

**T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PD-1 GEN POLİMORFİZMİNİN
(PD-1.5 C/T) TÜRK KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA
ARAŞTIRILMASI**

YOSRA MOHAMED K. LAMAMI

**Danışman
Jüri Üyesi
Jüri Üyesi**

**Doç. Dr. Bayram KIRAN
Prof. Dr. İlhan YAYLIM
Yrd. Doç. Dr. Nejdet GÜLTEPE**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**

KASTAMONU – 2017

TEZ ONAYI

Yosra Mohamed K. LAMAMI tarafından hazırlanan “**PD-1 Gen Polimorfizminin (PD-1.5 C/T) Türk Kolorektal Kanserli Hastalarda Araştırılması**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve **oy birliği** ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Bayram KIRAN
Kastamonu Üniversitesi

Jüri Üyesi Prof. Dr. İlhan YAYLIM
İstanbul Üniversitesi

Jüri Üyesi Yrd. Doç. Dr. Nejdet GÜLTEPE
Kastamonu Üniversitesi



12/06/2017

Enstitü Müdür V. Prof. Dr. Temel SARIYILDIZ



TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.

İmza



Yosra Mohamed K. LAMAMI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PD-1 GEN POLİMORFİZMİNİN (PD-1.5 C/T) TÜRK KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA ARAŞTIRILMASI

Yosra Mohamed K. LAMAMI

Kastamonu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Bayram KIRAN

Aktive edilmiş T hücreleri tarafından ifade edilen programlanmış ölüm-1 (PD-1), bağışıklık ve tolerans sırasında T hücresi görevinin düzenlenmesiyle ilgili bir inhibitör hücre yüzeyi reseptörüdür. İmmun yanıtla ilişkili genlerin kanser ile ilişkileri kurulmuştur. Bu çalışma, kolorektal kanserli (CRC) hastalarda PD-1.5(C/T) polimorfizmini araştırmaktadır.

PCR-RFLP kullanarak 249 Türk bireyde (CRC'si olan 99 hasta ve kontrol olarak 150 sağlıklı birey) PD-1.5(C/T) polimorfizmi araştırıldı. CRC'li hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında PD-1.5(C/T) genotip dağılımı istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.003$). Uzak metastazı olan hastalarda olmayanlara göre C alleli ve CT genotipleri daha yüksektir ($p=0.016$, odds oranı (OR), 1.248; %95 güven aralığı (CI), 1.063-1.465; $p<0.001$, odds oranı (OR), 1.732; %95 güven aralığı (CI), 1.291-2.322}. Ayrıca, anjiyolifatik invazyona sahip olan hastalarda, PD-1.5(C/T) homozigot CC genotip taşıma frekansı, anjiyolifatik invazyon bulunmayan hastalara göre daha yüksektir ($p=0.043$, OR: 2.25; %95 GA: 1.063-4.763}. Müsinöz bileşeni olan hastalar, T allel frekansı müsine komponenti bulunmayan hastalara göre daha yüksektir ($p=0.023$, OR: 1.284, %95 GA: 1.066-1.546}. Sonuçlarımız, PD-1.5 (C/T) polimorfizmi ile CRC duyarlılığı ve hastalığın progresyonu arasında anlamlı ilişkiler olduğunu göstermiştir. PD-1.5 polimorfizminin belirli bir genotipinin kolorektal kanser ile ilişkili olup olmadığını ve PD-1.5(C/T) polimorfizminin ve klinikopatolojik özelliklerin ilişkisini açıklığa kavuşturmak için daha fazla hastadan oluşan daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: PD-1.5 (C/T), polimorfizm, kolorektal kanser

2017, 58 sayfa

Bilim Kodu: 923

ABSTRACT

MSc. Thesis

INVESTIGATION OF PD-1 GENE POLYMORPHISM (PD-1.5 C/T) IN TURKISH PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

Yosra Mohamed K. LAMAMI

Kastamonu University
Institute of Science
Department of Genetic and Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bayram KIRAN

Programmed death-1 (PD-1), expressed by activated T cells, is an inhibitory cell surface receptor concerned in the regulation of T cell task during immunity and tolerance. The associations of the immune response-related genes with cancer have been established. This study investigates PD-1.5 (C/T) polymorphism in patients with colorectal cancer (CRC).

PD-1.5 (C/T) polymorphism was investigated in 249 Turkish subjects (99 patients with CRC and 150 healthy individuals as controls) by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The distribution of PD-1.5 (C/T) genotypes between the patients with CRC and healthy controls were significantly different ($p=0.003$). The patients who have distance metastasis have increased C allele and heterozygous CT genotypes than those with negative metastatic ($p=0.016$, odds ratio (OR), 1.248; 95% confidence interval (CI), 1.063-1.465; $p<0.001$, odds ratio (OR), 1.732; 95% confidence interval (CI), 1.291-2.322). Moreover, the patients who have angiolymphatic invasion have increased frequency of CC genotype than those with the absence of angiolymphatic invasion ($p=0.043$, OR: 2.25; 95% CI: 1.063-4.763). The patients who have mucinous component have increased frequency of T allele than those with the absence of mucinous component ($p=0.023$, OR: 1.284; 95% CI: 1.066-1.546). Our results have shown significant associations between PD-1.5 (C/T) polymorphism and CRC susceptibility and progression of the disease. Further researches comprising more patients are required to clarify whether a particular genotype of the PD-1.5 polymorphism is associated with colorectal cancer and clarify the association of PD-1.5(C/T) polymorphism and clinicopathological characteristics.

Key Words: PD-1.5(C/T), polymorphism, colorectal cancer

2017, 61 pages

Science Code: 923

TEŞEKKÜR

İlk olarak, bana böyle bir harika çalışmanın içinde yer alma fırsatını sunan tez danışmanım Doç.Dr. Bayram KIRAN'a ve İstanbul Üniversitesi'nden Prof. Dr. İlhan YAYLIM'a saygı ve şükranlarımı sunmak istiyorum. Bana karşı gösterdikleri anlayış, sağladıkları motivasyon, sergiledikleri coşku ve paylaştıkları değerli bilgiler için onlara minnettarım. Araştırma ve tez yazma aşamasında yaptıkları rehberlik her zaman bana yardımcı oldu. Yüksek Lisans çalışmalarımı yönetecek onlardan daha iyi danışmanlar ve yol göstericiler olabileceğini hayal bile edemiyorum. Bu tez üzerindeki çok değerli yorumları için kendimi borçlu hissediyorum.

Ayrıca, laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Enstitüsü/Moleküler Tıp Bölümü teknik personellerine en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek Lisans çalışmalarım için burs desteği sağlayan ülkem Libya'ya ve sağladığı eğitim imkânı için Kastamonu Üniversitesine minnettarlığımı ifade etmek istiyorum.

Son olarak ama bir o kadar da önemlisi, öğrencilik yıllarım boyunca ve bu Yüksek Lisans çalışmamın araştırma ve yazım sürecinde bana kesintisiz destek sunan ve beni sürekli yüreklendiren ailem ve arkadaşlarıma en derin şükran duygularımı ifade etmek istiyorum. Onlar olmadan bunu başarmak mümkün olmazdı.

Yosra Mohamed K. LAMAMI
Kastamonu, Haziran, 2017

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TAAHHÜTNAME	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser Hücrelerinin Host Bağışıklık Sisteminden Kaçış Mekanizmaları	2
1.1.1. Karsinogenezin Başlangıç Evresinde Tümör ve Bağışıklık Sistemi Arasındaki İletişimler.....	2
1.1.2. Tümör Mikro Çevresindeki İmmünsüpresif Mekanizmalar	3
1.1.3. Bağışıklık Kontrol Noktası Blokaj Terapisi	7
1.1.4. Kansere karşı Bağışıklık Kontrol Noktası Blokaj Terapisinin Gelecek Bakış Açısı.....	10
1.2. Kolorektal kanser (CRC).....	11
1.2.1. CRC'de bağışıklık kontrol noktaları	13
1.2.1.1. PD-1/PDL1	13
1.2.1.2. CTLA-4/B7.....	15
1.2.1.3. TIM-3	17
1.2.1.4. LAG-3	18
1.2.1.5. CD70/CD27	19
1.2.1.6. OX40 (CD134)	20
1.2.1.7. GITR (CD357)/ GITRL.....	21
1.2.1.8. 4-1BB (CD137)/ 4-1BBL.....	22
1.2.1.9. CD40/CD40L.....	23
1.2.2. Kolorektal kanser ve PD-1 gen varyasyonları	24

2. LİTERATÜR İNCELEMESİ	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Çalışma Denekleri.....	29
3.2. DNA Ekstraksiyonu	29
3.3. Genotipleme {PD-1.5 C / T (+7785 veya +872) SNP'nin (rs2227981) Tayini	30
3.4. İstatistiksel analiz	31
4. BULGULAR	32
4.1. Kolorektal Kanserli Hastaların ve Kontrollerin Özellikleri.....	32
4.2. Kolorektal Kanserli Hastalarda ve Kontrollerde PD-1.5 Polimorfizminin Genotip Dağılımı ve Allelik Sıklığı	33
4.3. Klinikopatolojik Parametreleri Karşılaştıran PD-1.5 (C / T) Genotiplerinin Dağılımı	34
5. TARTIŞMA.....	37
6. SONUÇ	42
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	58

KISALTMALAR DİZİNİ

PD-1	Programlanmış Ölüm-1
CTLA-4	Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen-4
TIM-3	T-hücresi immünoglobülin ve müsin proteini-3
LAG-3	lenfosit aktivasyon gen-3
GITR	Glukokortikoid kaynaklı TNFR ailesel reseptör
KIR	Öldürücü hücre immünoglobülin benzeri reseptörleri
PD-L1	Programlanmış öldürücü-Ligand 1
KHDAK	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
CRC	Kolorektal Kanser
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü - β
IL-10	İnterlökin -10
IDO	İndolamin 2, 3- Dioksijenaz
TILs	Tümör infiltrate edici Lenfositler
CAR-T cells	Kimerik Antijen Reseptör T Hücreleri
TCR	T hücre Reseptörü
MHC	Büyük histokompatibilite kompleksi
CD 28	Farklılaşma yığılım molekülü 28
APCs	Antijen sunan hücreler
NK cells	Doğal Öldürücü Hücreler
IFN- γ	İnterferon- γ
Ab	Antikor
IgG4	İmmünoglobulin G 4
RCC	Renal Hücreli Karsinom
UBC	Metastatik Ürotelyal Mesane Kanseri
MIG	Gamma interferon tarafından indüklenen monokin
MSI	Mikrosatelit İnstabilite
CIMP	KSY Adası Methylator fenotip
CIN	Kromozom İnstabilitesi
TNM	Tümörün Lenf bezlerine Metastazı
PD-L2	Programlanmış Öldürücü-Ligand 2
mAbs	Monoklonal Antikorlar
IHC	İmmünohistokimya
MMR	Uyumsuzluk Onarımı
Tregs	Regülatör T hücreleri
Foxp3 ⁺ cells	Forkhead kutusu P3 ⁺ Hücreler
DCs	Dendritik hücreler
Tr1	Tip 1 Regülatör T hücreleri
TNFRSF	Tümör nekroz faktörü reseptörleri Süper Familyası
GITRL	Glukokortikoid-indüklü TNFR-ilişkili Ligand
ICOS	İndüklenebilir T Hücre eş-uyaranı
Th	Yardımcı T hücresi
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizm
SNPs	Tek Nükleotid polimorfizmler
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
T1D	Tip 1 Diyabet
MS	Multipli Skleroz

AS	Ankilozan Spondilit
RA	Romatoid Artrit
BTLA	B- ve T- lenfosit Zayıflatıcı
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
PCR-RFLP	Polimerize Zincirleme Reaksiyon- Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
PCR	Polimerize Zincirleme Reaksiyon
OR	Tahmini Risk Oranı
CI	Güven Aralığı



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. İmmün takip ve kanser immüno-düzenlemesi.....	3
Şekil 1.2. Uyarıcı ve önleyici eş sinyallerle T hücre yanıtlarının düzenlenmesi.....	5
Şekil 1.3. Bağışıklık kontrol noktası blokajı ile kanser immünoterapisinin kavramsal diyagramı	6
Şekil 1.4. CTLA-4 ve PD-1'in bağışıklık kontrol noktası işlevlerini ifade ettiği farklı evreler	8
Şekil 1.5. CRC patogeneğinde yer alan bağışıklık kontrol noktası moleküllerine genel bakış	13

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

	Sayfa
Fotoğraf 3.1. PZR prosedürü.....	31
Fotoğraf 3.2. Jel Elektroforezi.....	31



TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 4.1. Kolorektal kanserli hastaların ve kontrollerin özellikleri	32
Tablo 4.2. Kolorektal kanser hastalarında (n = 99) ve kontrollerde (n=150) PD-1.5 (C / T) polimorfizminin genotipi ve alel frekansları	33
Tablo 4.3. Klinikopatolojik parametrelerin karşılaştıran PD-1.5 (C / T) genotiplerinin dağılımı	34



1. GİRİŞ

Bağışıklık sistemi, kanseri kontrol altına alma ve ortadan kaldırmada merkezi bir rol oynar. Bununla birlikte, malignite ortamında, etkili antitümör bağışıklığı durduran çeşitli bağışıklık baskılama mekanizmaları mevcut olabilir. Agresif tümör gelişiminin immüno-regülasyonu, bağışıklık kontrol noktalarının aktivasyonu yoluyla efektör bağışıklık tepkilerini engelleyen ligandların tümör up-regülasyonu tarafından genellikle geride bırakılmıştır[1].

Bu tür kontrol noktaları, programlanmış ölüm-1 (PD-1), sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen-4 (CTLA-4), T-hücresi immünoglobülin ve müsin proteini-3 (TIM-3), lenfosit aktivasyon gen-3 (LAG-3), Glukokortikoid kaynaklı TNFR ailesel reseptör (GITR) ve öldürücü hücre immünoglobülin benzeri reseptörleri (KIR) içerir, GITR hariç tutulduğunda, kendi kontrol ligandlarına bağlandıktan sonra bu kontrol noktaları, otoimmüniteyi önlemek için bağışıklık tepkilerinin aşağı modülasyonunu uyarır. Bununla birlikte, bu bağışıklık mekanizmaları, hızla tümör hücresi çoğalmasına izin vermek üzere tümörler tarafından seçilir[2].

T hücreleri, insan bağışıklık sisteminin karmaşık ağında kritik efektör benzeri roller oynarlar. T hücreleri tümör büyümesini engeller [3, 4]. Ne yazık ki, tümörler aynı zamanda CTLA-4, PD-1 ve programlanmış öldürücü-Ligand 1 (PD-L1) gibi bağışıklık kontrol noktaları aracılığıyla sürekli T hücresi yanıtlarından kendilerini önleyebilirler [5].

Agresif tümörler, zorlu host ortamlarında da yaşamak için moleküler mekanizmalar geliştirir ve kronik enflamasyon bölgelerinde çoğalır [6]. Anjiyogenezisi teşvik eden ve yakın doku mimarisinde düzeni bozan faktörlerin tümör salınımı invazyon ve metastatik yayılımı teşvik eder.

