

**TC.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TİP-1 YARDIMCI T (Th1) HÜCRELERİN
RADYASYON STRESİ ALTINDA FONKSİYONEL
ve FENOTİPİK DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ**

Uzm. Bio. Anıl IŞIK

**TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ankara
2022**

TC.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİP-1 YARDIMCI T (Th1) HÜCRELERİN
RADYASYON STRESİ ALTINDA FONKSİYONEL
ve FENOTİPİK DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ**

Uzm. Bio. Anıl IŞIK

**TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI**

**Ankara
2022**

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TİP-1 YARDIMCI T (Th1) HÜCRELERİN RADYASYON STRESİ ALTINDA
FONKSİYONEL VE FENOTİPİK DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ
Öğrenci: Anıl Işık
Danışman: Prof. Dr. Güneş Esendağlı
İkinci Danışman: -

Bu tez çalışması 16.06.2022 tarihinde jürimiz tarafından "Tümör Biyolojisi ve İmmünoloji Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Gözde Yazıcı* (imza)
Hacettepe Üniversitesi

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Güneş Esendağlı* (imza)
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. İ. Çağatay Karaaslan* (imza)
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Doç. Dr. İrem Doğan Turaçlı* (imza)
Ufuk Üniversitesi

Üye: *Dr. Öğr. Üyesi. Neşe Ünver* (imza)
Hacettepe Üniversitesi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

04 Temmuz 2022

(imza)

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü/fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir⁽¹⁾.
- Enstitü/fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir⁽²⁾.
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir⁽³⁾.

04/07/2022

(imza)

Anıl IŞIK

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” Madde 6.

- (1) *Madde 6.1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
 - (2) *Madde 6.2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ay aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
 - (3) *Madde 7.1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.*
- Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.*
- * Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışma kapsamındaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

Anıl IŞIK*(imza)*

TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programında aldığım yüksek lisans eğitimim kapsamında danışmanlık görevini üstlenmesiyle birlikte akademik kariyerime bulunduğu katkılardan dolayı Prof. Dr. Güneş Esendağlı'ya çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecim boyunca öğretim hayatıma buldukları katkıları ve destekleri için Prof. Dr. Lale Doğan, Doç. Dr. Füsün Özmen, Doç. Dr. Hande Canpınar, Doç. Dr. Gürcan Günaydın, Dr. Öğr. Üyesi Begüm Kocatürk, Dr. Öğr. Üyesi Güneş Dinç Akbulut'a çok teşekkür ederim. Tez çalışmam kapsamında yaptığım çalışmalara desteklerinden dolayı Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Gözde Yazıcı ve Dr. Fazlı Yağız Yedekçi'ye çok teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim sürecinde birlikte çalışma fırsatı bulduğum, bana öğrenim hayatım için çok şey katan ve arkadaşlıklarıyla yanımda olan Sibel Gökşen, Sefa Özdemir, Ali Mert Sencer, Ece Tavukçuoğlu, Feyza Gül Özbay, İzel Yılmaz, Mubaida Parveen, Süleyman Can Öztürk, Hatice Toprak, Emre Gedik, Ceren Narin ve Melek Günindi Korkut'a teşekkürlerimi iletirim.

Yüksek lisans tez çalışmam kapsamında deneysel sürecim ve akademik bilgilerimin gelişmesine büyük katkıda bulunan Dr. Utku Horzum'a teşekkür ederim.

Gülüşiyle hayatıma ışık tutan, bakışlarıyla bana huzur veren, sevgisiyle içimi ısıtan ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim biricik yol arkadaşım Öykü Ersoy'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca attığım her adımda desteklerini hissettiğim, maddi manevi her anlamda hayatıma dokunuşları olan, aldığım her kararda gururla arkamda duran sevgili ablalarım, Gamze Varan ve Gizem Işık Kapucu'ya, babam Yaşar Işık'a ve varlığını her zaman yanımda hissettiğim sevgili annem Sevim Işık'a sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım. Ayrıca bu süreçte bana moral desteği olan, yüzümü güldüren, sevgiyi en içten hissettiren biricik yeğenlerim Defne Varan ve Ediz Aslan Kapucu'ya sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Aileme...

ÖZET

Işık A., Tip-1 Yardımcı T (Th1) Hücrelerin Radyasyon Stresi Altında Fonksiyonel ve Fenotipik Değişimlerinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Tümör mikroçevresindeki immün baskılayıcı ortam nedeniyle, anti-tümör yanıtta öncül rol alan T lenfositlerin fonksiyonel ve fenotipik durumundaki değişimlerin anlaşılması önemlidir. Kanser gibi kronik inflamasyonda T hücreler, yüksek inhibitör reseptör ifade eden yorulmuş fenotipte ve fonksiyonunu kaybetmiş hücrelere farklılaşabilmektedir. Yorulmuş T hücrelerin efektör fonksiyonları inhibitör reseptörlerin blokajı yardımıyla geri kazandırılabilir. Radyoterapi ve blokaj tedavisi ise anti-tümör immün yanıtları artırabilecek bir kombinasyon olarak ön görülmektedir. Bu *in vitro* tez çalışması kapsamında, THR sinyali anti-CD3 monoklonal antikoru ile ve ko-stimülasyon ise bir monositik hücre hattı aracılığıyla sağlanmış; bu sayede, CD4⁺ yardımcı T hücreler sürekli olarak uyarılmıştır. Kullanılan ko-kültür modelinin farklı inkübasyon sürelerinde (0, 24, 72 ve 120 saat), farklı fenotiplerdeki T hücrelerin farklı dozlarda (0 Gy, 2 Gy, 5 Gy, 8 Gy ve 12 Gy) radyasyon stresi altında fonksiyonel ve fenotipik değişimleri incelenmiştir. Naif CD4⁺ T lenfositlerin uyarımla birlikte IL-2, IFN- γ ve TNF- α üreten efektör hücrelere farklılaştığı; ardından, yüksek düzeyde inhibitör reseptör ifade eden ve sitokin üretimi azalmış, yorulmuş hafıza-benzeri T hücrelere dönüştüğü görülmüştür. Hücrelerin en radyosensitif olduğu uyarım periyodunun, apoptotik düzey ve DNA kırık sayıları hesaplanarak 72. saat olduğu ve efektör T lenfositler ile efektör hafıza-benzeri T lenfositlerin en hassas alt gruplar olduğu bulunmuştur. Radyasyona en dirençli alt tipler ise naif T ve merkezi hafıza benzeri T lenfositler olmuştur. Radyasyonun Th hücrelerde mitokondri membran potansiyelini değiştirmediği görülmüştür. Radyasyon maruziyeti öncesinde uygulanan anti-PD-1 blokajının ise Th1 hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, Th1 hücrelerinin PD-1 blokajı ile yeniden fonksiyon kazanma sürecinde radyasyon hassasiyeti göstermediği değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: T lenfosit aktivasyonu, CD4⁺ T hücre, radyoimmünoterapi, γ -H2AX, mitokondriyal membran potansiyeli.

ABSTRACT

Işık A., Determination of Functional and Phenotypical Alteration in Type-1 Helper T (Th1) Cells Under Radiation Stress, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Tumor Biology and Immunology Program Master of Science Thesis, Ankara, 2022. It's critical to understand changes in the functional and phenotypic status of T cells, which play a key role in the anti-tumor response due to the immunosuppressive environment in the tumor microenvironment. In chronic inflammation such as cancer, T cells can differentiate into dysfunctional exhausted phenotype cells and express high inhibitory receptors. Effector functions of exhausted T cells can be restored with the help of blockade of inhibitory receptors. On the other hand, a combination of radiotherapy and blockade therapy is predicted to enhance anti-tumor immune responses. Within the scope of this in vitro thesis study, THR signal was provided by an anti-CD3 monoclonal antibody and co-stimulation was provided by a monocytic cell line, resulting in continual stimulation of CD4⁺ helper T cells. Functional and phenotypic changes of T cells of different phenotypes under radiation stress at different doses (0 Gy, 2 Gy, 5 Gy, 8 Gy, and 12 Gy) were investigated at different incubation times (0, 24, 72, and 120 hours) of the co-culture model used. After differentiating into effector cells that produce IL-2, IFN- γ , and TNF- α in response to stimulation, naive CD4⁺ T lymphocytes become fatigued memory-like T cells that express high levels of inhibitory receptors and have decreased cytokine production. By calculating the apoptotic level and DNA break numbers, it was found that the stimulation period when cells were most radiosensitive was 72 hours, and the most sensitive subgroups were effector T lymphocytes and effector memory-like T lymphocytes. The most radiation-resistant subtypes were naive T and central memory-like T lymphocytes. It was observed that radiation did not change the mitochondrial membrane potential in Th cells. It was shown that anti-PD-1 blockade applied before radiation exposure had no negative impact on Th1 survival. As a result, it was determined that Th1 cells did not show radiation sensitivity in the process of regaining function with PD-1 blockade.

Key words: T lymphocyte activation, CD4⁺ T cell, radioimmunotherapy, γ -H2AX, mitochondrial membrane potential

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-------|
| ONAY SAYFASI | iii |
| YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI | iv |
| ETİK BEYAN SAYFASI | v |
| TEŞEKKÜR | vi |
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | viii |
| SİMGELER ve KISALTMALAR | xii |
| ŞEKİLLER | xiv |
| TABLolar | xviii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. Bağışıklık Sistemi ve T hücreler | 4 |
| 2.2. T hücre Gelişimi | 7 |
| 2.3. T Hücre Aktivasyonu | 9 |
| 2.4. Yardımcı T Hücrelerde Hafıza Gelişimi | 13 |
| 2.5. Yardımcı T lenfosit Yanıtlarının PD-1 Aracılığıyla Düzenlenmesi | 15 |
| 2.6. İyonize Edici Radyasyonun Hücre Biyolojisine Etkisi | 18 |
| 2.7. İyonize Edici Radyasyonun T Hücelere Etkisi | 19 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM | 23 |
| 3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler | 23 |
| 3.2. Tamponlar ve Çözeltiler | 24 |
| 3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları | 25 |
| 3.3.1 Hücre Sayımı | 25 |
| 3.3.2 Dondurularak Stoklanan Hücrelerin Çözülmesi ve Pasajlanması | 26 |
| 3.3.3. Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin ve CD4+ T Hücrelerin İzolasyonu | 27 |
| 3.3.4. Ko-kültür Ortamının Oluşturulması | 28 |
| 3.3.5. Floresan Aktive Hücre Ayırma Yöntemi | 29 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 3.3.6. | Yardımcı T Hücrelere İnhibitör Sinyal Blokajı Uygulanması | 30 |
| 3.4. | Radyasyon Uygulaması | 30 |
| 3.5. | Yardımcı T Lenfositlerin Fenotipik ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler | 31 |
| 3.5.1. | İmmüfenotipleme | 31 |
| 3.5.2. | Hücre Canlılık Analizi | 32 |
| 3.5.3. | Hücre Çoğalma Analizi | 32 |
| 3.5.4. | Akım Sitometri ile Sitokin Miktar Tayini | 33 |
| 3.5.5. | Mitokondriyel Membran Potansiyelinin Belirlenmesi | 34 |
| 3.5.6. | Sitolojik Analizler İçin Preparat Hazırlanması | 35 |
| | Hücre İçi DNA Kırıklarının Saptanması İçin H2aX Boyaması | 36 |
| | May-Grünwald – Giemsa Boyama | 37 |
| 3.6. | İstatistiksel Yöntem | 38 |
| 4. | BULGULAR | 39 |
| 4.1. | Ko-kültürde Th Uyarımının İmmüfenotip Analiz ile Takibi | 39 |
| 4.2. | Radyasyon Maruziyetinin, Farklı Sürelerde Uyarılmış Th Hücre Morfolojisine Etkisi | 41 |
| 4.3. | Radyasyona Maruz Bırakılan Th Hücrelerin DNA Kırığı ve Mitokondriyal Membran Potansiyeli Açısından İncelenmesi | 41 |
| 4.4. | Farklı Sürelerde Uyarılan CD4+ T Hücrelerinde Canlılık Düzeyleri | 45 |
| 4.5. | CD4+ T Hücrelerin, Radyasyon Uygulaması Sonrasında Çoğalma Kapasitelerinin Belirlenmesi | 48 |
| 4.6. | Radyasyon Uygulamasının Th Hücre İlişkili Sitokin Üretimine Etkisi | 50 |
| 4.7. | PD-1 İmmün Kontrol Noktası Blokajı Altında Uygulanan Radyasyonun CD4+ T Hücrelerin Canlılıklarına Etkisi | 51 |
| 5. | TARTIŞMA | 54 |
| 5.1. | Th1'lerin Kullanılan Ko-kültür Modelinde, İnkübasyon Süresine Bağlı Biyolojik Özellikleri | 54 |
| 5.2. | İyonize Radyasyon Aracılı Hasarın, Oluşan DNA Kırığı ve Mitokondri Membran Potansiyeli Açısından Değerlendirilmesi | 56 |

| | | |
|------|---|----|
| 5.3. | CD4+ T Hücrelerin Artan Dozlarda Radyasyon Maruziyetine Bağlı Canlılık ve Çoğalma Kapasiteleri | 57 |
| 5.4. | Th1 Hücrelerin anti-PD-1 Blokaj Uygulaması ve Radyasyon Maruziyeti Sonrasında Canlılık Durumu | 59 |
| 6. | SONUÇLAR VE ÖNERİLER | 62 |
| 7. | KAYNAKLAR | 65 |
| 8. | EKLER | |
| 9. | ÖZGEÇMİŞ | |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|---------------|--|
| AIF | Apoptoz indükleyici faktör |
| AP-1 | Aktivatör protein-1 |
| ASH | Antijen sunan hücre |
| ATM | Ataksi telenjektazi mutasyonu barındıran protein |
| ATR | Ataksi telenjektazi ve Rad3 ilişkili protein |
| BSA | Buzağı serum albümin |
| BTLA-4 | B ve T lenfosit zayıflatıcı reseptörü |
| CFSE | Karboksifloresin süksinimidil ester |
| cGAS | Siklik GMP-AMP sentaz |
| cTEC | Kortikal timik epitelyal hücreler |
| CTLA-4 | Sitotoksik T lenfosit antijeni-4 |
| DAMP | Hasar ile ilişkili moleküler modeller |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole |
| DC | Dendritik hücre |
| DN | Çift negatif |
| DNA-PK | DNA bağımlı protein kinaz |
| DP | Çift pozitif |
| DSB | Çift iplik kırılması |
| EDTA | Etilendiamintetraasetik |
| ETP | Erken timik öncüller |
| FACS | Floresan aktive hücre ayırma |
| FBS | Fötel buzağı serumu |
| FOX O1 | Forkhead kutu proteini O1 |
| GM-CSF | Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör |
| HMGB1 | Yüksek Mobilite Grup Protein-1 |
| ICOS | İndüklenebilir kostimülatör reseptörü |
| ICOSL | İndüklenebilir kostimülatör ligandı |
| IKK | IκB kinase |
| IRF | İnterferon düzenleyici faktör |
| LAG3 | Lenfosit aktivasyon gen 3 |
| LFA-1 | Lenfosit fonksiyon ilişkili antijen 1 |

| | |
|------------------------|--|
| MHK | Majör doku uygunluk kompleksi |
| MMP | Matriks metalloproteinaz |
| NFAT | T hücrelerinin nükleer faktörü |
| NF-κB | Nükleer faktör κB |
| NK | Doğal öldürücü hücre |
| NKT | Doğal öldürücü T hücre |
| PAMP | Patojen-ilişkili moleküler desenleri |
| PBS | Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi |
| PD-1 | Programlanmış hücre ölüm protein-1 |
| PI | Propidyum iyodür |
| PI3K | Fosfatidilinositol-3-kinaz |
| PKMH | Periferik kan mononükleer hücreleri |
| RAG | Rekombinasyon aktive edici gen |
| S1P1 | Sfingozin-1-fosfat |
| S1P1R | Sfingozin-1-fosfat reseptör |
| SP | Tek pozitif |
| STAT | Transkripsiyonun Sinyal-dönüştüren Aktivatörleri |
| STING | İnterferon genlerinin uyarıcısı |
| TBK1 | TANK bağlayıcı kinaz 1 |
| T_{CM} | Merkezi hafıza T lenfositler |
| T_{FH} | Foliküler T hücre |
| Th | Yardımcı T hücre |
| Th1 | Tip-1 yardımcı T hücre |
| THR | T hücre reseptörü |
| TIM-3 | T hücre immünglobin-3 |
| T_{reg} | Düzenleyici T hücre |
| T_{RM} | Efektör hafıza T lenfositler |

ŞEKİLLER

| Şekil | Sayfa |
|--|-------|
| <p>2.1. En fazla çalışılan efektör yardımcı T (Th) hücre alt tipleri ve görev aldıkları durumlar. (A) IFN-γ üretimi yapan Th1 hücreleri, bakteri, protozoon ve virüs kaynaklı inflamasyonlarla ilişkilidir. Aynı zamanda makrofajlarda aktiviteyi destekler. Benzer yollar, Th1 hücrelerinin kendi antijenlerine karşı yönlendirildiği bazı otoimmün hastalıklarda da söz konusudur. (B) Helmintler ve zehirler aracılığıyla oluşan inflamasyon durumlarında çoğunlukla IL-4, IL-5 ve IL-13 üretimiyle birlikte Th2 hücreleri görev almaktadır. Bunun yanı sıra makrofajlar, doku onarımını desteklemek için bu koşullar altında bir “M2” fenotipini kazanırlar. (C) Hücre dışı bakteri ve mantar kaynaklı inflamatuvar koşullar altında, Th17 hücreleri, nötrofil aktivitesini ve epitelden anti-mikrobiyal peptitlerin salınmasını destekler. (D) Efektör fonksiyonların düzenlenmesinden, dendritik hücreler ve efektör Th hücreleri üzerinde etkili olan IL-10⁺ Treg'in sorumludur. (E) IL-21 üretiminden sorumlu Tfh hücreleri, germinal merkez oluşumunu, afinite olgunlaşmasını ve izotip değişimini teşvik ederek antikor yanıtlarında görev alır (128).</p> | 5 |
| <p>2.2. Timus, mezenkimal alanlarla bölünmüş loblu bir organdır. Lobların her biri belirli T hücre olgunlaşma aşamalarında, timosit öncülerinin varlığı ile karakterize edilen ayrı kortikal ve medüller alanlar bulundurur. Timosit farklılaşmasında, birbirini takip eden 4 farklı çift-negatif (double negative, DN) evresini, CD4 ve CD8 moleküllerinin ikisini birlikte taşıyan çift-pozitif (double positive, DP) evreye geçiş izler. Bu safhalarda timositler ve timik stromal hücreler arasındaki etkileşimlerin, timusta karmaşık bir T-hücre olgunlaşması programının yürütülmesinde önemli olduğu bilinmektedir, bu da sonuçta Th hücrelerin ve sitotoksik T hücrelerinin timustan göç etmesiyle sonuçlanır (129).</p> | 9 |

- 2.3. T hücre aktivasyonunun başlangıcı için ilk basamak olan antijen sunumu ve aktivasyonun tamamlanmasında görevli olan diğer sinyal kaynakları. 10
- 2.4. Aktivasyonla birlikte T hücre yüzeyinde ifadelenen moleküller ve fonksiyonları. 12
- 2.5. T hücrelerde programlanmış hücre ölüm proteini-1 (PD-1)'in ligandı ile bağlanması sonucu oluşan sinyal yolağı ve sinyal sonucu hücre sel fonksiyonların değişimi. 17
- 2.6. İyonize radyasyon maruziyeti sonucunda hücrede oluşan DNA çift iplik kırılması (double-stranded DNA, dsDNA) sonucu cGAS-STING sinyal yolağının aktivasyon süreci. 21
- 3.1. Fuchs-Rosental lamı ve yüzey alanı. 25
- 3.2. Periferik kanın faz ayrıştırma işlemi ile farklı fazlarda hücre gruplarına ayrıştırılması. 27
- 3.3. Ko-kültür ortamı ve anti-CD3 uyarımı. A. Ko-kültür ortamı ve bileşenleri. B. Ko-kültür ortamına yapılan anti-CD3 uygulama süreleri. 29
- 3.4. FACS için kullanılan kapılama stratejisi. FACS işlemi sonrasında CD4+ hücrelerin saflığı >%96 olarak belirlenmiştir. 30
- 3.5. Akım sitometri cihazından alınan .fcs dosyalarının FlowJo yazılımı yardımıyla oluşturulan kapılama stratejisi. 31
- 3.6. FlowJo yazılımı yardımıyla yapılan canlılık analizinin kapılama stratejisi. Şekil 3.4.'te gösterilen kapılama stratejisi yardımıyla ilgilenilen immünofenotipteki hücre seçildikten sonra Annexin V-PI boyaması yardımıyla hücrelerin canlılık analizleri yapılmıştır. Annexin V-PI- popülasyon canlı hücreleri, Annexin V+PI- popülasyon erken apoptozdaki hücreleri, Annexin V+PI+ olan hücreler ise geç apoptozdaki hücreleri temsil etmektedir. 32

- 3.7.** JC-1 boyamasının FlowJo programında kullanılan kapılama stratejisi. Agregat durumda bulunan JC-1 boyası PE+ hücreler içerisinde MFI değeri alınarak, monomer durumda bulunan JC-1 boyası ise PE- kapılama içerisinde alınan FITC MFI değeri ile hesaplanmaktadır. 35
- 3.8.** DNA kırık odağı sayısının saptanması için kullanılan analiz yönteminin işlem basamakları. 37
- 4.1.** Farklı inkübasyon süreleri sonunda CD4+ T hücrelerin immünofenotip dağılım grafikleri. A. CD4+ T hücrelerin CD45RO+/- hücre popülasyonlarındaki % dağılım grafiği. B. Ko-kültürlerdeki CD4+ T hücrelerin CD45RO ve CD62L ifadesine göre yüzdesel dağılım grafiği. C. Ko-kültürde 120 saat inkübe edilen CD4+ T hücrelerin yüzeyinde ifade ettikleri inhibitör reseptörlerin yüzde grafiği. D. 120. saatteki ifadelenen inhibitör reseptörlerin iki farklı hafıza benzeri fenotipteki CD4+ T hücrede yüzdesi ($n \geq 3$, $p < 0,05$). 39
- 4.2.** Sitokimyasal (May-Grünwald – Giemsa) boyamanın ışık mikroskopi görüntüsü. 41
- 4.3.** A. Ko-kültürde farklı inkübasyon sürelerinde CD4+ T hücrelere farklı dozlarda radyasyon uygulaması sonucu oluşan γ -H2AX odak sayısı grafiği ve immünfloresan görüntüleri. B. CD4+ T hücrelerin mitokondriyal membran potansiyel grafiği. C. Farklı dozlardaki radyasyon uygulaması sonucunda mitokondriyal membran potansiyelinde gözlenen değişim grafiği. 42
- 4.4.** Ko-kültürdeki farklı uyarım periyodlarındaki CD4+ T hücrelerin artan radyasyon dozlarındaki apoptotik durumları. A. Toplam apoptoz grafiği. B. Erken ve geç apoptoz grafikleri. C. Farklı fonksiyonel basamaklardaki hücrelerin erken ve geç apoptotik durumlarının immünofenotipe göre dağılım grafikleri. D. Canlılık 46

- sonuçlarını reprezente eden 120. Saat FlowJo görüntüleri. ($n \geq 3$, $p < 0,05$)
- 4.5.** CD4+ T hücrelerin ko-kültürün farklı zamanlarında ürettikleri IL-2 miktar (pg/mL) grafiği ($n \geq 3$, $p < 0,05$). 49
- 4.6.** Bu hücre gruplarının proliferasyon ve duplikasyon hızlarının yüzde grafikleri ve reprezente eden FlowJo görüntüleri. 50
- 4.7.** Ko-kültürün 72. ve 120. saatlerinde bulunan CD4+ T lenfositlerin IFN- γ ve TNF- α sitokin üretimi düzeyleri (pg/mL) ve radyasyon maruziyeti sonucu sitokin üretim düzeyindeki değişim grafikleri. 51
- 4.8.** Ko-kültürün 120. saatinde bulunan CD4+ T hücrelere anti-PD-1 uygulaması yapılmıştır. Hiç uygulama yapılmamış (dokunulmamış), kontrol (IgG) ve PD-1 reseptörü bloklanmış (aPD-1) grupların yüzeylerindeki PD-1 inhibitör reseptör düzeyinin değişimini gösteren temsili akım sitometri histogramları. 52
- 4.9.** Ko-kültürün 120. saatinde bulunan CD4+ T hücrelerin PD-1 blokajı sonucunda farklı dozlardaki radyasyona bağlı apoptotik hücrelerin yüzde grafikleri. 52

TABLÖLAR

| Tablo | | Sayfa |
|--------------|---------------------------------|--------------|
| 3.1. | Çalışmada kullanılan antikörler | 23 |

1. GİRİŞ

Edinsel bağışıklık sisteminin en önemli elemanlarından olan CD4⁺ yardımcı T (*T helper*, Th) hücre ve CD8⁺ sitotoksik T hücre, insan sağlığını ve hayatını tehdit eden birçok antijen ve patojene karşı olan savunmada kritik rol oynamaktadır. Naif T lenfositler, antijen sunucu hücreler ASH (*antigen presenting cell*, APC) tarafından T hücre reseptörüne antijenin tanıtılmasının ardından ko-stimülasyon yardımıyla farklılaşarak efektör duruma geçerler. Efektör faza geçiş yapan T lenfositler inflamasyon alanına göç ederek inflamatuvar olaya tepki göstermektedir (1,2). Patojenin ortadan kaldırılmasının ardından inflamatuvar yanıtın düzenlenmesi amacıyla, T hücrelerin büyük bir kısmı apoptoza giderken, küçük bir popülasyon ise enfeksiyonla tekrar karşılaşma durumunda hızlı yanıt oluşturmak için uzun süreli sağkalım sağlayarak immün sistem hafızasını oluşturur. Oluşan hafıza T lenfositler, sekonder lenfoid organlara ve periferik dokularda yerleşim gösterirler. Bu hücreler, *homing* kapasitesi, yeniden uyarımla birlikte kazanılan efektör fonksiyon ve yüzey molekül ifadenmesindeki farklılıklara göre efektör hafıza T lenfositler (*effector memory T cell*, TEM) ve merkezi hafıza T lenfositler (*central memory T cell*, TCM) olmak üzere iki temel gruptan oluşur (3). İmmün sistem hafızasının oluşturduğu hızlı immün yanıtın aksine kanser ve kronik inflamasyon gibi antijenik devamlılık olan durumlarda T hücrelerinin fenotipik ve fonksiyonel profilleri akut enfeksiyonlardaki profillere kıyasla değişir. Böylesi patolojik koşullarda T hücreler efektör fonksiyonlarını yitirerek disfonksiyonel hale gelmektedir. Bu disfonksiyonel hücreler anerjik, yorulmuş (*exhausted*), yaşlı (*senescent*) ve kök benzeri T lenfositler olmak üzere dört gruptan oluşmaktadır (4). Yorulmuş T lenfositlerin yüzeyinde yüksek düzeyde artan immün kontrol noktası inhibitör moleküllerinin blokajı aracılığıyla uygulanan tedavi yöntemi, T lenfositlerin efektör fonksiyonlarını tekrar kazanmalarına aracılık eder. Son yıllarda yapılan çalışmalarda birçok bilimsel veri ve klinik çalışma doğrultusunda lokal radyasyon tedavisinin, immünoterapi ile birlikte uygulanmasının sinerjik bir etki yaratacak anti-tümör yanıtları artırdığı gösterilmiştir.

Radyoterapi iyonlaştırıcı ışın aracılığıyla kapsamlı kanser tedavisi ve bakımının kritik bir bileşenidir. İyonize radyasyon, tüm kanser vakalarının yarısından fazlasında, lokalize hastalığı tedavi etmek, semptomları hafifletmek ve tedavi edilemeyen kanserlerde hastalığı kontrol etmek için kullanılır. Bununla birlikte, kanser

için tedavi kapasitesinin planlanması ve geliştirilmesinde radyoterapi, en sık göz önünde bulundurulması gereken araçtır (5). Radyoterapi ve konakçı bağışıklık sistemi arasındaki etkileşim ile ilgili araştırmalar, radyoterapinin etkinliğini arttırmak için potansiyel olarak yararlanılabilecek yeni mekanizmalar ortaya çıkarmıştır (6). Başarılı radyoterapi ve immünoterapi kombinasyonları tümör içindeki T lenfositlerin etkinliğine bağlıdır.

Bu tez çalışması kapsamında farklı uyarım sürelerinde ilerletilen tip-1 yardımcı T (Th1) hücrelerin, farklı dozlardaki radyasyon maruziyeti sonucunda fenotipik ve fonksiyonel değişimlerinin belirlenmesinin yanı sıra; Th1 hücrelerin, immün kontrol noktası blokajı ve iyonize radyasyonun kombine tedavisine vereceği yanıtın araştırılması amacıyla hipotezler kurulmuştur.

Gerçekleştirilen çalışma kapsamında, sağlıklı bireylerden izole edilen CD4⁺ T lenfositler, akut miyeloid lösemi monositik hücre hattı olan THP-1 ile anti-CD3 varlığında ko-kültür edilmiştir. Bu modelde T hücre reseptörü üzerinden alınan sinyal her gün tazelenmesi yapılan anti-CD3 monoklonal antikor ile, ko-stimülasyon sinyali ise THP-1 hücreleri aracılığıyla sağlanmıştır. Gerçekleşen sürekli uyarımın farklı zaman dilimlerinde (0., 24., 72. ve 120. saatler) farklı dozlarda radyasyon (0 Gy, 2 Gy, 5 Gy, 8 Gy, 12 Gy ve 18 Gy) uygulaması yapılmıştır. Th hücreler toplanıp CD4, CD45RO, CD62L, PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG3 molekülleri ile akım sitometri ile immünofenotiplenmiş, IL-2, IFN- γ ve TNF- α sitokinleri ELISA analizi ile ölçülmüş, H2AX agregasyonu ile DNA kırıklarının belirlenmesi için immünfloresan ile çalışılmış, canlılık, çoğalma, morfolojik analizlerinin yanı sıra, JC-1 boyaması ile mitokondriyal membran potansiyel analizi yapılmıştır. Ko-kültürün 96. saatte anti-PD-1 antikor ile blokaj uygulaması yapılmış, 24 saat sonra hücrelere radyasyona maruz bırakılmış ve canlılık analizi yapılmıştır.

