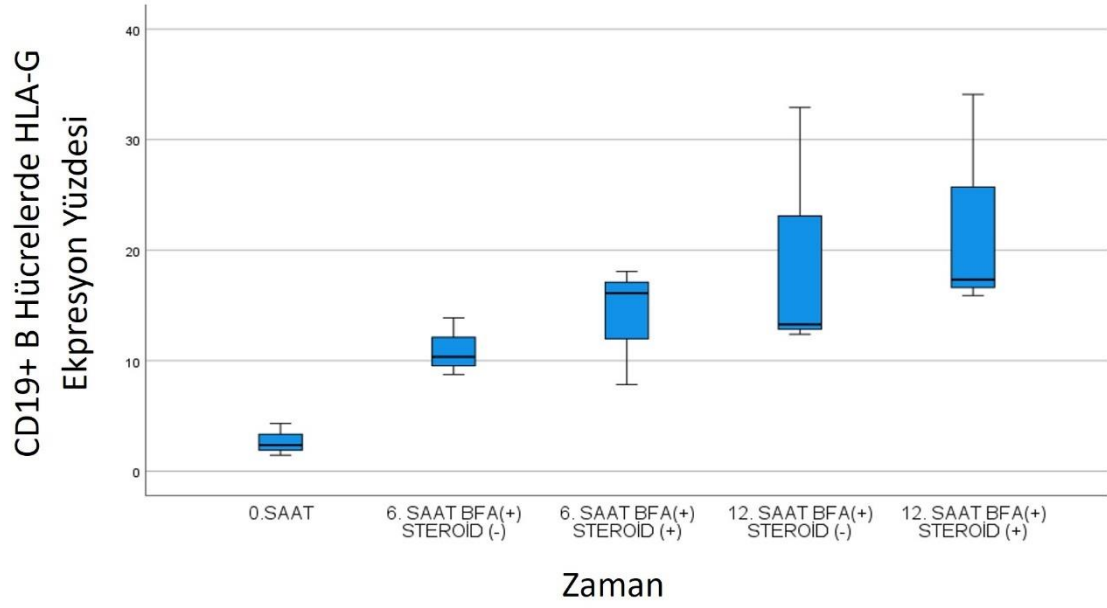
Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6.saat BFA (+) steroid (-), 6.saat BFA (+) steroid (+), 12. saat BFA (+) steroid (-) ve 12. saat BFA (+) steroid (+) flasklarına ait örneklerde CD19+ B hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında farklılık saptanmadı ($p=0,066$) (Tablo 4.29.). İstatistiksel olarak yapılan devam çalışmasında Durbin-Conover testi ile yapılan ikili karşılaştırma sonuçlarına göre CD19+ B hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun BFA varlığında steroid etkisinden bağımsız 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. saatte anlamlı olarak arttığı saptandı ($p=0.040$). Hem BFA hem de steroid varlığında CD19+ B hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. saatte anlamlı olarak arttığı saptandı (sırasıyla $p=0.011$, $p=0.001$) (Tablo 4.30.).

Tablo 4.29. BFA ve steroid muamelesinin CD19+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

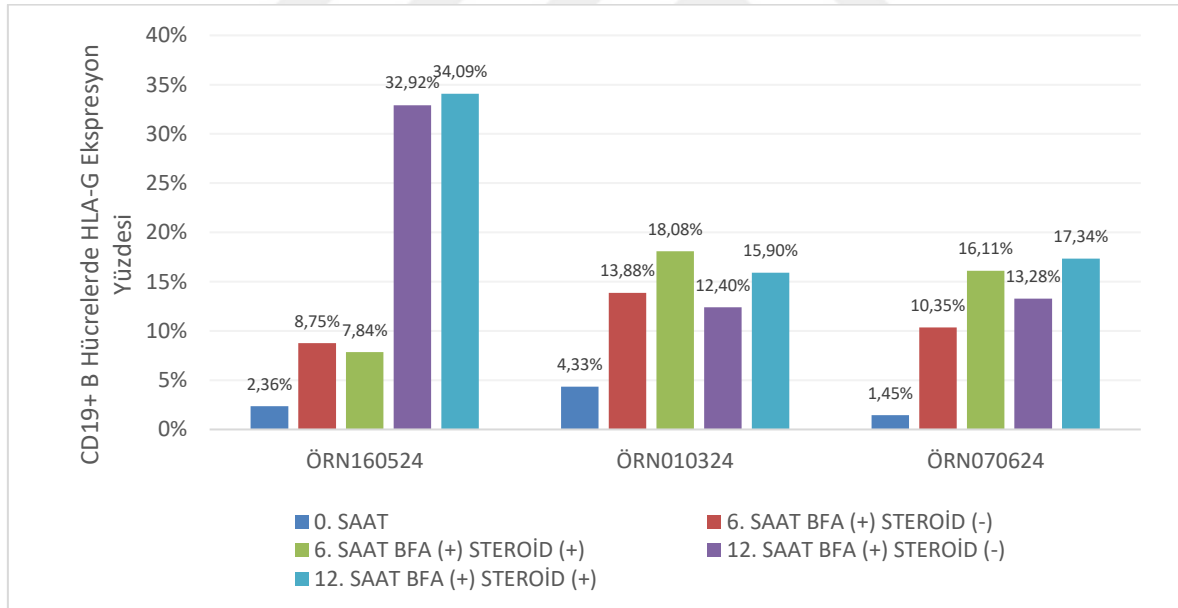
CD19+HLA-G	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0.SAAT	2,71	$\pm 1,47$	2,36	1,45	4,33	0,066
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	10,99	$\pm 2,62$	10,35	8,75	13,88	
6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	14,01	$\pm 5,43$	16,11	7,84	18,08	
12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	19,53	$\pm 11,60$	13,28	12,4	32,92	
12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	22,44	$\pm 10,11$	17,34	15,9	34,09	

Tablo 4.30. BFA ve steroid muamelesinin CD19+ HLA-G ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

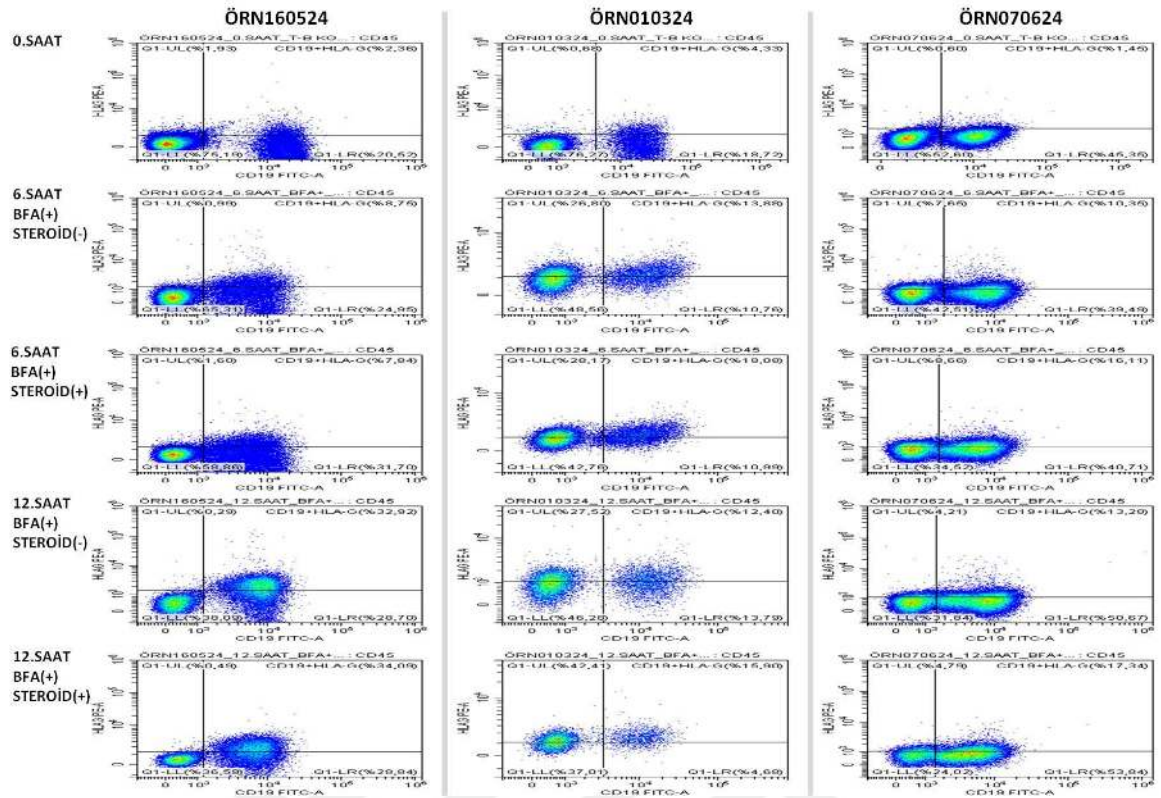
		İstatistik	p
0. SAAT	- 6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	2.041	0.076
0. SAAT	- 6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	3.266	0.011
0. SAAT	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	2.449	0.040
0. SAAT	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	4.491	0.002
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	1.225	0.256
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	0.408	0.694
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	2.449	0.040
6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	0.816	0.438
6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	1.225	0.256
12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	2.041	0.076