Bağışıklık sisteminin merkezi rolü, anormal hücre çoğalmasının bir sonucu olarak ifade edilenler de dahil olmak üzere yabancı antijenleri ortadan kaldırmaktır [7]. Bağışıklık efektör hücrelerini engelleyen veya bağışıklık hücre sağkalımı için anahtar faktörlerin tümör mikrobiyolojisini tüketen moleküllerin tümör hücresi ekspresyonu yüzünden proliferatif kanser hücreleri sistemik bağışıklık yanıtıyla immünolojik

olarak gözlenmeyebilir [8, 9]. İlk tümör büyümesi sağlam doğuştan ve adaptif bağışıklık ile saptanır ve yok edilirken, adaptif bağışıklık yanıtı efektör hücreleri ile denge içerisinde bekleyen tümör hücreleri geride bırakılır [9- 12]. Tümör hücreleri ligandları yukarı doğru regüle edecek ve sitotoksik T-lenfosit aktivitesini engelleyecek çözünür faktörleri tahliye edecek ve bu tür moleküllerin tümör ekspresyonu kanserin tümör hücrelerinin bağışıklık tepkisi ve yayılımından kaçmasına yol açacaktır [8, 9].

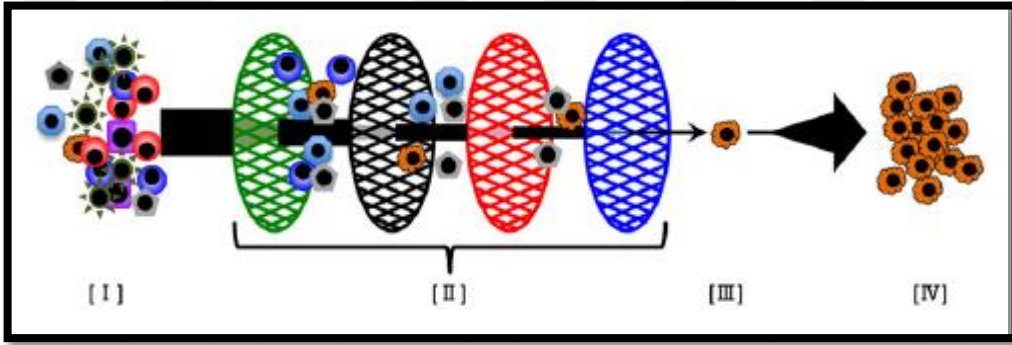
Bağışıklık kontrol noktaları, normal koşullar altında inflamatuvar yanıtlar sırasında çevresel otoimmüniteyi önleyen çeşitli bağışıklık hücreler üzerinde eksprese edilen hücre yüzeyi moleküllerini ifade eder [13]. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) ve Kolorektal Kanser (CRC) gibi kötü immünojenik kanserler, bu bağışıklık kontrol noktalarının ligandlarını eksprese edebilir ve tümör mikro ortamında bağışıklık efektörünün inhibisyonuna neden olabilir.

1.1. Kanser Hücrelerinin Host Bağışıklık Sisteminden Kaçış Mekanizmaları

1.1.1. Karsinogenezin Başlangıç Evresinde Tümör ve Bağışıklık Sistemi Arasındaki İletişimler

Tümör hücrelerinin görünümünden tümör dokusunun gelişimine kadar olan süreç, kanser moleküler biyolojisi alanında aktif olarak araştırılan en önemli konulardan biridir. Karsinogenezin erken safhasındaki (yani kanser hücrelerinin ortaya çıktığı zaman) tümör-bağışıklık sistemi etkileşimi ile ilgili olarak, aşağıdaki teori önerilmiş ve yaygın şekilde kabul edilmiştir: gen mutasyonları, endojen veya çevresel uyaranlar tarafından sürekli bir olasılık ile sürekli olarak indüklenmiştir, böylece mutant hücrelerin muhtemel bir karsinogenez ile rutin olarak *in vivo* ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, konak bağışıklık sistemi sürekli olarak bu mutasyona uğramış kanserojenik hücreleri gözlemlemekte ve keşfetmekte ve onları "kansere immün takibi" olarak bilinen mekanizma ile ortadan kaldırmaktadır [10-12]. Bununla birlikte, mutasyona uğramış hücrelerin birikmiş ortaya çıkışı yoluyla, bazıları tesadüfen, immün takibinden kaçınma (yani konak bağışıklık sistemi tarafından bir öldürmeyi önleme) kapasitesini kazanır ve tümör dokusunun gelişimini

ayarlamak için gelişimlerine devam eder. Konağın bağışıklık sistemi tarafından tümörlere karşı sürekli stres sonucu ortaya çıkan ve immün takibine dirençli mutantların ortaya çıkmasından kaynaklanan kanserli hücrelerin immünojenitesindeki değişiklikler, "kanser immüno-düzenlemesi" olarak bilinir (Şekil 1.1) [10,11,14]. Başka bir deyişle, klinik ortamda gözle görülür bir kitle olarak saptanan tümörler, zaten kanser oluşumunun erken safhasındaki immünojenikliği düzenleyerek anti-tümör immüniteden kaçarlar; buna karşın değişikliklerin sıklığı (yani, neoantijenler sayısı ve / veya aralığı) kanserler arasında farklılık gösterir [15,16]. Bu nedenle, bağışıklık direnci, iyi bilinen tümörlerin doğasında bulunur.



Şekil 1.1. İmmün takip ve kanser immüno-düzenlemesi.

- i. Sürekli vücutta üretilen mutant hücreler.
- ii. İmmün takip.
- iii. Bağışıklık dirençli hücre (kanser immüno-düzenlenmesi).
- iv. Tümör gelişimi için bağışıklık sistemine dirençli hücrelerin genişlemesi.

1.1.2. Tümör Mikro Çevresindeki İmmünsüpresif Mekanizmalar

Kanserli hücrelerin tümör spesifik ve / veya tümör ile ilişkili antijenleri ifade ettiği ve T lenfositleri tarafından immünojenik hedefler olarak görülebileceği iyi bilinmektedir [17, 18]. Bu nedenle, bu tümör antijenlerine karşı bağışıklık kazandırma ve / veya bağışıklık uyarıcı mekanizmaların teşviki yoluyla T lenfosit yanıtlarını indüklemek veya güçlendirmek inandırıcı bir yaklaşım olarak gözükmemektedir. Ancak, tümör antijenine spesifik T hücre tepkileri periferik kandaki bu tür yaklaşımlarla uyarıldığı ve fark edildiği halde, esasen tümör kütesinin azaltılması ya da hayatta kalmanın sürdürülmesi gibi klinik olarak takdir edilen terapötik yararlar yol açmazlar. Bu konuya açıklık getirilmesinin ana nedenlerinden

biri, kanser immüno-düzenlenmesi sonucunda gelişen immünsüpresif tümör mikrobiyolojisidir.

Tümör mikro ortamında kansere özgü ortamlar, tümör hücreleri, stromal hücreler ve infiltrasyon yapan bağışıklık hücreleri gibi birçok hücre popülasyonu tarafından yaratılır. Bu ortamlar, tümör spesifik T hücrelerinin antitümör işlevlerinin büyük çapta yasaklanmasıyla güçlü bağışıklık baskılayıcı potensiyel gösterirler. Tümör mikro ortamında bağışıklık baskılayıcı fonksiyonların altında yatan önemli mekanizmalar, aşağıda yazılı üç kategoride özetlenebilir. Bu mekanizmaların birbirini etkilediği ve birbirlerini senkronize ettiği ve sinerjistik olarak güçlerini sergilediği dikkati çekmektedir.

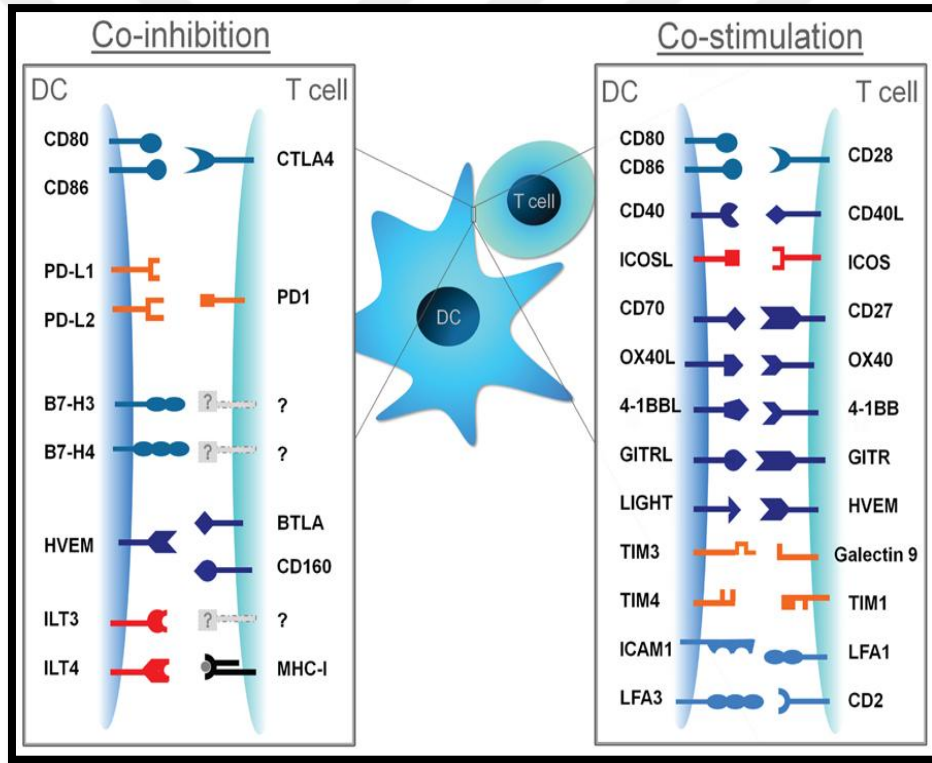
1. Bağışıklık baskılayıcı hücre popülasyonlarının sağkalımı: Bazı kanserlerde düzenleyici T hücrelerinin ve miyeloid türevli baskılayıcı hücrelerin kitlesel infiltrasyonu gözlenir [19, 20].
2. Bağışıklık baskılayıcı humoral faktörlerin üretimi: kanserli hücreler ve komşu stromal hücreler transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) ve interleokin-10 (IL-10) gibi baskılayıcı sitokinlerin yanı sıra indolamin 2,3-dioksigenaz (IDO) üretirler [19, 21, 22].
3. Bağışıklık kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonu: PD-L1 ve CTLA-4 sırasıyla regülatör T hücreleri ve tümör hücreleri üzerinde aşırı derecede ifade edilir. Dahası, PD-L1 ifadesi aynı zamanda tümör stromal hücrelerinde ve infiltre eden bağışıklık hücrelerinde saptanabilir [23].

Adoptif transferinin melanom ve hematolojik maligniteler de dahil olmak üzere bazı kanserlerde klinik etkinliğini ortaya koymuştur. Etkinliğin kesin sebepleri kesin olarak bilinmemekle birlikte, bu, adoptif T hücre tedavisinin, bağışıklık baskılayıcı mekanizmaların ağırlıklı olarak çalıştığı *in vivo* indüksiyon evresini gerektirmediği bir teori ile veya *in vitro* aktive edilmiş T hücrelerinin, tümör mikro ortamında efektör fazda immünsüpresyona dirençli olabileceği teorisi ile bağlantılı olabilir. Bu noktalar, başarılı kanser immünoterapilerinin geliştirilmesi için araştırmada önemlidir.

Bağışıklık kontrol noktası molekülleri: Tümör mikro ortamında T hücre yanıtlarını kontrol eden bir mekanizma. Her ne kadar çeşitli doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık

hücreleri anti-tümör bağışıklığına katkıda bulunsa da yaygın olarak, tümör antijenlerine özgü T hücrelerinin, tümör çıkarılmasında hayati bir rol oynadığı düşünülmektedir. T hücresi aktivasyonunu başlatmak için iki sinyal vazgeçilmezdir (Şekil 1. 2) [24].

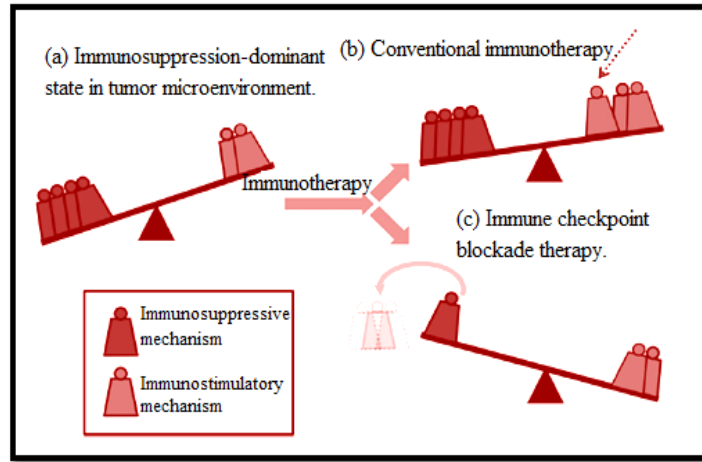
Birincisi antijenik peptid kompleksi ve büyük histokompatibilite kompleksi (MHC) tarafından tetiklenen T hücre reseptörü (TCR) vasıtasıyla gelen sinyaldir ve diğeri farklılaşma yığılım molekülü 28 (CD28), 4-1BB ve OX-40 gibi uyarıcı ko-reseptörler olarak adlandırılan yüzey molekülleri aracılığıyla sinyallerdir. CD28, profesyonel antijen sunan hücrelerde (APC'ler) ifade edilen CD80 (B7-1) ve CD86'yı (B7-2) harekete geçirir ve uyarıcı ortak sinyali T hücrelerine iletir.



Şekil 1.2. Uyarıcı ve önleyici eş sinyallerle T hücre yanıtının düzenlenmesi.

Bu arada, daha önce de belirtildiği gibi, inhibe edici ortak sinyalleri dönüştüren bağışıklık kontrol noktası molekülleri, uyarıcı ortak işaretlere karşı koymak ve bağışıklık sistemlerinin aktivasyonunu durdurmak için de mevcuttur. CTLA-4 ve PD-1, en temsili bağışıklık kontrol noktası molekülleridir. T hücrelerinin TCR bağlanması üzerine aktive edilip edilmediği veya inaktive edilip edilmediği uyarıcı ve inhibe edici ortak sinyaller arasındaki denge üzerine kuruludur. Bu nedenle,

bağışıklık kontrol noktası moleküllerinin yüksek oranda ifade edildiği tümör mikrobölgesel ortamında, eş-sinyaller dengesinin inhibisyon baskın tarafına doğru büyük ölçüde eğilimlidir, böylece anti-tümör tepkileri belirgin olarak engellenmiş olur (Şekil 1. 3a). Kanser immünoterapilerinin amacı denge sağlamak, özellikle kanserli dokulardaki uyarılma baskın tarafa doğru yöneltme eğiliminde olmaktır. Konvansiyonel immünoterapide amaç, "ağırlıkları uyarıcı tarafa koymak"tır (Şekil 1. 3b). Buna ek olarak, uyarı hakim tarafa doğru yeniden dengelemek için aşırı derecede güçlü uyarılar verilse bile, bu tür yöntemler, tümör olmayan organlarda bağışıklık hücrelerinin aşırı aktivasyonu ile bağlantılı olumsuz olaylar nedeniyle hastalarda uygulanması karmaşıktır. Aksine, bağışıklık kontrol noktası blokaj tedavisinin amacı, "ağırlıkları inhibe edici taraftan azaltmak veya kaldırmak" ve böylece tümör mikro ortamında uyarı dominant yüzüne karşı anti-tümör bağışıklık tepkisinin yeniden dengelemektir (Şekil 1. 3c) Bağışıklık kontrol noktası bloke edici tedavilerin amaç yanıt oranlarının melanomda %30 civarında [25] ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri %20 olduğu bildirilmiştir [26]. Ayrıca, bazı kanser tiplerinde bağışıklık kontrol noktası blokaj tedavisi daha az etkilidir. Bazı hastalar ve belli kanser türleri, ne yazık ki, yetersiz sayıların ve / veya konak immünesini uyandırmak için neoantijenler repertuarlarının bir sonucu olarak bu terapilere cevap vermemektedir. Bir terapi olarak henüz geliştirilmesine rağmen, immün kontrol noktası blokaj tedavisi, konvansiyonel tedavilerle iyileştirilmeyen kanser hastalarını kurtarabileceği için onkolojide önemli bir gelişme sağlıyor.