Kullanılan ko-kültür ile Th1 uyarım modelinde, Th1 hücrelerin devam eden uyarım altında erken dönemde CD45RO⁻ popülasyon baskın durumdayken, ilerleyen saatlerde CD45RO⁺ popülasyonun çoğunlukta olduğu belirlendi. Devam eden uyarımın 120. saatinde yorgunluk fenotipi ile benzer şekilde yüksek düzeyde immün kontrol noktası inhibitör reseptörleri bulunmuştur. Oluşan DNA kırıklarına bakıldığında en fazla kırığın bulunduğu fonksiyonel basamak 72. saat olarak

belirlenmiştir. JC-1 boyaması aracılığıyla Th hücrelerin mitokondriyel membran potansiyelleri test edildiğinde radyasyonun etkisinin mitokondriyel yollardan bağımsız olabileceği tespit edilmiştir. Canlılık analizleri sonucunda radyasyona en hassas olan uyarım süresi efektör faz 72. saat olarak belirlenmiştir. En hassas immünofenotip efektör Th1 hücreler, en dirençli immünofenotipteki T lenfositler ise naif ve merkezi hafıza benzeri Th1'ler olmuştur. Ko-kültürdeki Th1 hücrelerin farklı IL-2 üretim kapasitesi nedeniyle ko-kültürlere IL-2 takviyesi yapılarak Th1 hücrelerin çoğalması desteklenmiş ve radyasyon maruziyeti sonucunda çoğalma analizleri yapılmıştır. Çoğalma analizleri sonucunda geç uyarım dönemindeki Th1 hücrelerin radyasyon dozu artmasına rağmen çoğalma kapasitelerinde bir farklılık gözlemlenmemiştir. Efektör sitokinlere bakıldığında, IFN- γ düzeyi 72. saatte radyasyonla birlikte artış gösterirken, TNF- α düzeyi ise ko-kültürün hem 72. hem de 120. saatlerinde radyasyon stresi altında artış göstermiştir. Ko-kültüre uygulanan anti-PD-1 blokajı sonrasında uygulanan radyasyonun Th1 hücrelerin canlılığına belirgin bir etkisi olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak kullanılan ko-kültür modelinde farklı fonksiyonel basamaklardaki Th1 hücrelerin, radyasyon stresi altında fenotipik ve fonksiyonel değişimleri belirlenmiştir. Ayrıca, ko-kültürün geç saatlerindeki Th1 hücrelere PD-1 immün kontrol noktası blokajının radyasyonla birlikte uygulanmasının hücrelerin canlılıkları üzerinde bir etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Bu çalışmayla birlikte farklı dozlardaki radyasyon uygulaması sonucunda farklı uyarım periyodlarında bulunan Th1 hücrelerin ne şekilde etkilendiği belirlenerek T hücrelerin radyobiyojisi açısından yeni bulgular elde edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bağışıklık Sistemi ve T Hücreler

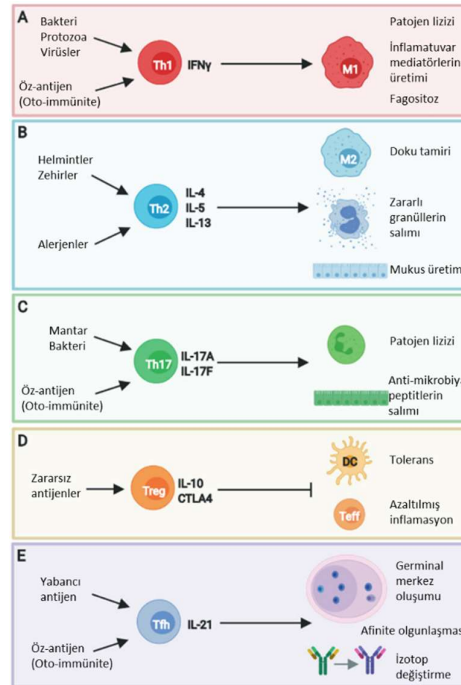
Bağışıklık sistemimiz, insan sağlığını ve hayatını tehdit eden çok sayıda antijen ve patojene karşı savunmamızı ve direnç kazanmamızı sağlamaktadır. İmmün sistemimiz bu karşılaştığımız antijenlere ve patojenlere karşı savaşmamızı ve direnç kazanmamızı sağlamaktadır. Antijen ve patojenlere karşı oluşturduğumuz ilk yanıt doğuştan gelen doğal bağışıklık ile sağlanır.

Doğal bağışıklık, deri ve mukozal dokularımızca oluşturulan fiziksel bariyerleri aşan mikoplarm yerleşimini ve çoğalmasını engelleme işlevi görür. Doğal bağışıklık sistemi mikrop sınıfları tarafından paylaşılan yapılar olan patojen-ilişkili moleküler desenleri (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP), tanıır. Doğal bağışıklık sistemimizin oluşturduğu yanıtla ortadan kaldırılamayan patojenler, edinsel bağışıklığın devreye girmesi ile oluşturulan daha düzenli ve özgül yanıtla ortadan kaldırılır.

Edinsel bağışıklık sistemi ise patojenleri ve diğer organizmalar tarafından üretilen protein antijenleri özgül olarak tanıyan yüzey reseptörlerini taşıyan hücrelerce oluşturulur. İmmünolojik hafıza oluşumu ve öz antijenlere karşı tolerans oluşturma kapasitesinde olan edinsel bağışıklık, kemik iliğinden köken alan B hücreleri tarafından oluşturulan hümoral yanıt ve timustan köken alan T hücreleri tarafından oluşturulan hücrese bağışıklık mekanizmalarını içerir. Bu hücreler aynı zamanda doğal immünitede yer alan hücrelerle iş birliği yapar. B hücreleri tarafından üretilen antikolar, mikrop yüzeyinde bulunan veya çözünmüş olan antijenleri tanıyıp bağlanarak, onların ortadan kaldırılmasına aracı olur (7). T hücreler ise hücre aracılıklı bağışıklıkta anahtar rol oynar. Bakteriyel ve viral enfeksiyonlara, tümör hücrelerine ve yabancı dokulara karşı bağışıklık yanıtlarına aracılık ederler (8).

T hücreler yüzeylerinde, antijenin tanınmasını sağlayan, oldukça değişken bir T hücre reseptörü (THR) taşırlar. Antikoların aksine, T hücre reseptörleri antijenleri doğrudan bağlayamaz. Antijen sunan hücrelerin (ASH) yüzeylerinde, T lenfositlere antijen sunumuna aracılık eden moleküller bulunur, bu moleküller majör doku uygunluk kompleksi (*Majör Histokompablite Kompleks*, MHK) olarak adlandırılır. T

hücreleri, yardımcı T ($CD4^+$) lenfositler ve sitotoksik ($CD8^+$) T lenfositler olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır. $CD8^+$ molekülü α ve β zincirinden oluşan dimerik bir yapıdır. Sitotoksik T hücreleri, tüm çekirdekli hücrelerin ifade edebildiği sınıf 1 majör histokompatibilite kompleksi molekülüne bağlı peptitleri tanır. Antijeni tanıyarak aktive olan $CD8^+$ T lenfositler anti-viral ve anti-tümör etkilere sahip sitokinlerden tümör nekroz faktörü alfa ($TNF-\alpha$) ve interferon-gama ($IFN-\gamma$) üretir. Ayrıca, salgıladıkları perforin ve granzim gibi sitotoksik moleküller ve Fas/FasL etkileşimleri aracılığıyla patojenle enfekte hücreleri apoptoza götürürler. $CD4^+$ T hücreleri ise, antijen sunan hücrelerden MHK sınıf 2 molekülü aracılığıyla sunulan antijenleri tanırlar ve aktivasyonla birlikte ürettikleri sitokinler aracılığıyla doğal bağışıklık sistemine ait hücrelerin, humoral bağışıklıktan sorumlu B hücrelerin ve sitotoksik T hücrelerin fonksiyonlarını düzenleyip, geliştirerek edinsel bağışıklık yanıtlarında önemli bir rol oynar. Aktivasyon sinyallerine, aktivasyonun gücüne ve buldukları mikro çevredeki faktörlere bağlı olarak farklı fonksiyonlara sahip alt tiplere farklılaşabilirler. Yardımcı T hücre alt tip 1 (*T helper 1*, Th1), Th2, Th17, düzenleyici T hücre (*regulatory T*, Treg) ve foliküler T hücreden (*T_{FH}*) oluşmakla birlikte, son zamanlarda Th2 alt tipine benzeyen Th9 ve Th17 alt tipine benzeyen Th22 alt tipleri tanımlanmıştır (1,2) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. En fazla çalışılan efektör yardımcı T (Th) hücre alt tipleri ve görev aldıkları durumlar. (A) IFN- γ üretimi yapan Th1 hücreleri, bakteri, protozoon ve virüs kaynaklı inflamasyonlarla ilişkilidir. Aynı zamanda makrofajlarda aktiviteyi destekler. Benzer yollar, Th1 hücrelerinin kendi antijenlerine karşı yönlendirildiği bazı oto-immün hastalıklarda da söz konusudur. (B) Helmintler ve zehirler aracılığıyla oluşan inflamasyon durumlarında çoğunlukla IL-4, IL-5 ve IL-13 üretimiyle birlikte Th2 hücreleri görev almaktadır. Bunun yanı sıra makrofajlar, doku onarımını desteklemek için bu koşullar altında bir "M2" fenotipini kazanırlar. (C) Hücre dışı bakteri ve mantar kaynaklı inflamatuvar koşullar altında, Th17 hücreleri, nötrofil aktivitesini ve epitelden anti-mikrobiyal peptitlerin salınmasını destekler. (D) Efektör fonksiyonların düzenlenmesinden, dendritik hücreler ve efektör Th hücreleri üzerinde etkili olan IL-10+ Treg'in sorumludur. (E) IL-21 üretiminden sorumlu Tfh hücreleri, germinal merkez oluşumunu, afinite olgunlaşmasını ve izotip değişimini teşvik ederek antikor yanıtlarında görev alır (9).

Th1 ve Th2 hücre gelişimi; sunulan antijenin miktarı, antijenik peptidin THR'ye bağlanma gücüne ve B7/CD28, CD40/CD40L ve ICAM-1/LFA-1 gibi ko-stimülatör moleküller arasındaki etkileşiminden etkilenir (10). Bu faktörler, farklı Th hücre alt kümelerinin gelişimi ile ilgili bilgiler vermesine rağmen, Th hücre farklılaşmasının ana uyarıcıları sitokinlerdir. Th1 farklılaşması, interlökin-12 (IL-12), IL-18, IFN- γ , tip-1 interferonlar (IFN- α ve IFN- β) ve IL-27 aracılığıyla desteklenirken, IL-4 ve IL-10 tarafından inhibe edilir. IL-12 ve IL-18 aracılığıyla Th1 farklılaşmasının sürekliliği sağlanır. IL-18, farklılaşması tamamlanmış Th1 hücrelerinin IFN- γ üretimini teşvik eder. İfade edilen IFN- γ 'nın, IFN- γ reseptörüne bağlanmasıyla birlikte STAT1 sinyal yolağı aktive olur ve bu yolak aracılığıyla Tbet transkripsiyon faktörünün üretimi uyarılır. Tbet, IFN- γ ve IL-12R β 2 ifadesini arttırarak Th1 fenotipini güçlendirmede rol oynar (11,12).

Th1, makrofaj, doğal öldürücü (*Natural killer*, NK) hücre, B lenfosit ve sitotoksik T lenfosit yanıtlarını düzenleyerek yıkıcı tipte bir inflamatuvar yanıtın aktivasyonunundan ve düzenlenmesinden sorumludur. Th1 hücreleri, salgıladığı granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) aracılığıyla kemik iliğinden granülosit ve monositlerin yapımını uyarır. Ayrıca IFN- γ üreterek makrofajlarda sınıf 1 ve sınıf 2 MHK moleküllerinin, ifade düzeyini arttırarak antijen sunumunu destekler. IFN- γ 'nın etki mekanizması yalnızca makrofajlarla sınırlı kalmayıp aynı zamanda farelerde NK hücrelerinin aktivasyonunu sağlar ve B lenfosit aracılı IgG_{2a} izotip değişimine neden olur (13). IgG_{2a} klasik kompleman yolağını aktive ederek fagositik hücreler tarafından yüzeyde ifade edilen Fc γ reseptörlerine bağlanma yoluyla

opsonizasyona aracılık eder. Th1 tarafından üretilen IL-2 ve IFN- γ ayrıca sitotoksik T lenfositlerin farklılaşmasında ve çoğalmasında rol oynar (14,15).

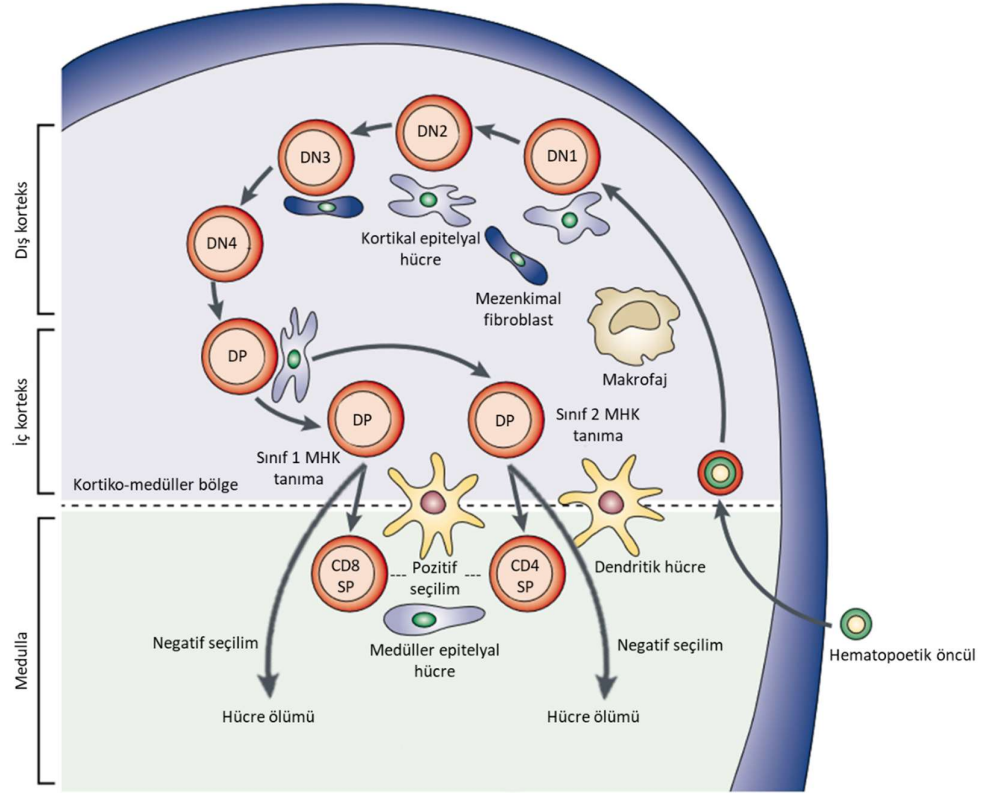
2.2. T Hücre Gelişimi

T hücre öncülleri, doğum öncesinde fetal karaciğerden başlayarak, yaşam boyu kemik iliğinden üretilecek şekilde dolaşıma geçer ve timusa göç ederler. Timusta bulunan hücreler kendilerini yenileyebilme özelliklerine sahip değildir; bu nedenle, timopoez için hematopoietik öncül hücrelerin kemik iliğinden sürekli alınması gerekmektedir. Timus, ön üst toraksta bulunan bir dış korteks ve iç medulladan meydana gelen ve timositler olarak da bilinen T hücre öncüllerinin, gelişimi için gerekli olan mikroçevreyi sağlayan iki lobüllü bir organdır (8, 16, 17). Timusun sub-kapsüler korteks epitel hücrelerce üretilen CCL25 kemokini kemik iliğinden çıkan öncül hücreler üzerinde bulunan CCR9 reseptörleri ile tanınır. Bu sayede öncüllerin timusa yerleşimi gerçekleşir (18). Timusa yerleşen bu öncül hücreler, hem T hem de B lenfositleri oluşturabilecek kararsızlıktadırlar. Timik stromal hücrelerince sağlanan Notch sinyali aracılığıyla kararsız öncüller, T hücre yönünde değiştirilir (19,20).

Timositlerin gelişimi, timusun farklı bölgelerinde T hücre reseptörünün (THR) yeniden düzenlenmesi, CD3, CD4, CD8, CD25, CD44 ve CD117'yi de içerisinde bulunduran yüzey moleküllerinin ifadesindeki kademeli değişimler sonucu tamamlanmaktadır. Erken timik öncüller (*early thymic progenitor*, ETP) CD4 veya CD8 protein ekspresyonu bulunmadığı için çift negatif (*double negative*, DN) hücreler olarak adlandırılır. DN timositler IL-2 reseptörünün alfa zinciri (CD25), adezyon molekülü (CD44) ve kök hücre büyüme faktörü reseptörü c-kit (CD117) ifade seviyesine göre belirlenen aşamalardan (DN1, DN2, DN3 ve DN4) geçer (21,22). Toplam timik T lenfosit havuzunun çok düşük miktarını oluşturmakla birlikte DN1 evresindeki ETP hücreleri genellikle yüksek düzeyde CD117 ifadesi ile tanımlanmaktadır. DN1 evresinde CD117^{yüksek}CD44^{yüksek}CD25⁻CD24^{düşük}/-CD27^{yüksek} fenotipteki hücreler kortiko-medüller bölgede bulunur ve timus mikroortamından alınan sinyaller aracılığıyla hücre çoğalmasının başlaması ve CD25 ifadenmesi ile birlikte DN2 evresine geçer (23,24). DN1 evresindeki hücreler kortiko-medüller bölgeyi terk ettikten sonra timus korteksine göç ederler ve burada kortikal timik epitelyal hücreler (*Cortical thymic epithelial cells*, cTECs) ve fibroblastlardan

aldıkları sinyaller aracılığıyla DN2 (CD117⁺CD44⁺CD25⁺CD24⁺CD27^{orta/yüksek}) timositlere farklılaşırlar. DN2 evresinde, THR γ , THR δ ve THR β gen lokuslarındaki yeniden düzenlenme başlatılır. T hücre reseptör gen bölgesi; V (*variable*), D (*diversity*), J (*joining*) ve C (*constant*) gen parçalarından oluşmaktadır. Fonksiyonel antijen reseptör genleri T lenfositlerde DNA yeniden düzenlemesi ile rastgele seçilen V, (D) ve J gen segmentlerini bitişik hale getirilmesi ile meydana gelir. T hücre reseptör gen bölgelerindeki rekombinasyon sinyalleri ve yalnızca lenfoid hücrelerce ifade edilen rekombinasyon aktive edici gen 1 ve 2 (*recombination activating gene 1-2*, RAG1 ve RAG2) aracılığıyla oluşan rekombinasyonla birlikte V(D)J kaynaklı T hücre reseptör çeşitliliği sağlanmaktadır (25,26). DN2 evresindeki antijen tanıma için TCR çeşitliliğinin sağlanmasının ardından; DN3 evresine geçiş, CD117'deki azalma ve CD44 ifade düzeyindeki azalma ile karakterizedir. DN3 evresine geçişle birlikte hücreler CD117^{düşük/-}CD44⁻CD25^{+/orta}CD24^{yüksek} fenotip sergilemekle birlikte tümör nekroz faktör reseptör süper ailesinin bir üyesi olan CD27, DN3 evresinin başında bulunmaz veya düşük düzeyde bulunur. DN3 evresinin ileri aşamalarında ise yüksek düzeyde ifadelenmeye başlar. THR β , γ ve δ lokuslarındaki yeniden düzenlenme devam eder ve THR- $\alpha\beta$ veya THR- $\gamma\delta$ taşıyan timositlere olgunlaşma gerçekleşir. DN4 evresinde çoğalma için sinyal alınması; DN3 evresinin sonunda, CD3 kompleksinin bileşenleri, α zinciri ve yeniden düzenlenmiş β zincirinin bir araya gelerek ligand bağımsız çalışabilen öncü-THR'nin oluşturulmasına bağlıdır. DN4 evresine geçişle birlikte timositler CD117^{-/düşük}CD44^{-/düşük}CD25^{-/düşük}CD24^{yüksek}CD27^{yüksek} fenotip kazanırlar. Bu aşamada RAG genleri yeniden ifadelenir ve α zinciri yeniden düzenlenir. Düzenlenmenin ardından timositler CD4 ve CD8 moleküllerinin ifadesi ile birlikte çift-pozitif (*double positive*, DP, CD4⁺CD8⁺) timositlere olgunlaşırlar (8, 24, 27, 28). CD4⁺CD8⁺ timositlere kortikal timik epitelyal hücreler, dendritik hücreler (*dendritic cells*, DC) ve fibroblastlar tarafından MHK aracılığıyla öz-antijenler sunulur. Sunulan öz-antijeni yüksek afinite ile tanıyan çift-pozitif hücreler negatif seçim aracılığıyla apoptoza giderken, düşük afinite ile öz-antijeni tanıyanlar hayatta kalır. Bu sayede yüksek afinite ile öz-antijen tanıyan hücrelerin delesyonu, otoreaktif T lenfositlerin oluşma riskini azaltır (29). Öz-antijeni düşük afiniteyle tanıyan çift-pozitif hücrelerden; sınıf 1 MHK ile sunulan antijeni tanıyan hücreler CD8 tek-pozitif (*single positive*, SP, CD4⁺CD8⁺), antijeni sınıf 2 MHK aracılığıyla tanıyan hücreler ise

CD4 tek-pozitif ($CD4^+CD8^-$) hücelere dönüşür (Şekil 2.2.). Olgunlaşmanın tamamlanmasının ardından hüceler, sfingozin-1-fosfat (S1P1) reseptör ifadesini arttırarak, dolaşımda yüksek miktardaki sfingozin-1-fosfat ligandına doğru göç etmek için timusu terk eder ve dolaşıma çıkarlar (30).

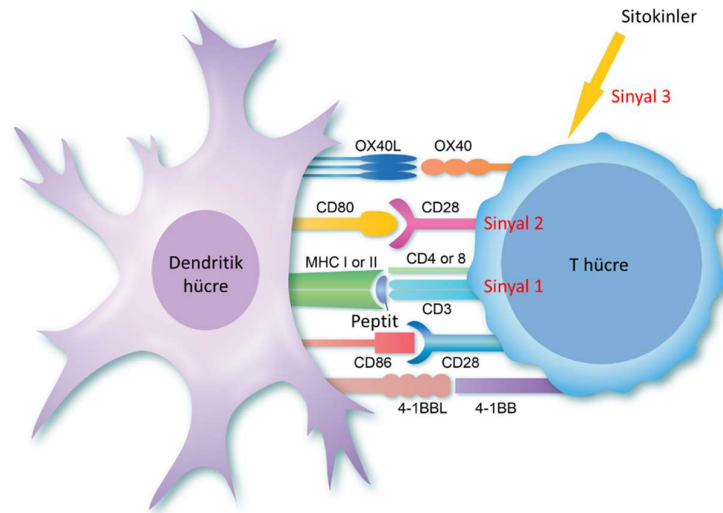


Şekil 2.2. Timus, mezenkimal alanlarla bölünmüş loblu bir organdır. Lobların her biri belirli T hücre olgunlaşma aşamalarında, timosit öncülerinin varlığı ile karakterize edilen ayrı kortikal ve medüller alanlar bulundurur. Timosit farklılaşmasında, birbirini takip eden 4 farklı çift-negatif (*double negative*, DN) evresini, CD4 ve CD8 moleküllerinin ikisini birlikte taşıyan çift-pozitif (*double positive*, DP) evreye geçiş izler. Bu safhalarda timositler ve timik stromal hüceler arasındaki etkileşimlerin, timusta karmaşık bir T-hücre olgunlaşması programının yürütülmesinde önemli olduğu bilinmektedir, bu da sonuçta Th hücelerin ve sitotoksik T hücelerin timustan göç etmesiyle sonuçlanır (31).

2.3. T Hücre Aktivasyonu

Timustan dolaşıma çıkan henüz aktivasyon sinyali almamış naif T hüceleri dolaşıma katılır. Dolaşıma yeni çıkmış naif T lenfositleri, hücre döngüsünün G0 evresinde olmakla birlikte metabolik olarak aktiftirler ve aktivasyon sinyali alınmadığı sürece durgunluk evresini korumaya devam ederler. T hücre aktivasyonunu iki temel sinyal ile tetiklenir. Bu sinyallerden birincisi, lenfoid organlarda (lenf düğümlerinde,

dalakta ve mukozal lenfoid dokularda) naif T lenfositlerin, antijen sunan hücrelerin (*antigen presenting cell*, ASH, APC) yüzeyindeki MHK-peptit kompleksini tanıyıp, bağlanan THR aracılığıyla sağlanır. İkincil sinyal ise, ASH yüzeyindeki MHK-peptit kompleksini tanıyan T lenfositlerde artan adezyon molekülleri aracılığıyla ASH ile yüzey temasını arttırması ve ko-stimülatör sinyallerin algılanması ile sağlanır (26, 32-36). Yalnızca THR üzerinden aktivasyonun tetiklenmesi veya kısa süreli uyarımlar, T lenfositin efektör fonksiyon kazanması için yetersiz olacak ve hücre anerjiye gidecektir. Bu durumun engellenmesi için ko-stimülatör moleküllerin önemi büyüktür. MHK-peptit kompleksi ile THR bağlantısı hücre-içi sinyal yollarını, özellikle tirozin kinaz aktivitesini uyarır. Böylece, transkripsiyon faktörlerinden, aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü (*nuclear factor of activated T-cells*, NFAT), nükleer faktör κ B (NF- κ B) ve aktivatör protein-1 (*activator protein-1*, AP-1) yardımıyla, farklılaşma, sağ kalım ve çoğalma ile ilgili genlerin transkripsiyonu başlatılır. T hücre aktivasyonunu, efektör fonksiyonunu, farklılaşmasını ve hayatta kalımını yönlendirecek olan esas faktörler ise ko-simülatör ve ko-inhibitör moleküllerdir. Ko-stimülatör moleküller, ASH yüzeyindeki ligandları ile bağlanarak T hücrelerin aktivasyonunda ikincil sinyal kaynağını sağlamaktadır. Yeterli sinyal iletim süresinin sağlanması ve efektör fonksiyonların kazanılması için adezyon moleküllerinin rolü de süreç için oldukça önemlidir (37) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. T hücre aktivasyonunun başlangıcı için ilk basamak olan antijen sunumu ve aktivasyonun tamamlanmasında görevli olan diğer sinyal kaynakları.

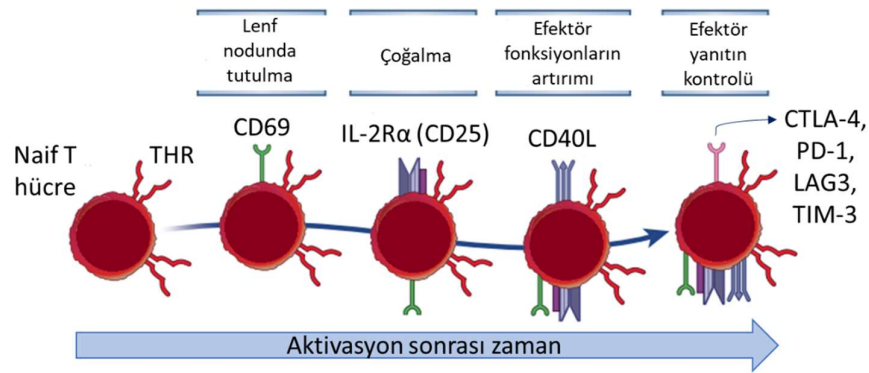
En iyi karakterize edilmiş T hücre ko-stimülasyon sinyali T hücre yüzeyinde ifade edilen CD28 ligandları olan B7-1 (CD80) ve B7-2 (CD86) bağlanması ile sağlanmaktadır. CD28 yardımcı T hücrelerin büyük çoğunluğunda, sitotoksik T hücrelerin ise yaklaşık olarak yarısının yüzeyinde bulunur. Dendritik hücreler, makrofajlar ve B hücreler gibi profesyonel antijen sunan hücrelerin yüzeyinde yüksek düzeyde ifadelenen B7 ko-stimülatör molekülleri, dinlenme durumunda düşük düzeyde görülürken, herhangi bir inflamatuvar durumda ifadesi artar (38,39).

CD28 ko-stimülasyonu, T hücrelerin enerjiden korunmasını, farklılaşmasını ve çoğalmasını destekler. Ligand bağlanması ile birlikte Lck kinaz tarafından CD28'in sitoplazmik kuyruğu fosforlanması gerçekleştirilir ve PI3K, CD28'in fosforlanmış kuyruğuna erişerek aktive hale gelir. PI3K aktivasyonu aracılığıyla Itk'nin membranda tutunmasına sağlanarak PLC γ 'nın aktive edilir bu da T hücre aktivasyonunun tamamlanmasına yardımcı olur. Bunlara ek olarak CD28, NF- κ B aktivasyonunu artırarak, Bcl-2 ve Bcl-XL gibi anti-apoptotik proteinler aracılığıyla hücre sağkalımına katkı sağlamaktadır. T hücrenin ikincil uyarımının tamamlanmasıyla IL-2 sitokin ifadenmesi başlatılır. Bu sayede sağkalım, farklılaşma ve hücre çoğalması için süreç başlatılmış olur (26, 34, 40, 41).