Grafik 4.29. BFA ve steroid muamelesinin CD19+HLA-G ekspresyonuna etkisi



Grafik 4.30. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait CD19+HLA-G ekspresyon oranları



Resim 4.15. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-G ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

4.2.2. Foliküler CD19+ B hücre yüzeyinde HLA-DR ekspresyonu

Foliküler B hücrelerde oluşturulan golgi stresinin CD19+ B hücre yüzeyinde HLA-DR ekspresyonuna etkisi

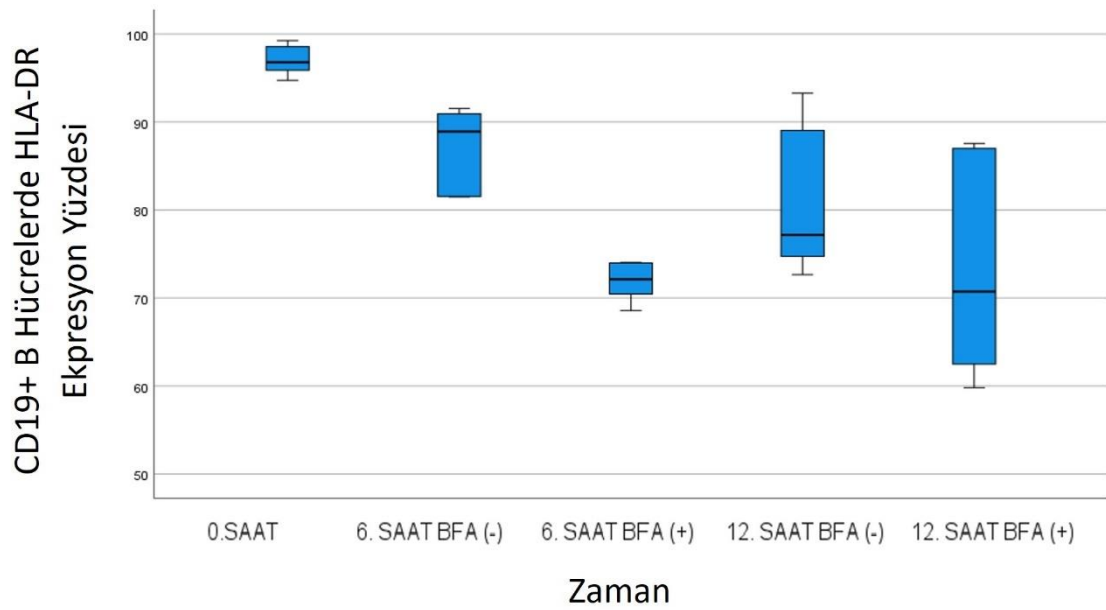
Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6.saat BFA (-), 6.saat BFA (+), 12. saat BFA (-) ve 12. saat BFA (+) flasklarına ait örneklerde CD19+ B hücre yüzeyindeki hücre yüzeyindeki HLA-DR ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p < 0,001$) (Tablo 4.31.). CD19+ B hücrelerin yüzeyindeki HLA-DR ekspresyonunun BFA etkisinden bağımsız zamana bağlı olarak (0.saat-6.saat için $p < .001$, 0.saat-12.saat için $p < .001$ ve 6.saat-12.saat için $p = 0.027$) azaldığı saptandı. CD19+ B hücrelerin yüzeyindeki HLA-DR ekspresyonu BFA etkisine bağlı olarak 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. saatte anlamlı olarak azaldığı saptandı (sırasıyla $p < .001$, $p < .001$). 6. ve 12. saatte BFA (-) grup ile BFA (+) karşılaştırıldığında CD19+HLA-DR yüzey ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı saptandı (sırasıyla $p < .001$, $p < .001$). (Tablo 4.32.).

Tablo 4.31. BFA muamelesinin CD19+ HLA-DR ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

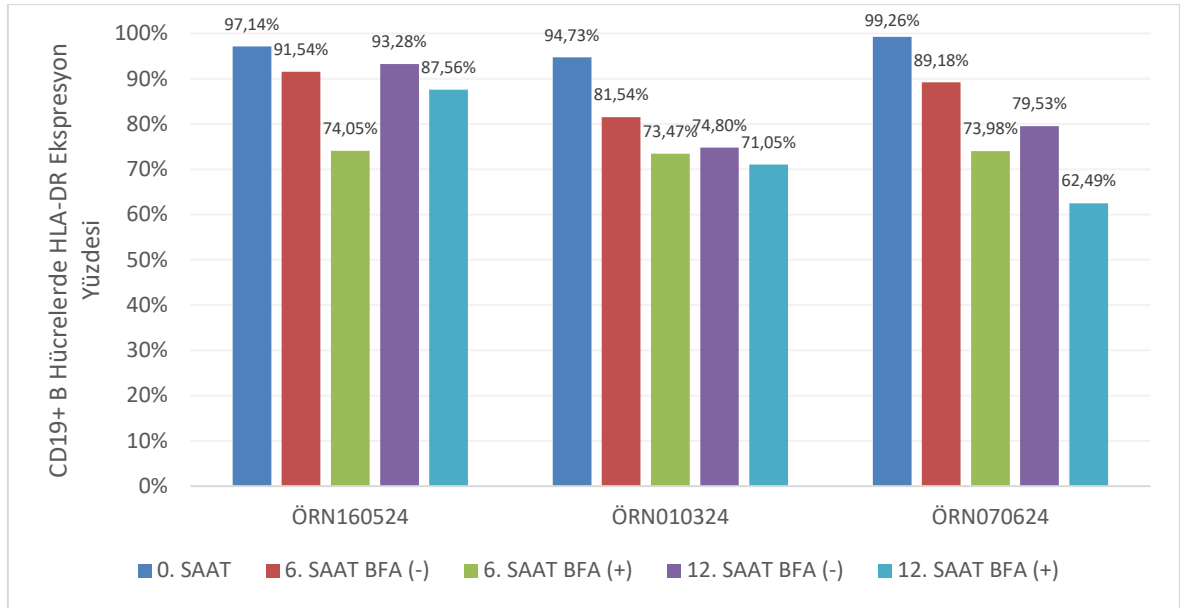
CD19+HLA-DR	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0.SAAT	97	±1,69	96,79	94,73	99,26	<0,001
6. SAAT BFA (-)	87,22	±4,55	88,92	81,48	91,54	
6. SAAT BFA (+)	71,89	±2,27	72,13	68,57	74,05	
12. SAAT BFA (-)	80,68	±8,53	77,16	72,67	93,28	
12. SAAT BFA (+)	73,06	±11,86	70,74	59,81	87,56	

Tablo 4.32. BFA muamelesinin CD19+ HLA-DR ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