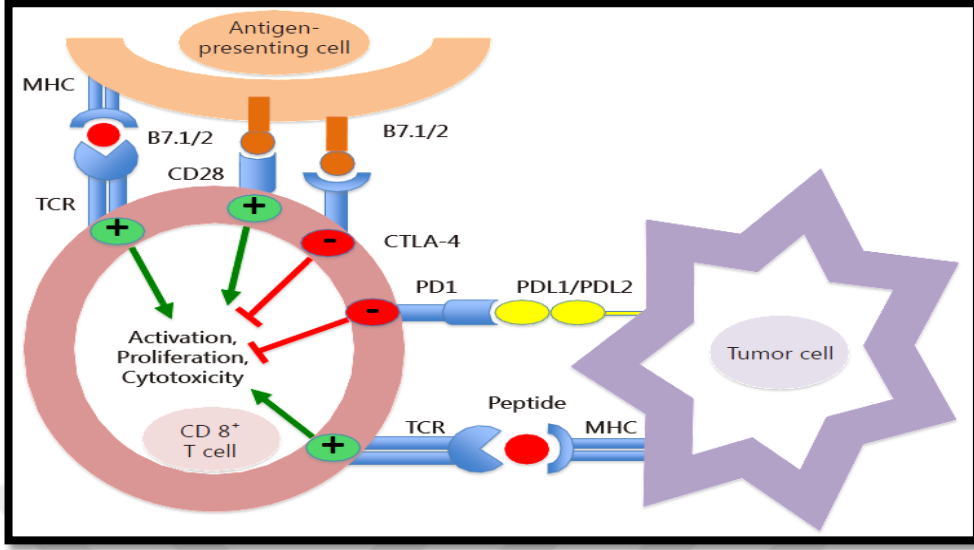


Şekil 1.3. Bağışıklık kontrol noktası blokajı ile kanser immünoterapisinin kavramsal diyagramı.

1.1.3. Bağışıklık Kontrol Noktası Blokaj Terapisi

Anti-PD-L1 Ab ile Bağışıklık Kontrol Noktası Blokaj Terapisi PD-1 / PD-L1 inhibitör eş sinyal yolağının iőlevleri. Aktif T hücrelerinin, B hücrelerinin ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin hücre yüzeyi üzerinde PD-1 ifade edilir ve PD-L1 / PD-L2 ile etkileşim üzerine bir inhibitör sinyali iletir [27- 29], çünkü PD-1-eksik fareler spontan otoimmün hastalıklardan muzdariptir, PD-1'in immünolojik homeostaz için gerekli immün kontrol noktası molekülü olarak görev yaptığı düşünölmektedir [28, 29]. CTLA-4 aynı zamanda hayati bir bağışıklık kontrol noktası molekülü olsa da, gen nakavt farelerinin fenotipleri tamamen farklıdır. CTLA-4 eksikliği farelerde öldürücü otoimmün hastalıklara neden olur ve PD-1eksik farelerde görölen belirtiler CTLA-4 eksik farelerde olduğundan daha hafiftir [30- 32]. CTLA-4 ve PD-1 moleküllerinin bağışıklık kontrol noktaları işlevlerini gösterdikleri yolaklar, bu moleküllerden yoksun fareler arasındaki fenotipik farklılıkları açıklığa kavuőturacaktır. CTLA-4 ekspresyonu, T hücresi aktivasyonunun erken aşamasında indöklenirken, PD-1 daha sonra ağırlıklı olarak efektör hücelere farklılaőtıktan sonraki aşamada ifade edilir. Bu nedenle, anti-tümör immünitede, CTLA-4, tümörlerin lenf düğümlerinin drenajında T hücrelerinin baőlatılması yoluyla bağışıklık düzenleyicisi olarak önemli bir rol oynarken, PD-1, tümör spesifik T hücreleri antitümör fonksiyonlar uyguladığı tümör mikro çevresindeki önemli bağışıklık kontrol noktası molekülüdür (Şekil 1. 4). PD-1'in bir ligandı olan PD-L1, makrofajlar ve aktive edilmiş T hücreleri de dahil olmak üzere bazı bağışıklık hücre tiplerinde ifade edilirler [33, 34].

PD-1 eksik farelerden farklı olarak, PD-L1 eksik fareler spontan otoimmün hastalıkları göstermemektedir [35]. Bununla birlikte, PD-L1 eksik CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin yeniden aktiviteleri, in vitro ve in vivo olarak, doğal hücrelerin aktivitelerine kıyasla PDL1'in hayati bir rol oynadığını teyit ederek çarpıcı bir Şekilde güçlendirilmiőtir [36]. Önemli olarak, PD-L1'in yüksek ekspresyonu çeőtli tümör örneklerinde ortaya çıkmıştır [37, 38]. PD-L1'in ekspresyon düzeylerinin ilerlemiş kanser evresi ile ve hastaların kötü prognozuyla ilişkili olduğu bildirilmiştir [39].



Şekil 1.4. CTLA-4 ve PD-1'in bağışıklık kontrol noktası işlevlerini ifade ettiği farklı evreler.

Tümör mikro ortamında, PD-L1 ifadesi, T hücrelerinin tümör dokusuna nüfuz ederek üretilen interferon- γ (IFN- γ) gibi enflamasyonlu sitokinlere yanıt olarak tümör hücreleri ve stromal hücreleri üzerinde indüklenir. Böylece, tümör lezyonlarında PD-L1'in ekspresyonu, kanser immün düzenlenmesinin yaşamsal bir mekanizmasıdır. Yukarıda belirtildiği gibi, kanser için bir terapötik madde olarak PD-L1'e karşı antikor (Ab), PD-1/ PDL-1 yolu, immün yanıtların fazla aktivasyonunu sınırlamak için hayati bir bağışıklık kontrol noktası mekanizmasıdır. PD-1 / PD-L1 ve CTLA-4 arasındaki gen nakavt farelerinin fenotipleri ve ifade şekilleri arasındaki farklara dayanarak, anti-PD-L1 Ab, kanser için muhtemelen anti-CTLA-4 Ab'den daha az yan etki ile tümör mikrobiyolojisinde immünosüpresif etkileri engelleme potansiyeline sahip terapötik bir madde olarak kabul edilir. Anti-PD-L1 Ab'nin kanser için terapötik değeri başlangıçta fare modelleri kullanılarak deneylerle oluşturulmuştur [37, 40, 41].

Daha sonra, Bristol-Myers Squibb, tamamen insan anti-PD-L1 monoklonal İmmüoglobulin G4 (IgG4) Ab olan BMS-936559'u geliştirmiş ve melanom, NSCLC ve renal hücreli karsinom (RCC) dahil olmak üzere zor kanserli hastalar için klinik deneyler başlatmıştır [42]. Sonuç olarak, melanomlu hastaların %17'sinde, RCC'li hastaların %12'sinde ve NSCLC'li hastaların %10'unda amaç yanıt oranları

gözlemlenmiştir. 24 haftadan daha uzun süren sabit hastalık oranları melanoma hastalarında %27, RCC'de %41 ve NSCLC'de %12 olmuştur. Deneklerin %9'unda derece 3 veya 4'ün ilaca bağlı olumsuz gelişmelerini tespit edilmiş, bunlar hiperglisemi, gastrointestinal semptomlar ve genel yorgunluk göstermişlerdir.

Bu arada Genentech tamamen insan Fc ile tasarlanmış anti-PD-L1 monoklonal IgG1 Ab olan MPDL3280A'yi geliştirmiş ve metastatik ürotelyal mesane kanseri (UBC) dahil olmak üzere çeşitli katı tümörlerde klinik denemelere başlamıştır [43]. UBC hastalarında MPDL3280A uygulanan son çalışmalarda rezeke edilen tümör dokuları PD L1 için immünohistokimyaya maruz bırakılmış ve hastalar tümör lezyonlarında PD-L1 ekspresyon seviyeleri ile teyit edilmiştir. Amaç yanıtları, PD-L1'in yüksek ifadesi olan hastaların %43'ünde (%7 tam yanıt dahil) gözlemlenirken, düşük veya hiç ifade görmeyen PD-L1 hastalarının sadece %11'i objektif yanıtlar göstermiştir. Tuhaf bir şekilde, MPDL3280A'nın terapötik etkileri, tümöre nüfuz eden bağışıklık hücreleri üzerindeki PD-L1 ifadesi ile ilişkili olmuştur, ancak tümör hücrelerinde PD-L1 düzeyleri ile ilişkili değildir [43]. İlk tedaviden sonra klinik yanıtların hızlı bir şekilde indüklenmesi önemlidir (medyan 42 gün) ve hastaların %55'inde tümör yükünde azalma gözlenmiştir. Diğer kanser türlerinde, MPDL3280A, NSCLC'de %23, melanomda %30 ve RCC'de %14 oranında amaç cevap oranları elde etmiştir [44]. MPDL3280A alan hastaların %12,6'sında, solunum sistemi semptomları, gastrointestinal semptomlar ve karaciğer fonksiyon bozukluğu dahil olmak üzere 3.

veya 4. derece tedaviyle ilişkili olumsuz gelişmeler görülmüştür. Bu son klinik araştırmaların sonuçlarına dayanarak, MPDL3280A, ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından UBC ve KHDAK tedavisinde devrim niteliğindeki bir tedavi olarak seçilmiştir. Kanserli hastalarda anti-PD-L1 Ab'in terapötik değeri ile ilişkili biyolojik belirteçler. İlacın güvenliği, değeri veya eksikliği için prognostik biyolojik belirteçlerin belirlenmesi, kişiselleştirilmiş tıbbın elde edilmesi için klinik kanser araştırması alanında en önemli ve acil konulardan biridir. 2014'te Genentech, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, melanom, böbrek hücreli karsinom ve baş-boyun skuamöz hücreli karsinom dahil olmak üzere bazı kanserli hastalardaki MPDL3280A yanıtlarıyla ilişkili biyolojik belirteçleri göstermiştir [43, 44]. Yukarıda belirtilen UBC vakasına benzer şekilde, MPDL3280A tedavisine klinik olarak değerli yanıtlar, tümör dokularına sızan bağışıklık hücreleri üzerindeki PD-L1'in ekspresyon

seviyeleri ile anlamlı şekilde ilişkili olmuştur. Aksine, tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyon seviyeleri, MPDL3280A'ya klinik yanıtlarla hafif bir ilişki göstermiştir. Bu gözlem, tümör hücrelerinde PD-L1 ifadesi ile klinik yanıt arasında anlamlı korelasyona uyan anti-PD-1 Ab kullanan çalışmalarda gösterilenlerle çelişkilidir [45, 46]. AntiPD-1 ve anti-PD-L1 Ab terapileri arasında böyle bir çelişkinin gözlemlenmesine neden olan sebep açıkça görülmemiştir. MPDL3280A tedavisinden önce tümör dokularındaki gen ekspresyon işaretinin analizi, CTLA-4 geni ifadesi ile klinik yanıtlar arasında büyük bir korelasyon olduğunu göstermiştir [44].

Ayrıca, melanom hastalarında IFN- γ ve IFN- γ ile indüklenebilir genlerin (örneğin ön muamele edilmiş tümör dokularında indolamin 2,3-dioksigenaz 1 {IDO1} ve gamma interferon tarafından indüklenen monokin {MIG ve ya CXCL9}) gen ifadeleri MPDL3280A tedavisinde tümör regresyonu ile kuvvetli bir ilişki kurmuştur [44]. Bu tür bağlantılar melanomda özel olduğu bulunmuştur ancak NSCLC veya RCC'si olan hastalarda çok daha zayıf bağlantı görülür veya hiç görülmez [44]. Bu bulgular anti-PD-L1 Ab tedavisinde klinik değeri öngören önemli biyolojik belirteçler önermektedir ve aynı zamanda anti-PD-L1 Ab'in en iyi klinik faydası için konsepti belirtmektedir, anti-tümör immünitesi üretilir ancak eş zamanlı olarak PD-L1 / PD-1 bağışıklık kontrol noktası mekanizması tarafından bastırılır. Bu hastalarda MPDL3280A uygulaması, bastırmayı ortadan kaldırır ve antitümör bağışıklığın "gitmeye hazır" pozisyonunu serbest bırakır.

1.1.4. Kansere karşı Bağışıklık Kontrol Noktası Blokaj Terapisinin Gelecek Bakış Açısı

Bağışıklık kontrol noktası blokaj tedavisinin klinik uygulamalarının iyileştirilmesi için gelecekteki çalışmalarda sonraki noktaların araştırılması gerekir:

1. Yaygın bağışıklık baskılayıcı etkileri uygulayan immün kontrol noktası molekülleri, farklı kanserler ve bireysel vakalar arasında değişebilir. Bu nedenle, tedavi için yönlendirilen en uygun hedefi tanıyan tanı araçları oluşturulmalıdır.
2. En ufak yan etkilere sahip terapötik ilaçlar, her bir bağışıklık kontrol noktası molekülünün bağışıklık önleme işlevinin temelini oluşturan moleküler ve hücresel mekanizmaları aydınlatarak planlanmalıdır.

3. Farklı bağışıklık kontrol noktası moleküllerine karşı Abs'lerin birleştirildiği veya bağışıklık kontrol noktası blokajının, radyoterapi terapisi, kemoterapiler ve tirozin kinaz inhibitörleri de dahil olmak üzere immünoterapilerle kombine edildiği kombine immünoterapiler, ilave tamamlayıcı terapötik etkinlikleri için araştırılmalıdır.
4. Bağışıklık kontrol noktası terapilerinde klinik yanıtlarla veya olumsuz olaylarla tam olarak ilişkili olan prognostik biyolojik belirteçler iyi bilinmelidir.

1.2. Kolorektal kanser (CRC)

Kolon kanseri veya bağırsak kanseri olarak da adlandırılan kolorektal kanser (CRC), kolondaki, rektumdaki ve apandikte anormal büyümeleri içerir; erkeklerde %10, kadınlarda %9,2 görülme sıklığı ile akciğer ve meme kanserlerinden sonra 2012'de yaklaşık 1.4 milyon yeni vaka ile dünya çapında erkek ve kadınlarda en yaygın olarak teşhis edilen üçüncü kanser olarak kabul edilir [47]. Hastanın sağkalımı, teşhis anındaki tümör evresine oldukça bağlıdır. CRC vakalarının sadece %40'ı erken bir aşamada teşhis edilir ve yakın zamanda teşhis edilen hastaların yaklaşık %50'si metastatik kansere dönüşebilir [48]. Metastatik CRC halen kanser nedeniyle ölüm nedeni olarak dördüncü sırada yer almaktadır [49].

CRC hastalarının toplam 5 yıllık sağkalım oranı, %65'e yakın olarak sınırlı hastalığı olan hastaların %90'ından lokalize lenf nodu metastazı veya organ metastazı olan hastalar için %70 ve %13'e uzanmaktadır [48]. Cerrahi işlem CRC'nin tedavisinde ana fikir olmaya devam etmesine rağmen, hastaların %30-40'ında tek başına operasyonla tedavi edilemeyen lokal olarak ilerlemiş veya metastatik hastalık vardır [50]. Bu nedenle, hastalık tekrar ortaya çıkma riski yüksek hastalar ve metastatik hastalığı olan hastalar adjuvan kemoterapi almaktadır. Hedeflenen tedavilerin uygulanması da dahil olmak üzere tanı ve tedavideki son gelişmelere rağmen, bu ileri CRC'nin prognozu kötü kalmaktadır [51].