Ko-stimülatör molekül olarak CD28'e ek olarak bulunan diğer bir önemli molekül ise indüklenebilir kostimülatör molekülü (*inducible T-cell costimulator*, ICOS, CD278)'dir. ICOS'un ligand molekülü (ICOSL, CD275) ise yine profesyonel antijen sunan hücrelerce ifade edilir. ICOS-ICOSL etkileşimi yüksek afiniteli B hücrelerin üretimi için gerekli foliküler T hücrelerin aktivasyonu ve gelişimi için CD28-B7 etkileşiminde üretilen sitokin olan IL-2'den ziyade IL-4 üretiminin sağlanmasıyla birlikte T hücre aracılı antikor yanıtlarında önemli rol almaktadır (33,42,43). Ayrıca B ve T lenfosit zayıflatıcı (*B- And T-Lymphocyte Attenuator*, BTLA-4) reseptörü, OX40 (CD134) ve 4-1BB (CD137) ko-stimülatör molekülleri de T hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar (44,45).

THR üzerinden birincil sinyali aldıktan sonra T hücre yanıtlarının CD28-B7 ve ICOS-ICOSL ko-stimülatör moleküller aracılığıyla pozitif yönde desteklendiği bilinmektedir. Bu moleküllerin etkileşiminin aksine bazı moleküllerin ligandlarıyla etkileşimleri sonucunda T hücre yanıtları negatif yönde düzenlenmektedir. Bu

moleküller genellikle T hücrede aktivasyonunu takiben 24-48 saat içerisinde hücre yüzeyinde ifade edilmeye başlayan programlanmış hücre ölüm protein-1 (*programmed cell death protein-1*, PD-1, CD279), sitotoksik T lenfosit antijeni-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*, CTLA-4, CD152), T hücre immünglobulin-3 (*T-cell immunoglobulin mucin receptor 3*, TIM-3, CD366) ve lenfosit aktivasyon gen 3 (*lymphocyte activation gene 3 protein*, LAG3, CD223) olarak sıralanabilir. Ayrıca TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*), CD244 ve CD160 ko-inhibitör moleküllerinin ifadenmesinde de artış meydana gelmektedir. Bu inhibitör reseptör moleküllerin ligandlarıyla bağlanması sonucu T hücre yanıtlarındaki negatif düzenlenme nedeni ile efektör fonksiyonlar yitirilir (37,41-43,46-52).



Şekil 2.4. Aktivasyonla birlikte T hücre yüzeyinde ifadelenen moleküller ve fonksiyonları.

T hücre aktivasyonunun erken belirteci olan CD69 yüzey molekülü, S1P1R molekülüne bağlanarak düzeyini azaltır ve T hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını başlatan sinyallerin alınmasını sağlayacak kadar lenfoid dokularda tutulmasını sağlar. Yeterli düzeyde sinyali alması ile CD69 seviyesi düşer, bu sayede efektör ve hafıza fenotiplere farklılaşan T lenfositler S1P1R ifadesindeki artışla birlikte tekrar dolaşıma geçerler (46-47).

IL-2 üretimi, aktivasyonun başlamasıyla artar ancak üretimi hızlı ve geçicidir. IL-2, efektör T hücre alt kümelerinin çoğalmasında, farklılaşmasında ve homeostazında rol oynayan bir sitokindir. Aktivasyonun erken saatlerindeki IL-2 sekresyonundaki artış beraberinde hücre yüzeyinde CD25 (IL-2R α) reseptöründe de artışa yol açar. CD25 düzeyindeki artışla birlikte IL-2 üreten aktive hücre otokrin veya parakrin etki sayesinde çoğalır ve efektör özellik kazanır (48).

Erken aktivasyonun ilerleyen saatlerinde T hücrelerde CD40 ligand (CD154) yüzey molekülü ifade olur. CD40L ile etkileşim sonucunda antijen sunan hücrelerde antijen sunma kapasitesi artırılır ve edinsel bağışıklık efektör yanıtları düzenlenir. CD40L-CD40 etkileşimi dendirik hücrelerde, sitokin üretimini tetikler, ko-stimülatör moleküllerin ifadelenmesinde artışa sebep olur ve çapraz antijen sunumunu (*cross presentation*) kolaylaştırır (49). B lenfositlerde CD40 sinyali ile birlikte, germinal merkez oluşumu, immünoglobülin izotip değişimi ve somatik hiper-mutasyon süreci başlar ve antikorların antijen afinitesinde artış gerçekleşir. CD40 uyarımı, plazma hücrelerinin ve hafıza B lenfositlerin oluşumunu teşvik eder (49).

T hücre aktivasyonunun başlatılmasıyla birlikte, T hücrelerin lenfoid organlarda tutulmasına yardımcı moleküller olan CD62L ve CCR7'nin ifadelenmesinde azalma başlar. Eş zamanlı olarak inflamasyon bölgesine göçte rol oynayan bir $\alpha 4\beta 1$ integrin heterodimeri olan VLA-4 (*very late antigen-4*) ve lenfositlerin periferik kandan ayrılarak dokuya girmesinde yardımcı olan lenfosit fonksiyon ilişkili antijen 1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*, LFA-1) gibi adezyon moleküllerinin ifadelenmesinde artış olur. Bu sayede efektör fonksiyon kazanmış T hücrelerin lenfoid organlardan çıkarak inflamasyon bölgesine göçü desteklenir (53-55). İfadelenmesinde artış meydana gelen CD44 de, hyaluronik asit ve matriks metalloproteinazlar (MMP) ile etkileşime girerek inflamasyon alanındaki tutunmaya yardımcı olarak T hücre yanıtlarında rol oynar (56,57).

Antijenle uyarılmış ve ko-stimülasyon almış T hücrelerin büyük çoğunluğu efektör hücrelere farklılaşır. $CD4^+$ T hücreler aktivasyonla birlikte, diğer immün hücrelerin fonksiyonlarını düzenlemek ve daha etkin bir inflamatuvar yanıt oluşturmak amacıyla çeşitli sitokinler üretirler. $CD8^+$ T hücreleri ise efektör fonksiyon kazandıktan sonra, sitotoksik etkileri aracılığıyla hedef hücreleri ortadan kaldırırlar. İnflamatuvar yanıtın sonlanmasıyla antijen spesifik T lenfosit klonlarının büyük çoğunluğu apoptozla birlikte ortadan kalkarken küçük bir popülasyon aynı antijenle tekrar karşılaşma durumunda hızlı yanıt oluşturmak üzere hafıza hücrelere farklılaşır.

2.4. Yardımcı T Hücrelerde Hafıza Gelişimi

İnsanlarda T hücre havuzunun oluşması yaşam boyu devam eden bir süreçle olsa da büyük ölçüde yaşamın erken evrelerinde oluşturulur. Efektör yanıtların

ardından T hücrelerin küçük bir kısmı hafıza fenotipi kazanarak uzun süre hayatta kalır. Hafıza T lenfositleri, çoğalma ve sitokin üretimi için aktivasyon ve ko-stimülator sinyal gereksinimi açısından naif T hücrelere göre daha düşük eşik değere sahiptir. Yüksek düzeyde ifade edilen Bcl-2 ve Bcl-XL anti-apoptotik proteinleri aracılığıyla, doğal bağışıklık tepkileri ve yaşam sinyalleri azalsa dahi hafıza T hücreleri uzun süreli sağkalım avantajına sahiptirler. Transkripsiyon faktörleri ise, Th'lerin farklı alt tiplere farklılaşmasında rol oynadığı gibi hafıza fenotipe geçişte de büyük öneme sahiptir. T-bet ve eomes transkripsiyon faktörleri efektör hücre gelişiminde önemli rollere sahiptir. IL-2 ve IL-12 aracılığıyla T-bet'in ifadeleneşindeki artışla birlikte bu transkripsiyon faktörü IL-12 reseptörünün ifadeleneşini destekleyerek efektör gelişimi için gerekli desteği sağlamaktadır. T-bet'in aşırı ifadeleneşini ise hafıza fenotipe geçiş ihtimalinin azalması ile koreledir (58,59). Eomes transkripsiyon faktörü ise daha çok hafıza fenotipinin gelişmesiyle ilişkilidir (60).

Hafıza T hücrelerde, hem güçlü uyarıma duyulan gereksinimin az olması hem de uzun süreli sağkalım özelliğine sahip olması ve bunlara ek olarak hem sekonder lenfoid organlarda hem de periferik dokularda bulunabilmeleri sayesinde aynı antijenle tekrar karşılaşma durumunda oluşacak olan sekonder immün yanıtın daha hızlı ve kararlı şekilde gerçekleşmesi sağlanmaktadır (3,61-63).

Hafıza T hücreleri için *homing* kapasitesi, yeniden uyarımla birlikte kazanılan efektör fonksiyon ve yüzey molekül ifadeleneşindeki farklılıklara göre birçok alt tip tanımlanmıştır. Bunlar arasında en sık kabul görenler hem CD4⁺ T hücreler hem de CD8⁺ T hücrelerde ortak olmakla birlikte, efektör hafıza T lenfositler (*effector memory T cell*, T_{EM}) ve merkezi hafıza T lenfositler (*central memory T cell*, T_{CM}) olmak üzere iki alt gruptur (64). Merkezi hafıza T hücreleri, yaklaşık 200 kDa moleküler ağırlığa sahip lökosit ortak antijeninin (*leucocytes common antigen*) bir izoformu olan CD45RO, CCR7 ve L-selektin (CD62L) yüzey moleküllerinin ifadeleneşini ile karakterizedir. Ek olarak yüksek düzeyde CD44 adezyon molekülü ve IL-7 reseptörü (CD127) ve düşük düzeyde KLRG-1 taşırlar. Genellikle lenf düğümlerine yerleşmek eğiliminde olmakla birlikte periferik dolaşımında da bulunurlar. Efektör hafıza hücreleri ise, merkezi hafıza hücreleriyle benzer şekilde CD45RO ve CD44 ifade ederken, CCR7 kemokin reseptörü ve L-selektin ifadesinden yoksundur. Buna ek olarak düşük düzeyde CD127 ifade ederken yüksek düzeyde KLRG-1 ifadesi görülmektedir.

Efektör hafıza T hücreleri sıklıkla mukozal dokular, periferik dokular ve dolaşımında bulunur. İkincil enfeksiyon durumlarında hızlı efektör yanıtla karakterize bu hücreler azalmış proliferatif aktiviteye sahiptirler. Aynı zamanda sitotoksik T hücrelerde bu hafıza durumu yüksek granzim B ve perforin ekspresyonu ile karakterizedir (3, 65-67). Efektör hafıza T hücreleri hızlı efektör yanıtı sayesinde, inflamasyon bölgesindeki ilk yanıtta rol oynayarak, merkezi hafıza T hücrelerine çoğalmak için sinyal sağlayarak patojenin ortadan kaldırılmasında önemli bir görev almaktadır (3,68).

2.5. Yardımcı T lenfosit Yanıtlarının PD-1 Aracılığıyla Düzenlenmesi

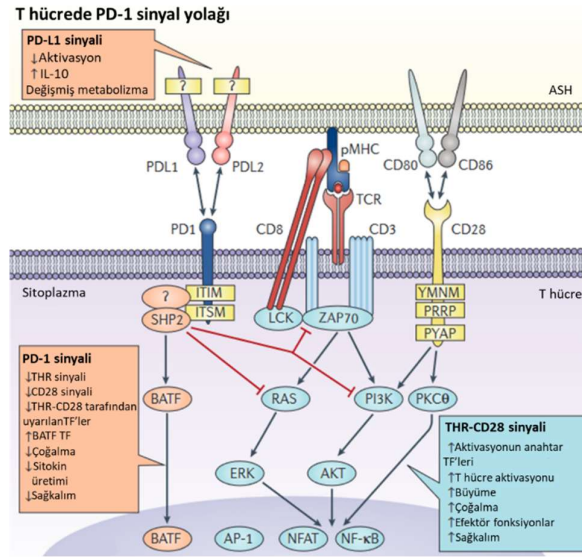
PD-1 molekülünün, ligandı ile bağlanması, bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesini ve toleransın sürdürülmesini sağlar. Ancak, kanser gibi immün yanıtın etkin olması gerektiği durumlarda immün baskılanmaya neden olarak hastalığın ilerlemesine yol açabilir (69) (Şekil 2.5.).

PD-1, CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositlerde, doğal öldürücü T (NKT) hücrelerde, B lenfositlerde, monositlerde ve bazı dendritik hücre alt kümelerinde aktivasyonu takiben ifadelenmeye başlar. PD-1 özellikle kronik viral enfeksiyonlarda ve kanserde, yorulmuş T lenfositlerce yüksek düzeyde ifade edilir (70). T hücre reseptörü ve MHK-peptit birleşmesi sonucu antijenin ve pozitif ko-stimülatör sinyaller aracılığıyla T hücre aktivasyonunun başlatılmasıyla birlikte, T hücre çoğalması ve hayatta kalımında önemli rollere sahip olan ortak gama-zincir sitokinlerinden IL-2, IL-7, IL-15 ve IL-21 aracılığıyla uyarılan NFAT, NOTCH, forkhead kutu proteini O1 (Forhead box protein O1, FOX O1) ve interferon düzenleyici faktör 9 (interferon regulatory factor 9, IRF9) transkripsiyon faktörleri, başta PD-1 (CD279) olmak üzere, birçok inhibitör kontrol-noktası (*checkpoint*) reseptör molekülleri hücre yüzeyinde ifadelenmeye başlar (70-72).

Tip-1 transmembran protein olan PD-1, B7/CD27/CTLA-4 reseptör ailesinin bir üyesidir ve hem doğal bağışıklık tepkilerinde hem de edinsel bağışıklık tepkilerinde rol oynar (73,74). PD-1 molekülü bir hücre dışı bölge, bir transmembran bölgesi ve bir hücre içi kuyruk bölgesinden oluşur. Hücre içi kuyruk, T hücre reseptörünün negatif düzenlenmesine aracılık eden iki farklı fosforilasyon bölgesi içerir (75).

Programlanmış hücre ölümü protein-ligand 1 (*programmed cell death-ligand 1*, PD-L1, CD274, B7 homolog 1, B7-H1) ve PD-L2 (CD273, B7-DC) reseptörünün ligandlarıdır. Diğer B7 ailesi üyelerine benzer şekilde IgV benzeri ve IgC benzeri hücre dışı bölgelerine sahiptirler (76). PD-L2, PD-L1'e göre yaklaşık 3 kat daha yüksek afinite ile PD-1'e bağlanır ancak PD-L2, PD-L1'e göre daha az hücre tipinde ifadenme gösterir. Ek olarak B7-1, PD-L1'e bağlanabilirken, PD-L2 bağlanamaz (77). PD-L2, daha çok dendritik hücreler, makrofajlar, hafıza B hücreleri üzerinde ifadenir. PD-L1, T lenfositler, B lenfositler, makrofajlar, dendritik hücrelerde bulunabilir ve aktivasyonla birlikte ifade düzeyinde artış görülür. PD-L1 tümör hücreleri üzerinde de bulunur ve anti-tümör immün yanıtlardan kaçış mekanizması olarak kullanılır (76,78). PD-1 ligandlarının ifadenmesi, inflamatuvar faktörler ve sitokinler tarafından düzenlenir (76). Kanser hücrelerinde PD-1'in ligandları ile etkileşimlerinin düzenlenmesi, PI3K/AKT, MAPK, JAK/STAT, WNT, NF- κ B ve hedgehog sinyal yolları aracılığıyla gerçekleştirilir (78).

PD-1'in antijen sunan hücreler veya kanser hücreleri yüzeyindeki PD-L1 ile transtaki bağlanma ile birlikte T hücre yanıtları negatif olarak düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Benzer şekilde PD-1-PD-L2 etkileşimleri de T hücre yanıtlarını negatif olarak düzenlemekle birlikte ek olarak ko-stimülasyon fonksiyona da sahiptir. PD-1'e ilgisini kaybeden PD-L2, henüz aktivasyon sinyali almamış olan naif T hücrelerin, makrofajların, nötrofillerin ve dendritik hücrelerin yüzeyinde ifadelenen ve solunum toleransını düzenlemeye yarayan bir ko-reseptör olan itici güç kılavuz molökülüne (*repulsive guidance molecule B*, RGMb) bağlanarak Th2 aracılı Th1 polarizasyonunu teşvik etmek için ko-stimülasyon görevi görebilir (79).



Şekil 2.5. T hücrelerde programlanmış hücre ölüm proteini-1 (PD-1)'in ligandı ile bağlanması sonucu oluşan sinyal yolağı ve sinyal sonucu hücresel fonksiyonların değişimi.

PD-1 ve PD-L1'in birçok hücrede ifadenmesi geniş bir etki alanı yaratır ve birçok çift yönlü etkileşim söz konusudur. PD-1 sinyalizasyonunun etkileri diğer hücrelerde de görülmekle birlikte, etkilerin en iyi gözlemlenildiği hücre grubu T lenfositlerdir. T hücre aktivasyonunu takiben yüzeyde ifadenmeye başlayan PD-1'in ligandıyla bağlanması, Bcl-xL molekülünün, GATA-3, T-bet ve Eomes transkripsiyon faktörlerinin ifadenmesini engelleyerek hücre sağ kalımını ve efektör fonksiyonlarını olumsuz yönde düzenler (80,81). Ancak, PD-1-ligand etkileşiminde inhibisyon yeteneği T hücrelerin, THR üzerinden aldığı sinyal gücüne bağlıdır. THR üzerinden alınan sinyal ne kadar düşük olursa PD-1 üzerinden alınan inhibisyon o kadar güçlü olur. Aynı zamanda, CD28 üzerinden alınan ko-stimülasyon ve IL-2 sitokini aracılı T hücre aktivasyonu, PD-1'in etkisini azaltacak veya geçersiz kılacaktır (82,83).

PD-1 ligasyonu T lenfosit membran proksimal sinyal olaylarında da değişikliklere sebep olabilir. Ligand ile bağlanması hücrede glikoz taşınımı ve glikoliz için anahtar bir molekül olan fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) aktivitesinin inhibe edilmesine neden olur. Bu da Akt fosforilasyonunu engeller. Ancak, IL-2, STAT5 (*signal transducer and activator of transcription*) aracılığıyla PI3K aktivitesine gereksinim duymadan Akt aktivasyonunu sağlayabilir ve PD-1 aracılı negatif sinyali

ortadan kaldırabilir (84). PD-1 etkileşimi, CD3 ζ , ζ -ilişkili protein 70kDa (ζ -associated protein of 70 kDa, ZAP70) ve protein kinaz C θ (protein kinase C θ , PKC θ) fosforilasyonunu azaltabilir ve Erk aktivasyonunu da inhibe edebilir. Ancak bu negatif etki de PI3K ve Akt aktivasyonlarının düzenlenmesinde olduğu gibi STAT5 molekülünün aktivasyonunu sağlayan sitokinlerden IL-2, IL-7 ve IL-15 tarafından geri döndürülebilir (84-86).

Başta PD-1 olmak üzere, inhibitör reseptör ifadenmesi, T lenfositlerde aktivasyonu takiben gerçekleşir ve fonksiyonunu kaybetmiş hücre grubu olan yorulmuş T hücrelerinde en yüksek düzeyde gözlenir. Bu inhibitör reseptörlerin etkisi blokaj ajanları kullanılarak ortadan kaldırılabilir. Bu durum özellikle tümör mikro-çevresinde yoğunlaşmış halde bulunan yorulmuş T hücrelerin, tekrar fonksiyon kazanmasının önünü açmakta ve bu sayede daha etkin bir anti-tümör yanıt oluşması sağlanmaktadır (87,88). Bununla birlikte immün kontrol noktası blokaj tedavilerinin, radyoterapi ve kemoterapi gibi diğer kanser tedavi yöntemleri ile kombine uygulamalarla daha başarılı anti-tümör yanıtların elde edilmesine ön ayak olabileceği düşünülmektedir (89,90).

2.6. İyonize Edici Radyasyonun Hücre Biyolojisine Etkisi

Radyoterapi, kanser vakalarının yarısından fazlasında, lokalize hastalığı tedavi etmek, semptomları hafifletmek ve tedavi edilemeyen kanserlerde hastalığı kontrol altında tutmak için kullanılır (91).

İyonize edici radyasyon özellikle tümör hücreleri üzerinde toksik etki ve DNA hasarlarının doğrudan veya dolaylı indüklenmesine neden olmaktadır (92). İyonize radyasyon aracılığıyla birikmeye başlayan reaktif oksijen türleri (*reactive oxygen species*, ROS), baz hasarı, depolimerizasyon, çapraz bağlanma (*crosslinking*) ve çift iplik kırılması (*double-strand break*, DSB) aracılığıyla DNA üzerinde çeşitli hasarlar oluşturabilir (93). Oluşan DNA hasarları, hücre döngüsünde interfaz sırasında, birisi G1 evresinden, kromozomal replikasyona geçiş aşamasında, diğeri ise G2 evresinden mitoz geçiş sırasında iki ayrı DNA kontrol noktasında teşhis edilebilir. Belirlenen hasarların, DNA onarım mekanizmalarıyla giderilmesi için en önemli faktörler, fosfoinositid-3 kinaz (PI3K) ailesinin üyeleri olan ataksi telenjiyektazi

mutasyonu barındıran protein (ATM), ataksi telenjektazi ve Rad3 ilişkili proteindir (ATR) ve DNA bağımlı protein kinazdır (DNA-PK) (94).

ATM, başta Ser1423 ve Ser1526 olmak üzere, ATR ise başta Ser1423 olmak üzere çoklu serin rezidülerinin aktivasyonu aracılığıyla tümör baskılayıcı bir gen olan Brcal'i aktive ederler. Hücre döngüsünün G2 evresinden mitoz evresine geçişin kontrolünü sağlayan BRCA1 genom koruyucu olarak işlev görür (95-97). Ayrıca, DNA hasarına yanıt olarak, onarım mekanizmasında rol oynayan Chk2 proteininin ATM tarafından fosforilasyonu, BRCA1'in homolog rekombinasyon aracılığıyla çift iplik kırılmalarının onarılmasına yardımcı olur (98).

DNA-PK bağımlı tamir mekanizması DNA bağlayıcı protein heterodimeri olan Ku aracılığıyla homolog olmayan uç birleştirilmesi (non-homologous end joining, NHEJ) şeklinde gerçekleştirilir (99). Ayrıca, DNA-PK/Ku kompleksi DNA hasar yanıtı olarak p53'ü fosforile ederek G1/S kontrol noktasında p21 üzerinden dolaylı olarak modüle etmektedir.

2.7. İyonize Edici Radyasyonun T Hücrelere Etkisi

T hücre aktivasyonunun ve efektör fonksiyonlarının iyileştirilmesi amacıyla, PD-1 ve CTLA-4 gibi inhibitör reseptörleri hedef alan tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak, hastaların büyük bir kısmında tümörlerin immünojenik olmaması ve yeterli immün cevabın alınamaması nedeniyle immün kontrol noktası blokaj tedavilerinden verim alınamayabilir (100). Bu nedenle, zayıf immün reaksiyonun güçlendirilmesi ve anti-tümör etkinliğin artırılması amacıyla blokaj tedavisine farklı tedavi yöntemleri eklenerek sinerjik etki yaratılması söz konusudur (101,102).

İyonize edici radyasyonun, biyolojik etkileri üzerine daha önce yapılan birçok çalışmaya göre, yüksek doz radyasyonun, DNA hasarlarının doğrudan veya dolaylı uyarılması yoluyla apoptotik/nekrotik doku hasarı ve ayrıca immünosupresyona neden olarak canlı organizmalar için olumsuz etkileri olduğu açıkça gösterilmiştir. İyonize edici radyasyon özellikle tümör hücreleri üzerindeki sito-toksik etkileri ile bilinmektedir. Ancak, immün sistem hücreleri üzerinde çeşitli akut veya uzun süreli etkileri de mevcuttur. Yüksek doz radyasyonun olumsuz etkilerinin aksine düşük doz

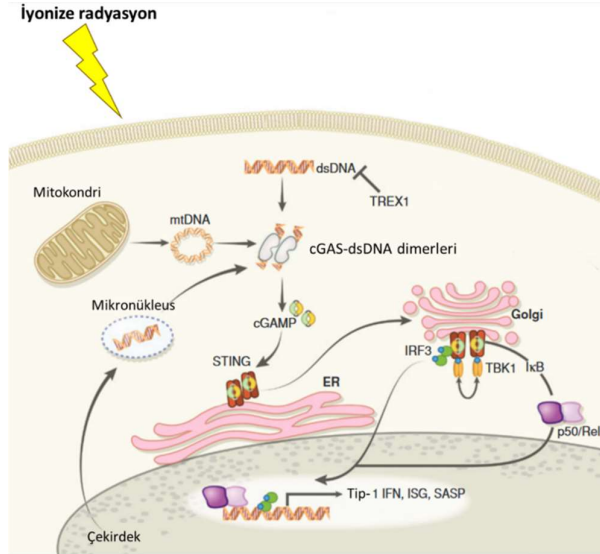
radyasyonun edinsel yanıtları desteklemesi mümkündür. İmmün sistem hücrelerinde DNA onarımının yüksek doz radyasyon maruziyetine göre daha kolay olması ve hücrel metabolik aktivitenin düzenlenmesi sayesinde anti-tümör yanıtta büyük ölçüde katkı sağlanmaktadır (103-109).

Hücrelerin çekirdeğinde ve mitokondride bulunan DNA'nın immün uyarıcı bir molekül olabildiği de bilinmektedir (110). İnflamasyon ve hücre dışı hasar durumunda oluşan sitozolik DNA varlığı, tip 1 interferonların indüklenmesi ve inflamasyon sağlayarak bağışıklık tepkilerini güçlendirir. Sitosolik DNA hücrede büyük ölçüde cGAS-STING yoluyla aracılığıyla kontrol edilir. Siklik GMP-AMP sentaz (*cyclic GMP-AMP synthase*, cGAS)-STING yoluyla (cGAS-STING), radyoterapi aracılığıyla efektör T hücre yanıtlarına katkıda bulunur. Ayrıca immün kontrol noktası blokajlarına verilen yanıtta radyoterapi ile sinerjik etkinin önemli ölçüde artabileceğini ortaya koymaktadır (111).

Memeli hücrelerin sitoplazmasında, interferon düzenleyici faktör (DAI), dead kutu polipeptid 41 (DDX41) ve interferon ile indüklenebilir protein 16 (IFI16) gibi sitoplazmik DNA bağımlı farklı aktivatörler bulunmaktadır. Bu aktivatörlerin tümü, interferon genlerinin uyarıcısı (*stimulator of interferon genes*, STING) olarak isimlendirilen sitoplazmik proteini aktive ederek düzenlenmeye katkıda bulunur (110).

Radyasyon yoluyla indüklenen ve onarılmamış DNA çift sarmal kırıklarını takiben, kanser hücrelerinin mitoz bölünme yoluyla çoğalması mikronükleus oluşumuna yol açar. Mikronükleuslar, kolayca parçalanabilen yapıdadır ve çift sarmallı DNA'yı sitoplazma içerisine sentezler (111-114). Sitoplazma içerisindeki DNA, cGAS'ın ATP ve GTP'nin 2',3'-siklik GMP-AMP'ye (cGAMP) katalize edilmesi için konformasyonel değişiklikleri uyarır. Ardından cGAMP'nin aktivasyonu endoplazmik retikulumda (ER) STING'i uyarır ve STING tetramerler oluşturabilmek için ER'den ER-golgi ara bölgesine yerleşerek oligomerizasyona girer. Golgi içerisindeki STING'in aktivasyonu ile birlikte IκB kinase (IKK) aracılığıyla NF-κB (115), TANK bağlayıcı kinaz 1 (TBK1) isimli protein kinaz aracılığıyla da interferon düzenleyici faktör 3 (IRF3) yolaklarının aktivasyonu ve yolakla ilgili transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu gerçekleşir (116). Her iki sinyal yolağının aktivasyonu ile tip-1 interferonların ve immün yanıtta rol alan diğer inflamatuvar sitokinlerin ifadesi

artar (117-119). STING aracılı tip-1 interferonların salımı, ışınlanmış kanser hücrelerinin sitozolündeki DNA çift iplik kırıklarının birikmesi ve uyarılan cGAS-STING yolağı anti-tümör T hücre yanıtını güçlendirebilir (111,120) (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. İyonize radyasyon maruziyeti sonucunda hücrede oluşan DNA çift iplik kırılması (*double-stranded DNA*, dsDNA) sonucu cGAS-STING sinyal yolağının aktivasyon süreci.

İyonize radyasyon uygulaması sonucunda oluşan stres, hasar ile ilişkili moleküler modeller (*damage-associated molecular pattern*, DAMP) aracılığıyla tehlike sinyalleri bağışıklık sistemine bildirilir (121-126). HMGB1, dsDNA, kromatin, RNA, mitokondri benzeri hücre bileşenlerinin hücre dışı boşluklarda bulunması immün sistemi doğrudan uyarır (127). Açığa çıkan bu DAMP'lar, immün hücrelerin yüzeyinde bulunan desen tanıma reseptörleri (*pattern recognition receptor*, PRR) tarafından tanınarak (128,129) tümörde ise DAMP'lar infiltre dendritik hücreler tarafından tanınır ve tümör ile ilişkili T hücrelere çapraz sunum yapılır. Aktive dendritik hücreler tarafından üretilen IFN- β çapraz sunuma destek sağlar (111,120). IFN ile uyarılan genler arasında yer alan CCL5, CXCL10 ve CXCL16 kemokinleri aracılığıyla efektör T hücreler tümör bölgesine yönlendirilerek anti-tümör yanıtı destek sağlanır (130,131).

İyonize radyasyon ile ortaya çıkan DAMP'lara bir diğer örnek ise U1 ve U2 gibi küçük ve endojen kodlamayan RNA'lardır. Bu moleküller radyasyon uygulamasının ardından sitoplazma içerisinde yer değiştirirler ve dsRNA sensörü olan

DDX58 ile bağlanarak mitokondriyal anti-viral sinyal proteini (MAVS) ve tip-1 interferonların aktivasyonuna katkıda bulunarak T hücre yanıtlarını düzenler (132).

T hücre alt grupları arasındaki farklılıklar buldukları organlar ve aktivasyon durumlarına göre farklı radyosensivite gösterebilirler. Radyasyon maruziyeti sonrasında iyileşme süreci de dokular arasında farklılık göstermektedir (133,134).