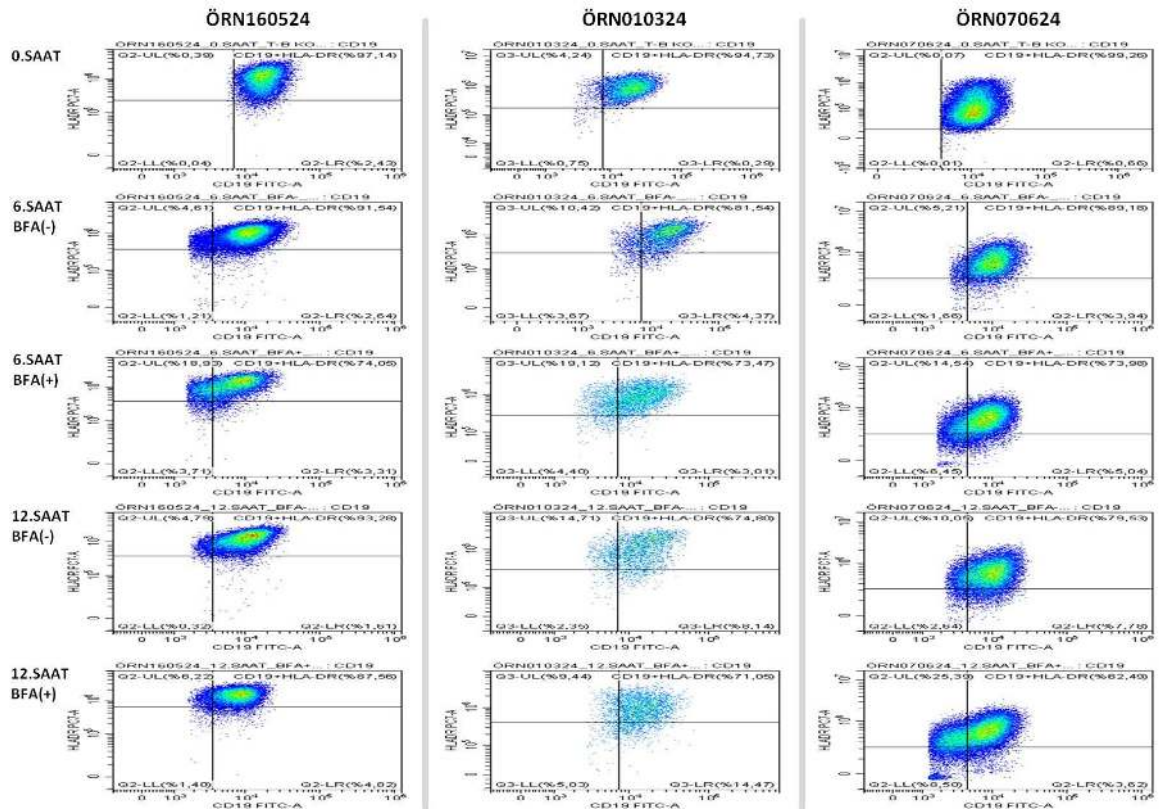
			İstatistik	p
0. SAAT	-	6. SAAT BFA (-)	4.18	<.001
0. SAAT	-	6. SAAT BFA (+)	12.55	<.001
0. SAAT	-	12. SAAT BFA (-)	6.57	<.001
0. SAAT	-	12. SAAT BFA (+)	12.55	<.001
6. SAAT BFA (-)	-	6. SAAT BFA (+)	8.37	<.001
6. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (-)	2.39	0.027
6. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (+)	8.37	<.001
6. SAAT BFA (+)	-	12. SAAT BFA (-)	5.98	<.001
6. SAAT BFA (+)	-	12. SAAT BFA (+)	0.00	1.000
12. SAAT BFA (-)	-	12. SAAT BFA (+)	5.98	<.001



Grafik 4.31. BFA muamelesinin CD19+ HLA-DR ekspresyonuna etkisi



Grafik 4.32. BFA muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-DR ekspresyon oranları



Resim 4.16. BFA muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-DR ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

Steroid muamelesinin foliküler CD19+ B hücre yüzeyinde HLA-DR ekspresyonuna etkisi

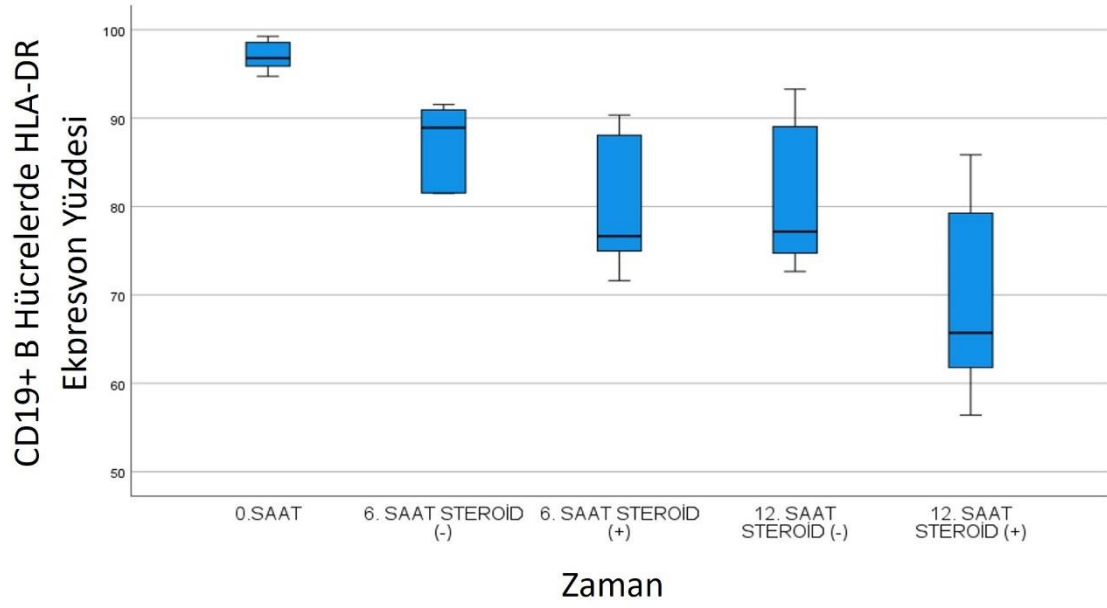
Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6.saat steroid (-), 6.saat steroid (+), 12. saat steroid (-) ve 12. saat steroid (+) flasklarına ait örneklerde CD19+ B hücre yüzeyindeki HLA-DR ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p<0,001$) (Tablo 4.33.). CD19+ B hücrelerin yüzeyindeki HLA-DR ekspresyonunun BFA etkisinden bağımsız zamana bağlı olarak (0.saat-6.saat için $p<.001$, 0.saat-12.saat için $p<.001$ ve 6.saat-12.saat için $p=0.002$) azaldığı saptandı. CD19+ B hücrelerin yüzeyindeki HLA-DR ekspresyonu BFA etkisine bağlı olarak 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. saatte anlamlı olarak azaldığı saptandı (sırasıyla $p<.001$, $p<.001$). 6. ve 12. saatte BFA (-) grup ile BFA (+) karşılaştırıldığında CD19+HLA-DR yüzey ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı saptandı (sırasıyla $p<.001$, $p<.001$) (Tablo 4.34.).

Tablo 4.33. Steroid muamelesinin CD19+ HLA-DR ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

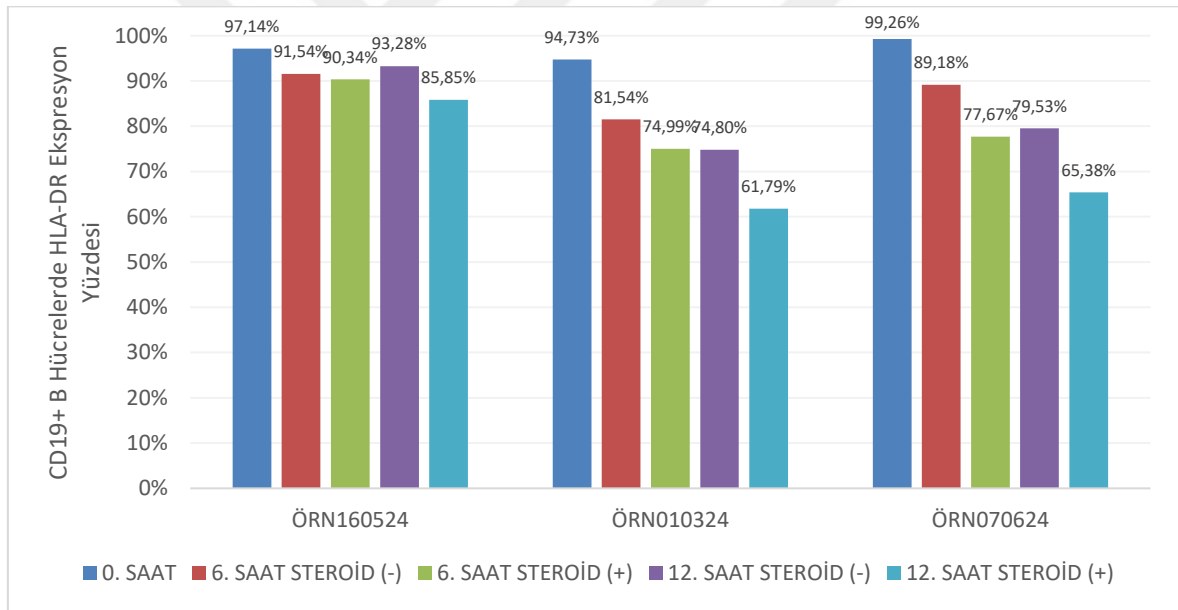
CD19+HLA-DR	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0.SAAT	97	$\pm 1,69$	96,79	94,73	99,26	<0,001
6. SAAT STEROİD (-)	87,22	$\pm 4,55$	88,92	81,48	91,54	
6. SAAT STEROİD (+)	79,72	$\pm 7,63$	76,66	71,62	90,34	
12. SAAT STEROİD (-)	80,68	$\pm 8,53$	77,16	72,67	93,28	
12. SAAT STEROİD (+)	69,12	$\pm 11,14$	65,71	56,42	85,85	