Moleküler biyolojideki ilerlemeler, kolorektal kanserojeneze yol açan bazı genetik mekanizmaların aydınlatılmasına yardımcı olmuştur. CRC vakalarının çoğu sporadik

genetik ve / veya epigenetik değişikliklerden kaynaklanır, fakat tüm CRC vakalarının %10-20'sine kadarının atalarına ait komponentleri vardır [48]. CRC'de anormal gen ekspresyonuna neden olan üç temel moleküler mekanizma vardır: mikrosatellit instabilite (MSI), CpG adası metilator fenotipi (CIMP) ve kromozomal instabilite (CIN) [48, 52]. Biriken ispatlar, tümör ilerlemesinin sadece kanser hücrelerine özgü genetik değişikliklerle değil, aynı zamanda çevresel faktörler tarafından da yönetildiğini gösterir. Bu nedenle, genetik değişiklikler ve Tümör Lenf Düğüm Metastazı (TNM) evrelemesine ek olarak, tümör dokusuna ve peritümöral bölgelere sızan immün hücrelerin kantitatif bir değerlendirmesi, bağımsız bir sonuç belirleyicisi olarak önerilmiştir [51].

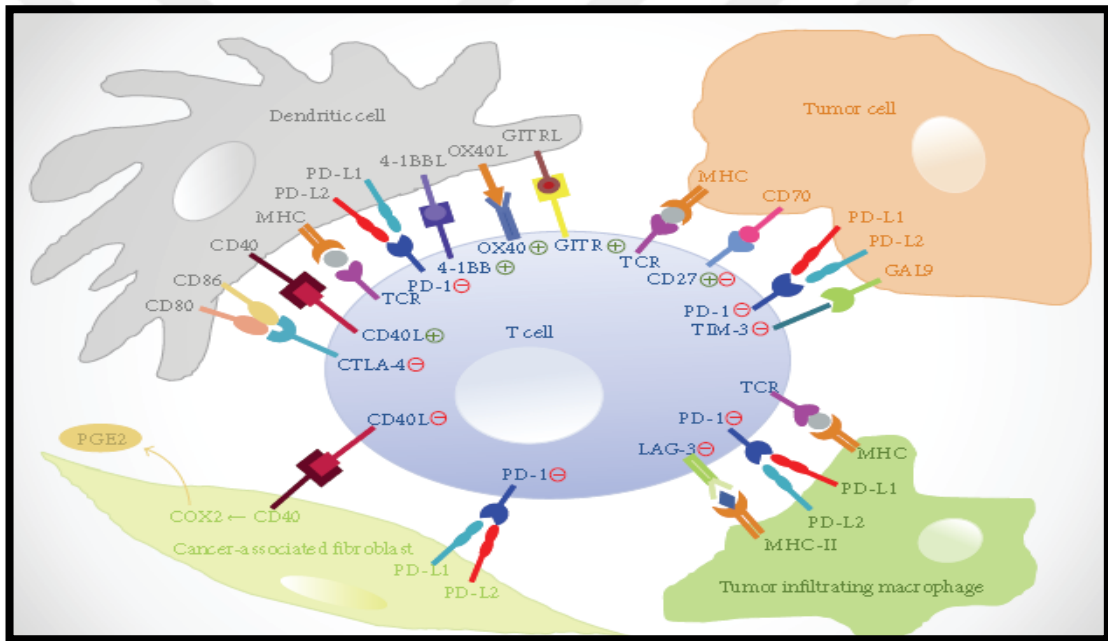
Bağışıklık tümörünün mikro ortamının artarak düşünülmesi, yeni bağışıklık temelli biyolojik belirteçlerin incelenmesine ve tedavi için bağışıklık yollarını hedefleyen yeni ajanlar geliştirilmesine izin vermiştir [53].

CRC biyolojisinde bağışıklık sisteminin önemi, rezeke edilen CRC karsinogenezinde bağışık infiltratların retrospektif tahminleriyle saptanmıştır. Tümör mikroçevresindeki tümör sızıntılı Lenfositlerin, özellikle CD8 + lenfositlerin ve lokal lenf düğümlerinin varlığı iyileşmiş prognoz ile bağlantılı olmuştur [54].

Dahası, sitotoksik bellek T lenfositleri (CD8⁺CD45RO⁺ T hücreleri) ile CRC tümörlerinin spesifik bölgelerinin artmış infiltrasyonu, CRC'nin nüksetme riskinin azalması ve sağ kalımı iyileştirme ile ciddi şekilde ilişkilidir [55, 56]. Ayrıca, bu efektör bellek T-hücrelerinin varlığının, naif T-hücrelerinden daha önemli olduğu ve nüks ve daha iyi hayatta kalma riskini azalttığı bilinmektedir. Diğer inflamatuvar hücrelerden farklı olarak T hücrelerinin prognostik etkisi, T hücre yanıtlarını modüle eden kanser immünoterapilerinin artmış sağkalıma yol açabileceğini savunmaktadır. En umut verici yaklaşımların ortasında, bağışıklık kontrol noktası moleküllerinin antitümör bağışıklığı uyarması için blokajı vardır [57].

1.2.1. CRC'de bağışıklık kontrol noktaları

Kanser immünoterapisinde önemli bir dönüm noktası, immün kontrol noktaları etkileşimini önleyen antikörlerin klinik uygulaması ile ortaya çıkmıştır [58]. Normal fizyolojik koşullarda T hücre fonksiyonlarını kontrol eden ve tümörler tarafından kırılan bu inhibitör ortak reseptörlerin ve yolakların bloke edilmesi, tümörün yok edilmesine yol açan bağışıklık duyarlılığı üzerine "frenleri bırakabilir" [59]. Öte yandan, bağışık duyarlılığının "gaza basmayı" sağlayan çeşitli bağışıklık kontrol noktaları belirlenmiştir. Bu bölümde, CRC patogeneğinde ortaya çıkan bağışıklık kontrol noktalarını tartışacağız (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. CRC patogeneğinde yer alan bağışıklık kontrol noktası moleküllerine genel bakış.

1.2.1.1. PD-1/PD-L1

Programlanmış ölüm-1 (PD-1, aynı zamanda CD279 olarak tanımlanır), CD28/ B7 ailesine ait bir immüno-engelleyici reseptördür. PD-1, CD4⁺ T hücreleri, CD8⁺T hücreleri, NKT hücreleri, B hücreleri ve monositler/ makrofajlar üzerinde ifade edilir [60]. PD-1'in iyi bilinen ligandları arasında PD-L1 (B7-H1) ve PD-L2 (B7-DC) bulunur. PD-L1 çok çeşitli bağışıklık hücreleri ve bağışık hücresi olmayan hücreler

üzerinde temel olarak ifade edilirken, PD-L2 için bu ifade mikro çevre uyarını temelinde indüklenebilir [61].

Bu yolak, PD-1'in tümör infiltre edici lenfositlerde (TIL'ler) yukarı doğru düzenlenmesinden ve tümör hücrelerindeki ligantlarının artmış ekspresyonundan ötürü tümör bağışıklık kaçınması ile ilgilidir ve bu da tümöre özgü CD8⁺ T hücrelerinin baskılanmasına yol açmaktadır. Dahası, bu yol, proliferasyon, sitokin üretimi ve sitotoksinite bozukluğunun tanımladığı kanserde T hücre tükenmesi ile ilişkilendirilmiştir [62].

Bu bağışıklık inhibisyonunun üstesinden gelmek için, PD-1'e ve PD-L1'e karşı monoklonal antikorların (mAb) bloke edilmesi ortaya çıkmış ve metastatik katı tümörlerde dayanıklı tepkiler göstermiştir. CRC patogenezindeki bu yolağın rolü ilk olarak İran nüfusundaki kolon kanserine ek olarak [64] Çinli bir popülasyonda PD-1 genindeki tek nükleotid polimorfizmlerin CRC ile ilişkilendirilmesi ile gösterilmiştir [63]. Bundan sonra, PD-1'in CD8⁺ tümörsüz lenf düğümlerinin aksine, CRC numunelerinin tümör mikro ortamında CD8⁺ T hücreleri üzerinde belirgin bir şekilde up-regüle olduğu gösterilmiştir. Dahası, tümör mikro ortamındaki bu PD-1⁺ CD8⁺ T hücreleri, sitokin ve perforin üretimindeki bozulmayla bağlantı olmuştur [62].

İlginç olarak, PD-L1'in CRC üzerindeki ekspresyon seviyesi, sitokin üretimindeki bu bozulmada hayati bir aktör olarak görünmüştür [62]. Buna ek olarak, immünohistokimya (IHC) kullanılarak, PD-L1'in CRC hücrelerinde ekspresyonu ile tümör mikro ortamında T hücre yoğunluğu arasında ters bir ilişki olduğu ortaya çıkmıştır [65]. T hücrelerinin azaltılmasının yanında, Foxp3⁺ (Forkhead kutusu P3⁺) hücrelerinin yüksek sayısı ve PDL-1⁺ tümör hücreleri ile kötü prognoz arasında güçlü bir ilişki bulunan Treg'lerin (Düzenleyici T Cells) genişlemesi bulunabilir [65]. Ayrıca, cerrahi sonrası CRC hastalarındaki periferik kanda PD-1 ifadesi hem CD4⁺ hem de CD8⁺ T hücrelerinde ve yine gözle görülür şekilde bozulmuş T hücre fonksiyonunda saptanabilir [66]. Bu bilgilere dayanarak, CR-1'de PD-1/ PD-L1 etkileşiminin bloke edilmesi terapötik bir strateji olarak önerilmiştir. Ne yazık ki, klinik bir ortamda, 19 CRC hastasında anti PD-1 tedavisinin (BMS936558/ Nivolumab / MDX-1106) hiçbir amaç klinik yanıtı görülmemiştir [45]. Ayrıca, 2012

yılında, antagonistik bir PD-L1 antikoru (BMS936559 / MDX-1105) kullanılarak 18 CRC hastasında hiçbir tedaviye yanıt alınmamıştır [42].

Dahası, Droeser ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma CRC örneklerinde PD-L1 ekspresyonunun iyileşmiş sağkalım ile ilişkili olduğunu doğrulamıştır [67]. Dahası, PD-L1 aşırı ekspresyonu, PD-1-CD8⁺ lenfositlerin infiltrasyonu ve IFN- γ geni ifadesi arasında büyük bir korelasyon görülmüştür.

Dikkat çekici olarak, bu ilişki yalnızca uyuşmazlık onarımı (MMR) özellikli tümörlerle işaretlenmiş CRC hastalarının bir alt kümesinde kurulabilirken, MSI olarak da bilinen MMR eksik CRC'de hiçbir ilişki bulunamamıştır [68]. Bağışıklık kontrol noktası blokajının MSI CRC'de daha etkili olabileceği fikri, tamamen PD-1'i hedefleyen insan mAb'si olan Pembrolizumab'ın küçük bir faz 2 çalışması ile daha da araştırılmıştır. Gerçekten de bu çalışma, MSI durumunun Pembrolizumab ile bağışıklık kontrol noktası blokajının klinik avantajını öngördüğünü ve MSI CRC'de daha iyi yanıt verildiğini göstermiştir [69].

Buna ek olarak, Nivolumab (MDX-1106), bir hastanın üç yıldan sonra hastalığın tekrar ortaya çıkışının hiçbir kanıtı olmaksızın tam bir yanıt alan (CR) hastanın olduğu 14 CRC hastasını içeren ileri tedavi refrakter solid tümörlü hastalarda tecrübe edilmiştir [59]. Benzer şekilde, bu hastanın tümörü üzerine yapılan daha fazla çalışma, mikrosatellit instabilitesi oluşturmuştur [70].

1.2.1.2. CTLA-4/B7

T lenfosit supresyonunda yer alan bir başka molekül, T lenfositlerinin yüzeyinde ifade edilen sitotoksik T lenfosit antijen -4 (CTLA-4) 'tür. CTLA-4, Antijen Sunan Hücrelerde (APC'ler) B7-1 (CD80) ve B7-2 (CD86) eş-uyarıcı reseptörler için karşılaştırılabilir bağlanma afinitelerine sahiptir ve bu etkileşim, B7 ligandları için homologu CD28 ile rekabet ederek T hücresi aktivasyonunu karşılamak için engelleyici sinyal gönderir [60]. Bu nedenle, CTLA-4, monoklonal antikolarla bloke etmek için ilginç bir hedeftir. Böyle bir örnek olarak Ipilimumab şu anda Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) metastatik malign melanomun birinci ve ikinci basamak tedavisi için onaylanmıştır. Burada, Ipilimumab'ın CTLA-4'ü bağlayarak anti-tümör

bağışıklık tepkisini aktive ettiği ve böylece ligandlarına bağlanmasını ve CD28 / B7 T hücresi aktivasyonunun inhibisyonunu düşürdüğü gösterilmiştir. T hücresi aktivasyonunun inhibisyonunun yanında, bu da düzenleyici T hücrelerinin (Treg'lerin) azaltılmasına neden olmuştur. Treg birikiminin CRC'de zayıf sonuç ile ilişkili olduğu gerçeği göz önüne alındığında, bu CRC için ilginç bir terapötik strateji olabilir [71].

PD-1'e kıyasla, CRTL'nin genişlemesinde CTLA-4'ün rolü, birkaç grup tarafından önerilmiştir; bu da CTLA-4 tek nükleotid polimorfizmlerinin ilişkisini ve CRC'yi geliştirme riski olduğunu göstermiştir [63, 72- 74]. CRA büyümesinde CTLA-4 49A / G polimorfizmi önemli bir aktör olarak ortaya çıkmıştır. Ayrıca CTLA-4'ün MSS tümörlerinde MSS ile karşılaştırıldığında anlamlı ölçüde daha yüksek seviyelerde ifade edildiği de doğrulanmıştır [75].

Burada, CTLA-4 ifadesi, sadece tümörün epitelyal bileşeninde interkalasyon yapılan TIL'lerde değil komşu tümör stromasında ve tümörün invaziv cephesinde de kurulmuştur. Ayrıca, CTLA-4'ün Treg'lerin çoklu alt grupları üzerindeki ekspresyonu özellikle ilgi çekicidir. İlk olarak, kolon kanserli hastaların periferik kanındaki ve kanser dokusundaki aktive Treg'lerin (CD45RA-Foxp3⁺ T hücreleri) belirgin şekilde yüksek artışı pldukça yüksek seviyelerde CTLA-4 ile saptanmıştır [76]. İkincisi, kolon adenokarsinomalarında CCR4⁺ CTLA-4⁺ düzenleyici T hücrelerinin birikiminin bulunmasının yanı sıra, tümör ile ilişkili mukozada bağışıklık regülasyonuna duyarlı CTLA-4⁺ konvansiyonel T hücrelerinde bir artış bulunmuştur [77]. Son olarak, güçlü bir baskılayıcı CD4⁺ Foxp3-T hücre popülasyonu varlığı, kolorektal tümör düzenleyici manzara içinde sağlıklı kolon, kolorektal tümör numuneleri ve CRC hastalarından eşleştirilmiş kan ile karşılaştırıldığında keşfedilmiştir [78].