Genel olarak iyonize radyasyonun anti-tümör immün yanıtla birçok farklı mekanizma üzerinden etki ettiği bilinmektedir. Tümör-ilişkili antijenin tanınması durumunda, efektör yanıtın artırılması anti-tümör T hücre yanıtlarının iyonize edici radyasyonun tedavi edici etkisi ile birleştirilmesi açısından öneme sahiptir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında yapılan deneylerde araştırma amacıyla kullanılan kanlar, 16969557-1486 sayılı Girişimsel Olmayan Etik Kurul izni kapsamında Hacettepe Üniversitesi, Onkoloji Hastanesi, Aferez Biriminde sağlıklı, gönüllü donörlerden toplanmıştır. Çalışma kapsamında yapılan deneylerin tamamı Hacettepe Üniversitesi, Kanser Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Radyasyon uygulamaları, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında yapılmıştır.

3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Penisilin-streptomisin, RPMI 1640, fetal buzağı serumu (*Fetal bovine serum*, FBS), fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi (*phosphate buffered saline*, PBS) (Advanta, ABD), Histofaque 1,077g/mL, Tripkan Mavis, etilendiamintetraasetik (*EDTA*), hücre bölünme takip boyası (*carboxyfluoresceinsuccinimidyl ester*, CFSE), JC-1, May-Grünwald, giemsa, kapatma solüsyonu (Entellan), triton X-100, buzağı Serum Albumin (BSA), paraformaldehit, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), fare γ -H2aX primer antikoru (Biolegend), Tavşan anti-CD3 (Abcam), anti-Fare Alexa 488, anti-Tavşan Alexa 555, esansiyel-olmayan amino asitler (HyClone™, GE Healthcare, İngiltere), anti-CD3 (klon: HIT3a), anti-PD-1 (Nivolumab, Opdivo), LEGENDplex Th1/Th2/Th17 sitokin çok-analitli ELISA kiti (BioLegend, ABD), CD4 mikrobuncuklar (Miltenyi Biotec, Almanya), hücre apoptoz tayin kiti (Annexin V), propidyum iyodür (PI), U tabanlı 96-kuyulu hücre kültürü tabakları, T25 kültür kabı, T75 kültür kabı, 1,5/15/50 mL steril tüpler, steril serolojik pipetler (5 mL, 10 mL, 25 mL).

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan antikolar

| Antikor Adı | Klon | Florokrom | Üretici Firma | Seyreltme |
|--------------|----------|-----------|--------------------------|-----------|
| CD4 | RPA-T4 | APC-Cy7 | Sony Biotechnology (Çin) | 1:50 |
| CD45RO | UCHL1 | PerCP | Sony Biotechnology (Çin) | 1:50 |
| CD62L | DREG56 | APC | Sony Biotechnology (Çin) | 1:50 |
| CD279 (PD-1) | EH12.2H7 | FITC | BioLegend (ABD) | 1:100 |

| | | | | |
|----------------|---------|------|--------------------------|-------|
| CD366 (TIM-3) | F38-2E2 | PE | BioLegend (ABD) | 1:100 |
| CD223 (LAG3) | 11C3C65 | FITC | BioLegend (ABD) | 1:100 |
| CD152 (CTLA-4) | L3D10 | PE | BioLegend (ABD) | 1:100 |
| CD11b | ICRF44 | APC | Sony Biotechnology (Çin) | 1:50 |

3.2. Tamponlar ve Çözeltiler

PBS çözeltisi (1X): 100 mL distile su içerisinde, 1 PBS tableti (NaCl, KCl, Na₂HPO₄ ve KH₂PO₄ içerir) çözülür. 7,4 pH'a sahip ve son konsantrasyonları 137 mM NaCl, 10 mM fosfat ve 2,7 mM KCl 1X PBS çözeltisi elde edilir. Çözelti otoklavlanarak, 4-8°C'de 2 yıla kadar saklanabilir.

Tam RPMI besi ortamı: L-glutamin (300 mg/L) içeren RPMI 1640 besi ortamına; son konsantrasyonu %10 ısı inaktive FBS ve %1 penisilin/streptomisin olacak şekilde tam RPMI besi ortamı hazırlanır. Besi ortamı +4-8°C'de 4 haftaya kadar saklanabilir.

Hücre kültüründe kullanılan monoklonal antikorlar: Ana stok (1 mg/mL) anti-CD3 (klon: HIT3a) antikorunun ara stok konsantrasyonu 5 µg/mL olacak şekilde ve ana stoğu 10 mg/mL olan anti-PD-1 (Nivolumab, Opdivo) ara stok konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde serumsuz RPMI 1640 içerisinde hazırlanır. Ara stoklar +4-8°C'de 1 hafta saklanabilmektedir.

Hücre bölünmesi takip boyası: Liyofilize halde bulunan CFSE (*carboxyfluoresceinsuccinimidyl ester*) (100 µg), üzerine 36 µL DMSO eklenir. Finaldeki konsantrasyon 5 mM olacak şekilde CFSE çözülür ve alikotlanarak ışıktan korunacak şekilde -80°C'de saklanır. Çözülmüş CFSE boyasının -80°C'de bir aya kadar saklanabilir.

Tripan mavisi: Toz halde bulunan tripan mavisi, 1X PBS içinde final konsantrasyonu %4 a/h olacak şekilde çözülür. Çözelti oda sıcaklığında 3 yıla kadar saklanabilir.

Buzağı serum albumin (BSA): %10 a/h konsantrasyonda olacak şekilde toz BSA, distile su içinde çözülür. Çözelti +4-8°C'de 2 yıla kadar saklanabilir.

MACS (*magnetic-activated cell sorting*) yıkama tamponu: 1X PBS içerisinde son konsantrasyonları 2 mM EDTA ve %0,5 a/h BSA olacak şekilde hazırlanır. Hazırlanan çözelti +4-8°C’de 4 haftaya kadar saklanabilir.

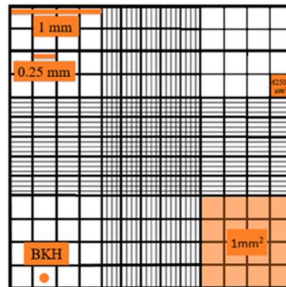
Propidyum iyodür: Toz halde bulunan propidium iyodür 5 mg/mL (2,5 mM) final konsantrasyonda olacak şekilde distile su yardımıyla çözülür. Hazırlanan çözelti +4-8°C’de 6 aydan uzun süre saklanabilir.

JC-1 mitokondriyal membran potansiyel test boyası: Toz haldeki JC-1 boyası final konsantrasyonu 200 μ M olacak şekilde DMSO içerisinde çözülür. Çözelti +2-8°C’de 1 yıla kadar saklanabilir.

3.3 Hücre Kültürü Çalışmaları

3.3.1. Hücre Sayımı

Sayılacak olan hücreler, sayımın en doğru şekilde yapılabilmesi için sayım öncesinde iyice ve nazikçe pipetlenerek karıştırılır. Bu sayede hücrelerin homojen bir şekilde süspansiyon olması sağlanır. Hücre süspansiyonundan 10 μ L alınarak yine 10 μ L tripan mavisi ile 1:1 oranında pipetlenerek karıştırılır. Hazırlanan karışım Fuchs-Rosental lamına örtülen lamel altına kapiler etki ile yayılır. Lamın yüzeyi ile lam üzerine kapatılan lamelin yüzeyi arasında 0.1 mm’lik aralık bulunmaktadır, dolayısıyla lamın oluştuğu 9 eşit kareden her birine 0.1 μ L hacimde sıvı yerleşir. Lamın farklı noktalarındaki 4 farklı kareden yapılan ölçümlerde bulunan hücre sayısının ortalaması alınarak yüklenen süspansiyon örneğinin 0.1 μ L’inde bulunan hücre sayısı elde edilmiş olur. Tripan mavisi ile 1:1 oranında seyreltilme kat sayısı da göz önünde bulundurularak mL hacim başına düşen hücre sayısı hesaplanır (Şekil 3.1., Formül 3.1.).



Şekil 3.1. Fuchs-Rosental lamı ve yüzey alanı.

$$\text{Alan} = 1\text{mm} \times 1\text{mm} = 1\text{mm}^2$$

$$\text{Hacim} = 1\text{mm}^2 \times 0.1\text{ mm} = 0.1\text{ mm}^3$$

$$\text{Hücre konsantrasyonu} = \frac{\text{Hücre sayısı} \times 10^4}{\text{Sayım alanı} \times 1\text{mm}^2} \times \text{Seyreltme faktörü}$$

Formül 3.1. Hücre sayısı hesaplama formülü.

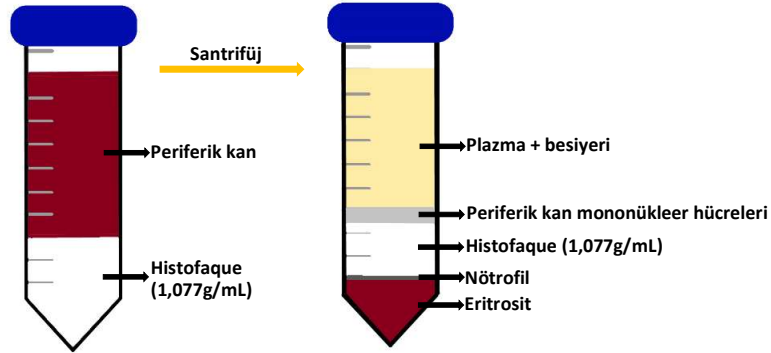
3.3.2. Dondurularak Stoklanan Hücrelerin Çözülmesi ve Pasajlanması

Hücrelerin daha sonra kullanabilmesi ve uzun vade saklanabilmesi amacıyla erken pasaj dönemlerinde kriyojenik tüpler yardımıyla -196°C 'de sıvı azot tankında dondurulur. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere kriyojenik tüp içerisindeki akut miyeloid lösemi hücre hattı THP-1 hücreleri kültürde kullanılmak üzere sıvı azot tankından çıkarıldı. Tüp, önceden 37°C 'ye getirilen su banyosu içerisinde buz kristalleri tamamen eriyene kadar çözülür. Tamamen çözdürülen hücreler kriyojenik tüpün dekontamine edilmesinin ardından laminar akım kabini içerisine alınır. Önceden hazırlanmış olan %10 fetal sıgır serumu (*fetal bovine serum*, FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren 50 mL tam RPMI 1640 besi ortamı içerisine aktarılır ve $400\times g$ 'de 5 dakika santrifüjlenir. Ardından, tüp dibinde toplanan hücrelere müdahale etmeden süpernatant tüpten uzaklaştırılır ve tüp içerisindeki hücre pelleti tam RPMI 1640 ile süspanse hale getirildikten sonra final konsantrasyonu 1×10^6 mL olacak şekilde esansiyel-olmayan aminoasit içeren tam RPMI besi ortamı içerisinde T25 kültür kabına alınır ve kültür kabı 37°C ve %5 CO_2 içeren inkübatöre kaldırılır. T25 kültür kabı içerisindeki hücrelerin yoğunluğu artınca T75 kültür kabı içerisine aktarılır ve aktarılan hücrelere 10 mL taze, tam besi ortamı eklenir.

İnkübatörde, T75 kültür kabında bulunan THP-1 hücreleri $2-4\times 10^5$ hücre/mL yoğunlukta olacak şekilde, ortalama olarak 2-3 günde bir tam RPMI 1640 ile besi ortamı yenilemesi yapılarak kültürün devamlılığı sağlanır. Kültürdeki hücre yoğunluğunun 1×10^6 /mL'ye ulaşmamasına özen gösterilir. Besi ortamı yenileme işlemi öncesinde ve besi ortamı yenileme işleminin ardından T75 kültür kabı, ışık mikroskobu altında olası kontaminasyon ve hücre morfolojisi açısından düzenli olarak incelenir.

3.3.3. Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin ve CD4⁺ T Hücrelerin İzolasyonu

Sağlıklı, gönüllü bireylerden alınan kan örnekleri pıhtılaşmayı engelleyen EDTA içerikli tüplere toplanır. Tüpler, %70 alkol ile dekontamine edildikten sonra laminer akım kabini içerisine alınır. Ardından, kan örneği, 15 mL'lik tüp içerisinde 1:1 oranında serum içermeyen RPMI 1640 besi ortamı ile seyreltilir. 15 mL tüp içerisine eş zamanlı olarak 1,077 g/mL yoğunluğa sahip 3 mL Ficoll eklenir ve karışmamasına özen gösterilerek şekilde 1/1 oranında seyreltilmiş kan, ayrıştırma solüsyonu üzerine dikkatlice yayılır. Tüpler ağzı kapatıldıktan sonra dik tutularak, sallamamaya dikkat ederek faz ayırma işlemi için santrifüje götürülür; 400xg'de 2 hızlanma/yavaşlama ayarında 25 dakika faz ayırımı için santrifüjleme işlemi başlatılır (Şekil 3.2.). Daha sonra pasteur pipeti aracılığıyla plazma, besi ortamı karışımının bulunduğu fazın (yaklaşık 1-2 mL) bir kısmı tüpten uzaklaştırılır. Ardından, periferik kan mononükleer hücreleri başka bir 15 mL steril tüpe, Pasteur pipeti yardımıyla toplanır ve tüpün kalan kısmı 1X PBS ile tamamlandıktan sonra 2 kez 5 dakika 400xg'de santrifüjlenerek yıkanır ve tüpün dibinde toplanan hücre pelleti haricindeki sıvı faz uzaklaştırılarak CD4⁺ T hücre saflaştırma aşamasına geçilir.



Şekil 3.2. Periferik kanın faz ayırma işlemi ile farklı fazlarda hücre gruplarına ayrıştırılması.

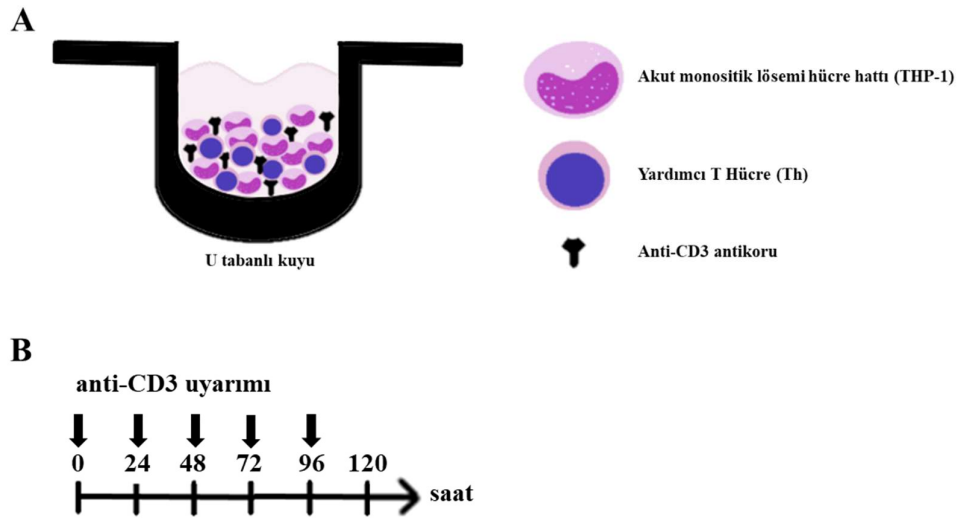
PKMH toplandıktan sonra, CD4⁺ T hücrelerin PKMH içerisinde saflaştırılması amacıyla MACS yöntemi kullanılır. Toplanan hücreler MACS tamponu aracılığıyla da bir kez 400xg'de 5 dakika santrifüjlenir. Santrifüj işleminin ardından

tampon çözelti uzaklaştırılarak hücre pelleti 100 uL MACS tamponu ile süspanse edilir. Hücre sayımı yapılarak 1×10^7 hücre manyetik-aktif boncuklarla işaretlenmek için ayrılır. Pozitif seçim MACS kiti kullanıldığı için yalnızca ilgilenilen popülasyon kolona (*LS column*) yapışacak boncuklarla işaretlenir ve işaretlenmeyen hücreler ($CD4^+$ T hücre haricindeki hücreler) kolondan geçerek aşağı akacaktır. İşaretleme için ayrılan hücreler üzerine 10 uL $CD4$ mikro-boncukları eklenerek $+4^\circ C$ 'de 15 dakika inkübe edilir. İnkübasyonun ardından MACS tamponu aracılığıyla 1 kez $400 \times g$ 'de 5 dakika yıkama işlemi gerçekleştirilerek bağlanmayan mikro-boncuklar uzaklaştırılır ve işaretli hücre pelleti MACS tamponu ile süspanse duruma getirilir. Manyetik standı dik bir konumda kolon yerleştirildikten sonra kolon aktivasyonu için 3 mL MACS tamponu geçirilir. Kolonun aktivasyonunun ve dikey akışın sabitlenmesinden sonra işaretli örnek kolondan geçirilir. $CD4$ mikro-boncukları ile işaretli PKMH örneği kolondan geçirildikten sonra 3 defa 3 mL MACS tampon çözeltisi ile kolon yıkanır. Yıkamaların ardından kolon manyetik alandan uzaklaştırılarak steril 15 mL tüp içerisine alınır ve üzerine 5 mL MACS tampon çözeltisi eklendikten sonra kolon pistonu hızlıca itilir. Pistonun itilmesiyle oluşan basınç ile 5 mL MACS tamponu kolondan hızlıca geçerek pozitif seçim ile kolona yapışan hücreler tüp içerisine toplanır. Hücre saflığının test edilmesi amacıyla geçen hücrelerden örnek alınarak 1 kez $400 \times g$ 'de 5 dakika yıkama işlemi gerçekleştirilir ve ardından 100 uL hücre boyama tamponu ile süspanse edilir. Süspanse hücreler floresan işaretli anti- $CD4$ antikoruna ile $+4^\circ C$ 'de 40 dakika süreyle inkübe edilerek işaretlendikten sonra tekrar 1 kez $400 \times g$ 'de 5 dakika yıkama işlemi yapılır ve ardından hücreler 100 uL tampon ile süspanse edilerek akım sitometri cihazından saflık analizi yapılır.

3.3.4. Ko-kültür Ortamının Oluşturulması

$CD4^+$ yardımcı T hücrelerin uyarımının sağlanması için akut myeloid lösemi hücre hattı THP-1 hücreleri birlikte kültüre alınır. $CD4^+$ T hücre ve THP-1 hücrelerin ko-kültür yöntemi daha önce laboratuvarımızda optimize edilmiş olup bu protokol yardımı ile ko-kültür ortamı kurulmuştur (135). Protokolden yola çıkılarak, $CD4^+$ T hücre/THP-1 hücre 1:2 ($25 \times 10^3/50 \times 10^3$) oranında ve 25 ng/mL final konsantrasyondaki anti- $CD3$ antikoruna tam RPMI besiyeri ortamı içerisine eklenir. Homojen bir biçimde kuyulara dağıtılmak amacıyla steril tüpte birleştirilir. Ardından çok kanallı mikro pipet yardımı ile her bir kuyuya 200 uL olacak şekilde U-tabanlı 96

kuyulu kültür tabaklarına ekilir. Oluşturulan ko-kültür tabakları inkübatöre kaldırılır. Ko-kültürdeki, anti-CD3 uyarımının sürekliliğini sağlamak ve bu sayede hücrelere farklı fenotipik ve fonksiyonel profillerin kazandırılması amacıyla, her 24 saatte bir kuyulardaki süpernatantın 100 uL'si U tabanın dibinde toplanan hücreleri rahatsız etmeyecek bir şekilde çeperden çok kanallı mikro pipet yardımıyla ortamdan uzaklaştırılır. Yerine 25ng/mL anti-CD3 içeren taze tam RPMI 1640 besi ortamından 100 uL yine aynı şekilde çeperden eklenir. Oluşturulan ko-kültür ortamı tazeleme işlemleri ile 120. saate kadar taşınmaktadır. Bu tez kapsamındaki ko-kültür inkübasyon süreleri 0, 24, 72 ve 120 saat olarak kullanılmıştır.

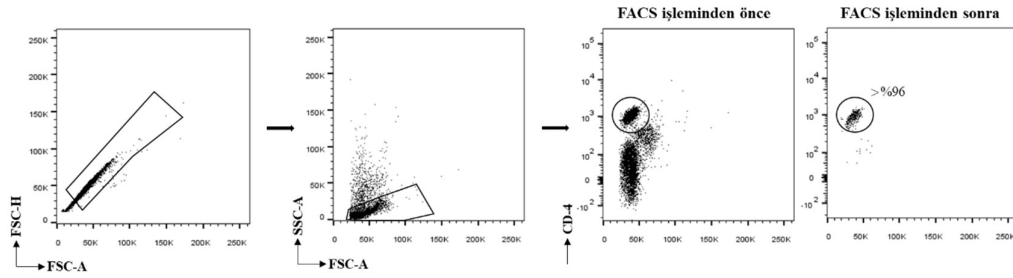


Şekil 3.3. Ko-kültür ortamı ve anti-CD3 uyarımı. **A.** Ko-kültür ortamı ve bileşenleri. **B.** Ko-kültür ortamına yapılan anti-CD3 uygulama süreleri.

3.3.5. Floresan Aktive Hücre Ayırma Yöntemi

Radyasyon uygulamasından 24 saat sonra yardımcı T hücrelerin ko-kültür ortamından izole edilerek mitokondriyal membran potansiyelinin floresan boyama yardımıyla görüntülenebilmesi amacıyla floresan aktive hücre ayırma (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) yöntemi kullanılmıştır. Ko-kültür ortamında bulunan hücreler, anti-CD4 antikoruna ile işaretlendikten sonra 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde tam RPMI1640 besi ortamı içerisine alınır. FACS cihazındaki akış ayarlarının optimizasyonunun yapılması için örnekten önce, cihaza yüklenen polistiren boncuklar

(Accudrop Beads, BD Biosciences, ABD) ile örnek ayırma ünitesi içerisindeki defleksiyon plakları arasına giriş zamanı, uygun frekans ve voltaj değerleri belirlenir. Cihazdaki optimizasyonlar yapıldıktan sonra, hazırlanılan örnek yüklenir ve uygun kapılama stratejileri yapıldıktan sonra ilgilenilen hücre grubu tam RPMI1640 besi ortamı içerisinde toplanır. Ayırıştırılan hücrelerden bir örnek alınarak saflık kontrolü yapıldıktan sonra akım sitometride immünofenotipleme yapılır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. FACS için kullanılan kapılama stratejisi. FACS işlemi sonrasında $CD4^+$ hücrelerin saflığı >96 olarak belirlenmiştir.

3.3.6. Yardımcı T Hücelere İnhibitör Sinyal Blokajı Uygulanması

Ko-kültür yapılarak farklı aktivasyon basamağına ilerletilen yardımcı T hücelere 120. saatte immün kontrol noktası blokaj uygulaması yapılmıştır; besi ortamının ve anti-CD3 uyarımının tazelenmesi sırasında kuyu başına final konsantrasyonu 10 $\mu\text{g/mL}$ anti-PD-1 (Nivolumab, Opdivo) antikoru eklenmiştir. İzotipik kontrol olarak son konsantrasyonu 10 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde IgG1 κ antikoru farklı kuyulara eklenmiştir. Ardından, kültürler radyasyon uygulaması yapılmış ve uygulamadan 24 saat sonra, yardımcı T hücelere ko-kültürlerden toplanarak canlılık analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.4. Radyasyon Uygulaması

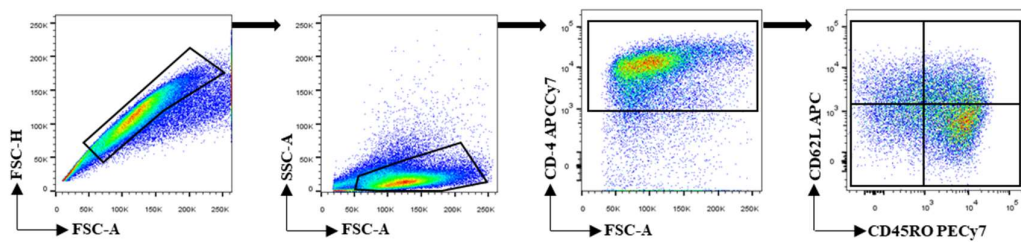
Kullanılan ko-kültür modelinde radyasyonun hücre üzerindeki fonksiyonel ve fenotipik değişimlere etkisinin belirlenmesi amacıyla $CD4^+$ T hücelere farklı dozlarda radyasyona maruz bırakılmıştır. 24 saatlik anti-CD3 uyarımları ve THP-1 ko-stimülasyonu sayesinde farklı fonksiyonel basamaklara taşınan $CD4^+$ T hücelere buldukları ko-kültür ortamı bozulmayacak titizlikle çalışılmıştır. Işınlama sırasında Varian marka DHX model lineer hızlandırıcı kullanılmıştır. Belirlenen radyasyon

dozları (kontrol/0 Gy, 2 Gy, 5 Gy, 8 Gy, 12 Gy ve 18 Gy), 6 MV enerjiye sahip foton demetleri ile iletilmiştir. Işınlama, hücre plakaları 5 cm derinlikte olacak şekilde gantri açısı 180°'de ve belirlenen doz dakikada 400 cGy doz oranında olacak şekilde yapılmıştır. Işınlama ardından hücreler tekrar 37°C ve %5 CO₂ barındıran inkübatöre kaldırılır.

3.5. Yardımcı T Lenfositlerin Fenotipik ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

3.5.1. İmmünofenotipleme

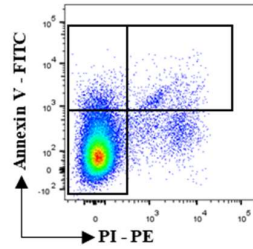
Ko-kültür öncesi (0. saat) ve ko-kültürde farklı aktivasyon basamaklarına ilerletilen yardımcı T hücreleri fenotipik karakterizasyonun yapılması için hücreler ko-kültürlerden toplanır. CD4, CD45RO, CD62L, PD-1, TIM-3, LAG3 ve CTLA-4 yüzey moleküllerine özgül monoklonal antikolarla işaretleme amacıyla 3 mL'lik tüpler içerisinde 100 µL hücre yıkama tamponunda (CellWash, BD) süspansiyon haline getirilen hücrelere optimum konsantrasyonlarda (Tablo.1.) floresan konjuge monoklonal antikolar eklenerek +4°C'de 40 dakika karanlıkta inkübe edilir. İnkübasyonun ardından örneklerin üzerine 2 mL yıkama tamponu eklenerek 400xg'de 5 dk santrifüj yapılır. Süpernatant atılarak, hücreler 150 µL CellWash içerisinde tekrar süspansiyon haline getirilir ve akım sitometri cihazında, kullanılan antikora bağlı olarak uygun lazerler açılır ve voltaj değerleri ayarlandıktan sonra ölçümler yapılır. Ölçüm sonuçlarında elde edilen veri dosyaları .fcs (*flow cytometry standard*) dosya formatında cihazdan alınarak FlowJo yazılımı (Tree Star, ABD) yardımıyla analizler tamamlanır (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Akım sitometri cihazından alınan .fcs dosyalarının FlowJo yazılımı yardımıyla oluşturulan kapılama stratejisi.

3.5.2. Hücre Canlılık Analizi

Ko-kültürün farklı inkübasyon sürelerinde toplanan yardımcı T lenfositlerin canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik hücre popülasyon oranlarının belirlenmesi amacıyla Annexin V ve PI boyaması yapılmıştır. Ko-kültürden farklı inkübasyon aralıklarında toplanan yardımcı T hücreler 1 kez 400xg'de 5 dk santrifüjlenerek yıkanır. Ardından 5×10^6 hücre 100 μ L Annexin V bağlama tamponu içerisinde süspande edilir ve tampon içerisinde 5 μ L floresan konjuge Annexin V eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edilir. İnkübasyon ardından son konsantrasyon 50 μ g/mL olacak şekilde PI eklemesi yapılır ve oda sıcaklığında, karanlıkta 5 dakika daha inkübe edilir. İnkübasyonların bitmesinin ardından tüplere 2 mL CellWash eklenerek 400xg'de 5 dk santrifüjlenerek yıkama işlemi gerçekleştirilir. Yıkamanın ardından tüp içerisindeki hücre pelleti 150 μ L CellWash aracılığıyla süspansiyon haline getirildikten sonra vakit kaybetmemeye özen gösterilerek akım sitometri cihazında hücre canlılık analizleri yapılır (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. FlowJo yazılımı yardımıyla yapılan canlılık analizinin kapılma stratejisi. Şekil 3.4.'te gösterilen kapılma stratejisi yardımıyla ilgilenilen immünofenotipteki hücre seçildikten sonra Annexin V-PI boyaması yardımıyla hücrelerin canlılık analizleri yapılmıştır. Annexin V⁻PI⁻ popülasyonu canlı hücreleri, Annexin V⁺PI⁻ popülasyonu erken apoptozdaki hücreleri, Annexin V⁺PI⁺ olan hücreler ise geç apoptozdaki hücreleri temsil etmektedir.

3.5.3. Hücre Çoğalma Analizi

Radyasyon uygulaması öncesinde ko-kültürün farklı inkübasyon sürelerinde bulunan hücreler toplanarak karboksifloresin süksinimidil ester (*carboxyfluorescein succinimidyl ester*, CFSE) boyası ile etiketlenmiştir ve IL-2 varlığında ko-kültür tekrar oluşturularak radyasyon verilmiştir. Radyasyon uygulamasından 72 saat sonra hücre çoğalması ile korele olarak boyanın dilüsyonu akım sitometride ölçülmüştür. Final

konsantrasyonu 5 μ M olacak şekilde CFSE boyası, en çok 10^7 hücre bulunan 1 mL'lik serumsuz RPMI 1640 besi ortamı içerisine eklenir. CFSE boyası eklendikten sonra tüp karanlıkta ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. İnkübasyonun ardından, bağlanmayan CFSE molekülünün etkinliğinin durdurulması amacıyla tüp içerisine en az 10 mL tam RPMI 1640 besi ortamı eklenir ve 2 kez 400xg'de 5 dk santrifüjlenerek yıkama işlemi gerçekleştirilir. Yıkamanın ardından final konsantrasyonları 10 μ g/mL IL-2 ve 25 ng/mL olan anti-CD3 eklemesi yapılarak tam RPMI besi ortamı içerisinde THP-1 ile ko-kültür kurulur. Ko-kültürün kurulmasının ardından farklı aktivasyon basamaklarındaki yardımcı T lenfositler farklı radyasyon dozlarına (0, 2, 5, 8, 12 ve 18 Gy) maruz bırakılır. Radyasyon uygulamasından 72 saat sonra hücre çoğalmalarının analizinin yapılması için gerekli immünofenotipleme boyamaları yapıldıktan sonra akım sitometri cihazında ölçümler tamamlanır. Veriler FACS Diva yazılımından .fcs dosya formatında alındıktan sonra, FlowJo yazılımı aracılığıyla analizler tamamlanır.