Tablo 4.34. Steroid muamelesinin CD19+ HLA-DR ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

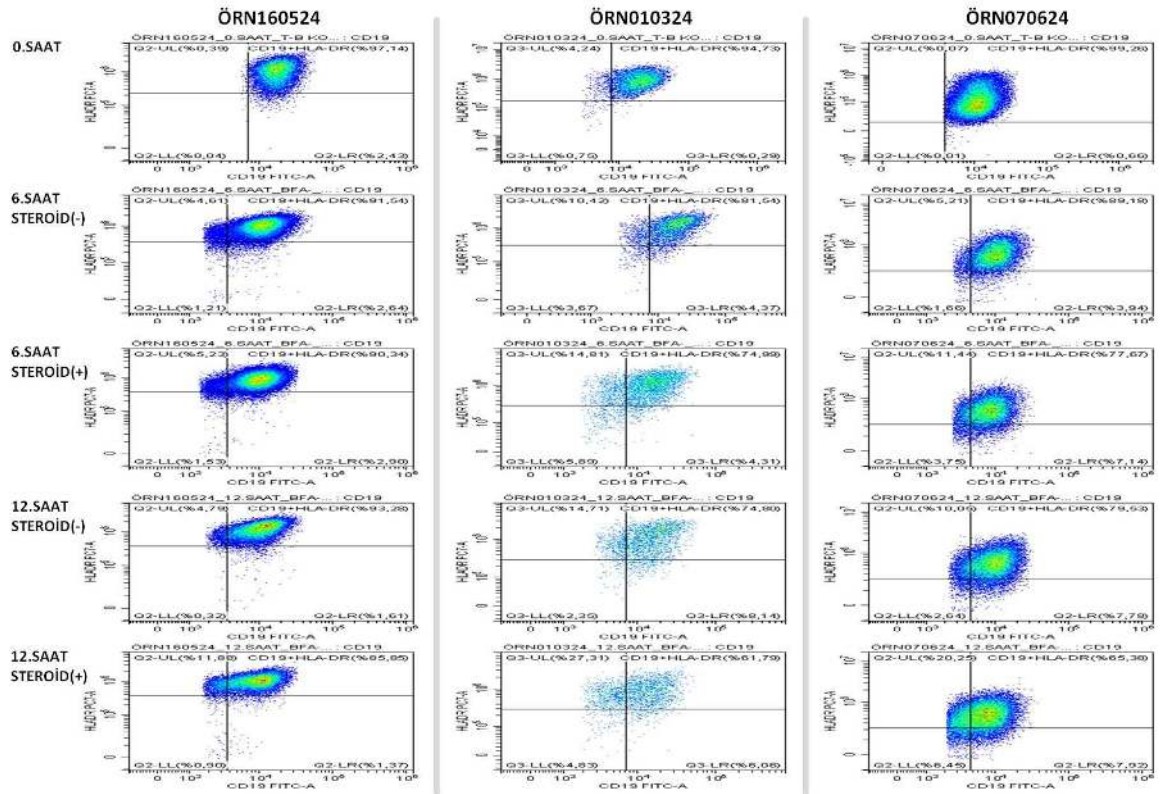
			İstatistik	p
0. SAAT	-	6. SAAT STEROİD (-)	4.04	<.001
0. SAAT	-	6. SAAT STEROİD (+)	9.24	<.001
0. SAAT	-	12. SAAT STEROİD (-)	7.51	<.001
0. SAAT	-	12. SAAT STEROİD (+)	13.86	<.001
6. SAAT STEROİD (-)	-	6. SAAT STEROİD (+)	5.20	<.001
6. SAAT STEROİD (-)	-	12. SAAT STEROİD (-)	3.46	0.002
6. SAAT STEROİD (-)	-	12. SAAT STEROİD (+)	9.81	<.001
6. SAAT STEROİD (+)	-	12. SAAT STEROİD (-)	1.73	0.099
6. SAAT STEROİD (+)	-	12. SAAT STEROİD (+)	4.62	<.001
12. SAAT STEROİD (-)	-	12. SAAT STEROİD (+)	6.35	<.001



Grafik 4.33. Steroid muamelesinin CD19+ HLA-DR ekspresyonuna etkisi



Grafik 4.34. Steroid muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-DR ekspresyon oranları



Resim 4.17. Steroid muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-DR ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

BFA ve steroid muamelesinin foliküler CD19+ B hücre yüzeyinde HLA-DR ekspresyonuna etkisi

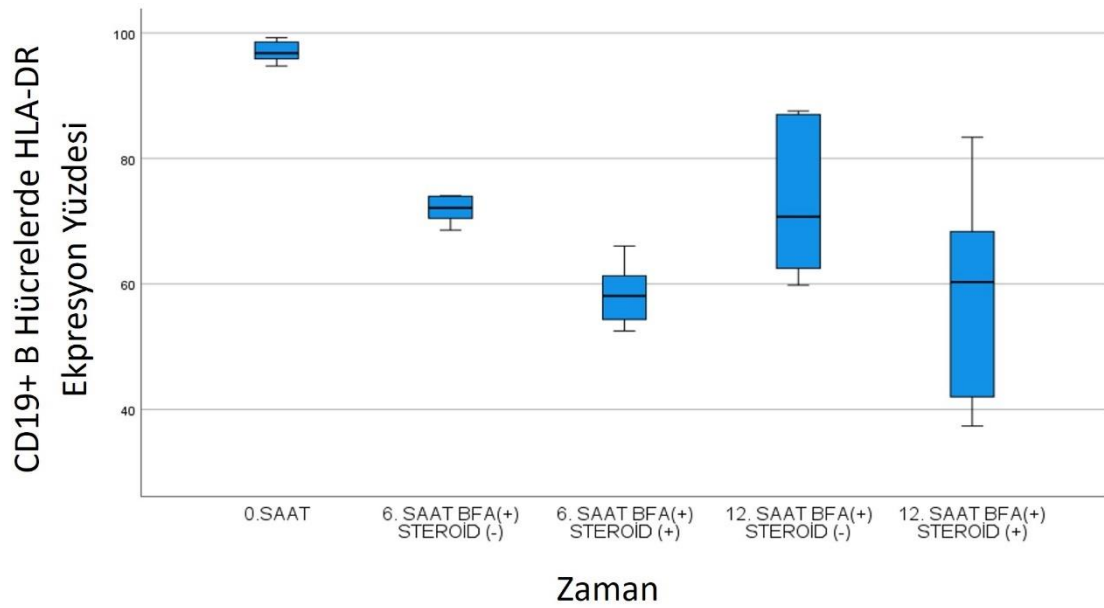
Çalışılan 3 farklı örneğin hücre kültüründe 0. saat, 6.saat BFA (+) steroid (-), 6.saat BFA (+) steroid (+), 12. saat BFA (+) steroid (-) ve 12. saat BFA (+) steroid (+) flasklarına ait örneklerde CD19+ B hücre yüzeyindeki HLA-DR ekspresyonu belirlendi. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p < 0,001$) (Tablo 4.35.). CD19+ B hücrelerin yüzeyindeki HLA-DR ekspresyonunun BFA varlığında steroid etkisinden bağımsız zamana bağlı olarak (0.saat-6.saat için $p < .001$ ve 0.saat-12.saat için $p = 0.001$) azaldığı saptandı. CD19+ B hücrelerin yüzeyindeki HLA-DR ekspresyonunun BFA varlığında steroid etkisine bağlı olarak azaldığı saptandı.