Bu CD4 + Foxp3-T hücreleri, LAG-3, PD-1 ve CTLA-4 gibi bağışıklık kontrol noktalarını birlikte ifade eder gibi görünmüştür ve IL-10 ve TGF-β gibi immünoşüpressif sitokinler üretebilmişlerdir. Daha da önemlisi, bu eşsiz popülasyon Foxp3⁺ Treg'lere göre 50 kat daha fazla baskılayıcı olmuştur. Düzenleyici T hücrelerinin farklı alt gruplarında CTLA-4 ifadesi, bu bağışıklık kontrol noktasını,

CRC'de antitümör bağışıklık tepkisinin artmasına yol açabilecek ilginç bir terapötik yaklaşım haline getirmiştir [78]. Bu bağlamda, Ipilimumab'a benzer bir antikor olan Tremelimumab, standart kemoterapi uygulanmayan, kolon ya da rektum refrakter metastatik adenokarsinomu olan hastalar için bir faz II çalışmasında araştırılmıştır. Şaşırtıcı bir şekilde, yalnızca bir hasta ikinci dozu almıştır, geri kalan 46 hastada ise 3 ayda planlanan ikinci doza ulaşmadan önce hastalık ilerlemesi veya hastalığa bağlı ölüm görülmüştür [79]. Bu veriler, tedavide dirençli gelişmiş kolorektal kanser tedavisinde tek bir ajan olarak Tremelimumab'ın daha fazla araştırılmasını desteklemediğinden solid tümörlerdeki hastalarda bir PD-L1 antagonistik mAb olan MEDI4736 ile kombine halde faz I çalışmaları devam etmektedir. Ayrıca, Ipilimumab'ın I ve I / II evreleri, stereotaktik vücut radyasyonu veya Lenalidomid ile kombine olarak metastatik katı tümörlü hastaları aktif olarak iyileştirmiştir.

1.2.1.3. TIM-3

T hücre immünoglobülini ve müsin içeren protein-3 (TIM-3), CD4⁺ Th1 ve CD8⁺ sitotoksik T hücreleri üreten IFN- γ 'da ifade edilen bir molekül olarak ortaya çıkmıştır. Ligandı olan Galectin-9 ile, TIM-3'ün, Th1 yanıtlarını inhibe etme ve hücre ölümünü indüklemeye konusunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [80]. Dahası, PD-1 ile birlikte TIM-3 ekspresyonundan ötürü katı malignitelere ek olarak hematolojik CD8⁺ T hücrelerinin hemen hemen tümü baskılanmış veya işlevsiz popülasyonları nedeniyle hayvan modelleri, T hücresi tükenmesindeki işlevini keşfetmiştir. Preklinik modellerde, TIM-3'ün engellenmesi, her ikisinin de gruplanması yoluyla daha büyük bir etkinlikle PD-1 blokajının etkisine benzer şekilde antitümör aktiviteyi yenileme kabiliyetine sahiptir.

CRC hastalarındaki periferik kan örneklerinde, Xu ve arkadaşları sağlıklı kan ile karşılaştırıldığında dolaşımdaki TIM-3⁺ PD-1⁺ CD8⁺ T hücrelerinin oldukça yüksek seviyelerini doğrulamıştır [81]. Ameliyattan sonra çekilen periferik kan, CD8⁺ T hücreleri ve CD4⁺ T hücreleri üzerinde TIM-3 ve PD-1 ekspresyonunu göstermiştir. Dahası, hem TIM-3 hem de PD-1'in ifadesinin bu T hücrelerinin bozulmuş görevi ile bağlantılı olduğu görülmüştür [82]. Benzer şekilde, Tim-3⁺ PD-1⁺ CD8⁺T hücrelerinin yükselmesi, bir kez tümörün yanındaki dokularla karşılaştırıldığında,

CRC dokusunda farkedilebilir olmuştur. Tuhaf bir şekilde, T hücrelerinin alt kümesini PD-1 ifadesi ile ayırt etmek, PD-1 alt kümesinde önemli ölçüde daha düşük bir IFN- γ üretimi seviyesi oluşturmuştur. CRC hastalarının büyük bir popülasyonunda (daha önce tartışıldığı gibi) PD-1 blokajının amaç yanıtlarının olmaması ile birlikte bu sonuçlar TIM-3'ü CRC'li hastalarda T hücre yanıtlarını kısıtlayan daha merkezi bir inhibitör reseptör olarak önermektedir. Aynı şekilde, bu yolun bloke edilmesi cerrahi rezeksiyon sonrası bozulmuş hücre aracılı bağışıklığı geri döndürebilir.

1.2.1.4. LAG-3

Bağışıklık kontrol noktası blokajı için bir diğer çekici işaret, lenfosit aktivasyon gen-3'tür (LAG-3, CD223 olarak da bilinir), bu immünooglobülin süper ailesine ait bir hücre yüzeyi molekülüdür. Aktif T hücreleri, NK hücreleri, B hücreleri ve plazmasitoid DC'ler (Dendritik Hücreler) üzerinde ifadesi ile mümkün olan, T hücresi çoğalmasının negatif regülasyonunda LAG-3'ün MHC sınıf II ile olan temasıyla iş birliği yaptığı doğrulanmıştır [83, 84]. Ayrıca, LAG-3, Tregs görevini rahatlatıcak gibi görünmektedir. Gerçekten de LAG-3'ün CD4⁺ CD25⁺ hücreleri üzerinde ifadesi güçlü baskılayıcı aktiviteye sahip olan bir hücre alt kümesini tanımlayabilmiştir [85]. CD49b ile birlikte, LAG-2'nin ekspresyonu, IL-10 üreten Treg'lerin bir alt grubu olan aşırı düzeyde baskılanan insan tip 1 düzenleyici T hücrelerini (Tr1) işaretler [86]. Bitkin CD8⁺ T hücrelerinin LAG-3'ü ifade edebileceği ve PD-1 ile kombinasyon gibi birçok inhibitör reseptör ekspresyonunun daha büyük T hücresi tükenmesi ile ilişkili olduğu çok yakın bir zamanda keşfedilmiştir. Üstelik, PD-1 ve LAG-3'ün eş zamanlı inhibisyonu, tek başına her molekül ile karşılaştırıldığında T efektör etkisini artırabilir [87].

Bundan sonra, LAG-3 inhibitörleri (LAG-525 ve BMS-986016) ile yapılan klinik çalışmalar, sofistike solid maligniteleri olan hastalarda PD-1 inhibitörlerinin (Nivolumab ve PDR001) kombinasyonu olsun olmasın, faz I çalışmaları içine ilerlemektedir. 108 CRC dokusu incelenmiş ve sağlıklı kolorektal mukozasında peritümöral dokulara kıyasla LAG-3⁺ / CD49b⁺ hücrelerinin yüzdesinde önemli bir artış olduğu gösterilmiştir [88]. Tümör dokularındaki Tr1 hücrelerinin artışı, CRC

gelişiminde bu hücre alt kümesi için yaşamsal bir rol olduğunu düşündürür ve kötü prognoz için prognostik görünmektedir. Bu nedenle beklenmedik bir şekilde, LAG-3 inhibitörleri ile yapılan klinik araştırmalar, CRC hastalarını kaydetmek için tasarlanmıştır.

1.2.1.5. CD70/CD27

Tümör nekroz faktör ailesinin bir üyesi olan CD70 ifadesi genel olarak aktive edilmiş T ve B hücreleri ve olgun dendritik hücrelerle sınırlı olmakla birlikte, tümör hücrelerinde CD70'in yapısal ifadesi oluşturulmuştur [89]. CD27 ligandı üzerinden, CD70'in tümör hücreleri tarafından upregülasyonu, üç ana mekanizma ile bağışıklık sisteminin önlenmesini kolaylaştırabilir: T hücresi apoptozunun uyarılması, tükenmiş T hücrelerinin eğilmesi ve baskılayıcı Treg'lerin miktarının büyütülmesi [90].

Dahası, in vivo deneylerde CD27⁺ Treg'lerin tümör konumuna indüklenmesiyle immün gözetimden kaçınıldığı doğrulanmıştır [91]. CD70 aracılı bağışıklık kaçışının görevi aynı zamanda küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) kurulmuştur, oysa CD27⁺ lenfositleri Foxp3'ün gelişmiş ifadesi ve CD70⁺ tümör hücrelerine yakın CD4/CD8 hücrelerinin daha yüksek oranlara doğru eğilimi ile tümör mikro ortamında mevcuttur [92].

Kolorektal tümör hücresi kaynaklı vakalarda, CD70 ifadesi bugüne kadar yayınlanmamıştır, bir grubun başlangıç verileri, 6/28 CRC biyopsilerinde CD70 ekspresyonunu göstermiştir [93]. Ayrıca, kolon biyopsilerinde immünohistokimya, olguların %9'unda CD70 ekspresyonu saptamıştır (17/194) [94]. Bu yorumlara göre, normal koşullarda CD70'in sınırlı ifade profiliyle eşleştirme, CRC'de bu molekülün objektif olabilmesi için ilginç bir şans bulmuştur. CD27, tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesine (TNFRSF) ait olup, immünojenik görevlerde, örneğin T hücresi hayatta kalımı, T hücresi aktivasyonu ve NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesinde önemli bir rol oynamaktadır [95]. In addition, binding of CD27 with CD70 stimulates T cell proliferation, expansion, and survival dependent upon IL-2 autocrine signaling [96, 97].

Yukarıda gösterildiği gibi, CD27 tetiklemesi aynı zamanda immünoterapi için bir işaret olarak CD27 kullanımını karmaşıklaştıran CD27⁺ Treg'lerin alınması yoluyla tümör gelişimine yol gösterebilir. Bununla birlikte, bir CRC hastasındaki tümör küçülmesi doz artışı çalışmasında zaten doğrulanmıştır [98].

1.2.1.6. OX40 (CD134)

CD134 olarak da tanımlanan OX40, tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesinin bir diğer eş-uyarıcı immün kontrol noktası molekülüdür ve bu terapötik bağışıklık tepkilerini uyarabilir. Bu molekül, T hücre reseptörü bağlanmasından sonra ve antijen spesifik astarlanması esnasında CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinde anlık olarak up-regüle edilmiştir [99]. Ligandı OX40L, aktive edilmiş antijen sunan hücrelerin yanı sıra B hücreleri, epitel hücreler ve aktive edilmiş endotel hücreleri üzerinde oturmaktadır [100]. Ek olarak, klinik olmayan modeller, OX40'un hücre yüzeyi ekspresyonunun, OX40'un etkileşimi üzerine geliştirilmiş NK hücresi aktivitesi ile NK hücrelerinin sonradan gelen aktivasyonunu indüklediğini gösterir.

Anti-OX40 agonistik monoklonal antikolarla yapılan klinik öncesi deneyler, artmış T hücre farklılaşması, sağkalım, genişleme ve sitolitik fonksiyon gösterir [101]. İyileştirici efektör T hücre genişlemesine ek olarak, OX40 agonistleri, Treg'leri inhibe edici etkilerini azaltarak kontrol etme becerisine sahiptir ve bu, uzun vadeli antitümör immün tepkilerini sürdürmek için gerekli olan antitümör CD8⁺ T hücre yanıtlarını teşvik ettiği anlamına gelmektedir [99].

OX40⁺ CD4⁺ tümör sızdıran lenfositleri meme kanseri, melanom ve sarkomun yanı sıra CRC'de de tespit edilmiştir. Aslında, yüksek OX40⁺ lenfosit seviyeleri primer CRC örneklerinin yarısında doğrulanmış ve sonrasındaki sağkalımı iyileştirmeye yönelik anlamlı bir ilişki saptanmıştır [101].

Dahası, OX40 ekspresyon seviyeleri tümörün en üstünde olmuştur ve 39 CRC hastasında tümör sınırı ve sağlıklı doku yönüne doğru önemli ölçüde azalmıştır [100]. Bu sonuçlar, tümör sınırında bağışıklık cevabının zayıflatıldığını ve bunun CRC'de immünoterapi için dikkat çekici bir hedef olduğunu düşündürmektedir.

1.2.1.7. *GITR (CD357)/ GITRL*

Glukokortikoid kaynaklı TNFR'ye bağı reseptör (GITR, aynı zamanda CD357 olarak tanımlanır), Treglerin baskılayıcı aktivitesinin azaltılması ve T efektör hücrelerinin hayatta kalışının genişletilmesi ile ilgili olduğu ortaya çıkan bir yüzey reseptörüdür. Sonuç olarak, agonistik antikörlerin üretimi için büyük bir umut vadedebilir. Aktive edilmiş CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerindeki geçici ifadeye ve Tregler üzerindeki yapısal ekspresyona ek olarak, dendritik hücreler, monositler ve NK hücreleri üzerinde ifadesi gösterilmiştir [96]. Glukokortikoid kaynaklı TNFR'ye bağı Ligand (GITRL), tekli ligandı, aktive APC'ler ve endotel hücrelerinde aşırı derecede ifade edilir ve GITR ile katılımı efektör T lenfositlerinin eş uyarıcı etkisini verir gibi görünür [102].

Klinik öncesi deneyler, GITR agonistik maddelerinin (DTA-1 gibi) hayvan modellerinde tümör zayıflamasına aracılık edebileceğini ortaya koymuştur; bu kısmen, Treglerin köken kararlılığını kaybetmesine neden olmakta, tümör mikro ortamı üzerindeki baskıcı etkilerini azaltmaktadır [103]. Üstelik, GITR ile T hücresi aktivasyonu, Treg aracılı bastırmayı zayıflatır veya CD4⁺ ve CD8⁺ efektör T hücreleri tarafından tümör öldürülmesini artırır. Ayrıca, anti-GITR'nin adoptif T hücre aktarımıyla ve anti-CTLA-4 monoklonal antikörlerle birlikte uygulandıktan sonra sinerjik bir etki gözlemlenmiştir ve diğer ileri tümörlerin baskılanmasına yol açmıştır [96, 104, 105]. Bu son etki, CRC veya fibrosarkom taşıyan fare modellerinde belirlenmiştir.

Karaciğer metastazlı CRC hastalarında, tümöre spesifik T hücre yanıtı, yüksek seviyelerde GITR ve indüklenebilir T hücre ko-stimülatörü (ICOS) eksprese eden artmış aktif Treg sayısı ile ilgilidir [102]. Ayrıca, çözünür GITRL ile idare, Treg aracılı baskılama, efektör T hücrelerinin hipo-yanıt verme yeteneğini azaltabilir [102]. CRC'de immünoterapötik girişimler için agonistik GITR monoklonal antikörlerin kullanılmasını destekleyen klinik öncesi unsurlar sınırlı olmakla birlikte, iki GITR agonistik antikoru (TRX518 ve MK-4166) bir faz I ortamında bir PD-1 inhibitörü (Pembrolizumab) eklenerek veya eklenmeden denetlenmektedir.

1.2.1.8. 4-1BB (CD137)/ 4-1BBL

CD137 olarak da tanımlanan 4-1BB, TNFRSF'nin bir üyesidir ve genellikle, T hücre antijeninin algılanmasından (tanınma) sonra indüklenen bir T hücresi yardımcı uyaran reseptör olarak bilinir. 4-1BB, T hücresi büyümesi ve farklılaşması için sinyalleri aktarmak için APC'ler üzerinde bulunan ligandı, 4-1BBL'ye bağlanır. 4-1BB hem CD4⁺ hem de CD8⁺ T hücrelerinde karşılaştırılabilir seviyelerde eksprese edilirken, aktivasyon üzerine 4-1BB yoluyla sinyaller, CD8⁺ T hücrelerine doğru daha fazla önyargılı davranırlar [106]. T hücreleri üzerindeki ifadesine ek olarak, 4-1BB düşük seviyelerde, B hücreleri, düzenleyici T hücreleri, NK'lar, NKT'ler, DC'ler, mast hücreleri ve erken myeloid progenitör hücreleri içeren çok sayıda hücrede ifade edilir [107]. Ayrıca, az miktarda çalışma, geniş bir dizi tümör hücresi üzerinde 4-1BB ekspresyonu görmüştür [106, 107]. Çeşitli hücre tipleri üzerindeki 4-1BB ekspresyonunun geniş aralığı, bu reseptörü, kansere karşı mücadelede hem yararlı hem de zararlı yapabilir; çünkü 4-1BB agonistleri, sayısız hücre tipinden güçlü antitümör yanıtlarını tetikleyebilir [107].