3.5.4. Akım Sitometri ile Sitokin Miktar Tayini

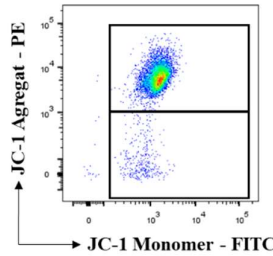
Ko-kültürün 0., 24., 72. ve 120. saatlerinde, kontrol koşulu (0 Gy) ve 2 farklı radyasyon dozu (5 Gy ve 12 Gy) uygulaması yapılan koşullardaki ko-kültür ortamlarındaki kuyulardan dipte bulunan hücre gruplarına dokunmamaya özen göstererek pipet yardımıyla kültür ortamından toplanır ve 1.5 mL'lik tüpe aktarılır. Toplanan süpernatantlar hızlı bir şekilde -80°C 'ye kaldırılarak, sitokin miktar analizinin yapılması için 3 farklı bağımsız kullanacağından, bağımsızların tamamı toplanana kadar burada muhafaza edilir. Örnek dondurma çözme esnasındaki protein denatürasyonu ve protein instabilitesinden korunmak amacıyla; ölçüm yapılacağı gün, 3 farklı bağımsızdan gelen örnekler buz üstünde ve her bağımsızdan eşit miktarda süpernatant alınmasına dikkat edilecek şekilde örnekler birleştirilir. Sitokin tayini, farklı yardımcı T lenfosit alt-tipleri (Th_1 , Th_2 , Th_9 , Th_{17} , Th_{22} , T_{H}) tarafından üretilen 13 farklı sitokin (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IFN- γ ve TNF- α) floresan kodlu mikrobuncuk-tabanlı immün-analiz kiti (LEGENDplex, Biolegend, ABD) yardımıyla IL-2, IFN- γ ve TNF- α sitokinlerinin miktarlarının ölçümü akım sitometri ile yapılmıştır. Kit içerisindeki mikro-boncuklar, kullanıma hazırlanmak için, 1 dakika sonikasyon banyosunda tutulur ve ardından 30 saniye vortekslenerek tamamen süspansiyon haline geldiğinden emin olunur. 5 mL'lik

tüplere 25 µL tampon çözeltisi (*assay buffer*), hazırlanacak tüpe bağlı olarak üzerine 25 µL sitokin miktarı tespit edilmek istenen örnek veya kit içerisindeki standart eklenerek tüp içeriği karıştırılır. Standart kit protokolüne uygun olarak 10.000 pg/mL stoktan 1:4 oranında seri dilüsyonlar yapılarak tüpler hazırlanır. Ardından mikrobuncuklar tüplere 25'er µL olacak şekilde eklenir ve tüplerin üzeri alüminyum folyo yardımıyla kapatılarak 500 rpm'de 2 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıya bırakılır. 2 saatlik inkübasyonun ardından her bir örneğin üzerine 500 µL yıkama tamponu eklenir ve 2 kez 300xg'de 5 dakika santrifüjleme işlemi yapılarak yıkanır. Yıkama sonrası tüplere 25'er µL deteksiyon antikoru (*detection antibody*) eklenir ve çalkalayıcıda 500 rpm'de 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilir. İnkübasyon sonrası yıkama yapılmadan tüplerin içerisine 25'er µL SA-PE (*streptavidin-phycoerythrin*) çözeltisi eklenir ve 500 rpm'de oda sıcaklığında 30 dakika çalkalayıcıda inkübasyona bırakılır. İnkübasyonun ardından tüplerin üzerine 500'er µL yıkama tamponu eklenerek 2 kez 300xg'de 5 dakika santrifüjlenerek yıkanır. Yıkama işleminin ardından tüpler içerisine 100 µL yıkama tampon çözeltisi eklenir ve örnekler süspansiyon hale getirildikten sonra akım sitometri yardımıyla analiz edilir. Verilerin analizi .fcs formatında alınan dosyaların, LEGENDplex veri analiz yazılımına aktarılıp bu yazılım aracılığıyla işlenmesiyle sağlanmıştır.

3.5.5. Mitokondriyel Membran Potansiyelinin Belirlenmesi

Mitokondriyel membran potansiyelinin belirlenmesi amacıyla, radyasyon uygulamasının ardından, farklı inkübasyon aşamalarındaki yardımcı T hücrelerde JC-1 (5,5',6,6'- tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbosiyanin iyodür) boyaması yapılmıştır. JC-1, floresan emisyonunun yeşilden (529 nm), kırmızıya (590 nm) kayışı ile izlenen bir birikim sergiler. Sağlıklı hücrelerde, JC-1 mitokondride birikir ve kırmızı floresan ışımaya yapan J-agregatları oluşturur. Apoptotik hücrelerde ise boya mitokondri içerisine girer ancak birikmez ve sitoplazmada monomerik formda yeşil floresan ışımaya yapar. Sonuç olarak, mitokondriyal depolarizasyon, kırmızı/yeşil floresan yoğunluk oranındaki azalma ile hesaplanabilir. JC-1 boyamasının yapılabilmesi için, radyasyon uygulamasından 24 saat sonra farklı inkübasyon sürelerinde hücreler, ko-kültür ortamından 15 mL'lik tüp içerisine toplanmıştır. Hücreler en fazla 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde sayılarak yeni bir tüp içerisine alındıktan sonra, 2 kez 1X PBS yardımıyla 400xg'de 5 dakika santrifüjlenerek

yıkanmıştır. Santrifüj işleminin ardından, 100 µL seyreltme tamponu veya hücre yıkama tamponu içerisinde hücreler süspansiyon haline getirildikten sonra final konsantrasyonu 2 µM olacak şekilde JC-1 boyası eklenir ve hücreler 30 dakika, 37°C’de inkübasyon işlemi yapılır. İnkübasyon sonrasında hücre yıkama tamponu eklenerek 400xg’de 5 dakika santrifüjlenerek 1 kez yıkama işlemi yapılır. Akım sitometride cihazındaki analiz esnasında kullanılacak bir yüzey molekülü varsa 3.5.1’de belirtilen şekilde gerekli antikör boyamalarının yapılmasının ardından 100-150 µL CellWash içerisinde süspansiyon haline getirildikten sonra analizler yapılır. Akım sitometri verileri .fcs dosyası olarak alındıktan sonra FlowJo yazılımı yardımıyla analizler tamamlanır (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. JC-1 boyasının FlowJo programında kullanılan kapılma stratejisi. Agregat durumda bulunan JC-1 boyası PE⁺ hücreler içerisinde MFI değeri alınarak, monomer durumda bulunan JC-1 boyası ise PE⁻ kapılma içerisinde alınan FITC MFI değeri ile hesaplanmaktadır.

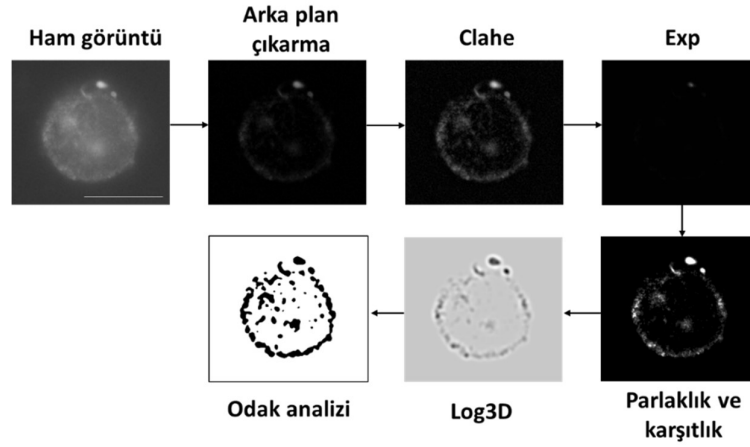
3.5.6. Sitolojik Analizler İçin Preparat Hazırlanması

Sitospin yapılamak istenen hücreler toplanarak 2 kez 1X PBS ile 5 dakika 400xg’de santrifüjlenerek yıkama işlemi yapılır. Santrifüjden sonra hücrelerin üzerindeki sıvı faz uzaklaştırılır ve hücreler tüp içerisinde 1X PBS ile 2 mL’lik hücre süspansiyonu oluşturulduktan sonra lam üzerine yerleştirilen sitospin (*Cytospin*) aparatının kuyularına Pasteur pipeti yardımıyla aktarılır. Hazırlanan örnekler 50xg’de 3 dakika sitospin cihazında (Hettich Universal 320, Almanya) santrifüjlenir. Ardından süpernatant sitospin kuyularından uzaklaştırılır ve spin aparatı çıkarılır. Sadece lam ve lamın üzerine kurutma kağıdı bırakılacak şekilde hazırlanan örnekler kalan süpernatant kalıntılarının kurutulması amacıyla 150xg’de 1 dakika santrifüjlenerek sitospin işlemi tamamlanmış olur.

Hücre İçi DNA Kırıklarının Saptanması İçin H2aX Boyaması

DNA kırıklarının belirlenmesi amacıyla farklı radyasyon dozlarına (kontrol/0 Gy, 5 Gy ve 12 Gy) maruz bırakılan farklı sürelerde uyarılan (0., 24., 72. ve 120. saat) CD4⁺ T hücrelerinde, γ -H2aX molekülünün durumu belirlenmiştir. İyonlaştırıcı radyasyon veya sito-toksik ajanlar aracılığıyla DNA hasarının başlatılmasının ardından γ -H2aX odakları hızlı bir şekilde oluşur ve bu odaklar immünfloresan metodu yardımıyla görselleştirilebilir. Radyasyon maruziyetinden 24 saat sonra hücreler 5 mL'lik tüpler içerisine dikkatlice toplanır ve 2 kez 1X PBS yardımıyla 5 dakika oda sıcaklığında 400xg'de santrifüjlenerek yıkanır ve sitospin ile preparat hazırlanır. Lam yüzeyine sitospin aracılığıyla yapıştırılan hücreler, %4 paraformaldehit yardımıyla 15 dakika oda sıcaklığında fikse edilir. Ardından; preparatlar, her biri 5'er dakika olacak şekilde 3 kez 1X PBS ile yıkanır. Yıkama işleminin ardından hücreler %0,1 Triton X-100 içeren 1X PBS ile oda sıcaklığında 4 dakika inkübe edilir. Bu sayede membran geçirgenliği artırılan hücreler uygulama ardından tekrar her biri 5'er dakika olacak şekilde 3 kez 1X PBS yardımıyla yıkanır ve sonrasında %1 BSA içeren 1X PBS ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilerek bloklanır. Bloklama işleminin ardından %1 BSA içeren 1X PBS içerisinde seyreltilmiş birincil antikorlar (*primary antibody*) olan anti-insan (fare) γ -H2aX, (klon: 2F3, BioLegend) ve anti-insan (tavşan) CD3 (Abcam) preparat üzerine mikropipet yardımıyla yavaşça bırakılarak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında 3 kez 1X PBS yardımıyla örnekler yıkandıktan ve bağlanmayan antikorlar ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, 1X PBS içerisinde seyreltilmiş anti-fare Alexa488 (Abcam) ve anti-tavşan Alexa555 (Abcam) floresan konjuge ikincil antikorları ve hücre çekirdek boyası olan DAPI (1:400 seyreltme) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında preparatlar 3 kez 1X PBS yardımıyla yıkanır ve ardından 100 μ L kapatma çözeltisi (*mounting media*) eklenerek 0,17 mm kalınlığındaki lamel yardımıyla örneklerin üzeri kapatıldıktan sonra kurumunun önlenmesi amacıyla lamel kenarları oje yardımıyla tamamen kapatılır. Floresan görüntülemenin yapılabilmesi için hazırlanan preparatların üzerine immersiyon yağı damlatılarak, 100X objektifte epifloresan mikroskoba (Olympus BX51, Japonya) yerleştirilir. Görüntüler, soğutmalı 5,0 mega piksel CCD renkli kamera (DC5000i, Euromex, Hollanda) yardımıyla çekilerek bilgisayara kaydedilir.

Kaydedilen görüntülerdeki DNA kırık odakları, Imaje J yazılımı üzerinden analiz edilir (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. DNA kırık odağı sayısının saptanması için kullanılan analiz yönteminin işlem basamakları.

May-Grünwald – Giemsa Boyama

Hücreler radyasyon maruziyetinden 24 saat sonra kültürden toplanarak 5 mL'lik tüplere alınır ve 2 kez 1X PBS yardımıyla 400xg'de 5 dakika santrifüj yardımıyla yıkanır ve sitospin yapılarak lam yüzeyine yapıştırılır. Santrifüj işleminin ardından preparatlar 5 dakika metanolde tutularak fikse edilir ve fiksasyonun tamamlanması ve örneklerin üzerindeki sıvının tamamen gitmesi için preparatlar sabit şekilde konumlandırılarak hava yoluyla kurumaya bırakılır. Ardında, örnekler şaleye içerisine yerleştirilir ve Giemsa boyası (distile su ile 1:10 seyreltme) örneklerin yüzeyi tamamen boya içerisinde kalacak şekilde şalenin içerisine doldurulduktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası boya ortamdan uzaklaştırılır ve örnekler 2 kez distile su yardımıyla yıkanır ve fazla boya ortamdan uzaklaştırılır. Yıkamanın ardından May-Grünwald boyası herhangi bir seyreltme işlemi yapılmaksızın, örneklerin yüzeyleri tamamen kaplanacak şekilde şale içerisine aktarılır ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir. May-Grünwald boyamasının ardından örnekler tekrar 2 kez distile su yardımıyla yıkandıktan sonra preparatlar hava yardımıyla kurumaya bırakılır. Daha sonra preparatların üzerine kapatma solüsyonu (Entellan, Merck, Almanya) çeker ocak içerisinde damlatılarak örneklerin üstü lamel

yardımıyla kapatılır. Örnekler dijital kameralı ışık mikroskobu (DM 6000, Leica, Almanya) ile analiz edilmiştir.

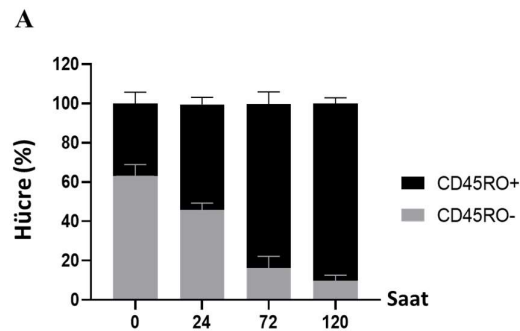
3.6. İstatistiksel Yöntem

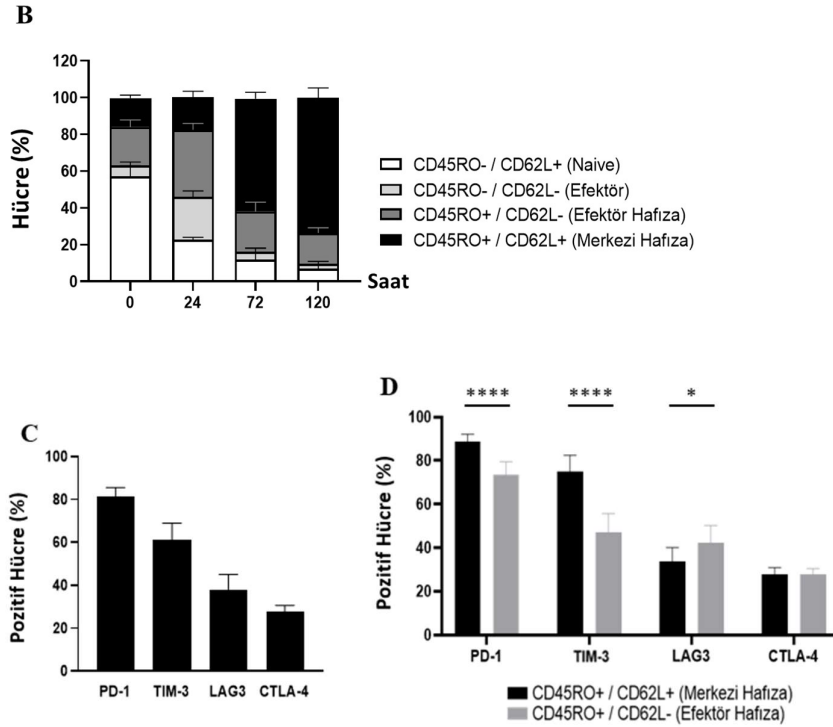
Fenotipik ve fonksiyonel deneylerde ≥ 3 bağımsız kullanılmıştır. Elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizi (ANOVA ve post-hoc analizleri, Ki-kare ve/veya Student's t testleri) Graphpad Prism v9 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Ko-kültürde Th Uyarımının İmmünofenotip Analiz İle Takibi

Bu tez çalışmasında kullanılan ko-kültür modelinde, Th hücreler için birincil sinyal kaynağı anti-CD3 antikoru aracılığıyla, ko-stimülasyon ise akut miyeloid lösemi monosit hücre hattı olan THP-1 tarafından sağlandı. Ko-kültürün farklı zaman dilimlerinde yapılan analizler sonucunda ko-kültür kurulduğunda CD45RO⁻ popülasyon kültür içerisinde baskın durumdayken ko-kültürün 24. saatinden itibaren ilerleyen saatlerde, T hücrelerin büyük çoğunluğu CD45RO⁺ olarak belirlenmiştir. CD45RO⁺ hücre yüzdesinin değişimi sırayla; %36,73±4,70, %53,83±3,10, %83,38±5,42, %90,30±2,51 olarak bulunmuştur (Şekil 4.1.A.). Naif T (CD45RO⁻CD62L⁺) lenfositlerin 0., 24., 72. ve 120. saatlerdeki değişimi sırasıyla %57,19±4,74, %22,73±1,10, %11,90±5,51, %7,01±1,63; efektör (CD45RO⁻CD62L⁻) T lenfositlerin değişimi sırayla %5,93±1,48, %23,27±2,86, %4,33±1,58, %2,64±1,12; efektör hafıza benzeri (CD45RO⁺CD62L⁻) T lenfositlerin zamana bağlı oranları sırayla %20,78±3,22, %36,49±3,04, %21,79±4,42, %16,83±2,38; merkezi hafıza benzeri (CD45RO⁺CD62L⁺) T lenfositlerin değişimi ise %15,83±1,36, %17,70±2,78, %61,32±3,07, %73,37±4,67 olarak belirlenmiştir. Ko-kültürün başlangıcında baskın immünofenotipteki popülasyon naif Th'ler olurken kültürün ilerleyen saatlerinde içerdeki popülasyonun büyük çoğunluğu uyarılmış T hücrelerden oluşmaktadır. Hafıza benzeri immünofenotipinde belirlenen T hücreler arasında ise en fazla oranda bulunan grup merkezi hafıza benzeri T lenfositler olarak bulunmuştur (Şekil 4.1.B.).





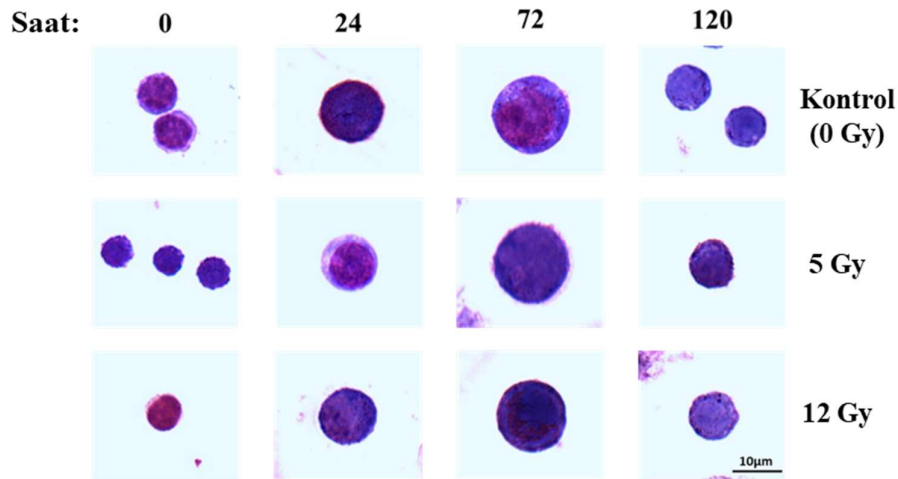
Şekil 4.1. Farklı inkübasyon süreleri sonunda CD4⁺ T hücrelerin immünofenotip dağılım grafikleri. **A.** CD4⁺ T hücrelerin CD45RO[±] hücre popülasyonlarındaki % dağılım grafiği. **B.** Ko-kültürlerdeki CD4⁺ T hücrelerin CD45RO ve CD62L ifadesine göre yüzdesel dağılım grafiği. **C.** Ko-kültürde 120 saat inkübe edilen CD4⁺ T hücrelerin yüzeyinde ifade ettikleri inhibitör reseptörlerin yüzde grafiği. **D.** 120. saatteki ifadelenen inhibitör reseptörlerin iki farklı hafıza benzeri fenotipteki CD4⁺ T hücrede yüzdesi (n≥3, p<0,05).

Ko-kültürün 120. saatindeki T hücrelerde inhibitör reseptör düzeyi analiz edilmiştir. En yüksek düzeyden en düşük düzeye ifadelenen inhibitör reseptörler sırayla PD-1 (%81,23±4,10), TIM-3 (%61,08±7,29), LAG3 (%38,06±6,48) ve CTLA-4 (%27,81±2,62) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1.C.). CD45RO ve CD62L taşıma durumuna göre T lenfosit alt gruplarının inhibitör reseptör ifadesi açısından bir farklılık olup olmadığı kontrol edildiğinde ise, merkezi hafıza (*central memory*, CM) benzeri Th hücreler PD-1 ve TIM-3 inhibitör reseptörlerini efektör hafıza (*effector memory*, EM) benzeri Th hücrelere (CM/EM, PD-1, %88,83±3,06/%73,62±5,42; TIM-3, %74,93±6,98/%47,22±7,85) göre istatistiksel olarak daha yüksek (PD-1 için, p<0,0001; TIM-3 için, p<0,0001) düzeyde ifade ederken, LAG3 inhibitör reseptörünü efektör hafıza benzeri Th hücreler istatistiksel olarak daha yüksek (p=0.0228) düzeyde (CM/EM, %33,80±5,88/%42,33±7,29) ifade etmektedir. CTLA-4 ifadesi açısından iki

grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (CM/EM, %27,86±2,87/%27,76±2,50) ($p<0,05$) (Şekil 4.1.D.).

4.2. Radyasyon Maruziyetinin, Farklı Sürelerde Uyarılmış Th Hücre Morfolojisine Etkisi

Ko-kültürde farklı sürelerde inkübe edilen CD4⁺ T hücreler, 5 ve 12 Gy radyasyon uygulamasının ardından, May-Grünwald – Giemsa sitokimyasal boyaması aracılığıyla sitolojik açıdan değerlendirilmiştir. Boyutsal ve granüler değişim analizleri sonucunda uyarılmamış hücrelerin dar sitoplazmalı ve küçük boyutta görülürken, 24. ve özellikle 72. saatlerde Th uyarımına istinaden hücrelerin büyüdüğü, sitoplazma alanının genişlediği ve granülitenin arttığı izlendi. Ko-kültürün 120. saatinde ise hücre boyutu ve granül içeriği belirgin ölçüde azaldı. Gerek 5 gerekse 12 Gy radyasyon uygulamasının ise hücre morfolojisinde belirgin bir değişikliğe neden olmadığına dair bulgular elde edildi (Şekil 4.2).

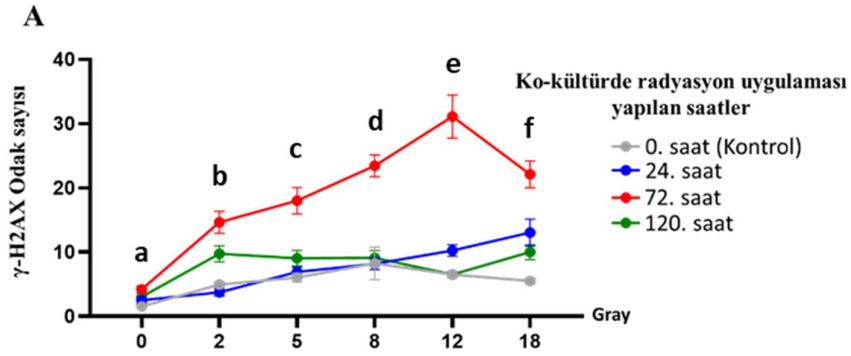


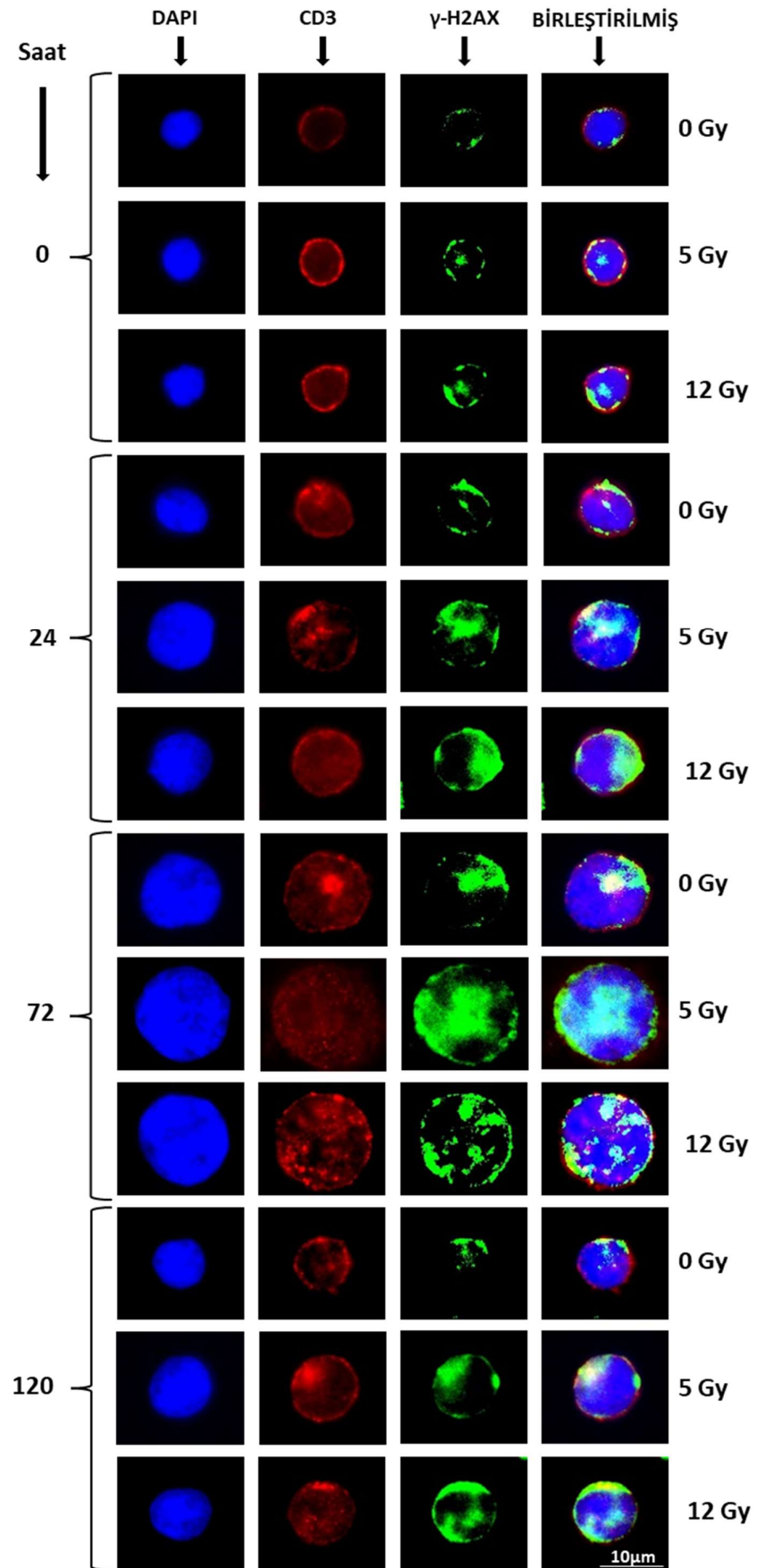
Şekil 4.2. Sitokimyasal (May-Grünwald – Giemsa) boyamanın ışık mikroskopi görüntüsü.