Tablo 4.35. BFA ve steroid muamelesinin CD19+ HLA-DR ekspresyonuna etkisi (Friedman testi)

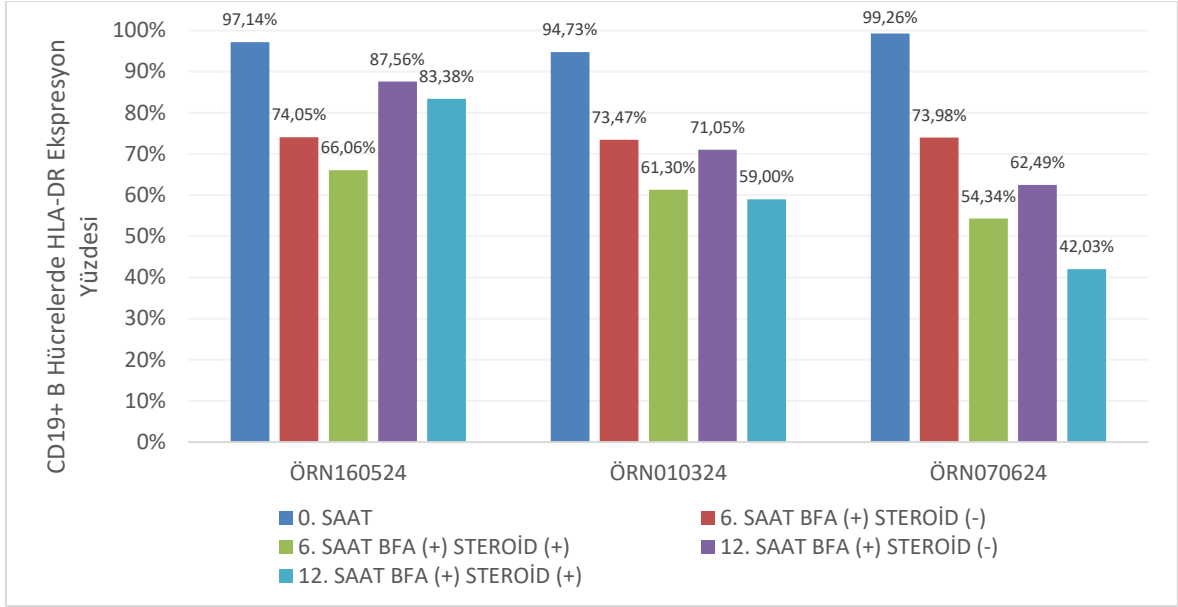
CD19+HLA-DR	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p
0.SAAT	97	±1,69	96,79	94,73	99,26	<0,001
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	71,89	±2,27	72,13	68,57	74,05	
6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	58,41	±5,02	58,11	52,53	66,06	
12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	73,06	±11,86	70,74	59,81	87,56	
12. SAAT BFA(+) STEROİD (+)	58,63	±16,99	60,31	37,37	83,38	

Tablo 4.36. BFA ve steroid muamelesinin CD19+ HLA-DR ekspresyonuna etkisi (İkili karşılaştırma Durbin-Conover testi)

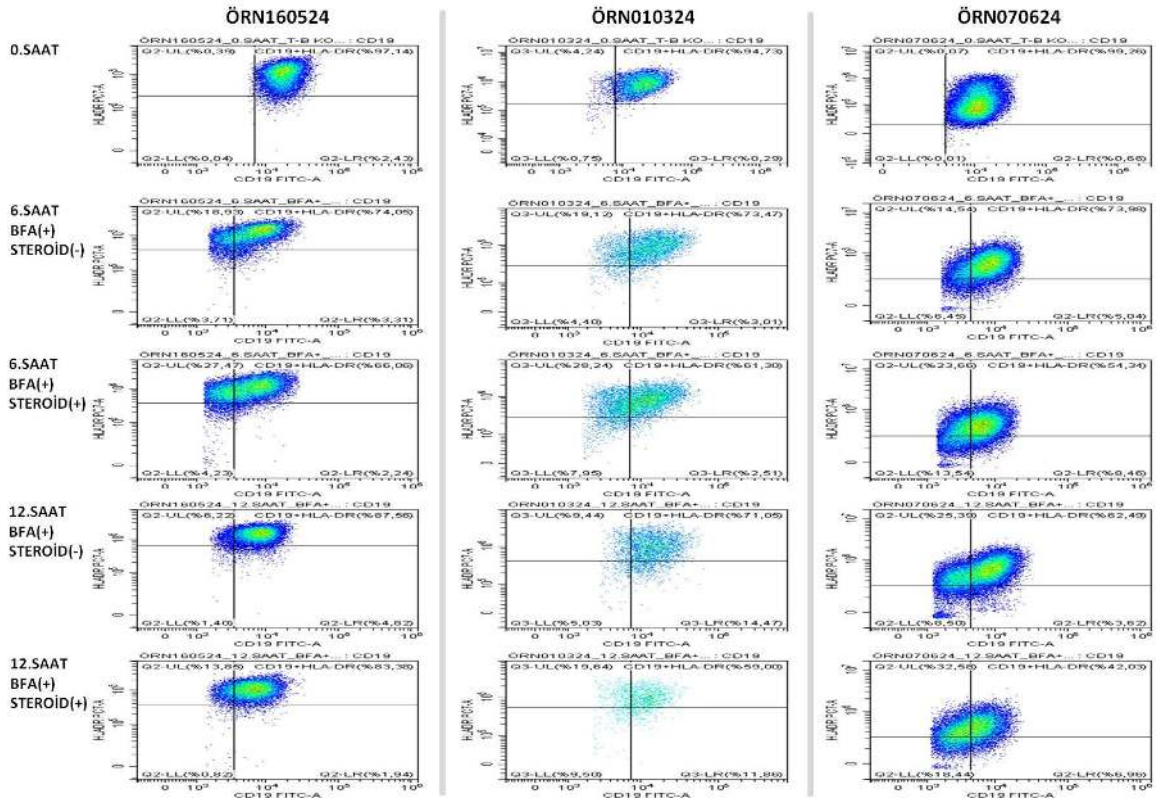
		İstatistik	p
0. SAAT	- 6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	4.152	<.001
0. SAAT	- 6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	8.720	<.001
0. SAAT	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	3.737	0.001
0. SAAT	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	8.305	<.001
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	4.568	<.001
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	0.415	0.682
6. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	4.152	<.001
6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	4.983	<.001
6. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	0.415	0.682
12. SAAT BFA (+) STEROİD (-)	- 12. SAAT BFA (+) STEROİD (+)	4.568	<.001



Grafik 4.35. BFA ve steroid muamelesinin CD19+HLA-DR ekspresyonuna etkisi



Grafik 4.36. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait CD19+HLA-DR ekspresyon oranları



Resim 4.18. BFA ve steroid muamelesinde örneklere ait CD19+ HLA-DR ekspresyon yüzdeleri akım sitometri görüntüleri

5. TARTIŞMA

Tezimde foliküler B hücrelerde meydana getirilen golgi stresi hem foliküler B hücre yüzeyinde hem de foliküler T hücre yüzeyinde bulunan HLA-G ekspresyona etkisi araştırıldı.

Foliküler B hücrelerde golgi stresi, fungal bir antibiyotik olan ve golginin yapısını bozarak proteinlerin hücre zarına taşınmasını bloke eden Brefeldin A (BFA) ile oluşturuldu. Golgi stresinin oluşumu akım sitometri yöntemiyle HLA-DR ekspresyonundaki değişimle ve immünohistokimya yöntemiyle anti-GM130 boyaması yapılarak floresan mikroskop ile gösterildi.

B hücreleri yüzeyinde bulunan ve MHC sınıf II ailesine ait olan HLA-DR molekülü B hücre aktivasyonunu gösteren bir molekül olup golgide antijeni yüklemeye hazır hale gelir. Çalıştığım 3 örnekte de BFA muamelesi sonrasında HLA-DR ekspresyonunun azaldığı belirlendi ve immünohistokimya yöntemiyle boyama ile golgi stresine bağlı olarak golginin normal şeklinin dağıldığı gösterildi. Bu iki bulgu B hücrelerde golgi stresinin meydana geldiğini gösterdi.

Brefeldin A ile muamele edilmiş foliküler B hücreler ile foliküler T hücre ko-kültürü oluşturuldu. Steroid etkisine bağlı değişiklikleri belirlemek amacıyla kültür ortamına steroid ilavesi yapıldı. Zamana bağlı (6/12/24. saat) immün fenotipleme çalışmasıyla her 3 örneğinde foliküler B (Bf) hücre ve T foliküler yardımcı (Tfh) hücre yüzey moleküllerinin ekspresyon oranları saptandı. Örneklerin 24. saat hücre yüzey moleküllerinin akım sitometri analizleri yapıldığında 24. saat hücre yüzey moleküllerinin ekspresyon oranlarının tekrar 0. saat hücre yüzey moleküllerinin ekspresyon oranlarına dönüştüğü saptandı. Bu nedenle istatistiksel analizler 0. saat, 6. saat ve 12. saat sonuçları ile yapıldı.