Primer CRC'li 72 hastanın periferik kan örneklerinde 4-1BB ekspresyonu çalışılmış ve invazyon derinliğine ek olarak immediyat bir 4-1BB pozitifliği ve CRC evresi ilişkisi olduğu doğrulanmıştır [108]. Dahası, CRC için cerrahi rezeksiyon sonrası alınan periferik kanda artmış bir 4-1BB (aynı zamanda CD134) mevcuttur; bu, tümörün yok edilmesinden sonra artmış IL üretiminden kaynaklanıyor olabilir.

Buna karşılık kanserli kolon dokusunda normal dokuya kıyasla 4-1BBL'nin ekspresyonunun daha düşük olduğu gözlemlenmiştir [109]. Bastırılmış 4-1BBL seviyeleri, T hücrelerinin tümör hücreleri ve makrofajlar ile azalmış kontaklarıyla bu yolağın kolon tümörlerinin bağışıklık kaçışındaki ilişkisini gösterebilir. İlginç bir şekilde, artmış 4-1BB ekspresyonu hastaların plazmasında yüksek çözünür 4-1BB seviyelerine sahip olduğunu ortaya çıkmıştır [109]. Bu çözünür 4-1BB'nin ligandı ile bağlanması, 4-1BBL'nin 4-1BB ile bağlanmasını bastırmak suretiyle T hücre fonksiyonunu yönettiği gösterilmiştir ve bu sonuçlar, T hücrelerinin ilave aktivasyonunu azaltmak için muhtemel bir geri besleme döngüsü önermektedir [110]. İlginçtir ki, tümör yerine bağlı olarak CRC'nin çeşitli karsinogenezisine işaret

eden rektum kanserli dokuda açığa çıkarılmamıştır. Buna ek olarak, CRC'nin karaciğer metastazı ile tedavisi için 4-1BB agonizminin pozitif etkileri daha önce hayvan modellerinde tespit edilmiştir [111, 112].

1.2.1.9. CD40/CD40L

TNFRSF'nin nihai bir üyesi olan CD40, ilk olarak B hücrelerinde karakterize edildiği gibi miyofibroblastlar, fibroblastlar, epitelyal hücreler ve endotel hücreleri gibi hematopoietik olmayan hücrelere ek olarak DC'ler, monositler, trombositler ve makrofajlar üzerinde ifade edilir. CD154 veya CD40L olarak bilinen ligandı, aktive olmuş B hücreleri ve trombositlerin yanı sıra aktive edilmiş T hücreleri tarafından eksprese edilir [113]. Aktive edilmiş T yardımcı (Th) hücrelerindeki CD40 / CD40L bağlantıları, antijen sunumunu ve birlikte uyarıcı moleküllerin ekspresyonunu geliştirir, DC'nin büyümesine ve etkili bir şekilde T hücresi aktivasyonuna neden olan tüm temel özelliklerini elde etmesine izin verir.

Murin modellerinde, CD40L ile bağlanması sitokin üretimini ve nitelikli etkili T hücresi aktivasyonu ve farklılaşmasını arttırmıştır [114]. Hematopoietik hücreler üzerindeki CD40 ekspresyonu haricinde, ekspresyonu birçok kanser hücresinde iyice anlaşılmıştır ve bu apoptoza duyarlı olmalarına neden olur [115]. CD40 ekspresyonu, normal epitel üzerinde mevcut değildir ve bu ifade, malignan büyümenin erken evrelerinde büyüme faydası sağladığına işaret eder [116]. Tümör büyümesinin proliferatif yeteneği ve sağkalımı korumak için bağışıklık sisteminden ayrı olarak CD40 / CD40L yolağını kullandığı öne sürülmüştür. Bundan başka, CD40 / CD40L etkileşimi tümörleri, muhtemelen immüno-supresif tümör mikro ortamının temel katılan hem T hücresi hem de APC bölmelerini kontrol etmesi için güçlendirir [117].

CRC hücre hatları ve kolon kanserinde CD40 ifadesi, ilk olarak Georgopoulos ve arkadaşları tarafından tümör hücrelerinde güçlü (2/17), ılımlı (4/17) veya zayıf (11/17) pozitifliğe sahip olmasıyla gösterilmiştir [117]. CD40L, birkaç primer kolorektal kanserde de belirlenmiştir ve CRC tümör bağışıklığında CD40/CD40L ekseninin belirgin bir rolünü göstermiştir [116]. Malignan büyümenin erken evrelerinde CD40 ekspresyonunun öneminin aksine malignan hücrelerin gelişmesi,

hücreleri direkt anti-proliferatif etkilere ve CD40 aracılı büyüme bastırmasına veya apoptoza duyarlı hale getirir ve CD40 ekspresyonunun eksikliğine yol açar [118]. Bu nedenle, CD40'ın prognostik belirteç olarak kullanılması doğrulanmıştır, ancak CRC'deki rolünü netleştirmek için ek araştırmalar zorunludur [117, 119].

1.2.2. Kolorektal kanser ve PD-1 gen varyasyonları

Kolorektal kanser (CRC), dünyada kadınlar ve erkekler arasında akciğer ve meme kanserlerinden sonra en sık teşhis edilen ve 2012'de yaklaşık 1,4 milyon yeni vaka ile üçüncü kanserdir [47]. Hastanın sağkalımı, teşhis anındaki tümör evresine oldukça bağlıdır. CRC vakalarının sadece %40'ı erken bir aşamada teşhis edilir ve yakın zamanda teşhis edilen hastaların yaklaşık %50'si metastatik kansere dönüşebilir [48]. Metastatik CRC halen kanser nedeniyle ölüm nedeni olarak dördüncü sırada yer almaktadır [49]. Hedeflenen tedavilerin uygulanması da dahil olmak üzere tanı ve tedavideki son gelişmelere rağmen, bu ileri CRC'nin prognozu zayıf kalmaktadır [51].

Bağışıklık sistemi kansere karşı merkezi savunma mekanizmasıdır ve malignite hastalarında bu sistem sıklıkla işlevsizdir.

Programlanmış ölüm 1 (PD-1) geni, inhibitör bir sinyal sağlayan reseptörü kodlar ve PD-L1 (B7-H1) ve PD-L2 (B7-DC) ligandları ile etkileşime girdiğinde hem proliferasyonu hem de CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositleri tarafından sitokin üretimini güçlü bir şekilde engeller [120, 121]. PD-1'in, iki ligandıyla temas ettikten sonra konakçı bağışıklık sistemi kanser hücrelerinin kaçırılmasının etkilenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Dahası, bu genin polimorfizmleri veya varyantları görevini etkileyebilir. Ayrıca, tek nükleotid polimorfizmi (SNP), kanser duyarlılığını etkileyen en önemli faktörlerden biridir.

Kolorektal kanser patogeneğinde önemli bir rol oynayan çeşitli genetik risk faktörleri tespit edilmiş ve pozitif genetik sendromlu ailelerde önemli bir kanser riski tespit edilmiştir [122].

Bir segment (2q33 ~ q37) üzerinde insan kromozomu 2 üzerinde bulunan PD-1 geni, 50-55 KD a tip I transmembranöz glikoproteini [123, 124] ve CTLA-4, CD28 ve ICOS [39, 125-127] gibi diğer birçok düzenleyici genleri kodlar.

PD-1.5 (C/T) polimorfizmi (+872 veya +7785), genin ekson 5'inde (pozisyon 7785) sessiz bir değişiklikdir [128] ve protein son amino asit dizisini değiştirmez. Bu tek nükleotid polimorfizminin (SNP) PD-1 molekölü üzerinde doğrudan veya dolaylı etkili etkisi olabilir, çünkü çeşitli hastalıklarla önemli ilişkisi vardır [128- 133].

Bu çalışmada, bir Türk popölasyonunda kolorektal kanserli hastalarda PD-1.5 (C/T) pozisyonunda polimorfizmden kaynaklanan genotip ve allellerin dağılımını araştırmayı ve sağlıklı bireylerle karşılaştırmayı amaçladık. Ayrıca, bu tek nükleotid polimorfizmi ile hastaların klinikopatolojik parametreleri arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Bilgimize göre, Türk popölasyonunda PD-1.5 (C/T) polimorfizm ve kolorektal kanser hakkında veri bulunmamaktadır.

2. LİTERATÜR İNCELEMESİ

PD-1'in anti-tümör yanıtlarında anahtar bir inhibitör görevi görmesi göz önüne alındığında, bir dizi maligniteye yönelik bireylerin genetik riski için güçlü bir aday olarak kabul edilir. Bu bağlamda, son çalışmalar, PD-1 polimorfizmlerinin, gastrik kanser [134], gastrik kardial adenokarsinoma [135], kolon kanseri [64, 136], göğüs kanseri [129, 137], özofagus kanseri [138], hepatoselüler karsinoma [139] ve serviks kanseri [140] gibi birçok kanser tipine yatkınlık ile ilişkili olduğunu vurgulamıştır. İmmunhistokimyasal inceleme, kolorektal kanseri de içeren PD-1 ifadesi ile kanser arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir [141, 142]. Bununla birlikte, PD-1 polimorfizmleri ile CRC arasındaki ilişki çeşitli popülasyonlarda iyi bilinmemektedir.

Bugüne kadar, rs36084323 A > G (PD-1.1), rs11568821 G > A (PD-1.3), rs2227981 C > T (PD-1.5), rs10204525 A > G (PD-1.6), rs7421861 T > C (PD-1.7), ve rs2227982 C > T (PD-1.9) ve PD-1 rs7421861 gibi PD-1 geni içindeki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. PD-1 geninin bu varyantları arasında PD-1.5 (C/T) polimorfizmi en çok çalışılanlardan biridir [64, 129, 134, 143- 145]. Bununla birlikte, PD-1 polimorfizmleri ile kanser riski arasındaki ilişki tutarsızdır.

PD-1 polimorfizmleri, sistemik lupus eritematosus (SLE) [146, 147], tip 1 diyabet (T1D) [148, 149], romatoid artrit [150], multipl skleroz (MS) [151] ve ankilozan spondilit (AS) [130] gibi otoimmün hastalıklarla ilişkilidir.

PD-1.5 (C / T) polimorfizm ve otoimmün hastalıklar durumunda birtakım çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte, kanserde PD-1.5 (C/T) polimorfizmi çok sayıda yayın tarafından araştırılmamıştır [64, 129, 137, 140, 143, 144].

Birkaç çalışma PD-1.5 (C/T) polimorfizminin malignite riski ile ilişkisine odaklanmasına rağmen, bu sonuçlar çelişkili kalmaktadır [152]. Oysa, çalışmalar, çeşitli etnik gruplardan, kanser yerinden, hastalık türünden ve diğer klinik

faktörlerden etkilenen PD1.5 SNP ve alel frekansında büyük bir çeşitlilik olduğunu teyit etmektedir [64, 129, 130, 137, 153].

Etnik gruplar göre yapılan bir alt grup analizinde Kafkasyalılar arasında (TT'ye karşı CT + CC için OR, 0.66; %95 CI, 0.44-0.99; $p=0.047$) [64, 134, 137, 143, 145] ve Asyalılar arasında (T'ye karşı C için OR, 0.74; 95% CI, 0.63-0.86; $p<0.001$ ve TT+CT'ye karşı CC için OR, 0.71; 95% CI, 0.59-0.87; $p=0.001$) önemli bir azalmış kanser riski belgelenmiştir [129, 144]. Üstelik, kanser türü alt grup analizinde, PD-1.5 C/T polimorfizmi, meme kanserinin (T'ye karşı C için OR, 0.82; 95% CI, 0.71-0.95; $p=0.009$) ve diğer kanserin (TT+CT'ye karşı CC için OR, 0.76; 95% CI, 0.63-0.92; $p=0.005$) önemli ölçüde azalmış olasılığı ile ilişkilidir [129, 137]. Bu sonuçlar, PD-1.5 (C/T) polimorfizminin T alelinin hafifçe kanser riskini azalttığının altını çizmektedir.

İranlılar üzerine yayınlanan veriler, PD-1.3 (+7146) G / A ve PD-1.5 (+7785 veya +872) C/T genetik belirteçlerinin meme kanserine duyarlılığı ile ilişkisini teyit etmemektedir [137].

Genel olarak, 2016 sonuçlarında ilk olarak PD-1.5 (rs2227981) polimorfizminin çok azalmış kanser riski ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Bulgularını kanıtlamak için daha fazla epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır [154].

Pemfigus foliaceus üzerinde yapılan bir araştırmaya göre, PD1.5'in polimorfik varyantları, pemfigus foliaceus patogenezinde rol oynuyor gibi görünmemektedir. Korelasyon eksikliği, bu tek nükleotid polimorfizminin pemfigus foliaceus'a duyarlılığı kontrol etmediğini önermemizi sağlar [155].

CRC patogenezindeki bu yolağın rolü ilk olarak bir İran popülasyonunda PD-1 genindeki tek nükleotid polimorfizmlerin CRC ile ilişkisi tarafından gösterilmiştir [64]. Bu çalışma, kolon kanseri hastalarında (%58,3'e karşı %44,8, Bonferroni düzeltilmiş $p=0.024$; OR = 1.74; %95 GA = 1.15-2.62) ve Rektal kanser hastalarında (%58,3'e karşı %28,0, Bonferroni düzeltilmiş $p= 0.012$; OR = 3.59; %95 CI = 1.42-9.04) CT genotip frekansının kontrol bireylere göre anlamlı derecede yüksek

olduğunu göstermiştir. Ayrıca, yaş, cinsiyet, tümör derecesi ve evre dahil olmak üzere hastaların özellikleri PD-1.5 polimorfizmiyle ilişkili değildi.

Başka bir çalışma da İnan popölasyonu arasında yapılmıştır [136]. Bu alışma CRC'li hastaları sağlıklı kontrollerle kıyasladığında, G / A genotip frekanslarının (%40.9'a karşı %33.75, OR = 1.36, $p=0.32$) anlamlı olarak farklı olmadığını göstermiştir.

Yine de CRC hastaları ile kontrol grubu arasındaki G/ G ve A/A genotip frekansları anlamlı farklılık gösterdi (sırasıyla $p=0.015$, $p=0.0004$). Ek olarak, bu polimorfizmin alel frekansları, CRC hastalarında sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak farklıdır ($p=0.0001$).