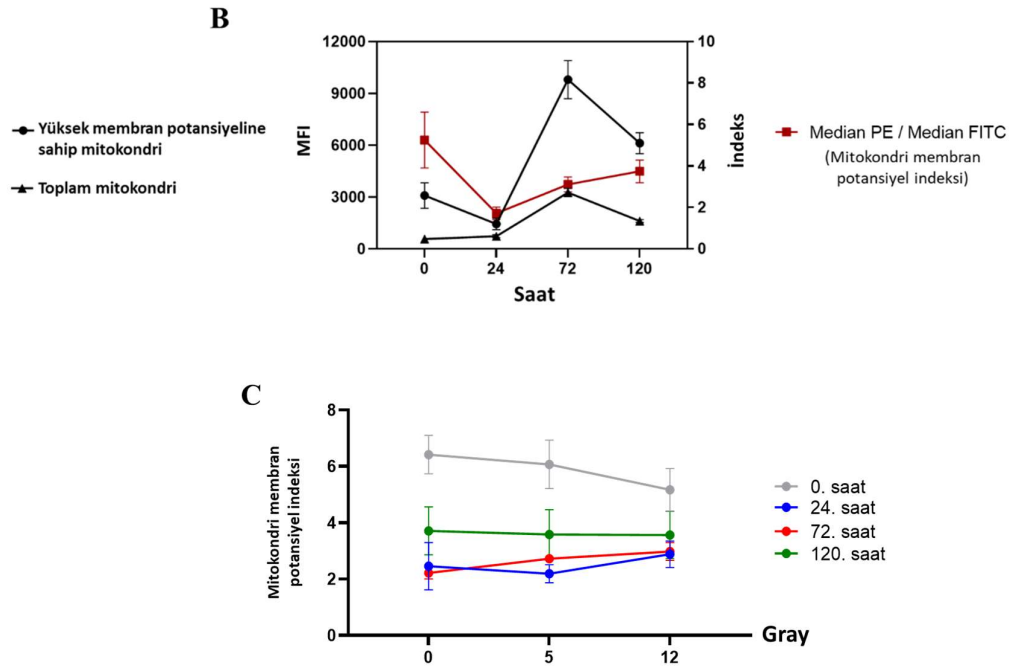
4.3. Radyasyona Maruz Bırakılan Th Hücrelerin DNA Kırığı ve Mitokondriyal Membran Potansiyeli Açısından İncelenmesi

Farklı sürelerde ko-kültürde uyarılan Th hücrelerin, radyasyon dozuna bağlı olarak DNA kırık odak sayısındaki değişimin belirlenmesi amacıyla γ -H2AX birikimi değerlendirilmiştir. Ko-kültürlerin 0., 24., 72. ve 120. saatlerinde radyasyon

uygulaması yapılarak 24 saat sonra γ -H2AX analizi gerçekleştirildi. Artan radyasyon dozları (kontrol, 2, 5, 8, 12 ve 18 Gy) uygulandıktan sonra kontrol (uyarılmamış) Th hücrelerinin DNA kırık sayısındaki değişim sırasıyla 1,55±0,43, 4,95±0,42, 6,05±0,64, 8,25±2,47, 6,50±0,55 ve 5,50±0,44; uyarımın 24. saatinde sırasıyla, 2,50±0,50, 3,75±0,57, 6,90±0,76, 8,20±0,90, 10,25±0,87 ve 13,05±2,05 olarak; 72. saatte 4,20±0,54, 14,65±1,65, 18±1,99, 23,45±1,64, 31,10±3,27 ve 22,10±2,02; 120. saatte ise, 3,05±0,58, 9,73±1,22, 9,05±1,15, 9,10±1,13, 6,50±0,50 ve 10±1,14 olarak bulunmuştur. Artan radyasyon dozlarında en çok DNA kırık odağı oluşturan Th hücrelerinin, 72. saate denk geldiği belirlenmiştir (Şekil 4.3.A.).







Şekil 4.3. A. Ko-kültürde farklı inkübasyon sürelerinde CD4⁺ T hücelere farklı dozlarda radyasyon uygulaması sonucu oluşan γ -H2AX odak sayısı grafiği ve immünfloresan görüntüleri. DNA kırık odağı sayısı, a için 0-72 saat *; b için 0-72 saat ***, 0-120 saat ***, 24-72 saat ***, 24-120 saat **; c için 0-72 saat ***, 24-72 saat ***, 72-120 saat **; d için 0-72 saat ***, 24-72 saat ***, 72-120 saat ***, e için 0-24 saat *, 0-72 saat ***, 24-72 saat ***, 24-120 saat **, 72-120 saat ***, f için 0-24 saat *, 0-72 saat ***, 0-120 saat **, 24-72 saat *, 72-120 saat *** düzeyde istatistiksel açıdan anlamlı olarak belirlenmiştir. **B.** CD4⁺ T hücelerin mitokondriyal membran potansiyel grafiği. **C.** Farklı dozlardaki radyasyon uygulaması sonucunda mitokondriyal membran potansiyelinde gözlenen değişim grafiği (n \geq 3, p<0,05).

Th hücelerin mitokondriyal membran potansiyel durumlarının incelenmesi amacıyla JC-1 kullanılarak akım sitometrisinde ölçümler yapılmıştır. Uyarımın 0., 24., 72. ve 120. saatlerinde yapılan analizler sonucunda 590 nm’de bulunan MFI değerleri sırayla, 3091,00 \pm 654,97, 1445,20 \pm 297,74, 9803,60 \pm 988,55 ve 6120,43 \pm 557,35 olarak 529 nm’de bulunan MFI değerleri yani toplam mitokondri miktarı ise sırayla, 574,80 \pm 32,29, 735,60 \pm 77,07, 3269,20 \pm 206,82 ve 1615,57 \pm 73,71 olarak bulunmuştur. Mitokondri membran potansiyelinin durumu ise sırayla 5,25 \pm 1,21, 1,72 \pm 0,27, 3,11 \pm 0,32 ve 3,74 \pm 0,51 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, radyasyon uygulaması yapılmayan koşulda aktivasyonun ardından 24. saatte membran

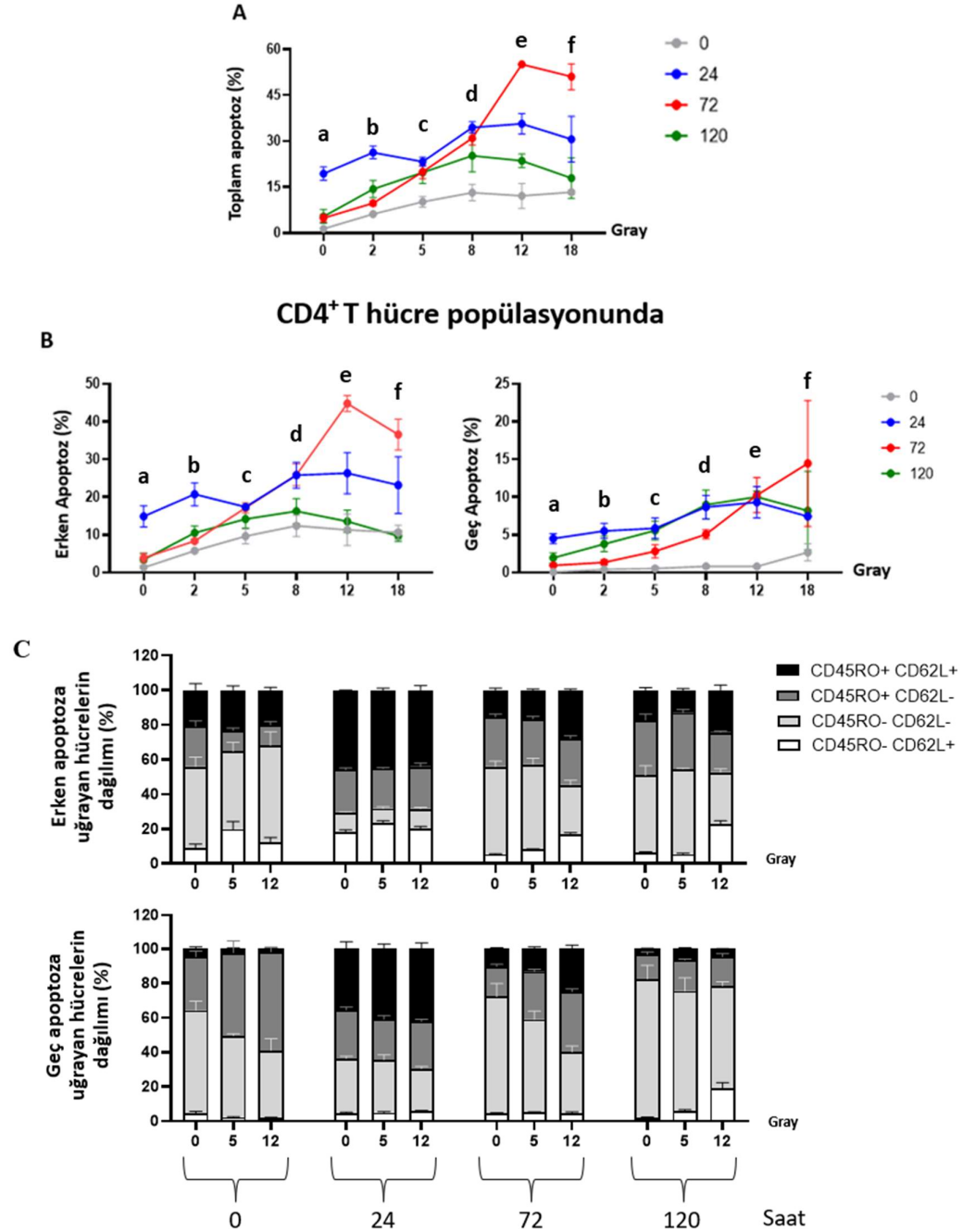
potansiyelinde düşüş gözlemlenirken, aktivasyonun ilerleyen saatlerinde membran potansiyeli tekrar yükselmektedir (Şekil 4.3.B). Sonrasında aynı deney düzeni kontrol grubuna ek olarak 5 ve 12 Gy dozda radyasyon verilerek, radyasyonun mitokondriyal membran potansiyeli üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ko-kültürün kurulduğu 0. saatte kontrol grubu, 5 ve 12 Gy dozları için sırayla, $6,42\pm 0,56$, $6,07\pm 0,70$, $5,17\pm 0,61$; aktivasyonun 24. saatinde $2,46\pm 0,68$, $2,19\pm 0,26$, $2,88\pm 0,38$; 72. saatte sırayla $2,21\pm 0,17$, $2,73\pm 0,05$, $2,98\pm 0,26$, 120. saatte ise $3,71\pm 0,70$, $3,58\pm 0,72$, $3,56\pm 0,69$ olarak belirlenmiştir. Radyasyon dozunun mitokondriyal membran potansiyeli açısından farklı uyarım sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (Şekil 4.3.C). Sonuçta radyasyonun apoptotik etkisinin Th hücrelerde mitokondriyal yollardan bağımsız olabileceğine işaret etmektedir.

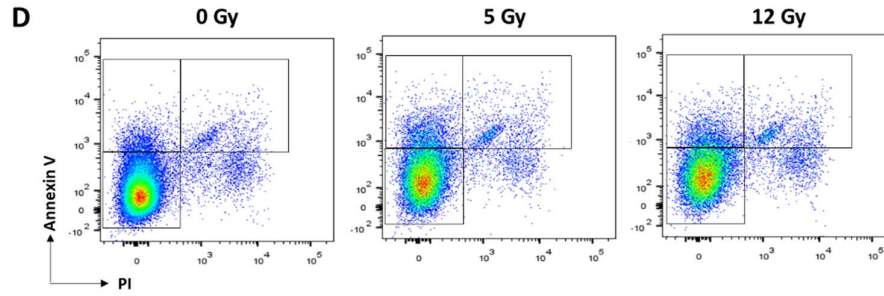
4.4. Farklı Sürelerde Uyarılan CD4⁺ T Hücrelerinde Canlılık Düzeyleri

Ko-kültürün farklı inkübasyon sürelerindeki CD4⁺ T hücrelere farklı dozlarda radyasyon uygulaması yapılmıştır. Uygulamanın ardından hücrelerin canlılık durumları (canlı, erken apoptoz ve geç apoptoz) analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, radyasyon dozundaki artışa bağlı apoptozda artış görülmüştür. Toplam apoptoz göz önünde bulundurulduğunda artan radyasyon değeriyle birlikte radyasyondan en çok etkilenen gruplar ko-kültürün 24. ve 72. saatleri olurken; 12 Gy'den itibaren en yüksek apoptoza sahip fonksiyonel basamak 72. saatte belirlenmiştir (Şekil 4.4.A.). Erken apoptoz açısından durum değerlendirildiğinde benzer sonuç elde edilirken, geç apoptoza bakıldığında 24. ve 120. saatte bulunan hücreler benzer apoptotik özellik sergiledi. Ancak, 12 Gy'den itibaren 72. saatteki hücrelerin apoptotik profili de belirginleşti (Şekil 4.4.B.). Ko-kültürün kurulduğu 0. saatte (kontrol, uyarılmamış koşul) artan radyasyon uygulamasına hücrelerin verdiği erken apoptotik yanıt sırasıyla, 0 Gy için $\%1,31\pm 0,05$, 2 Gy için, $\%5,77\pm 0,33$; 5 Gy için, $\%9,63\pm 1,39$; 8 Gy için, $\%12,38\pm 2$; 12 Gy için, $\%11,32\pm 2,96$ ve 18 Gy için, $\%10,63\pm 1,33$; 24 saat için sırasıyla, $\%14,90\pm 1,98$, $\%20,75\pm 2,16$, $\%17,40\pm 0,07$, $\%25,80\pm 2,40$, $\%26,35\pm 3,85$, $\%23,20\pm 5,30$; 72 saat için sırasıyla, $\%3,92\pm 0,84$, $\%8,37\pm 0,31$, $\%17,15\pm 0,95$, $\%25,90\pm 2,05$, $\%44,80\pm 1,48$, $\%36,60\pm 2,90$ olarak; 120 saat için ise sırasıyla $\%3,45\pm 1,15$, $\%10,54\pm 1,24$, $\%14,20\pm 1,70$, $\%16,25\pm 2,37$, $\%13,55\pm 2,09$, $\%9,70\pm 0,99$ olarak bulunmuştur. Hücrelerin geç apoptotik yanıtları ise başlangıç saati için sırasıyla, $\%0,08\pm 0,00$, $\%0,40\pm 0,13$, $\%0,54\pm 0,17$, $\%0,82\pm 0,11$,

%0,80±0,07, %2,69±0,80; 24 saat için sırasıyla, %4,50±0,45, %5,52±0,71, %5,86±0,95, %8,67±1,08, %9,32±1,47, %7,44±0,04 olarak; 72 saat için sırasıyla, %0,95±0,02, %1,34±0,23, %2,83±0,62, %5,08±0,42, %10,27±1,65, %14,46±5,90 olarak ve 120 saat için sırasıyla, %1,95±0,46, %3,78±0,73, %5,58±0,89, %8,99±1,35, %10,03±0,55, %8,21±3,67 olarak bulunmuştur.

CD4⁺ T hücre popülasyonunda





Şekil 4.4. Ko-kültürdeki farklı uyarım periyodlarındaki CD4⁺ T hücrelerin artan radyasyon dozlarındaki apoptotik durumları. **A.** Toplam apoptoz grafiği. Toplam apoptoz oranları: a için 0-24 **, 24-72 *, 24-120 *; b için 0-24 ***, 24-72 **; c için 0-24 *; d için 0-24 ***, 0-72 ***, e için 0-24 ***, 0-72 ****, 24-72 **, 72-120 ****, f için 0-24 **, 0-72 ****, 24-72 ***, 24-120 *, 72-120 **** düzeyde istatistiksel açıdan anlamlılık belirlenmiştir. **B.** Erken ve geç apoptoz grafikleri. Erken apoptoz oranları: a için 0-24 *; b için 0-24 **, 24-72 *; d için 0-24 *, 0-72 *, e için 0-24 **, 0-72 ****, 24-72 **, 24-120 *, 72-120 ****; f için 0-24 **, 0-72 ****, 24-72 *, 24-120 *, 72-120 **** düzeyde ve geç apoptoz oranları: e için 0-72 *, 0-120 *; f için 0-72 ** düzeyde istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirilmiştir. **C.** Farklı fonksiyonel basamaklardaki hücrelerin erken ve geç apoptotik durumlarının immünofenotipe göre dağılım grafikleri. **D.** Canlılık sonuçlarını reprezente eden 120. Saat FlowJo görüntüleri (n≥3, p<0,05).

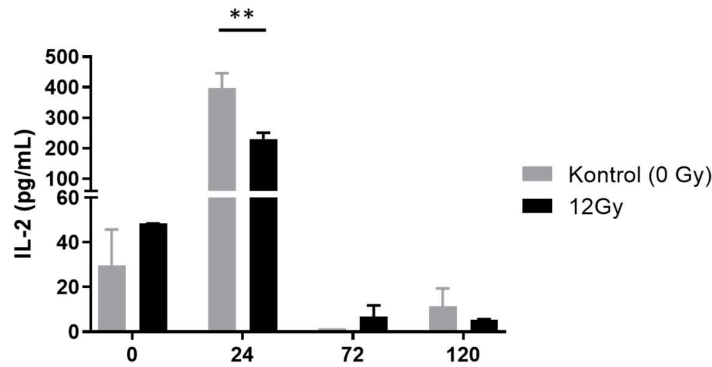
Ko-kültürün içerisindeki Th alt-tipleri CD45RO ve CD62L durumuna göre apoptoz açısından değerlendirildiğinde radyasyona en hassas olan grup, efektör immünofenotipteki T hücreler olurken, en dirençli grup ise naif ve merkezi hafıza benzeri T hücreler olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4.C.). Apoptoza giden hücreler değerlendirildiğinde, ko-kültürün kurulduğu saatte yapılan radyasyon uygulamaları sonuçlarına bakıldığında sırayla naif (CD45RO- CD62L+), efektör (CD45RO- CD62L-), efektör hafıza benzeri (CD45RO+ CD62L-) ve merkezi hafıza benzeri (CD45RO+ CD62L+) T hücrelerin erken apoptoz durumları 0 Gy için sırasıyla; %9,23±2,14, %46,70±5,48, %23,18±3,28, %20,89±3,77; 5 Gy için sırasıyla, %19,80±4,50, %44,93±5,25, %12,00±21,53, %23,25±2,53; 12 Gy için sırasıyla, %12,27±2,93, %55,92±7,91, %11,80±1,97, %20,01±1,70 olarak bulunmuştur. 24 saatte 0 Gy için yukarıda belirtilen immünofenotipteki hücrelerin apoptotik durumu sırayla, %18,46±1,04, %11,16±0,29, %24,55±0,92, %45,82±0,09; 5 Gy için sırayla, %23,33±1,44, %8,42±1,06, %23,10±0,53, %45,15±1,17; 12 Gy için sırasıyla, %20,22±1,24, %11,39±0,94, %24,37±2,02, %44,02±2,66 olarak bulunmuştur. Ko-

kültürün 72 saatinde 0 Gy için sırayla, %5,41±0,38, %50,55±3,08, %28,58±1,64, %15,46±1,12; 5 Gy için sırasıyla, %8,17±0,33, %49,06±3,50, %26,27±1,37, %16,50±0,67; 12 Gy için sırasıyla, %16,90±1,04, %28,53±2,73, %26,72±1,57, %27,85±0,78 olarak bulunmuştur. 120 saatteki fonksiyonel basamakta bulunan hücrelerin 0 Gy'de erken apoptoz durumu sırasıyla, %6,41±0,52, %44,39±5,66, %31,95±3,38, %17,25±1,47; 5 Gy için sırasıyla, %5,45±0,63, %49,09±0,48, %32,40±1,93, %13,07±0,94 ve 12 Gy için sırasıyla, %22,85±1,86, %29,80±2,11, %23,00±0,74, %24,36±2,92 olarak bulunmuştur. Hücrelerin yüzdesel olarak geç apoptotik durumlarının dağılımları ko-kültürün kurulduğu saatte 0 Gy için sırasıyla, %4,53±1,17, %59,69±5,44, %31,25±3,20, %4,53±1,17; 5 Gy için sırasıyla, %2,21±0,44, %47,47±1,00, %48,11±6,89, %2,21±0,44; 12 Gy için sırasıyla, %1,72±0,54, %39,30±6,82, %57,26±2,76, %1,72±0,54 olarak bulunmuştur. 24 saatteki duruma bakıldığında 0 Gy için, %4,84±0,31, %31,55±1,38, %28,11±1,65, %35,50±4,20; 5 Gy için sırasıyla, %4,91±0,62, %30,79±2,72, %23,47±2,09, %40,83±2,87; 12 Gy için sırasıyla, %5,75±0,37, %24,68±1,37, %27,46±1,21, %42,11±3,55 olarak bulunmuştur. 72 saatteki hücrelerin geç apoptotik durumlarına bakıldığında dağılım 0 Gy için sırasıyla, %4,57±0,39, %67,66±7,63, %17,54±1,32, %10,22±0,74; 5 Gy için sırasıyla, %5,08±0,42, %53,86±4,95, %27,81±1,38, %13,26±1,16; 12 Gy için sırasıyla, %4,82±0,59, %35,36±3,51, %34,96±1,69, %24,86±2,30 olarak bulunmuştur. 120 saate bakıldığında ise 0 Gy için sırasıyla %1,98±0,34, %80,57±7,92, %14,22±1,42, %3,24±0,34; 5 Gy için sırasıyla %5,68±0,93, %69,75±7,75, %18,08±0,56, %6,50±0,69; 12 Gy için sırasıyla %19,24±3,23, %59,27±2,38, %16,95±1,79, %4,53±0,16 olarak bulunmuştur.

4.5. CD4⁺ T Hücrelerin, Radyasyon Uygulaması Sonrasında Çoğalma Kapasitelerinin Belirlenmesi

Ko-kültür içerisindeki Th hücrelerin radyasyon stresi altında çoğalma kapasitelerindeki değişimin belirlenmesi amacıyla CFSE boyaması yapılmıştır. Ko-kültürün farklı periyodlarında öncelikle hücre çoğalmasında önemli bir role sahip olan IL-2 sitokininin tayini yapılmıştır. Analiz sonucunda ko-kültürün kurulduğu saatten itibaren 24., 72. ve 120. saatlerde sırasıyla, 29,55±11,50 pg/mL, 396,43±35,39 pg/mL, 1,51±0 pg/mL ve 11,39±5,69 pg/mL olarak bulunmuştur. Radyasyon uygulaması 12 Gy yapılan koşulda ise sırasıyla, 48,43±0,03 pg/mL, 230,41±14,32 pg/mL, 6,69±3,66

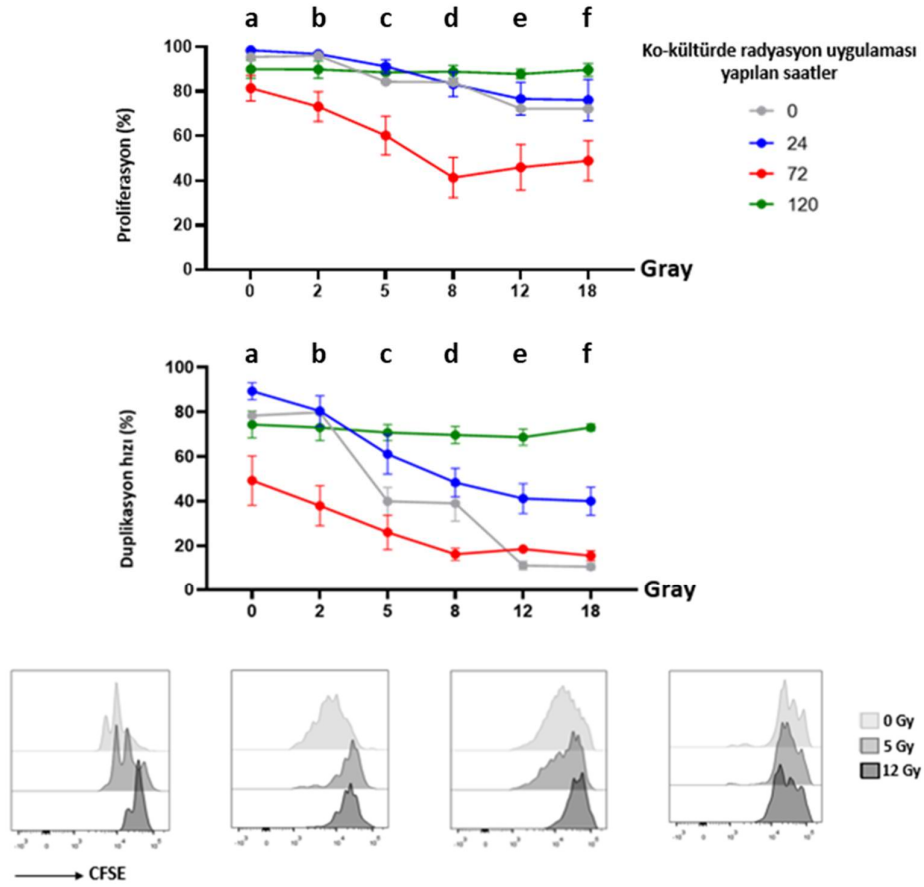
pg/mL ve $5,41 \pm 0,17$ pg/mL olarak bulunmuştur. Radyasyon verilmemiş koşulun 24. saatinde en yüksek düzeyde üretimi olan IL-2'nin 24. saatten sonra önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.5.) Yanı sıra 12 Gy radyasyon uygulamasının 24. Saatte bulunan Th hücrelerin IL-2 üretimini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşürdüğü saptanmıştır ($p=0,0076$).



Şekil 4.5. CD4⁺ T hücrelerin ko-kültürün farklı zamanlarında ürettikleri IL-2 miktar (pg/mL) grafiği ($n \geq 3$, $p < 0,05$).

Hücre çoğalmasını her koşulda desteklemek amacıyla ko-kültür içerisine, CFSE boyamasının yapılmasıyla birlikte IL-2 takviyesi yapılarak hücrelere radyasyon uygulaması yapılmıştır. Radyasyon maruziyetinden 72 saat sonra yapılan analizler sonucunda, ko-kültürün 0., 24. Ve 72. saatlerinde bulunan Th hücrelerin radyasyon dozundaki artışla ters orantılı olarak çoğalma kapasiteleri ve duplikasyon hızları önemli ölçüde azalırken ($p < 0,05$); ko-kültürün 120. saatinde bulunan Th hücrelerin artan radyasyon dozlarında çoğalma kapasiteleri veya duplikasyon hızlarında istatistiksel olarak bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4.6.). Ko-kültürün kurulduğu saatte (0. saat) Th hücrelerin çoğalma kapasitesi 0 Gy-18 Gy aralığında sırasıyla 0 Gy için, $95,55 \pm 0,39$; 2 Gy için, $96,15 \pm 0,18$; 5 Gray için, $84,45 \pm 0,46$; 8 Gy için, $84,20 \pm 1,06$; 12 Gy için, $72,35 \pm 0,46$ ve 18 Gy için, $72,30 \pm 0,35$ olarak, 24. saatteki hücrelerde sırasıyla $98,50 \pm 0,28$, $96,85 \pm 0,67$, $91,25 \pm 2,67$, $83,28 \pm 4,75$, $76,73 \pm 6,38$ ve $76,20 \pm 8,01$ olarak, 72. saatteki Th hücrelerde çoğalma kapasiteleri sırasıyla, $81,55 \pm 4,99$, $73,25 \pm 5,84$, $60,25 \pm 7,57$, $41,40 \pm 7,83$, $46,03 \pm 8,87$ ve $48,95 \pm 7,76$ olarak belirlenirken ko-kültürün 120.

saatindeki Th hücrelerde ise sırasıyla %90,00±3,23, %89,93±3,17, %88,63±2,84, %88,93±2,27, %87,87±1,78 ve %89,77±2,36 olarak belirlenmiştir.

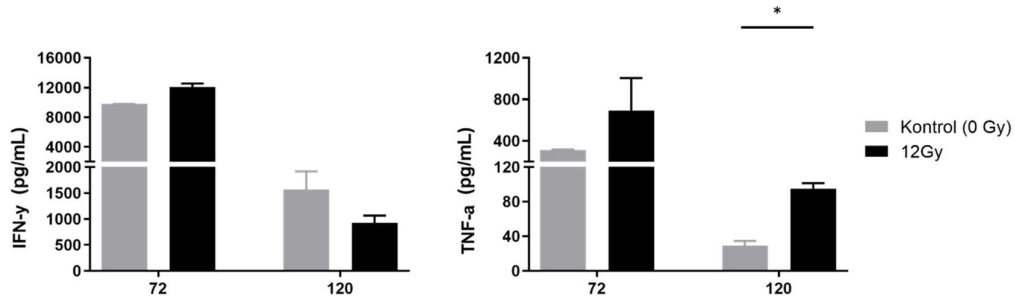


Şekil 4.6. Hücre gruplarının proliferasyon ve duplikasyon hızlarının yüzde grafikleri ve reprezente eden FlowJo görüntüleri. Proliferasyon kapasiteleri: a için 0-72 *, 24-72 *, 72-120 **; b için 0-72 *, 24-72 *, 72-120 **; c için 0-72 *, 24-72 *, 72-120 **; d için 0-72 *, 24-72 *, 72-120 **; e için 0-72 *, 24-72 *, 72-120 **; f için 0-72 *, 24-72 *, 72-120 ** düzeyde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Duplikasyon hızları: a için 0-72 *, 24-72 ****, 72-120 *; b için 0-72 **, 24-72 ****, 72-120 **; c için 0-120 *, 24-72 ***, 72-120 ****; d için 0-120 *, 24-72 **, 72-120 ****; e için 0-24 *, 0-120 ****, 24-72 *, 24-120 *, 72-120 ****; f için 0-24 *, 0-120 ****, 24-72 *, 24-120 **, 72-120 **** düzeyde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (n≥3, p<0,05).