ÖRN160524, ÖRN010324 ve ÖRN070624 isimli örneklerin BFA etkisine bağlı olarak CD19+ Bf hücre yüzeyindeki hücre yüzeyindeki HLA-DR ekspresyonu belirlendi. BFA (-) grup ile karşılaştırıldığında BFA (+) grupta CD19+ Bf hücre yüzeyindeki HLA-DR ekspresyonunun istatistiksel olarak azaldığı saptandı ($p < 0,001$) (Tablo 4.31.). Örneklerle uygulanan BFA muamelesinin CD19+ Bf hücre yüzeyindeki HLA-DR ekspresyonu azalttığı

saptandı. Bu sonuç foliküler B hücrelerdeki golgi stresinin HLA-DR ekspresyonunu etkilediğini göstermektedir.

Foliküler B hücrelerde golgi stresinin ve steroid muamelesinin foliküler T hücre ve foliküler B hücre yüzeyinde bulunan ve bağışıklık yanıtını düzenlemede önemli bir role sahip olan HLA-G molekülünün ekspresyonuna etkisi araştırıldı.

ÖRN160524, ÖRN010324 ve ÖRN070624 isimli örneklerin BFA etkisine bağlı olarak CD19+ Bf hücre yüzeyindeki hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. BFA (-) grup ile karşılaştırıldığında BFA (+) grupta CD19+ Bf hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun istatistiksel olarak arttığı saptandı ($p=0,038$) (Tablo 4.25.). Örneklerle uygulanan BFA muamelesinin CD19+ Bf hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu arttırdığı saptandı. Bu sonuç foliküler B hücrelerdeki golgi stresinin HLA-G ekspresyonunu etkilediğini göstermektedir.

ÖRN160524, ÖRN010324 ve ÖRN070624 isimli örneklerin steroid etkisine bağlı olarak CD19+ Bf hücre yüzeyindeki hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Steroid (-) grup ile karşılaştırıldığında steroid (+) grupta CD19+ Bf hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun istatistiksel olarak arttığı saptandı ($p=0,043$) (Tablo 4.27.). CD19+ Bf hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu steroid etkisine bağlı olarak 0. saat ile karşılaştırıldığında 12. saatte arttığı saptandı ($p=0.002$) (Tablo 4.28.).

ÖRN160524, ÖRN010324 ve ÖRN070624 isimli örneklerin BFA ve steroid etkisine bağlı olarak CD19+ Bf hücre yüzeyindeki hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Hem BFA hem de steroid varlığında CD19+ Bf hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. saatte anlamlı olarak arttığı saptandı (sırasıyla $p=0.011$, $p=0.001$). (Tablo 4.30.).

Bu sonuçlara göre CD19+ Bf hücre yüzeyinde eksprese olan HLA-G molekülünün stres altında ve steroid muamelesi ile ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. Foliküler B hücre yüzeyinde artan HLA-G ekspresyonu B hücre aktivasyonunun baskılanması ve antikor oluşumuna katkı sağlayabileceği düşünülebilir.

Literatür taraması yapıldığında literatürde böyle bir çalışma ve sonuca rastlanmamıştır.

ÖRN160524, ÖRN010324 ve ÖRN070624 isimli örneklerin BFA etkisine bağlı olarak CD4+ T yardımcı hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. BFA (-) grup ile karşılaştırıldığında BFA (+) grupta CD4+ T hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun istatistiksel olarak arttığı saptandı ($p=0,004$) (Tablo 4.1.). Foliküler B hücrelere uygulanan BFA muamelesinin CD4+ T hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu arttırdığı saptandı. Bu sonuç B hücrelerdeki golgi stresinin HLA-G ekspresyonunu etkilediğini göstermektedir. CD4+ T hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu BFA etkisine bağlı olarak 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. saatte arttığı saptandı (sırasıyla $p<.001$, $p<.001$). 6. saatte BFA (-) grup ile BFA (+) karşılaştırıldığında CD4+HLA-G yüzey ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı saptandı ($p=0.011$) (Tablo 4.2.).

ÖRN160524, ÖRN010324 ve ÖRN070624 isimli örneklerin steroid etkisine bağlı olarak CD4+ T yardımcı hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Steroid (-) grup ile karşılaştırıldığında steroid (+) grupta CD4+ T hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun istatistiksel olarak arttığı saptandı ($p=0,034$) (Tablo 4.3.). CD4+ T hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu steroid etkisine bağlı olarak 0. saat ile karşılaştırıldığında 12. saatte arttığı saptandı ($p=0.015$) (Tablo 4.4.).

ÖRN160524, ÖRN010324 ve ÖRN070624 isimli örneklerin BFA ve steroid etkisine bağlı olarak CD4+ T yardımcı hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Hem BFA hem de steroid varlığında CD4+ T hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. saatte anlamlı olarak arttığı saptandı (sırasıyla $p=0.003$, $p<.001$). 12. saatte BFA varlığında CD4+HLA-G yüzey ekspresyonunun steroid etkisine bağlı olarak arttığı görüldü ($p=0.053$) (Tablo 4.6.).

Caroline Creput ve arkadaşları 40 kombine nakil hastasının böbrek ve karaciğer biyopsilerinde yaptıkları çalışma sonucunda steroid etkisinin HLA-G ekspresyonunu indüklediğini belirtmişlerdir (66). Nan Lu ve arkadaşları yaptıkları 66 renal nakil hastasının periferik tam kan T hücrelerindeki HLA-G çalışma sonuçlarına göre CD4+ T hücrelerde HLA-G ekspresyonunun renal akut rejeksiyon erken tanısı ve alıcıların immünosüpresif durumu için potansiyel bir belirteç olabileceğini söylemişlerdir (67).

ÖRN160524, ÖRN010324 ve ÖRN070624 isimli örneklerin BFA etkisine bağlı olarak CXCR5+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. BFA (-) grup ile

karşılaştırıldığında BFA (+) grupta CXCR5+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun istatistiksel olarak arttığı saptandı ($p=0,012$) (Tablo 4.7.).

ÖRN160524, ÖRN010324 ve ÖRN070624 isimli örneklerin steroid etkisine bağlı olarak CXCR5+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. CXCR5+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu steroid etkisine bağlı olarak 0. saat ile karşılaştırıldığında 12. saatte arttığı saptandı ($p=0.053$) (Tablo 4.10.).

ÖRN160524, ÖRN010324 ve ÖRN070624 isimli örneklerin BFA ve steroid etkisine bağlı olarak CXCR5+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. Hem BFA hem de steroid varlığında CXCR5+ hücrelerin yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu 0. saat ile karşılaştırıldığında 6. ve 12. saatte anlamlı olarak arttığı saptandı (sırasıyla $p<.001$, $p<.001$). 12. saatte BFA varlığında CXCR5+ HLA-G yüzey ekspresyonunun steroid etkisine bağlı olarak arttığı saptandı ($p=0.006$) (Tablo 4.12.).

Artan HLA-G molekül ekspresyonu Tfh hücrelerin kemotaksisini baskılayarak B hücre foliküllerine göç etmelerini engelleyecek ve B hücrelerinin antikor salgılan plazma hücresine dönüşmesini engelleyeceği düşünülmektedir.

ÖRN160524, ÖRN010324 ve ÖRN070624 isimli örneklerin BFA etkisine bağlı olarak ICOS+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonu belirlendi. BFA (-) grup ile karşılaştırıldığında BFA (+) grupta ICOS+ hücre yüzeyindeki HLA-G ekspresyonunun istatistiksel olarak arttığı saptandı ($p=0,043$) (Tablo 4.19.).

CD4+ T yardımcı hücre alt grubu olan T foliküler yardımcı hücreleri (Tfh), germinal merkez oluşumunda önemli rol oynarlar ve yüzeylerinde CXCR5, ICOS ve PD1 moleküllerini eksprese ederler (68). Bir kemokin reseptörü olan CXCR5 molekülü Tfh hücrelerin B hücre foliküllerine göç etmelerini sağlarlar (69). ICOS ekspresyonu germinal merkez oluşumu, bellek B hücre ve antikor salgılayan plazma hücresi gelişimi için önemlidir (45). Tfh hücreleri aşılarla karşı bağışıklık tepkileri, otoimmün hastalıklar, alerjiler, organ nakli ve kötü huylu tümörlere karşı koruyucu bağışıklık tepkilerinde önemli rol oynar (68). Tfh hücreleri B lenfositlerinin aktivasyonunda yer aldığından, otoimmün hastalıkların patogeneğinde merkezi bir rol oynayabilirler. Dolaşımdaki Tfh hücrelerinin sayısının artması ve Tfh hücrelerinin anormal aktivasyonu otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (70).