Buna ek olarak, Çinli bir popölasyon arasında bir çalışma yapılmıştır [63]. İstatistikler B- ve T-lenfosit zayıflatıcısı (BTLA) ve PD-1 polimorfizmleri ile CRC duyarlılığı arasındaki potansiyel ilişkileri göstermektedir. Kısaca, PD-1 / rs7421861 CT genotipinin frekansı, CRC hastalarında kontrol grubuna kıyasla (OR 1.314, CI 1.012-1.706) doğal tip genotipten (TT genotipi) anlamlı derecede yüksektir. Sonuç olarak, araştırmaları, CTLA-4'teki rs231777 ve PD-1'deki rs7421861'in temsili polimorfizmlerinin bir Çin popölasyonundaki CRC'ye yatkınlık için aday belirteçler olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Denekleri

Çalışmaya, kolorektal kanserli 99 hasta (50 erkek, 49 dişi; ortalama yaş: 62.06 ± 12.8 yıl) alınmıştır. Yüz elli sağlıklı kontrol (%58 erkek ve %42 dişi; ortalama yaş; 54.50 ± 16.47 yıl) vardır. Tüm katılımcılar, çalışma öncesinde yazılı bilgilendirilmiş onay vermiştir. Hasta grubunda tanı ve kanser durumu, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden (Samatya) alınan standart anket, patolojik kayıtlar ve tıbbi kayıtlarla doğrulanmıştır. Sağlıklı durumda olan ve yüz yüze görüşülerek herhangi bir düzenli ilaç almadığı onayı alınan bireylerden oluşan kontrol grubu hem hastane personeli hem de yakınları tarafından oluşturulmuştur. Çalışma, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulunca onaylanmıştır.

3.2. DNA Ekstraksiyonu

Genomik DNA ekstraksiyonu, tüm katılımcılar etilendiaminetetraasetik asit (EDTA) içeren tüplerde toplanan 10 ml venöz kan numuneleri kullanılarak tuzla çökeltilme tekniği ile yapılmıştır [156]. Bu işlem, dehidrasyon ve doymuş NaCl çözeltisi ile çökeltilme yoluyla hücresel proteinlerin tuzlanması içerir. Antikoagüle kan EDTA'dan elde edilen çekirdek hücrelerin buffy katları, 15 ml polipropilen santrifüj tüplerinde 3 ml nükleizis tamponu ile yeniden askıya alınmıştır (10 mM Tris-HCl 400 mM NaCl ve 2 mM Na₂EDTA, pH 8.2). Hücre lisatları gece boyunca 37 °C'de 0.2 ml 10Z SDS ve 0.5 ml proteaz K çözeltisi (1Z SDS ve 2 mM Na₂EDTA içinde 1 mg proteaz K) ile parçalanmıştır. Parçalanma tamamlandıktan sonra, her tüpe 1 ml doymuş NaCl (yaklaşık 6M) ilave edilmiş ve 15 saniye kuvvetli bir şekilde çalkalanmıştır, ardından 15 dakika süreyle 2500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Çöktürülmüş protein peleti tüpün tabanında bırakılmış ve DNA içeren süpernatant, başka bir 15 ml polipropilen tüpüne aktarılmıştır. Tam olarak 2 hacim oda sıcaklığında mutlak etanol ilave edilmiş ve tüpler DNA çökene kadar birkaç kez ters çevrilmiştir. Çökertilen DNA iplikçikleri bir plastik spatula veya pipet ile çıkarılmış ve 100-200 pi TE tamponu içeren 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır (10 mM Tris-HCl, 0.2 mM Na₂EDTA, pH 7.5). DNA'nın nicelleştirmeden önce 37

°C'de 2 saat erimesine izin verilmiştir. Bu basit teknikten elde edilen DNA, fenol-kloroform ekstraksiyonlarından elde edilenlerle karşılaştırılabilir miktarlar vermiştir. 260/280 oranlarının sürekli olarak 1.8- 2.0 aralığında olmuştur ve iyi bir deproteinizasyon olduğunu göstermiştir. Restriksiyonlar, yüksek, orta veya düşük tuz konsantrasyonları gerektiren, hepsi de tam bir restriksiyon ile sonuçlanan bir dizi farklı enzim kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA'nın kalitesi ve miktarı Nanodrop Spektrofotometre ile değerlendirilmiştir. Numuneler daha ileri tetkiklere kadar -20 ° C'de dondurulmuştur.

3.3. Genotipleme {PD-1.5 C / T (+7785 veya +872) SNP'nin (rs2227981) Tayini}

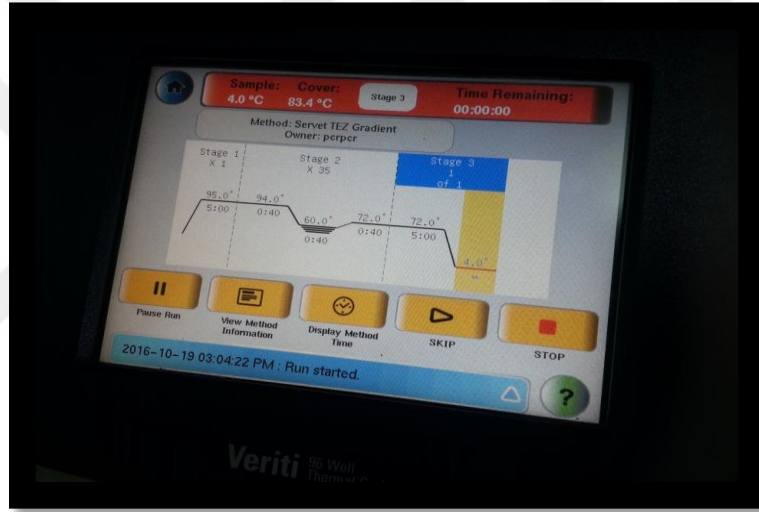
Daha önce tarif edildiği gibi [64, 134, 137] PD-1.5 pozisyonunda C/T polimorfizminin belirlenmesi için termal bir döngüleyici (Applied Biosystems Veriti™ Thermal Döngüleyici) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (PZR-RFUP) yöntemi kullanılmıştır. PCR amplifikasyonu için, PD-1.5 için primerler şunlardır: (ileri 5'-GGACAGCTCAGGTAAGCAG-3 've ters 5' AAGAGCAGTGTCCATCCTCAG-3'). PD1 genine bağlı olarak tasarlanmıştır [157].

PZR reaksiyonu için karışımlar 2 ul şablon DNA, 18.3 ul Nükleaz içermeyen su, 1 ul dNTP, 2.5 ul 10X Standart Taq Reaksiyon Tamponu, 0.5 ul İleri Primer, 0.5 ul Ters Primer, 0.2 ul Taq DNA Polimeraz içermiştir. Enzim *PvuII*, RFLP kullanılarak genotiplerin saptanması için kullanılmıştır. %2 agaroz jel elektroforezinden sonra parçalanma ürünlerinin görselleştirilmesi mor ötesi ışık altında olmuştur. PD-1.5 C / T için PZR koşulları başlangıçta 95 °C'de 5 dakika erime basamağı, daha sonra 94 °C'de 45 saniye, 57 °C'de 45 saniye ve 72 °C'de 45 saniye için 35 döngü ve son olarak 72 °C'de 5 dakika uzatma basamağı olmuştur (Photo 3.1).

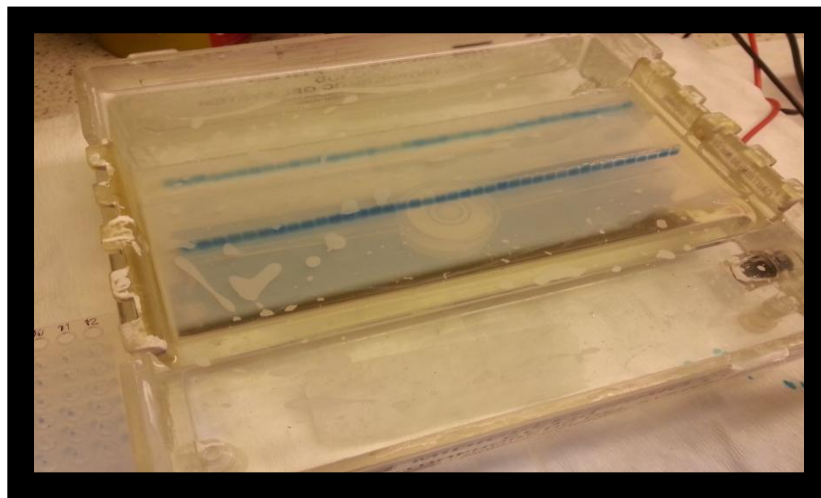
PCR ürünleri (213 bp), *PvuII* restriksiyon enzimi (1 saat için 37°C) ile parçalanmıştır. Enzim parçalamasından sonra, C allel 56 ve 213 bp fragmanları üretmiştir. T allel 56 ve 157 bp parçacıklarının varlığı ile tespit edilmiştir.

3.4. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz, SPSS yazılım paketi (revizyon 21.0; SPSS Inc., Armonk, NY, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tanımlayıcı istatistikler, ortalama, standart sapma ve yüzdeleri içerir. Hastalar ve kontroller arasındaki klinik parametrelerdeki farklılıkların ortalama değerleri eşleştirilmemiş Student t testi ile karşılaştırılmıştır ve ortalama \pm SS olarak ifade edilmiştir. Ki-kare testi, hastalarla kontroller arasındaki genotiplerin ve alellerin dağılımındaki kategorik dağılımları ve farklılıkları karşılaştırmak için kullanılmıştır. P'nin 0.05'den küçük değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



Fotoğraf 3.1. PZR prosedürü.



Fotoğraf 3.2. Jel elektroforezi.

4. BULGULAR

4.1. Kolorektal Kanserli Hastaların ve Kontrollerin Özellikleri

Çalışma grupları Kolorektal Kanserli 99 hasta (%50,5 erkek ve %49,5 dişi) ve sağlıklı bir kontrol grubundan (n = 150, 87 erkek ve 63 dişi) oluşmaktadır.

Kolorektal kanserli hastaların ve kontrollerin özellikleri, yaş, cinsiyet ve klinikopatolojik parametreler (tümör lokalizasyonu, tümör evresi, lenf nodal metastazı, uzak metastaz, anjiolenfatik invazyon, müsinöz komponent varlığı) açısından Tablo 4.1'de gösterilmektedir. Kısaca, hastaların %34,4'ü sigmoid tümöre sahiptir, %52,5'i evre III'tedir, %35,4'ünde nodal tutulum vardır, hastaların %37,4'ünde metastaz, %18,2'sinde ve %34,39'unda sırasıyla anjiolenfatik ve perineüler invazyonlar mevcuttur. Müsinöz komponent hastaların %38'inde bulunmaktadır.

Tablo 4.1. Kolorektal kanserli hastaların ve kontrollerin özellikleri.

Birey sayısı		Hasta n (%)	Kontrol n (%)
		99	150
Yaş (yıl) ortalama \pm SS(SH)		62.06 \pm 12.8 (SH ;1.31)	54.50 \pm 16.47 (SH 4.4)
Cinsiyet	Erkek	50 (%50.5)	87 (%58)
	Dişi	49 (%49.5)	63 (%42)
Tümör lokalizasyonu ^a			
Sol kolon		12 (12.5)	-
Sağ kolon		21 (21.9)	-
Transvers kolon		7 (7.3)	-
Sigmoid		33 (34.4)	-
Çekum		5 (5.2)	-
Rektum		18 (18.8)	-
Tümör evresi			
I		3 (3)	-
II		12 (12.1)	-
III		52 (52.5)	-

Tablo 4.1 'in devamı

IV	32(32.3)	-
Lenf nodu durumu		
N0	41 (41.4)	-
N1	35 (35.4)	-
N2	19 (19.2)	-
N3	4 (4)	-
Uzak Metastaz		
var	37 (37.4)	-
yok	62 (62.6)	-
anjyolenfatik invazyon		
var	18 (18.2)	-
yok	81 (81.8)	-
perinöral invazyon		
var	34 (34.39)	-
yok	65 (65.7)	-
Histolojik evre^a		
Iyi farklılaşmış	22 (26.5)	-
Orta derecede farklılaşmış	38 (45.8)	-
Zayıf derecede farklılaşmış	23 (27.7)	-
Müsinöz komponent^a		
Pozitif	27 (38)	-
Negatif	44 (62)	-

n: birey sayısı, SS: Standart sapma, SH: standart hata.

^a Tümör lokalizasyonu, histolojik derecesi ve müsinöz komponent varlığı ile ilgili veriler tüm hastalar için mevcut değildi.

4.2. Kolorektal Kanserli Hastalarda ve Kontrollerde PD-1.5 Polimorfizminin Genotip Dağılımı ve Allelik Sıklığı

Çalışılan polimorfizmde, kontrol bireyleri ve tüm kolorektal kanser hastaları arasındaki PD-1.5 (C / T) pozisyonundaki genotipik dağılım ve alel frekansları Tablo 4.2'de gösterilmektedir.

Tablo 4.2. Kolorektal kanser hastalarında (n = 99) ve kontrollerde (n = 150) PD-1.5 (C / T) polimorfizminin genotipi ve allel frekansları.

Genotipler ve alleller	Kolorektal kanserli hasta n (%)	Kontroller n (%)	P
Genotip frekansı			

Tablo 4. 2'in devamı

CC (%)	21 (21.2)	63 (42)	=0.003
CT (%)	17 (17.2)	18 (12)	
TT (%)	61 (61.6)	69 (46)	
Alel frekansı			
C (%)	103 (52.0)	195 (65)	=0.004
T (%)	95 (48.0)	105 (35)	

n: katılımcı sayısı, p: p-değeri, Gruplar arasında ki-kare (χ^2) testi kullanılmıştır.

Verilerimize göre, CRC'si olan hastalar ile sağlıklı kontroller arasındaki CC, CT ve TT genotip frekansları anlamlı olarak farklıydı ($p=0.003$). Kolorektal kanserli hastalarda ve kontrollerde genotip dağılımı (CC, TT ve CT genotipleri) gözlemlendi (hastalarda sırasıyla %21,2, %17,2 ve %61,6, kontrollerde %42, %12 ve %46). Benzer şekilde, hasta grubunda T allelin frekansı kontrole göre daha yüksekti (hastalarda %78,8, kontrollerde %58, $p = 0.001$, Odds oranı (OR): 1.358 %95 CI 1.146-1.611).

4.3. Klinikopatolojik Parametreleri Karşılaştıran PD-1.5 (C / T) Genotiplerinin Dağılımı

Kolorektal kanserli hastaların klinikopatolojik özelliklerini karşılaştıran PD-1.5 (C/T) polimorfizminin genotipik dağılımları özetlenmekte ve Tablo 4.3'te gösterilmektedir.

Tablo 4.3. Klinikopatolojik parametrelerin karşılaştıran PD-1.5 (C / T) genotiplerinin dağılımı.

	PD-1.5		
	CC n (%)	CT n (%)	TT n (%)
Cinsiyet			
Dişi	11 (22.4)	6 (12.2)	32 (65.3)
Erkek	10 (20)	11 (22)	29 (58)
Tümör evresi			
III/IV	15 (17.9)	15 (17.9)	54 (64.3)
I/II	6 (40)	2 (13.3)	7 (46.7)
Lenf nodu durumu			
N+	10 (17.2)	9 (15.5)	39 (67.2)
N-	11(26.8)	8 (19.5)	22 (53.7)
metastaz			

Tablo 4.3 'in devamı

var	4 (10.8)	2 (5.4)	31 (83.8)
yok	17 (27.4)	15 (24.2)	30 (48.4)
anjiyolenfatik inv.			
var	7 (38.9)	5 (27.8)	6 (33.3)
yok	14 (17.3)	12 (14.8)	55 (67.9)
Perinöral inv.			
var	8 (23.5)	4 (11.8)	22 (64.7)
yok	13 (20)	13 (20)	39 (60)
Histolojik evre			
İyi Orta Farklılaşma	13 (21.7)	10 (16.7)	37 (61.7)
Zayıf Farklılaşma	22 (8.7)	5 (21.7)	16 (69.6)
Müsinöz komponent			
pozitif	1 (3.7)	7 (25.9)	19 (70.4)
negatif	11 (25)	7 (15.9)	26 (59.1)

n: hasta sayısı, Gruplar arasında ki-kare (χ^2) testi kullanılmıştır, inv: invazyon.