4.6. Radyasyon Uygulamasının Th Hücre İlişkili Sitokin Üretimine Etkisi

Kullanılan ko-kültür modelinde 72. ve 120. saatte Th hücrelerin kontrol (0 Gy) ve 12 Gy radyasyon uygulaması sonrasında proinflamatuvar sitokin üretim

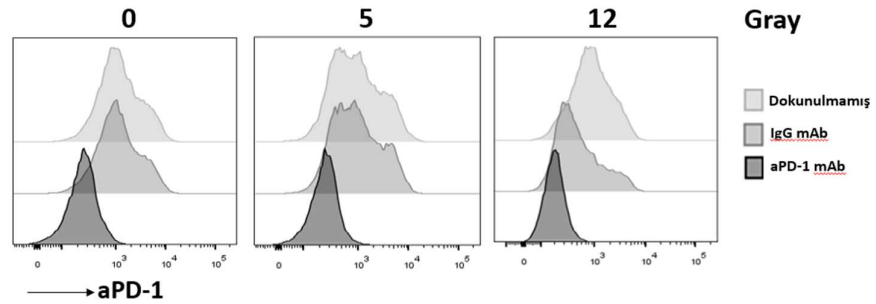
tayinleri yapılmıştır. Sonuçta 72. saatteki efektör Th hücrelerde kontrol grubuna göre 12 Gy radyasyon uygulaması ile IFN- γ üretimi anlamlı derecede artarken (kontrol, 9776,92 \pm 2,31 pg/mL; 12 Gy, 12089,75 \pm 317,79 pg/mL) 120. saatteki Th hücrelerin IFN- γ üretimi (kontrol, 1566,59 \pm 247,99 pg/mL; 12 Gy, 923,19 \pm 100,04 pg/mL) açısından radyasyon maruziyetine bağlı anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Fonksiyonel basamaklar TNF- α düzeyi açısından değerlendirildiğinde ise, Th hücrelerin ko-kültür saatleri arasında farklılık görülmesiyle birlikte, kontrol grubuna göre 12 Gy uygulanmış durumlarda 72. saatte (kontrol, 313,87 \pm 2,94 pg/mL; 12 Gy: 692,14 \pm 222,38 pg/mL) istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmadı. Th hücrelerin 120. saatteki TNF- α üretiminde (kontrol, 29,02 \pm 3,90 pg/mL; 12 Gy: 94,92 \pm 4,61 pg/mL) istatistiksel açıdan artış gözlemlenmiştir ($p=0,0097$) (Şekil 4.7.).



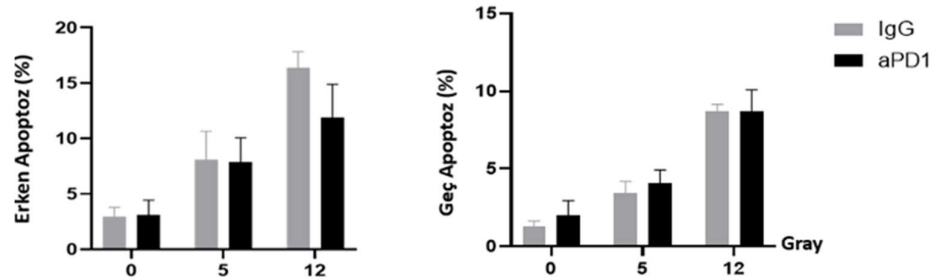
Şekil 4.7. Ko-kültürün 72. ve 120. saatlerinde bulunan CD4⁺ T lenfositlerin IFN- γ ve TNF- α sitokin üretimi düzeyleri (pg/mL) ve radyasyon maruziyeti sonucu sitokin üretim düzeyindeki değişim grafikleri ($n\geq 3$, $p<0,05$).

4.7. PD-1 İmmün Kontrol Noktası Blokajı Altında Uygulanan Radyasyonun CD4⁺ T Hücrelerin Canlılıklarına Etkisi

Ko-kültürün 120. saatinde radyasyon uygulaması yapılacak olan T hücrelere, 96. saatte anti-PD-1 monoklonal antikoru (mAb) ile inhibitör reseptör blokajı yapılmıştır. Kontrol grubu olarak non-spesifik izotip uyumlu IgG uygulaması yapılmıştır. Blokaj sonucunda Th hücre yüzeyindeki PD-1 düzeyi uygulama yapılmamış ve IgG uygulaması yapılmış gruplara göre büyük ölçüde azalmıştır. Bu sayede blokajın başarılı bir şekilde yapıldığı kabul edilmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Ko-kültürün 120. saatinde bulunan CD4⁺ T hücelere anti-PD-1 uygulaması yapılmıştır. Hiç uygulama yapılmamış (dokunulmamış), kontrol (IgG) ve PD-1 reseptörü bloklanmış (aPD-1) grupların yüzeylerindeki PD-1 inhibitör reseptör düzeyinin değişimini gösteren temsili akım sitometri histogramları.



Şekil 4.9. Ko-kültürün 120. saatinde bulunan CD4⁺ T hücelerin PD-1 blokajı sonucunda farklı dozlardaki radyasyona bağlı apoptotik hücelerin yüzde grafikleri (n≥3, p<0,05).

Ko-kültürün 96. saatinde PD-1 immün kontrol noktası blokaj uygulaması yapıldıktan 24 saat sonra Th hücelere 5 ve 12 Gy dozlarında radyasyon uygulaması yapılmıştır. Bu uygulamadan 24 saat sonra Th hücelerin canlılık analizleri yapıldığında erken apoptoza giden Th hücelerin yüzdesi IgG (kontrol) ve anti-PD1 uygulanmış gruplarda kontrolde (0 Gy) sırasıyla %2,94±0,75, %3,11±1,20 olarak; 5 Gy için sırasıyla %8,10±2,08, %7,85±1,81 olarak ve 12 Gy için, %16,40±1,16, %11,91±2,41 olarak bulunmuştur. Erken apoptoz açısından değerlendirilen Th hücelerde blokaj uygulamasının, 120. saatteki fonksiyonel basamakta bulunan Th hücelere üzerinde canlılık açısından istatistiksel bir anlam ifade etmediği belirlenmiştir (Şekil 4.9.). Hücelerin geç apoptoz durumlarının incelendiğinde de erken apoptoz gösteren Th hücelere benzer olarak blokaj uygulamasının hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği saptanmıştır. Analiz sonucunda 120. saatteki Th hücelerin kontrol IgG uygulaması yapılmış ve anti-PD-1 blokajı yapıldığı durumlarda geç apoptoz yüzdeleri sırasıyla, kontrolde %1,30±0,30, %2,01±0,86, 5 Gy

dozda radyasyon uygulaması yapıldığında $\%3,46 \pm 0,58$, $\%4,08 \pm 0,70$ olarak ve 12 Gy uygulandığında ise $\%8,72 \pm 0,25$, $\%8,72 \pm 0,80$ olarak bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

5.1. Th1'lerin Kullanılan Ko-kültür Modelinde, İnkübasyon Süresine Bağlı Biyolojik Özellikleri

Yardımcı T hücrenin aktivasyonu için gerekli sinyal eşiği, T hücre reseptörüne antijen taşıyan MHK molekülünün bağlanması ve ASH yüzeyinde bulunan ko-stimülatör moleküller tarafından T hücreye sağlanan ikincil sinyaller yardımıyla aşılmaktadır (26,32,33). *In-vitro* ortamda ko-kültürde, CD4⁺ T hücre aktivasyonu için THR üzerinden olan sinyal, çözümlü anti-CD3 antikor yardımıyla, birincil sinyale eşlik eden ko-stimülatör sinyal ise akut miyeloid lösemi monositik hücre hattı olan THP-1 aracılığıyla sağlanmaktadır. Daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda kullanılan CD86⁺ akut miyeloid lösemi monositik hücre hattının CD4⁺ T lenfositlerde Th1 farklılaşmasını desteklediği belirlenmiştir (136). Laboratuvarımız kapsamında yapılan başka bir çalışmada ise THP-1 tarafından sunulan ko-stimülasyonun CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) ve ICOS-L moleküllerinin, T hücre yüzeyindeki CD28'e bağlanması ile yapıldığı bilinmektedir. Kullanılan modelde ko-stimülasyonun tek bir molekül üzerinden değil birçok çeşitli molekül üzerinden olabildiği ve miyeloid lösemi monositik hücre hatları tarafından sağlanan ko-stimülasyonun yorulma fenotipi ile ilişkili inhibitör reseptörlerin T hücre yüzeyindeki ifadesini arttırdığı bulunmuştur (135). Kullanılan ko-kültür modelinde inkübasyon süresine bağlı olarak aktivasyonun ardından Th hücrelerin immünofenotipindeki değişim incelenmiştir. Aktivasyon sinyal eşiğinin aşılması yapılan fenotipik ve fonksiyonel deneylerle incelenmiştir. Ko-kültürün kurulduğu saatte naif (CD45RO⁻ CD62L⁺) CD4⁺ T lenfositlerin oranı, kültürdeki T lenfositlerin yarısından çoğunu oluşturmaktadır. Aktivasyon için gerekli birincil ve ikincil sinyallerin sağlanmasının ardından, naif T lenfositlerin oranı büyük ölçüde düşerken ko-kültür ortamındaki Th hücrelerin büyük çoğunluğu hafıza benzeri fenotipteki T lenfositlerden oluşmaya başlamıştır. Bunun yanı sıra aktivasyonun erken belirteçlerinden birisi olan IL-2, ko-kültürün 24. saatinde en üst düzeyde üretilirken ko-kültürün ilerleyen saatlerinde IL-2 düzeyi düşmektedir. Ayrıca, IL-2 haricindeki Th1 farklılaşması için imza sitokinlerinden olan IFN- γ ve TNF- α 'nın ko-kültürün 72. saatteki üretimleri ve ko-kültürün geç saatlerinde yüksek düzeyde TIM-3 inhibitör reseptör ifadesi göz önünde bulundurulduğunda Th hücrelerin Th1 yönünde farklılaşma eğilimi gösterebileceği

söylenbilir. Th1 farklılaşmasının, IL-12 sitokini ile oluştuğu bugüne kadar kabul gören bir bilgidir ancak yapılan bir çalışmada dendritik hücrelerin IL-12 yokluğunda Myd88 yolağı aracılığıyla *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda Th1 farklılaşmasını desteklediği kaydedilmiştir (137). Kullandığımız ko-kültür modelinde Th1 gelişimi sitokinden bağımsız olarak gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Ko-kültürde aktivasyon sinyalinin alınmasından kısa süre sonra aktivasyonla ilişkili olarak hücrelerin yüzeylerinde CD45RO⁺ ifadesinde bir artış görülmektedir. Naif T hücrelerin aktivasyon sinyalinin almasıyla birlikte farklılaşmaları ve çoğalarak hafıza fenotipteki hücrelere dönüşmesi uzun zaman almaktadır. Yaptığımız çalışmalar kapsamında T hücrelerin aktivasyonun ilerleyen saatlerindeki (120. saat) pro-inflamatuvar sitokin üretim düzeyindeki azalma, CD45RO ifade etme düzeyindeki artış, aktivasyon sürecinin ilerlemesiyle birlikte efektör fazdan sonra hücre boyutundaki ve granül yapısındaki azalış ve inhibitör reseptör düzeyindeki yükseliş kaynaklı olarak bu tez çalışmasında hafıza benzeri T hücre isimlendirilmesi kullanılmıştır. Hafıza T lenfositlerde artış gösteren, Bcl-2 ve Bcl-XL anti-apoptotik protein düzeyleri, hafıza fenotiple ilişkili transkripsiyon faktörlerinin ifade düzeyi (Tbet, eomes vb.), bunlara ek olarak CD127 ve KLRG-1 ifade düzeylerinin (58-60) ölçümleri yapılmadığı için hafıza T lenfosit olarak isimlendirme yapılmamıştır.

Ko-kültür yardımıyla aktivasyonu gerçekleştirilen Th hücrelerin 120. saat itibariyle, 72. saate göre proinflamatuvar sitokin üretimlerinde ciddi düzeyde düşüş izlenmiştir. İnflamasyon durumunda, patojenin ortadan kaldırılmasının ardından, T lenfositlerin büyük çoğunluğu apoptoza giderken; sağ kalan hücreler hafıza fenotipteki T lenfositleri oluşturmaktadır. Hafıza T lenfositler aynı patojenle karşılaşma durumuna karşı uzun süreli sağkalım sağlayarak hızlı yanıt oluşturmaya destek sağlamasıyla bilinmektedir. Ancak, kanser ve kronik inflamasyon durumlarında bu hafıza T lenfositler efektör fonksiyonlarını yitiren ve yüzeylerinde yüksek düzeyde inhibitör reseptör ifade etmesiyle karakteristik yorulmuş (*exhausted*) T lenfositte farklılaşabildiği bilinmektedir (4,61). Bu çalışmada ise 120. saatte ko-kültür içerisindeki hücrelerin büyük çoğunluğu (>%90) hafıza benzeri T lenfositlerden oluşmakta ve halen büyük ölçüde canlılığını korumaktadır. Bu hücrelerin yüzeyinde başta PD-1 olmak üzere hücrelerin büyük çoğunluğunda (>%80) en az bir inhibitör reseptörün ifade edildiği saptanmıştır. Bu durumun kronik inflamasyon ve kanser

durumlarında ortamda bulunan yorulmuş hafıza benzeri T hücrelerin, kullanılan ko-kültür ortamı yardımıyla da oluşturulabildiğine işaret etmektedir. Bu çalışma kapsamında yorulma fenotipine sahip hücreler CD3/CD28 aracılığıyla yapılmış *in vitro* uyarımlardan (138,139) farklı olarak miyeloid monositik hücre hattı olan THP-1 ile yapılmıştır. Sentetik olarak kullanılan CD3 ve CD28 uyarımından farklı olarak kullanılan ko-kültür modeli kanserdeki yorulmayı biyolojik olarak taklit etmek için daha uygundur.

5.2. İyonize Radyasyon Aracılı Hasarın, Oluşan DNA Kırığı ve Mitokondri Membran Potansiyeli Açısından Değerlendirilmesi

Endojen veya eksojen yolla oluşan DNA çift iplik yapısındaki kırılmaları, H2AX histonunun fosforillenmesi takip eder. H2AX, nükleozomlarda bulunan histon oktamerin bir bileşeni olan H2a protein ailesinin bir çeşididir. DNA çift iplik hasarı oluşmasının ardından PI3K ailesi üyeleri olan ATM ve ATR gibi kinazlar aracılığıyla DNA hasarının onarımı sırasında H2AX fosforillenmesi gerçekleştirilir. Fosforillenme sonucunda oluşan bu yeni protein olan γ -H2AX, hasar sonrasında DNA onarım proteinlerinin alımında ve lokalize edilmesindeki ilk adımdır. İyonlaştırıcı radyasyon veya sito-toksik ajanlar aracılığıyla DNA hasarının başlatılmasının ardından γ -H2AX odakları hızlı bir şekilde oluşur (140). Oluşan odaklar ikincil antikörler (*Secondary antibody*) yardımıyla işaretlenerek immünfloresan mikroskobu yardımıyla gözlemlenebilir. Analizler sonucunda 0, 24 ve 120 saatlik inkübasyon sürelerindeki Th hücreler artan dozlarda birbirine yakın DNA kırık odakları oluştururken, artan radyasyon dozuyla birlikte en fazla DNA kırık odağının 72 saatlik inkübasyon sonucunda oluştuğu görülmüştür. Th hücrelerin morfolojik incelemesi esnasında Th uyarımına istinaden 72. saatte çekirdek alanının diğer saatlere göre oldukça büyüdüğü gözlenmiştir. İnkübasyonun 72. saatinde oluşan DNA kırık odaklarındaki artışın nedeninin, çekirdekteki büyümeyle doğru orantılı olarak çekirdek içerisindeki gevşek kromatin yerleşimiyle birlikte hücrenin hasara daha açık hale gelmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Daha önce yapılmış bir yayında da kromatin yapısının, DNA'nın γ -radyasyonuna duyarlılığı tetiklediği bulunmuştur. Ancak duyarlılığa ek olarak DNA onarımının da daha fazla olduğu belirlenmiştir (141).

Programlanmış hücre ölümünün erken evrelerinin özelliklerinden birisi mitokondri aktivitesinin bozulması ile ilişkilendirilmiştir. Bu bozulma membran potansiyel değişikliği ile açıklanmaktadır. İyonize radyasyonun hücre üzerinde verdiği hasarın ise yoğun olarak çekirdekdeki DNA üzerinden olduğu uzun yıllardır yapılan çalışmalarla gözlemlenmiştir (142). Radyasyonun hem kanser hücreleri hem de immün sistem hücrelerinin çekirdek dışında sahip olduğu organellere de çeşitli etkileri olabileceğine dair farklı düşünceler mevcuttur (143,144). Özellikle mitokondri, hücrelerde çekirdek haricinde DNA'nın bulunduğu bir organel olarak lenfositlerde toplam hücre hacminin yaklaşık üçte birini oluşturmaktadır (145). Bu nedenle mitokondri, hücre çekirdeği ile benzer şekilde oluşabilecek DNA hasarları veya diğer doğrudan hasarlar yüzünden iyonize radyasyonun ana hedeflerinden biri haline gelebilir. Bulgularımız, farklı inkübasyon sürelerindeki CD4⁺ T hücrelerin farklı düzeylerde mitokondriyal membran potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir; ancak, 5 ve 12 Gy dozlarda radyasyon uygulamasının T lenfositler özelinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yaratmadığı gözlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda mitokondriyal genomun oksidatif hasara daha yatkın olduğu ve çekirdek içerisindeki DNA ile kıyasla daha düşük onarım yeteneği ile karakterize olduğu ve buna ek olarak reaktif oksijen türleri için kritik bir hedef olduğu bilinmektedir (146). Radyasyonla birlikte artan reaktif oksijen türleri nedeniyle membran potansiyelinde bozulma ve DNA onarımında sıkıntılar yaşanabileceği düşünülmektedir. Çalışmamız kapsamında reaktif oksijen türlerinin oluşumuna bakılmamıştır. Ancak mitokondriyal membran potansiyeli hakkında elde edilen bulgular doğrultusunda iyonize radyasyonun toksik etkisinin, CD4⁺ T lenfositlerde mitokondriyal yollardan bağımsız olabileceğini düşünülmüştür.

5.3. CD4⁺ T Hücrelerin Artan Dozlarda Radyasyon Maruziyetine Bağlı Canlılık ve Çoğalma Kapasiteleri

İyonize edici radyasyonun tümör hücreleri üzerindeki bilinen toksik etkisinin yanı sıra immün sistem hücreleri üzerindeki etkileri de büyük öneme sahiptir. Bu tez çalışması kapsamında en yüksek hücre ölümü olan grup, ko-kültürde 72 saat inkübe edilen grup olarak belirlendi. Beklendiği üzere artan radyasyon dozuna bağlı olarak hücre ölümünde bir artış görüldü ve ko-kültürün farklı inkübasyon sürelerinin canlılıkları arasındaki fark yüksek Gy dozlarında belirginleşti. Özellikle inkübasyonun

72. saatinde bulunan $CD4^+$ T hücrelerin 12 Gy'de yarıya yakını apoptoz sürecine girmişti. Radyasyon dozunun yüksek olmasının yanı sıra 72. saatte bulunan yüksek ölüm oranı, daha önce de bahsedildiği gibi T lenfositlerin aktivasyonu takiben çekirdek alanının en yüksek düzeyde olması ve hasara daha açık hale gelmesi sonucu radyasyon hassasiyetinin artmasıyla alakalı olabileceği düşünülmektedir. En az ölüme sahip grup ise uyarılmamış kontrol grubu olan (0. saat) $CD4^+$ T lenfositler olarak belirlenmiştir. Aktivasyon sinyali beraberinde apoptotik yolların da aktive olduğu bilinmektedir (147). Diğer taraftan yaşam sinyalleri hem aktivasyon ile ilişkili transkripsiyon faktörleri hem de mikroçevredeki sitokinler gibi faktörlerden sağlanır. Naif T lenfositler metabolik olarak aktif olmalarına rağmen aktivasyon sinyali almadıkları için genomik olarak durgundur (32,33). Yanı sıra uzun dönem bağışlıktan sorumlu hafıza T hücreleri, antijen içermeyen ortamdaki homeostatik proliferasyon aracılığıyla, hücrelerin efektör fonksiyonlarının geri çağırılması için aktif tutulur (148). Bu homeostatik proliferasyon ile izlenen genomik aktiviteye rağmen hafıza benzeri T lenfositlerde radyasyon hassasiyetinin belirgin olmaması da dikkat çekicidir.

Tüm T hücre alt-tipleri radyasyona aynı yanıtı vermemektedir. Bazı kaynaklara göre radyasyona en hassas T hücre alt grubu $CD8^+$ T hücreler olarak belirlenirken (150,151), aktivasyon sinyali almış veya hafıza fenotipe geçiş yapmış $Foxp3^+IL10^+$ düzenleyici T (Treg) hücreler, naif Treg hücrelere göre radyasyona daha dirençli olarak bulunmuştur (152-154). Başka bir çalışma kapsamında T hücre alt gruplarına bakıldığında hücrelerin radyosensitivitesi, Bcl-2 seviyesi ile ilişkilendirilmiştir (141). Radyasyona verilen T hücre yanıtları araştırıldığında literatürde birçok farklı fikre yer verilmiştir. Çalışmamız kapsamında $CD4^+$ T hücre alt grupları incelendiğinde ise naif T ve merkezi hafıza benzeri $CD4^+$ T hücrelerin radyasyona en dirençli gruplar olduğu saptanırken, efektör $CD4^+$ T ve efektör hafıza benzeri $CD4^+$ T lenfositlerin radyasyona karşı en hassas gruplar olduğu belirlenmiştir.

Radyasyonun verdiği DNA hasarı, hücre döngüsünün, kromozomal geçiş aşaması ve mitoza geçiş aşaması olmak üzere iki ayrı zamanında kontrol edilir. Hasar tespit edilecek olursa DNA tamir mekanizmaları yardımıyla hasarın giderilmesi için hücre döngüsü durdurulur; bu nedenle hücre çoğalmaya devam edemez. Eğer oluşan hasar tamir edilebilirse normal döngü devam edecektir; ancak, oluşan hasar tamir edilemezse hücre apoptoza yönlendirilir (94). T lenfositlerin yüksek doz radyasyona

oldukça duyarlı olduğu bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda düşük doz radyasyonun T lenfositler üzerindeki etkileri ise araştırma konusu olmuştur (155). T hücre çoğalması için önemli bir sitokin olan IL-2'nin ko-kültür içerisinde eksikliğinin giderilmesi ve CD4⁺ T lenfosit çoğalmasının tetiklenmesi amacıyla ko-kültür ortamına dışardan rekombinant IL-2 proteini eklemesi yapılmıştır. IL-2, T hücre yüzeyindeki IL-2R α (CD25) molekülü ile bağlanarak T hücre çoğalmasını desteklemektedir (156). Yapılan analizler sonucunda ko-kültürün 0, 24 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde bulunan CD4⁺ T lenfositler artan radyasyon dozuna bağlı olarak azalan çoğalma yeteneği göstermiş olsalar da, 0, 24 ve 120 saatlik inkübasyon sürelerinde bulunan CD4⁺ T lenfositler birbirlerine yakın çoğalma kapasitelerine sahiptiler. Ancak, 72. saatteki T lenfositlerde artan radyasyon maruziyetine bağlı olarak çoğalma kapasitesi neredeyse yarı yarıya düşüş göstermiştir. Geç periyotlarda ise çoğalma kapasitesi açısından artan radyasyon değerlerinde hiçbir fark görülmemiştir. Bu hücreler duplikasyon hızları açısından değerlendirildiklerinde ise ko-kültürün 120. saatindeki CD4⁺ hücrelerinin artan radyasyon değerlerinden etkilenmedikleri bulunurken, geri kalan tüm inkübasyon sürelerindeki CD4⁺ T lenfositlerin ise artan radyasyon maruziyeti sonucunda azalan duplikasyon hızına sahip oldukları belirlenmiştir. Ko-kültürün 120. saatindeki T lenfositlerin büyük çoğunluğu hafıza benzeri fenotipteki T lenfositlerden oluşmaktadır ve bu hücrelerin neredeyse tamamı yüksek düzeyde inhibitör reseptör ifade ettiği belirlenmiştir. Literatürde yorulmuş T lenfositler yüksek düzeyde inhibitör reseptör ifade etmesi ile karakterize, genomik açıdan kapalı disfonksiyonel alt tiplerdir (4,157). Yüzeylerinde yüksek düzeyde IL-2R α bulunmasına rağmen düşük düzeyde IL-2 üretimi nedeniyle düşük çoğalma kapasitesine sahip olabilirler; ancak, ortama IL-2 takviye edilmesi durumunda çoğalma özelliği gösterebilirler. IL-2 molekülünün canlılığı desteklediği bilinmektedir (158). IL-2 molekülünün bu özelliğinin yanı sıra bu hücrelerin yüzeylerindeki yüksek IL-2R α sayesinde, IL-2 molekülünü yakalama kapasitesinin daha fazla olması çoğalmaya destek sağlamaktadır.

5.4. Th1 Hücrelerin anti-PD-1 Blokaj Uygulaması ve Radyasyon Maruziyeti Sonrasında Canlılık Durumu

Literatürdeki çalışmalar kapsamında, tümör mikroçevresindeki immün baskılayıcı profil aracılığıyla T hücrelerin disfonksiyonel alt tiplere farklılaştığı

gösterilmiştir. Tümör içerisine yeni efektör T hücre göçünün sağlanması zor olduğundan, mikroçevrenin baskılayıcılığı ile etkisizleşmiş tümöre infiltre T hücrelerin yeniden aktive edilmesi büyük önem kazanmıştır. Radyoterapi uzun zamandır tümör büyümesinin kontrolü için kullanılmaktadır. Ancak, tek başına ışınlama alanı dışındaki tümörleri inhibe edebilmek için sistemik anti-tümör yanıtı tetiklemede nadiren etkilidir. Son yıllarda yapılan çalışmalar bu etkinin artırılabilirliğini göstermiştir. Yorulmuş T hücrelerin fonksiyonel yanıtı zayıflığı, yüzeylerindeki inhibitör reseptörlerin blokajı aracılığıyla ortadan kaldırılabilir. Bunun yanı sıra blokaj tedavilerinin iyonize radyasyonla veya kemoterapiyle birlikte uygulanması şeklinde yapılan kombine tedavilerde anti-tümör yanıtın artırılabilirliği düşünülmektedir (68,158,159). Bilindiği gibi sistemik radyasyon uygulaması vücut bağışıklık sistemini zayıflatabilir; ancak, lokal olarak tümör ışınlamasının bağışıklık tepkilerini artırabileceğine dair kanıtlar mevcuttur (160). Radyasyon kaynaklı tümör gerilemesinin yanı sıra radyasyon uygulanan alan dışında da tümör gerilemesi olabilmektedir. Uygulama alanı dışındaki gerileme abskopal etki olarak adlandırılır. Yapılan çalışmalarda immün kontrol noktası blokaj tedavisinin veya radyoterapinin tek başına kullanılmasındansa, kombine tedavi ile abskopal yanıtlar artmaktadır (161,163). İmmün kontrol noktası blokaj tedavisi ve radyoterapinin en verimli şekilde nasıl kombine edilebileceği hakkında halen bir kesinlik bulunmamaktadır. Çalışmamız kapsamında kurulan *in-vitro* deney düzenleğinde ko-kültürün 96. saatine taşınan Th hücrelere anti-PD-1 blokaj tedavisi uygulandı ve uygulama sonrasında yapılan ölçümler sonucunda CD4⁺ T hücre yüzeyindeki PD-1 molekül düzeyinin büyük ölçüde azaldığı izlendi. Bu durum blokajın başarılı olduğuna işaret etmektedir. Ardından 120. saatte 5 ve 12 Gy uygulanan radyasyonun hücrenin canlılığı üzerindeki etkisi araştırıldı. Sonuçta, radyasyon uygulamasından 24 saat önce uygulanan blokaj tedavisinin Th hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde bir değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır. Literatürde radyasyon öncesinde uygulanan immün kontrol noktası blokaj tedavilerinin T hücrelerin radyoduyarlılığını arttırdığı dair bilgiler mevcuttur. CD8⁺ T hücre özelinde yapılan bir *in vivo* çalışmada tümör bölgesine yapılacak ışınlama öncesinde uygulanan anti-PD-1 blokaj tedavisi sonucunda hücrelerin yüksek radyoduyarlılık nedeniyle canlılığını kaybettiği ve azalan bir sistemik bağışıklık yanıtı olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışma kapsamında,

anti-PD-1 blokaj tedavisi, radyasyon uygulamasından sonra yapıldığında ise tümör içerisindeki efektör fonksiyonunu kaybetmiş T lenfositlerin azalmaya gittiğini ve yeniden efektör fonksiyonlarını kazanan T hücrelerin çoğalarak daha güçlü bir abskopal etkiye neden olduğu bulunmuştur (159). Çalışmamız kapsamında yapılan *in vitro* deneylerde ise ışınlama öncesi uygulanan blokaj tedavisinin ise ko-kültürün 120. saatinde bulunan CD4⁺ T hücrelerin canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı saptanmıştır. Literatürde yapılan çalışmada (160) ışınlama öncesinde radyasyon uygulamasının canlılığa olumsuz etki yarattığının belirlenmesi *in vivo* deneyler sonucunda ve CD8⁺ sitotoksik T lenfositleri üzerinde gerçekleştirilmiştir ancak bu tez çalışması kapsamında yapılan deneyler *in vitro* olup CD4⁺ yardımcı T hücreler özelindedir. Bilindiği gibi radyasyona en hassas T hücre grubu sitotoksik T lenfositler olarak düşünülmektedir (149,150) ve buna ek olarak yapılan çalışmaların *in vivo* ortamda yapılmış olması tümör mikroçevresindeki diğer faktörlerin de devreye girmesiyle durum üzerinde değişiklik yaratabilecektir. CD4⁺ T lenfosit alttiplerinin de *in vivo* ortamda gözlenmesi konuya daha iyi açıklık getirecektir. Yardımcı T hücrelerin anti-tümör yanıtta salgıladıkları sitokinler ve kemokinlerle birlikte diğer bağışıklık sistemi hücreleri üzerindeki rolü düşünüldüğünde, CD4⁺ T lenfositlerin radyobiyojisinin anlaşılması daha etkili anti-tümör yanıtların oluşturulabilmesi için oldukça elzemdir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Periferik kandan izole edilen CD4⁺ T lenfositler, THP-1 ve anti-CD3 monoklonal antikoru yardımıyla kurulan ko-kültür modelinde uyarılarak Th1 hücrelerine dönüştürülmüş ve uyarımın farklı süreçlerinde izlenebilmiştir.
- Th aktivasyonunu takiben ko-kültürün 24. saatinde IL-2 üretimi en üst düzeyde seyrederken ko-kültürün ilerleyen saatlerinde IL-2 düzeyinde ciddi oranda azalma meydana gelmiştir.
- Ko-kültürün 72. saatinde IFN- γ ve TNF- α gibi Th1 farklılaşmasının imza sitokinleri yüksek düzeyde üretilirken 120. saatte sitokin üretimi büyük ölçüde azalmıştır.
- Ko-kültürün geç saatlerinde (120. saat) Th lenfositlerin yüzeylerinde yüksek düzeyde inhibitör reseptör ifadenmesi görülürken en yüksek düzeyden en düşük sıklıkta ifade edilen inhibitör reseptörler sırasıyla; PD-1, TIM-3, LAG3 ve CTLA-4 olarak belirlenmiştir.
- Hafıza benzeri T lenfositler kendi içlerinde inhibitör reseptör ifadesi açısından değerlendirildiğinde; PD-1 ve TIM-3'ün merkezi hafıza benzeri T lenfositlerde ifadesi daha yüksektir. LAG3 ifadenmesi ise efektör hafıza benzeri T lenfositlerde daha yüksek düzeyde belirlendi. CTLA-4 ifadesi açısından iki alt grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık yoktur.
- Th hücre aktivasyonuna istinaden, ko-kültürün 24. ve 72. Saatlerinde hücre boyutu ve çekirdeğinde büyüme gözlenirken, ko-kültürün 120. saatinde hücre boyutu ve çekirdek boyutunda azalma meydana gelmiştir. Radyasyon uygulamasının hücre morfolojisinde belirgin bir değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır.
- Ko-kültürün farklı periyotlarında elde edilen Th lenfositlerde radyasyon uygulaması ile izlenen DNA kırık odakların, 72. saate en yüksek düzeye ulaşmıştır.