Nan Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada diyabetik nefropati tanılı hastaların tam kan örneklerinden akımsitometri yöntemi ile Tfh hücrelerin alt gruplarını çalışılmış ve diyabetik nefropati hastalarında CD4+CXCR5+PD-1+ Tfh hücrelerinin sayısında bir artış saptanmıştır (71).

2023 yılında ise diyabetik retinopati hastaları ile yapılan bir başka çalışmada dolaşımdaki CD4+ CXCR5+PD-1+ Tfh hücrelerinin sayısında sağlıklı gruba göre belirgin bir artış saptanmış (70).

Yapılan bir çalışmada IgA nefropatisi tanısı almış hastalarda CD4+CXCR5+ Tfh hücrelerinin alt grupları çalışılmış. Sağlıklı kontrol ile karşılaştırıldığında CD4+CXCR5+, CD4+CXCR5+ICOS+, CD4+CXCR5+PD-1+ Tfh hücrelerinin yüzdeleri anlamlı derece yüksek bulunmuş. Prednizon tedavisi gören hastalarda ise CD4+CXCR5+, CD4+CXCR5+PD-1+ Tfh hücrelerin sıklığının önemli ölçüde azaldığı saptanmış (72). Steroid tedavisi ile hastalarda CD4+CXCR5+ Tfh hücrelerin sıklığının azalması bizim sonuçlarımızla uyumlu çıktı.

Rejeksiyon tanısı olan ve olmayan böbrek nakli alıcılarında yapılan bir çalışmada farklı Tfh ve B hücresi alt gruplarının sayısını tespit etmeyi amaçlamışlar. Nakil sonrası rejeksiyon öyküsü olan hastalarda dolaşımda CD4+CXCR5+, CD4+CXCR5+ICOS+, CD4+CXCR5+PD-1+, CD4+CXCR5+IL-21+ Tfh, CD19+CD86+ ve CD19+CD86+CD38+ B hücrelerinin sayıları ve serum IL-21 düzeyi nakil öncesine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş. Dolaşımdaki Tfh hücrelerinin, B hücrelerini aktive ederek B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmasını desteklemesi hastalığın ilerlemesine neden olacaktır (73).

Böbrek nakli yapılan hastalardan oluşan prospektif bir başka çalışmada dolaşımdaki Tfh'lerin antikor aracılı reddin oluşumuyla ilişkisini araştırmışlar ve CXCR5+PD1+ICOS+ dolaşımdaki Tfh hücrelerin nakil sonrasında de novo donöre özgü anti-HLA antikorlarla ilişkili olduğunu bulmuşlar (74).

Sonuç olarak golgi stresine bağlı foliküler B hücrelerin yüzeyinde HLA-DR ekspresyonunu azaldığı ve CD19+ HLA-G hücre grubunun oranlarının arttığı saptanmıştır. Bununla birlikte B hücrelerindeki golgi stresi ve steroid etkisi Tfh hücre yüzeyinde fenotip

değişimine neden olduğu ve Tfh hücrelerin yüzeyinde bulunan HLA-G ekspresyonunun arttığı saptanmıştır.



KAYNAKLAR

1. Abul K. Abbas AHL and SP. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. SEVENTH EDITION. 2024.
2. Abul K. Abbas MBBS, Andrew H. Lichtman MD, PhD and Shiv Pillai MBBS P. Cellular and Molecular Immunology. Tenth Edit. 2022.
3. LaRosa DF, Orange JS. 1. Lymphocytes. Journal of Allergy and Clinical Immunology. Şubat 2008;121(2 SUPPL. 2).
4. Boehm T, Bleul CC. The evolutionary history of lymphoid organs. Nat Immunol. Şubat 2007;8(2):131-5.
5. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. C. 5, Nature Reviews Immunology. 2005. s. 606-16.
6. Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure and function of the immune system in the spleen. C. 4, Science Immunology. American Association for the Advancement of Science; 2019.
7. Nolte MA, 'T Hoen ENM, Van Stijn A, Kraal G, Mebius RE. Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments. Eur J Immunol. 2000;30(2):626-34.
8. Nolte MA, Beliën JAM, Schadee-Eestermans I, Jansen W, Unger WWJ, Van Rooijen N, vd. A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp. Journal of Experimental Medicine. 04 Ağustos 2003;198(3):505-12.
9. Calabro S, Liu D, Gallman A, Nascimento MSL, Yu Z, Zhang T ting, vd. Differential Intrasplenic Migration of Dendritic Cell Subsets Tailors Adaptive Immunity. Cell Rep. 30 Ağustos 2016;16(9):2472-85.

10. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. C. 357, Lancet. Elsevier B.V.; 2001. s. 1777-89.
11. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD, vd. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. Nature [Internet]. 2000;406(6793):309-14. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/35018581>
12. Pereira JP, Kelly LM, Jason JGC. Finding the right niche: B-cell migration in the early phases of T-dependent antibody responses. Int Immunol. 2010;22(6):413-9.
13. Huang C. Germinal Center Reaction. İçinde: Wang JY, editör. B Cells in Immunity and Tolerance [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2020. s. 47-53. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/978-981-15-3532-1_4
14. Gatto D, Brink R. The germinal center reaction. C. 126, Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2010. s. 898-907.
15. Kwun J, Manook M, Page E, Burghuber C, Hong J, Knechtle SJ. Crosstalk between T and B Cells in the Germinal Center after Transplantation. C. 101, Transplantation. Lippincott Williams and Wilkins; 2017. s. 704-12.
16. Liu X, Liu B, Qi H. Germinal center reaction and output: recent advances. C. 82, Current Opinion in Immunology. Elsevier Ltd; 2023.
17. Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. C. 45, Immunity. Cell Press; 2016. s. 471-82.
18. Allen CDC, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, vd. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. Nat Immunol. Eylül 2004;5(9):943-52.
19. Heesters BA, Myers RC, Carroll MC. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. Nat Rev Immunol [Internet]. 2014;14(7):495-504. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/nri3689>

20. Wan Z, Lin Y, Zhao Y, Qi H. TFH cells in bystander and cognate interactions with B cells. C. 288, Immunological Reviews. Blackwell Publishing Ltd; 2019. s. 28-36.
21. Papa I, Vinuesa CG. Synaptic interactions in germinal centers. C. 9, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2018.
22. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. J Leukoc Biol [Internet]. 01 Ocak 2000;67(1):2-17. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1002/jlb.67.1.2>
23. Luo W, Weisel F, Shlomchik MJ. B Cell Receptor and CD40 Signaling Are Rewired for Synergistic Induction of the c-Myc Transcription Factor in Germinal Center B Cells. Immunity. 20 şubat 2018;48(2):313-326.e5.
24. Liu D, Xu H, Shih C, Wan Z, Ma X, Ma W, vd. T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. Nature. 08 Ocak 2015;517(7533):214-8.
25. Shi J, Hou S, Fang Q, Liu X, Liu X, Qi H. PD-1 Controls Follicular T Helper Cell Positioning and Function. Immunity. 21 Ağustos 2018;49(2):264-274.e4.
26. Kerfoot SM, Yaari G, Patel JR, Johnson KL, Gonzalez DG, Kleinstein SH, vd. Germinal Center B Cell and T Follicular Helper Cell Development Initiates in the Interfollicular Zone. Immunity. 24 Haziran 2011;34(6):947-60.
27. Gars E, Butzmann A, Ohgami R, Balakrishna JP, O'Malley DP. The life and death of the germinal center. C. 44, Annals of Diagnostic Pathology. W.B. Saunders; 2020.
28. Crotty S. Follicular Helper CD4 T cells (T FH). Annu Rev Immunol. 23 Nisan 2011;29:621-63.
29. Clement RL, Daccache J, Mohammed MT, Diallo A, Blazar BR, Kuchroo VK, vd. Follicular regulatory T cells control humoral and allergic immunity by restraining early B cell responses. Nat Immunol. 01 Ekim 2019;20(10):1360-71.