- Th hücreleri ko-kültürün başlangıcında yüksek mitokondri membran potansiyeline sahipken, ko-kültürün 24. saatinde membran potansiyelinde bir düşüş yaşanmıştır. Ancak, 72. ve 120. saatlerde membran potansiyeli artış göstermiştir. Radyasyonun (5 Gy ve 12 Gy) membran potansiyeli üzerinde belirgin bir farklılık yaratmadığı gözlenmiştir.
- Th hücrelerin artan radyasyon dozlarına maruziyeti ile çoğalma ve canlılık düzeylerinde en büyük düşüş ko-kültürün 72. saati olarak belirlenmiştir. Radyasyona en dirençli Th hücreleri ise 0. saatteki kontrol (naif) grup iken; artan radyasyon dozlarına rağmen çoğalma yeteneğini yitirmeyen hücreler ise ko-kültürün 120. saatindeki Th hücreler olarak belirlenmiştir.
- Th hücre alt gruplarının artan radyasyon dozuna maruziyeti sonucunda canlılıkları değerlendirildiğinde, efektör ve efektör hafıza benzeri T lenfositlerin radyasyona en hassas grup oldukları belirlenirken naif ve merkezi hafıza benzeri T lenfositler radyasyona en dirençli gruplardır.
- Ko-kültürün geç dönemlerinde yüksek inhibitör reseptör ifade eden Th lenfositlere uygulanan anti-PD-1 blokajı sonucunda Th hücrelerin üzerindeki PD-1 molekül miktarı büyük ölçüde azalmıştır.
- Radyasyon öncesinde uygulanan anti-PD-1 blokajının CD4⁺ T hücrelerin canlılığı üzerinde olumsuz bir etki göstermediği belirlenmiştir.
- İlerde radyasyon maruziyetinin Th1 farklılaşması üzerindeki etkisinin daha iyi karakterize edilebilmesi amacıyla IL-12, IL-18 gibi sitokinlere bakılabilir ve imza transkripsiyon faktörleri olan STAT1, IRF1 ve Tbet gibi moleküllerin ifade düzeyi incelenebilir.
- Ko-kültürdeki aktivasyon durumunun daha iyi karakterize edilebilmesi için uyarımdan kısa bir süre sonra Th hücrelerdeki erken dönem belirteçlerinin düzeyleri belirlenebilir.

- Anti-PD-1 blokajına ek olarak diğer inhibitör reseptörlerin blokajı ile ek çalışmalar yapılabilir.
- Blokaj uygulaması ve radyasyonun birlikte doğru şekilde uygulanarak T hücre yanıtlarındaki değişikliklerin belirlenebilmesi için farklı süre, fraksiyon ve blokaj konsantrasyonlarının kombinasyonları denenmelidir.
- Radyasyon uygulama dozu, dozun uygulanış şekli ve uygulanış hızı gibi faktörlerin etkisi araştırılabilir.
- Th hücre alt gruplarının radyasyon hassasiyetine dair daha detaylı bilgiler elde etmek amacıyla, farklı alt tiplerdeki Th hücreler ayrıştırılarak DNA kırık odak sayıları analiz edilebilir.
- Radyasyon uygulaması öncesi ve sonrası yapılacak transkriptomik analizler yardımıyla radyasyonun total gen ifadesi düzeyinde yarattığı değişiklikler açıklanabilir.
- *In vitro* ortamda kurulan deney düzeneğinin daha iyi anlaşılabilmesi ve CD4⁺ T hücrelerin daha detaylı karakterize edilebilmesi için Th hücreler *in vivo* koşullarda incelenmelidir.
- Kanser hastalarından alınacak örnekler ile radyoterapinin Th hücre farklılaşması ve fonksiyonları üzerinde kanıtsal çalışmalar yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Haring JS, Badovinac VP, Harty JT. Inflaming the CD8 + T Cell Response. *Immunity*. 2006;19–29
2. Kennedy R, Celis E. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunological Reviews* 2008;222: 129–144
3. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kedl RM. T cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ*. 2013;37(4):273-83.
4. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(2):214-21.
5. Atun R, Jaffray RA, Barton MB, Bray F, Baumann M, Vikram B. ve arkadaşları. Expanding global access to radiotherapy. *Lancet Oncol*. 2015;16(10):1153-86.
6. Weichselbaum RR, Liang H, Deng L, Fu YX. Radiotherapy and immunotherapy: a beneficial liaison?. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(6):365-379.
7. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 8th Edition. Philadelphia:Saunders: Elsevier; 2017;38(2):1-188.
8. Koch U. ve Radtke F. Mechanisms of T cell development and transformation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:539-62.
9. Hilligan KL ve Ronchese F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(6):587-599.
10. Constant SL. ve Bottomly, K. Induction of the Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol*. 1997;15,297–322.
11. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 713–758.
12. Szabo SJ, Kim SK, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell*. 2020;100(6): 655-669.
13. Coffman RL, Lebman DA, Rothman P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv Immunol*. 1993; 54: 229–270.

14. Eagar TN, ve Miller SD. Helper T-Cell Subsets and Control of the Inflammatory Response. Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schoeder HW, Frew AJ, Weyand CM. *Clinical Immunology*. 5. Baskı. Elsevier. 2019.
15. O'Garra A, Arai N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol*. 2000;10(12):542-50.
16. Aghaallaei N, Bajoghli B. Making thymus visible: Understanding T-cell development from a new perspective. *Front Immunol*. 2018;9(MAR):18–22.
17. Gui J, Mustachio LM, Su D, Craig RW, Worth F, Worth F. Thymus Size and Age-related Thymic Involution : Early Programming, Sexual Dimorphism, Progenitors and Stroma. *Aging and Disease*. 2012;3(3):280–90.
18. Aghaallaei N, Bajoghli B. Making thymus visible: Understanding T-cell development from a new perspective. *Front Immunol*. 2018;9:18–22.
19. Deftos ML, Bevan MJ. Notch signaling in T cell development. *Curr Opin Immunol*. 2000;12(2):166-72.
20. Pui JC, Allman D, Xu L, DeRocco S, Karnell FG, Bakkour S, ve arkadaşları. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity*. 1999;11(3):299-308.
21. Etzensperger R, Kadakia T, Tai X, Alag A, Guintier TI, Erman B, et al. HHS Public Access. 2018;18(11):1218–27.
22. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(3):180–90.
23. Allman D, Sambandam A, Kim S, Miller JP, Pagan A, Well D ve arkadaşları. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol*. 2003;4(2):168-74.
24. Porritt HE, Rumfelt LL, Tabrizifard S, Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC, Petrie HT. Heterogeneity among DN1 Prothymocytes Reveals Multiple Progenitors with Different Capacities to Generate T Cell and Non-T Cell Lineages. *Immunity*. 2004;20(6):735-745.
25. Petrie GT, Zúñiga-Pflücker JC. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:649-79.
26. Murphy K. *Janeway's Immunology*. 8th Edition. New York:Taylor&Francis: 2012.
27. Takaba H, Takayanagi H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends Immunol*. 2017;38(11):805-816.

28. Kurd N, Robey EA. T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. *Immunol Rev.* 2016;271(1):114-26.
29. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(12):833-44.
30. Baeyens A, Fang V, Chen C, Schwab SR. Exit Strategies: S1P Signaling and T Cell Migration. *Trends Immunol.* 2015;36(12):778-787.
31. Anderson G ve Jenkinson EJ. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(1):31-40.
32. Imanishi T ve Saito T. T Cell Co-stimulation and Functional Modulation by Innate Signals. *Trends Immunol.* 2020;41(3):200-212.
33. Curtsinger JM ve Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(3):333-40.
34. Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Harry WS. *Clinical Immunology: Principles and Practice.* 2008. 1616 p.
35. Jakubzick C V, Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(6):349–62.
36. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(12):953–64.
37. Chen L ve Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(4):227-42.
38. June CH, Ledbetter JA, Gillespie MM, Lindsten T, Thompson CB. 1987;7(12):4472-81.
39. Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. 1990;87(13):5031-5.
40. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(2):116–26.
41. Esensten JH, Helou YA, Chopra G, Weiss A, Bluestone JA. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity.* 2016;44(5):973–88.
42. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Review CD4+. *Annu Rev Immunol.* 2012;(1):445–89.

43. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*. 2018;359(6382):1350–5.
44. Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DAA. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev*. 2017;276(1):80–96.
45. Nguyen LT, Ohashi PS. Clinical blockade of PD1 and LAG3 — potential mechanisms of action. *Nat Rev Immunol*. 2014;15(1):45–56.
46. Cibrián D ve Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol*. 2017;47(6):946-953.
47. Garris CS, Blaho VA, Hla T, Han MH. Sphingosine-1-phosphate receptor 1 signalling in T cells: trafficking and beyond. *Immunology*. 2014;142(3):347-53.
48. Létourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(4):758-62.
49. Elgueta R, Benson MJ, C de Vries V, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*. 2009;229(1):152-72.
50. Speiser DE, Utzschneider DT, Oberle SG, Münz C, Romero P, Zehn D. T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion? *Nat Publ Gr*. 2014;(September):1–7.
51. Karagiannis P, Iriguchi S, Kaneko S. Reprogramming away from the exhausted T cell state. *Semin Immunol*. 2015; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2015.10.007>.
52. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*. 2016;44(5):989–1004.
53. Imai Y, Shimaoka M, Kurokawa M. Essential roles of VLA-4 in the hematopoietic system. *Int J Hematol*. 2010;91(4):569-75.
54. Sasaki K, Pardee AD, Okada H, Storkus WJ. IL-4 inhibits VLA-4 expression on Tc1 cells resulting in poor tumor infiltration and reduced therapy benefit. 2008;38(10):2865-73.
55. Walling BL ve Kim M. LFA-1 in T Cell Migration and Differentiation. *Front Immunol*. 2018;9:952.
56. Johnson P ve Ruffell B. CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009;8(3):208-20

57. Borland G, Ross JA, Guy K. Forms and functions of CD44. *Immunology*. 1998;93(2):139-48.
58. Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, Hagman J. ve arkadaşları. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity*. 2007;27(2):281-95.
59. Kallies A. Distinct regulation of effector and memory T-cell differentiation. *Immunol Cell Biol*. 2008;86: 325–332.
60. Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP. ve arkadaşları. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science*. 2003;7;302(5647):1041-3.
61. Sprent J ve Surh CD. T cell memory. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:551-79.
62. Sprent J ve Surh CD. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat Immunol*. 2011;12(6):478-84.
63. Seder RA ve Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol*. 2003;4(9):835-42.
64. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745-63.
65. Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrançois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 2001;291:2413–2417.
66. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401:708–712.
67. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol*. 2013;43(11):2797-809.
68. Zhao X ve Shao C. Radiotherapy-Mediated Immunomodulation and Anti-Tumor Abscopal Effect Combining Immune Checkpoint Blockade. *Cancers (Basel)*. 2020;25;12(10):2762.
69. Salmaninejad A, Khoramshahi V, Azani A, Soltaninejad E, Aslani S, Zamani MR, Zal M, Nesaei A, Hosseini SM. PD-1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms. *Immunogenetics*. 2018;70:73–86.

70. Freeman GJ, Wherry EJ, Ahmed R, Sharpe AH. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1–PD-1 ligand blockade. *J Exp Med*. 2006; 203(10): 2223–2227.
71. Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, Sereti I, Roby GA, O'Shea MA ve arkadaşları. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol*. 2008;15;181(10):6738-46.
72. Sharpe AH ve Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(3):153-167.
73. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE ve arkadaşları. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009;114:1537–1544.
74. Staron MM, Gray SM, Marshall HD, Parish IA, Chen JH, Perry CJ, Cui G, Li MO, Kaech SM. The transcription factor FoxO1 sustains expression of the inhibitory receptor PD-1 and survival of antiviral CD8+ T cells during chronic infection. *Immunity*. 2014;41:802–814.
75. Patsoukis N, Wang Q, Strauss L, Boussiotis VA. Revisiting the PD-1 pathway. *Sci Adv*. 2020;18;6(38):eabd2712.
76. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2010;236:219-42.
77. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*. 2007;27(1):111-22.
78. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020;1;10(3):727-742.
79. Nie X, Chen W, Zhu Y, Huang B, Yu W, Wu Z ve arkadaşları. B7-DC (PD-L2) costimulation of CD4 + T-helper 1 response via RGMb. *Cell Mol Immunol*. 2018;15(10):888-897.
80. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol*. 2004;15;173(2):945-54.
81. Nurieva R, Thomas S, Nguyen T, Martin-Orozco N, Wang Y, Kaja MK ve arkadaşları. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *EMBO J*. 2006;25(11):2623-33.

82. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ ve arkadaşları. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Exp Med*. 2000;2;192(7):1027-34.
83. Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, Collins M, Honjo T, Freeman GJ, Carreno BM. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol*. 2002;32(3):634-43.
84. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV. ve arkadaşları. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2005;25(21):9543-53.
85. Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev*. 2009;229(1):114-25.
86. Bennett F, Luxenberg D, Ling V, Wang IM, Marquette K, Lowe D ve arkadaşları. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol*. 2003;170(2):711-8.
87. Wieder T, Eigentler T, Brenner E, Röcken M. Immune checkpoint blockade therapy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018;142(5):1403-1414.
88. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov*. 2018;8(9):1069-1086.
89. Chen C, Liu Y, Cui B. Effect of radiotherapy on T cell and PD-1 / PD-L1 blocking therapy in tumor microenvironment. *Hum Vaccin Immunother*. 2021;3;17(6):1555-1567.
90. Bagherifar R, Kiaie SH, Hatami Z, Ahmadi A, Sadeghnejad A, Baradaran B. ve arkadaşları. Nanoparticle-mediated synergistic chemoimmunotherapy for tailoring cancer therapy: recent advances and perspectives. *J Nanobiotechnology*. 2021;17;19(1):110.
91. Jaffray DA, Atun R , Barton M, Baumann M, Gospodarowicz M, Hoskin P ve arkadaşları. Radiation therapy and the global health agenda. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2015;27(2):67-9.
92. Formenti SC ve Demaria S. Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncol*. 2009;10(7):718-26.
93. Bucher N ve Britten CD. G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Br J Cancer*. 2008;12;98(3):523-8.

94. Haffty BG VE Wilson LD. (Eds). Handbook of Radiation Oncology: Basic Principles and Clinical Protocols. Boston, MA:Jones and Bartlett, 2009, pp. 41–72.
95. Tibbetts RS, Cortez D, Brumbaugh KM, Scully R, Livingston D, Elledge SJ ve arkadaşları. Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev.* 2000;14(23):2989-3002.
96. Gatei M, Zhou BB, Hobson K, Scott S, Young D, Khanna KK. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM and Rad3 related kinase mediate phosphorylation of Brca1 at distinct and overlapping sites. In vivo assessment using phospho-specific antibodies. *J Biol Chem.* 2001;18;276(20):17276-80.
97. Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet.* 2002;30(3):285-9.
98. Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GCM, Lukas J ve arkadaşları. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol.* 2006;8(1):37-45.
99. Fattah F, Lee EH, Weisensel N, Wang Y, Lichter N, Hendrickson EA. Ku regulates the non-homologous end joining pathway choice of DNA double-strand break repair in human somatic cells. *PLoS Genet.* 2010;26;6(2):e1000855.
100. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science.* 2015;3;348(6230):56-61.
101. Victor CTS, Rech AJ, Maity A, Rengan R, Pauken KE, Stelekati E. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature.* 2015;16;520(7547):373-7.
102. Demaria S, Golden EB, Formenti SC. Role of Local Radiation Therapy in Cancer Immunotherapy. *JAMA Oncol.* 2015;1(9):1325-32.
103. Cho SJ, Kang H, Hong EH, Kim JY, Nam SY. Transcriptome analysis of low-dose ionizing radiation-impacted genes in CD4 + T-cells undergoing activation and regulation of their expression of select cytokines. *J Immunotoxicol.* 2018;15(1):137-146.
104. Calabrese E, Bachmann K, Bailer A, Bolger P, Borak J, Cai L ve arkadaşları. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;222:122–128.

105. Cohen B. Dose-response relationship for radiation carcinogenesis in the low-dose region. *Int Arch Occup Environ Health*. 1994;66:71–75.
106. Feinendegen L, Bond V, Sondhaus C, Muehlensiepen H. Radiation effects induced by low doses in complex tissue and their relation to cellular adaptive responses. *Mutat Res*. 1996;358:199–205.
107. Feinendegen L. Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis. *Br J Radiol*. 2005;78:3–7.
108. Calabrese E, Bachmann K, Bailer A, Bolger P, Borak J, Cai L ve arkadaşları. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;222:122–128.
109. Vaiserman A. Radiation hormesis: Historical perspective and implications for low-dose cancer risk assessment. *Dose Response* 2010;8:172–191.
110. O’Neill LAJ. Sensing the dark side of DNA. *Science*. 2013;15;339(6121):763-4.
111. Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, Sarfraz Y, Diamond JM, Schneider RJ, Inghirami G, Coleman CN, Formenti SC, Demaria S. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat Commun*. 2017;9;8:15618.
112. Harding SM, Benci JL, Irianto J, Discher DE, Minn AJ, Greenberg RA. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature*. 2017;24;548(7668):466-470.
113. Mackenzie KJ, Carroll P, Martin CA, Murina O, Fluteau A, Simpson DJ. cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature*. 2017;548, 461–465.
114. Bartsch K, Knittler K, Borowski C, Rudnik S, Damme M, Aden K. Absence of RNase H2 triggers generation of immunogenic micronuclei removed by autophagy. *Hum. Mol. Genet*. 2017;26, 3960–3972.
115. Gonugunta VK, Sakai T, Pokatayev V, Yang K, Wu J, Dobbs N. Trafficking-Mediated STING Degradation Requires Sorting to Acidified Endolysosomes and Can Be Targeted to Enhance Anti-tumor Response. *Cell Rep*. 2017;12;21(11):3234-3242.
116. Zhang C, Shang G, Gui X, Zhang X, Bai XC, Chen ZJ. Structural basis of STING binding with and phosphorylation by TBK1. *Nature*. 2019;567(7748):394-398.

117. Keating SE, Baran M, Bowie AG. Cytosolic DNA sensors regulating type I interferon induction. *Trends Immunol.* 2011;32, 574.
118. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature.* 2009 Oct 8;461(7265):788-92.
119. Kwon J, Bakhom SF. The Cytosolic DNA-Sensing cGAS-STING Pathway in Cancer. *Cancer Discov.* 2020;10(1):26-39.
120. Deng L, Liang H, Xu M, Yang X, Burnette B, Arina A. ve arkadaşları. STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity.* 2014;20;41(5):843-52.
121. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002;296, 301–305.
122. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature.* 2003;425, 516–521.
123. Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR. ve arkadaşları. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev.* 2007;220:60-81.
124. Curtin JF, Liu N, Candolfi M, Xiong W, Assi H, Yagiz K. ve arkadaşları. HMGB1 mediates endogenous TLR2 activation and brain tumor regression. *PLoS Med.* 2009;13;6(1):e10.
125. Sato Y, Goto Y, Narita N, Hoon DSB. Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron.* 2009;2 Suppl 1(Suppl 1):205-14.
126. Kawai T ve Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 2011;27;34(5):637-50.
127. Miller YI, Choi SH, Wiesner P, Fang L, Harkewicz R, Hartvigsen K. ve arkadaşları. Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circ Res.* 2011;21;108(2):235-48.
128. Schaeue D ve McBride WH. Links between innate immunity and normal tissue radiobiology. *Radiat Res.* 2010;173(4):406-17.
129. Schaeue D, Kachikwu EL, McBride WH. Cytokines in radiobiological responses: a review. *Radiat Res.* 2012;178(6):505-23.


130. Matsumura S, Wang B, Kawashima N, Braunstein S, Badura M, Cameron TO. ve arkadaşları. Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells. *J Immunol.* 2008;1;181(5):3099-107.
131. Burnette BC, Liang H, Lee Y, Chlewicki L, Khodarev LN, Weichselbaum RR. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Res.* 2011;1;71(7):2488-96.
132. Ranoa DRE, Parekh AD, Pitroda SP, Huang X, Darga T, Wong AC. ve arkadaşları. Cancer therapies activate RIG-I-like receptor pathway through endogenous non-coding RNAs. *Oncotarget.* 2016;3;7(18):26496-515.
133. Schaeue D ve McBride WH. T lymphocytes and normal tissue responses to radiation. *Front Oncol.* 2012;19;2:119.
134. Schmitz A, Bayer J, Déchamps N, Thomas G. Intrinsic susceptibility to radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;1;57(3):769-78.
135. Ozkazanc D, Yoyen-Ermis D, Tavukcuoglu E, Buyukasik Y, Esendagli G. Functional exhaustion of CD4⁺ T cells induced by co-stimulatory signals from myeloid leukaemia cells. *Immunology.* 2016;149(4):460–71.
136. Dolen Y ve Esendagli G. Myeloid leukemia cells with a B7-2(+) subpopulation provoke Th-cell responses and become immuno-suppressive through the modulation of B7 ligands. *Eur J Immunol.* 2013;43(3):747-57.
137. Skokos D ve Nussenzweig MC. CD8⁻ DCs induce IL-12-independent Th1 differentiation through Delta 4 Notch-like ligand in response to bacterial LPS. *J Exp Med.* 2007;9;204(7):1525-31.
138. Shi Y, Wu W, Wan T, Liu Y, Peng G, Chen Z. ve arkadaşları. Impact of polyclonal anti-CD3/CD28-coated magnetic bead expansion methods on T cell proliferation, differentiation and function. *Int Immunopharmacol.* 2013;15(1):129-37.
139. McKinney EF, Lee JC, Jayne DRW, Lyons PA, Smith KGC. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature.* 2015;30;523(7562):612-6.
140. Kuo LJ ve Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo.* 2008;22(3):305-9.
141. Falk M, Lukášová E, Kozubek S. Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to gamma-radiation. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1783(12):2398-414.

142. Morgan, WF. Is there a common mechanism underlying genomic instability, bystander effects and other nontargeted effects of exposure to ionizing radiation?. *Oncogene*. 2003;22:7094-7099.
143. Somosy, Z. Radiation response of cell organelles. *Micron*. 2000;31:165-181.
144. Wang JS, Wang HJ, Qian HL. Biological effects of radiation on cancer cells. *Mil Med Res*. 2018;30;5(1):20.
145. Kam WWY, McNamara AL, Lake V, Banos C, Davies JB, Kuncic Z. ve arkadaşları. Predicted ionisation in mitochondria and observed acute changes in the mitochondrial transcriptome after gamma irradiation: a Monte Carlo simulation and quantitative PCR study. *Mitochondrion*. 2013;13(6):736-42.
146. Yakes FM ve Houten BV. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;21;94(2):514-9.
147. Horzum U. Farklı Aktivasyon Basamaklarına İlerletilen Yardımcı T Hücrelerinde Adezyon ve Migrasyon Mekanizmalarının İncelenmesi [Doktora tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi;2020.
148. Abdelsamed HA, Zebley CC, Youngblood B. In vitro Homeostatic Proliferation of Human CD8 T Cells. *Bio Protoc*. 2017;20;7(22):e2619.
149. Crompton NE ve Ozsahin M. A versatile and rapid assay of radiosensitivity of peripheral blood leukocytes based on DNA and surface-marker assessment of cytotoxicity. *Radiat Res*. 1997;147(1):55-60.
150. Wilkins RC, Wilkinson D, Maharaj HP, Bellier PV, Cybulski MB, McLean JRN. Differential apoptotic response to ionizing radiation in subpopulations of human white blood cells. *Mutat Res*. 2002;15;513(1-2):27-36.
151. Brent L ve Medawar P. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. 8. The effects of irradiation. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1966;11;165(1001):413-23.
152. Dunn PL ve North RJ. Selective radiation resistance of immunologically induced T cells as the basis for irradiation-induced T-cell-mediated regression of immunogenic tumor. *J Leukoc Biol*. 1991;49(4):388-96.
153. Grayson JM, Harrington LE, Lanier JG, Wherry EJ, Ahmed R. Differential sensitivity of naive and memory CD8+ T cells to apoptosis in vivo. *J Immunol*. 2002;1;169(7):3760-70.
154. Qu Y, Jin S, Zhang A, Zhang B, Shi X, Wang J. ve arkadaşları. Gamma-ray resistance of regulatory CD4+CD25+Foxp3+ T cells in mice. *Radiat Res*. 2010;173(2):148-57.

155. Beauford SS, Kumari A, Benson CG. Ionizing radiation modulates the phenotype and function of human CD4⁺ induced regulatory T cells. *BMC Immunol.* 2020;16;21(1):18.
156. Nakamura M, Asao H, Sugamura K. Interleukin-2 receptor heterotrimer complex and intracellular signaling. *Semin Immunol.* 1993;5(5):309-17.
157. Zhang Z, Liu S, Zhang B, Qiao L, Zhang Y, Zhang Y. T Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2020;11;8:17.
158. Dooms H, Kahn E, Knoechel B, Abbas AK. IL-2 induces a competitive survival advantage in T lymphocytes. *J Immunol.* 2004;15;172(10):5973-9.
159. Hargadon KM, Johnson CE, Williams CJ. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *Int Immunopharmacol.* 2018;62:29-39.
160. Wei J, Ortiz WM, Yu L, Krasco A, Ebstein S, Cortez C. ve arkadaşları. Sequence of α PD-1 relative to local tumor irradiation determines the induction of abscopal antitumor immune responses. *Sci Immunol.* 2021;9;6(58):eabg0117.
161. Herrera FG, Bourhis J, Coukos G. Radiotherapy combination opportunities leveraging immunity for the next oncology practice. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(1):65-85.
162. Shaverdian N, Lisberg AE, Bornazyan K, Veruttipong D, Goldman JV, Formenti SC. Previous radiotherapy and the clinical activity and toxicity of pembrolizumab in the treatment of non-small-cell lung cancer: a secondary analysis of the KEYNOTE-001 phase 1 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(7):895-903.
163. Ruysscher DD. Radiotherapy and PD-L1 inhibition in metastatic NSCLC. *Lancet Oncol.* 2017;18(7):840-842.

8. EKLER

EK 1. Tez çalışması ile ilgili etik kurul izin belgesi.

**T.C.**
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı :

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi :

Toplantı No :

Proje No :

Karar No :

Üniversitemiz Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI'nın sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. Gözde YAZICI ile birlikte çalışacakları ve Bio. Anıl IŞIK'ın yüksek lisans tezi olan, kayıtlı numaralı "*Tıp-1 Yardımcı T(Th1) Hücrelerin Radyasyon Stresi Altında Fonksiyonel ve Fenotipik Değişimlerinin İncelenmesi*" başlıklı proje önerisi araştırmamızın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 21 Ekim 2020-21 Nisan 2023 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışma tamamlandığında sonuçlarımızı içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

1. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (imza) (Başkan) 7. Doç. Dr. Nüket Paksoy ERBAYDAR (imza)

2. Prof. Dr. G. Burça AYDIN (imza) (Üye) 8. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTIK (imza)

3. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK (imza) (Üye) 9. Doç. Dr. Hande Güney DENİZ (imza)

4. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER (imza) (Üye) 10. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR (imza)

5. Doç. Dr. H. Tuna Çak ESEN (imza) (Üye) 11. Av. Serap MORALIOĞLU (imza)

6. Doç. Dr. Can Ebru KURT (imza) (Üye)

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için:

EK 2. Tez çalışması orjinallik raporu.

Tip-1 Yardımcı T(Th1) Hücrelerin Radyasyon Stresi Altında Fonksiyonel ve Fenotipik Değişimlerinin İncelenmesi

ORJİNALLIK RAPORU

| | | | |
|-------------------|---------------------|------------|------------------|
| % 6 | % 6 | % 1 | % 0 |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

BİRİNCİL KAYNAKLAR

| | | |
|----------|--|-------------|
| 1 | www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı | % 4 |
| 2 | openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 3 | acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 4 | ftp.cngb.org İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 5 | www.freepatentsonline.com İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 6 | tur.bioconus.com İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 7 | hdl.handle.net İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 8 | www.nature.com İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 9 | tez.yok.gov.tr İnternet Kaynağı | <% 1 |

EK 3. Dijital makbuz.



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Anil Işık
Ödev başlığı: Deneme
Gönderi Başlığı: T1P-1 YARDIMCI T (Th1) HÜCRELERİN RADYASYON STRESİ ALT...
Dosya adı: i_Alt_nda_Fonksiyonel_ve_Fenotipik_De_i_imlerinin_ncelenme...
Dosya boyutu: 3.31M
Sayfa sayısı: 80
Kelime sayısı: 20,296
Karakter sayısı: 128,106
Gönderim Tarihi: 04-Tem-2022 11:19ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1866490066



9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Anıl IŞIK