30. Sage PT, Sharpe AH. T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. C. 36, Trends in Immunology. Elsevier Ltd; 2015. s. 410-8.
31. Shinnakasu R, Inoue T, Kometani K, Moriyama S, Adachi Y, Nakayama M, vd. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. Nat Immunol. 21 Haziran 2016;17(7):861-9.
32. Suan D, Sundling C, Brink R. Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center. C. 45, Current Opinion in Immunology. Elsevier Ltd; 2017. s. 97-102.
33. Althwaiqeb SA, Bordoni B. Histology, B Cell Lymphocyte [Internet]. 2024 [a.yer 02 Eylül 2024]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560905/>
34. Wang Y, Liu J, Burrows PD, Wang JY. B Cell Development and Maturation. İçinde: Wang JY, editör. B Cells in Immunity and Tolerance [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2020. s. 1-22. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/978-981-15-3532-1_1
35. Akkaya M, Pierce SK. From zero to sixty and back to zero again: the metabolic life of B cells. C. 57, Current Opinion in Immunology. Elsevier Ltd; 2019. s. 1-7.
36. Ghosh D, Jiang W, Mukhopadhyay D, Mellins ED. New insights into B cells as antigen presenting cells. Curr Opin Immunol. 2021;70:129-37.
37. Karahan GE, Claas FHJ, Heidt S. B Cell Immunity in Solid Organ Transplantation. Front Immunol. 10 Ocak 2017;7:686.
38. Adler LN, Jiang W, Bhamidipati K, Millican M, Macaubas C, Hung S chen, vd. The Other Function: Class II-Restricted Antigen Presentation by B Cells . C. 8, Frontiers in Immunology . 2017.
39. Paquin Proulx D, Aubin É, Lemieux R, Bazin R. Inhibition of B cell-mediated antigen presentation by intravenous immunoglobulins (IVIg). Clinical Immunology. 2010;135(3):422-9.

40. Kwun J, Manook M, Page E, Burghuber C, Hong J, Knechtle SJ. Crosstalk Between T and B Cells in the Germinal Center After Transplantation. *Transplantation*. Nisan 2017;101(4):704-12.
41. Zhu J. T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 01 Ekim 2018;10(10):a030338.
42. Hoefig KP, Heissmeyer V. Posttranscriptional regulation of T helper cell fate decisions. *J Cell Biol*. 2018/04/23. 06 Ağustos 2018;217(8):2615-31.
43. Cicalese MP, Salek-Ardakani S, Fousteri G. Editorial: Follicular Helper T Cells in Immunity and Autoimmunity. *Front Immunol*. 29 Mayıs 2020;11:1042.
44. Eivazi S, Bagheri S, Hashemzadeh MS, Ghalavand M, Qamsari ES, Dorostkar R, vd. Development of T follicular helper cells and their role in disease and immune system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;84:1668-78.
45. Rasheed AU, Rahn HP, Sallusto F, Lipp M, Müller G. Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5hiICOShi CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *Eur J Immunol*. 01 Temmuz 2006;36(7):1892-903.
46. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*. 2013;38(3):414-23.
47. Bertaina A, Andreani M. Major Histocompatibility Complex and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Beyond the Classical HLA Polymorphism. *Int J Mol Sci*. 22 Şubat 2018;19(2):621.
48. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, vd. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*. 2004;5(12):889-99.
49. Gruen JR, Weissman SM. Human MHC class III and IV genes and disease associations. *Front Biosci*. Ağustos 2001;6:D960-72.

50. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, vd. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol.* 17 Mart 2017;8:292.
51. Klein J, Sato A. The HLA System. *New England Journal of Medicine.* 07 Eylül 2000;343(10):702-9.
52. Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(12):823-36.
53. Arnaiz-Villena A, Juarez I, Suarez-Trujillo F, López-Nares A, Vaquero C, Palacio-Gruber J, vd. HLA-G: Function, polymorphisms and pathology. *Int J Immunogenet.* 01 Nisan 2021;48(2):172-92.
54. Landsverk OJB, Bakke O, Gregers TF. MHC II and the Endocytic Pathway: Regulation by Invariant Chain. *Scand J Immunol.* 01 Eylül 2009;70(3):184-93.
55. Kotsias F, Cebrian I, Alloatti A. Chapter Two - Antigen processing and presentation. İçinde: Lhuillier C, Galluzzi LBTIR of C and MB, editörler. *Immunobiology of Dendritic Cells Part A.* Academic Press; 2019. s. 69-121.
56. Mellins ED, Stern LJ. HLA-DM and HLA-DO, key regulators of MHC-II processing and presentation. *Curr Opin Immunol.* 2013/12/08. Şubat 2014;26:115-22.
57. Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011;11(12):823-36. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1038/nri3084>
58. Li J, Ahat E, Wang Y. Golgi structure and function in health, stress, and diseases. İçinde: *Results and Problems in Cell Differentiation.* Springer Verlag; 2019. s. 441-85.

59. Kulkarni-Gosavi P, Makhoul C, Gleeson PA. Form and function of the Golgi apparatus: scaffolds, cytoskeleton and signalling. C. 593, FEBS Letters. Wiley Blackwell; 2019. s. 2289-305.
60. Agliarulo I, Parashuraman S. Golgi Apparatus Regulates Plasma Membrane Composition and Function. C. 11, Cells. MDPI; 2022.
61. Sasaki K, Yoshida H. Golgi stress response and organelle zones. C. 593, FEBS Letters. Wiley Blackwell; 2019. s. 2330-40.
62. Mitchell SB, Iwabuchi S, Kawano H, Yuen TMT, Koh JY, Ho KWD, vd. Structure of the Golgi apparatus is not influenced by a GAG deletion mutation in the dystonia-associated gene Tor1a. PLoS One. 07 Kasım 2018;13(11):e0206123-e0206123.
63. Chardin P, McCormick F. Brefeldin A: The Advantage Minireview of Being Uncompetitive of brefeldin A action might have important implications for drug discovery. By what mechanism does brefeldin A inhibit Arf1 ex. C. 97, Cell. 1999.
64. Nilsson T, Lucocq JM, Mackay D, Warren G. The membrane spanning domain of beta-1,4-galactosyltransferase specifies trans Golgi localization. EMBO J. Aralık 1991;10(12):3567-75.
65. Thibodeau J, Bourgeois-Daigneault MC, Lapointe R. Targeting the MHC Class II antigen presentation pathway in cancer immunotherapy. Oncoimmunology. 01 Eylül 2012;1(6):908-16.
66. Créput C, Durrbach A, Menier C, Guettier C, Samuel D, Dausset J, vd. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. J Hepatol [Internet]. 2003;39(4):587-94. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827803003544>

67. Lu N, Zhang Y, Zou X, Yang X, Tian J, Zhen J, vd. HLA-G on peripheral blood CD4+ T lymphocytes: a potential predictor for acute renal rejection. *Transplant International* [Internet]. 01 Kasım 2011;24(11):1103-11. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2011.01314.x>
68. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* [Internet]. 2019;50(5):1132-48. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761319301918>
69. Schmitt N, Bentebibel SE, Ueno H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunol* [Internet]. 2014;35(9):436-42. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490614001069>
70. Xiang X, Huang X, Zhang Z, Gu J, Huang Z, Jiang T. Dysregulation of circulating CD4 + CXCR5 + PD-1+ T cells in diabetic retinopathy. *J Diabetes Complications* [Internet]. 2023;37(3):108420. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056872723000181>
71. Zhang N, Tai J, Qu Z, Zhang Z, Zhao S, He J, vd. Increased CD4+CXCR5+T follicular helper cells in diabetic nephropathy. *Autoimmunity* [Internet]. 17 Ağustos 2016;49(6):405-13. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1080/08916934.2016.1196677>
72. Zhang L, Wang Y, Shi X, Zou H, Jiang Y. A higher frequency of CD4+CXCR5+ T follicular helper cells in patients with newly diagnosed IgA nephropathy. *Immunol Lett* [Internet]. 2014;158(1):101-8. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247813002095>
73. Liu J, Tang T, Qu Z, Wang L, Si R, Wang H, vd. Elevated number of IL-21+ TFH and CD86+CD38+ B cells in blood of renal transplant recipients with AMR under conventional immuno-suppression. *Int J Immunopathol Pharmacol* [Internet]. 10 Ocak 2022;36:20587384211048028. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1177/20587384211048027>

74. Danger R, Chesneau M, Delbos F, Le Bot S, Kerleau C, Chenouard A, vd. CXCR5+PD1+ICOS+ Circulating T Follicular Helpers Are Associated With de novo Donor-Specific Antibodies After Renal Transplantation. *Front Immunol* [Internet]. 2019;10. Erişim adresi: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.02071>

1