Bu çalışmada, yaş, cinsiyet, tümör derecesi ve evre dahil olmak üzere hastaların özellikleri PD-1.5 (C/T) polimorfizmiyle ilişkili bulunmamıştır. Buna rağmen geç tümör evresi olan hastalarda T alleli sıklığı, erken evre tümör hastalarına göre daha yüksektir. Fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır ($p>0.05$).

Buna ek olarak, lenf nodal metastazı ile PD-1.5 (C/T) polimorfizm arasında herhangi bir fark gözlemlenmedi. Öte yandan, mesafe metastazı olan hastalarda negatif metastatik olanlara göre homozigot TT genotipleri artmıştır ($P<0.001$, odds oranı (OR), 1.732; %95 güven aralığı (CI), 1.291-2.322}.

Dahası, anjiyolenfatik invazyonu olan hastalarda, C alleli sıklığı, anjiyolenfatik invazyon bulunmayan hastalara göre artmıştır ($p=0.006$, odds oranı (OR), 2.077; %95 güven aralığı (CI), 1.318-3.274}.

Sonuçlarımızın bir başka bulgusu, anjiolenfatik invazyonu olan hastalarda negatif lenfatik invazyona kıyasla artan CC genotip sıklığıdır { $p=0.043$, odds oranı (OR), 2.25, %95 güven aralığı (CI), 1.063-4.763}.

Ayrıca, müsinöz komponenti olan hastalar, müsinöz komponenti olmayanlara oranla yokluğunda T allel frekansı artmıştır { $p=0.023$, odds oranı (OR), 1.284, %95 güven aralığı (CI), 1.066-1.546}.



5. TARTIŞMA

Kolorektal Kanser (CRC) dünya çapında kansere bağlı ölümlerin bilinen bir nedenidir [47].

Kolorektal kanser patogeneğinde önemli bir görev oynayan çeşitli genetik risk faktörleri tanımlanmış ve pozitif genetik sendromlu ailelerde belirgin bir kanser riski tespit edilmiştir [122]. CRC'nin erken teşhisi, tedavi olasılığını artırabilir ve hastaların sağkalım süresini uzatabilir.

Bir bölgede (2q33 ~ q37) insan kromozomu 2 üzerinde bulunan PD-1 geninin [123, 124] iki ligandıyla temas ettikten sonra konak bağışıklık sistemin kanser hücrelerini kaçırmasında etkili olduğu düşünülmektedir [120, 121]. Dahası, PD-1 genindeki polimorfizmler veya varyantların bunun görevine bir etkisi olabilir. Ayrıca, tek nükleotid polimorfizm (SNP), kanser duyarlılığını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Öte yandan, gen polimorfizmleri, kanser riskinin değerlendirilmesi için muhtemel parametreler olarak bilinir. Bu bağlamda, son çalışmalar, PD-1 polimorfizmlerinin mide kanseri [134], gastrik kardiyovasküler adenokarsinom [135], kolon kanseri [64, 136], meme kanseri [129, 137], özofagus kanseri [138], hepatoselüler karsinoma [139] ve serviks kanseri [140] gibi birçok kanser tipine yatkınlık ile ilişkili olduğunu vurgulamıştır. İmmunhistokimyasal inceleme, PD-1 ifadesi ile kolorektal kanseri de içeren kanser arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir [141, 142]. Bununla birlikte, PD-1 polimorfizmleri ile CRC arasındaki ilişki çeşitli popülasyonlarda iyi bilinmemektedir.

Bu güne kadar rs36084323 A > G (PD-1.1), rs11568821 G > A (PD-1.3), rs2227981 C>T (PD-1.5), rs10204525 A > G (PD-1.6), rs7421861 T > C (PD-1.7), ve rs2227982 C>T(PD-1.9) ve PD-1 rs7421861 gibi PD-1 geni içerisindeki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. PD-1 geninin bu varyantları arasında PD-1.5 (C/T) polimorfizmi en çok çalışılanlardan biridir [64, 129, 134, 143- 145]. Çeşitli çalışmaların PD-1.5 (C/T) polimorfizminin malignite riski ile ilişkilisine odaklanmasına rağmen bu sonuçlar çelişkili kalmaktadır [152].

Oysa araştırmalar, çeşitli etnik gruplar, kanser yeri, hastalık türü ve diğer klinik faktörlerle etkilenen PD-1.5 (C/T) SNP ve alel frekansında geniş bir çeşitlilik olduğunu teyit etmektedir [64, 129, 130, 137, 153].

PD-1.5 (C/T) polimorfizminin, proteinin nihai amino asit sekansını değiştirmeyen, genin sessiz bir alterasyonu olduğu dikkat çekicidir [128]. Bu tek nükleotid polimorfizmi, PD-1 molekülü üzerinde doğrudan veya dolaylı etkili etkiye sahip olabilir, çünkü çeşitli hastalıklarla önemli ilişkisi vardır [128- 134].

Bu çalışmada, ilk defa bir Türk popülasyonunda PD-1.5 (C/T) polimorfizmi ve kolorektal kanser riski araştırılmıştır. Verilerimize göre, PD-1.5 (C/T) genotipleri ve allelik frekans dağılımlarında hastalar ile kontroller arasında anlamlı ilişkiler bulunmuştur. Bununla birlikte, PD-1.5 (C/T) için T allel ve CT genotipleri hastalarda kontrollerden daha sık olmuştur. Bu sonuç özellikle heterozigot CT genotipinden kaynaklanmıştır.

Buna ek olarak, CRC hastaları ile sağlıklı kontroller arasında araştırılan polimorfizmin allel frekansları anlamlı olarak farklı çıkmıştır. Çalışmamızda, literatürde yer alan PD-1.5 (C/T) polimorfizminin kolorektal kanserde genotip dağılımı veya allelik frekansları arasındaki ilişki üzerine benzer sonuçlar elde edilmiştir. İran popülasyonu üzerinde yapılan bir çalışmada, CT genotipi ve CRC'li İranlı hastalar arasında önemli bir ilişki gözlemlenmiştir, bu da PD-1.5 (C/T) polimorfizminin CT genotipinin muhtemelen kolorektal kanserde bir risk faktörü olduğunu önermektedir [64]. Savabkar ve arkadaşları, 2013 yılında, bir İran nüfusundaki PD-1.5 (C/T) polimorfizminin mide kanseri ile ilişkili olduğunu araştırmıştır [134]. Dahası, PD-1.5 (C/T) polimorfizminin CT genotipinin romatoid artrit riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [131]. Buna karşılık, Cooper ve arkadaşları tarafından PD-1.5 (C/T) polimorfizminin CT genotipi ile tip-1 diyabet arasında istatistiksel olarak bir ilişki gözlemlenmemiştir [153]. Buna göre, çalışmamız PD-1.5 (C/T) polimorfizminin CRC gelişme olasılığının artışı ile korelasyonunu desteklemektedir.

İran nüfusa yönelik yakın tarihli bir araştırmada, CC genotipi PD-1.5 (C / T), sağlıklı bireylerde daha sıktır [64]. Buna karşılık literatürde zıt yönde bulgular da yer almaktadır. Yapılan bir çalışmaya göre PD-1.5 (C / T) polimorfizmi ve gastrik kanser arasında herhangi bir ilişki olmadığını göstermektedir [134].

Bununla birlikte, C alleli sıklığı, meme kanseri hastalarında, Çin nüfusundaki kontrol bireylerden daha fazla idi [129]. Bununla birlikte, önceki bir çalışma, T alelinin gelişmiş romatoid artrit ile ilişkili olduğunu göstermiştir [131].

Çalışmalar, çeşitli etnik gruplar, tümör yerleşimi, hastalık türü ve diğer klinik faktörlerle etkilenen PD1.5 genotipinde ve allel frekansında büyük bir çeşitliliğin olduğunu teyit eder [64, 129, 130, 137, 153]. Örneğin, PD-1.5 pozisyonundaki genotipik dağılım ve alelik frekanslar, İranlı kolorektal kanser hastaları ve sağlıklı bireyler arasında anlamlı bir farklılık göstermedi. Bununla birlikte, CRC hastaları tümör lokalizasyonuna (kolon ve rektum) göre alt gruplara ayrıldığı zaman, hasta alt grupları arasında genotipe göre ($p=0.017$) ve ayrıca kolon kanseri hastaları ile sağlıklı kontrol grubu arasında anlamlı bir fark vardı ($p=0.026$), ancak rektum kanseri hastaları ile sağlıklı kontroller arasında fark yoktu ($p=0.289$) [64]. Öte yandan alelik frekanslar, kolon kanseri hastalarında sağlıklı bireylere karşı ($p=0.299$) ve rektum kanseri hastalarında sağlıklı bireylere ($p=0.759$) karşı tümör lokalizasyonuna göre anlamlı olarak farklı değildi. Verilerimize göre, yaş, cinsiyet, tümör evresi, perinöral invazyon, tümör lokalizasyonu parametreleri ile hastaların özellikleri, PD1.5 (C / T) genotip dağılımı arasında ilişkili bulunmadı. Buna rağmen anjiyolenfatik invazyon, müsinöz komponent, uzak metastaz varlığı olan hastalarda PD. Fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca, lenf nodu durumu ile genotipler arasında herhangi bir anlamlılık tespit etmedik. Bununla birlikte, uzak metastaz, müsinöz durum, anjiyolenfatik invazyon parametreleri ile PD1.5 (C/T) genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuçlar saptadık.

Ayrıca, kanser türünden bir alt grup analizinde, PD-1.5 (C/T) polimorfizmi, meme kanseri (T'ye karşı C için OR, 0.82; 95% CI, 0.71-0.95; $p=0.009$ ve TT+CT'ye karşı CC için OR, 0.76; 95% CI, 0.63-0.92; $p=0.005$) ve diğer kanser (TT'ye karşı CT+CC için OR, 0.58; 95% CI, 0.36-0.92; $p=0.004$) olasılığının önemli derecede azalması ile

ilişkiliydi [129, 137]. Bu sonuçlar, PD-1.5 (C/T) polimorfizminin T alelinin hafifçe kanser riskini azalttığının altını çizmektedir.

İranlılar üzerine yayınlanan veriler, PD-1.3 (+7146) G / A ve PD-1.5 (+7785 veya +872) C/T genetik belirteçlerinin meme kanserine duyarlılığı ile ilişkisini teyit etmeyen veriler mevcuttu. [137].

Lin ve arkadaşları (2004), romatoid artrit (RA) ve sistemik lupus eritematoz (SLE) 'da PD-1.5 (C / T) SNP'yi araştırmışlar ve CT genotipi ve T alelinin romatoid artrite duyarlılıkla ilişkili olduğunu, ancak sistemik lupus eritematoza olmadıklarını belirtmişlerdir [131]. Hua ve ark., 2011'de T alelinin T hücrelerinin artmış aktivitesi ile bağlantılı olabileceğini önermişlerdir [129]. Bir başka çalışmada, PD-1.5 (C / T) ile romatoid artrit arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır [128]. Bununla birlikte PD-1.5 T allel içeren bir haplotip romatoid artritli hastalarda daha belirgindi.

Kore popülasyonu [130] ve Çin Han nüfusundaki [132] iki ayrı çalışmada PD-1.5 (C/T) ile ankilozan spondilit arasında herhangi bir ilişki gözlenmemiştir; bununla birlikte PD-1.5 C alel içeren bir haplotip, ankilozan spondilit ile ilişkilendirilmiştir. Bir başka çalışmada, Çin Han hastalarında ekstraoküler bulguları olan Vogt Koyanagi Harada sendromlu hastalarda C alleli düşüşü ortaya çıkmıştır [133]. Otoimmün hastalıkların aksine, birçok yayın kanserdeki PD-1.5 (C/T) polimorfizmini araştırmamıştır.

Pemfigus foliaceus üzerinde yapılan bir araştırmaya göre, PD-1.5'in (C/T) polimorfik varyantları, pemfigus foliaceus patogenezinde rol oynuyor gibi görünmemektedir. Korelasyon eksikliği, bu tek nükleotid polimorfizminin pemfigus foliaceus'a olan duyarlılığı kontrol etmediğini önermemizi sağlar [155].

Genel olarak, 2016 yılındaki sonuçlarda ilk olarak PD-1.5 (C/T) polimorfizminin kanserlerin fazlasıyla azalmış riski ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu bulguları ispatlamak için daha ileri epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır [154].

Buna ek olarak, Çin nüfusu üzerine bir çalışma yapılmıştır [63]. İstatistikler B- ve T-lenfosit zayıflatıcısı (BTLA) ve PD-1 polimorfizmleri ile CRC duyarlılığı arasındaki potansiyel ilişkileri göstermektedir. Kısaca, PD-1 / rs7421861 CT genotipinin frekansı, kontrol grubuna kıyasla (OR 1.314, CI 1.012-1.706) CRC hastalarında doğal tip genotipten (TT genotipi) anlamlı derecede yüksekti. Sonuç olarak, araştırmaları, CTLA-4'teki rs231777 ve PD-1'deki rs7421861'in temsilci polimorfizmlerinin bir Çin popülasyonundaki CRC'ye yatkınlık için aday belirteçler olarak kullanılabileceğini gösterdi.

Ancak, daha önce tartışılan verilere göre, PD-1.5 (C/T) polimorfizminin kanser riski ile ilişkisi konusunda bu sonuçlar çelişkilidir [152].

Çalışmamızda, uzak metastazı olan hastalarda negatif metastatik olanlara göre PD-1.5 (C / T) polimorfizminin C allel taşıma ve CT heterozigot olma sıklığı yüksekti. Ayrıca, anjiyolenfatik invazyona sahip hastalarda anjiyolenfatik invazyon bulunmayan hastalara kıyasla PD-1.5 (C/T) homozigot genotip olma frekansı CC genotipi ve C allel artmıştır. Dahası, T allel, müsinöz komponenti olan hastalarda müsinöz komponenti bulunmayan hastalara göre daha sıklı. PD-1.5 (C / T) polimorfizminin klinikopatolojik özelliklerle ilişkisi ile ilgili bulgularımız, PD-1.5 polimorfizminin prognoz üzerindeki etkisini değerlendirmek için daha geniş örneklem büyüklükleri ile yapılan daha sonraki çalışmalarda düşünülmelidir.

6. SONUÇ

Özetlemek gerekirse, Bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez PD-1.5 (C/T) polimorfizminin kolorektal kanser ile ilişki araştırıldı. Veriler PD-1.5 (C/T) polimorfizminin genotip dağılımı ve allelik frekanslarının kolorektal kanserli hastalar ile sağlıklı bireyler arasında önemli ölçüde farklı olduğunu göstermektedir. Buna göre hasta grubunda T alleli taşıma frekansı kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı yüksekti. Yaş, cinsiyet, tümör evresi, perinöral invazyon, lokalizasyon gibi hastaların özellikleri PD-1.5 (C/T) polimorfizm ile anlamlı bir ilişki göstermedi. Buna rağmen, uzak metastazı olan hastalarda negatif metastatik olanlara göre PD-1.5 (C/T) polimorfizmi C alleli taşıma, CT heterozigot artmıştır. Çalışmamızın bir başka bulgusu, anjiyolenfatik invazyona sahip hastaların negatif lenfatik invazyona kıyasla homozigot CC genotip taşıma frekansı ve C allel. Son olarak, müsinöz komponenti olan hastalarda T allel sıklığı, müsinöz komponenti bulunmayan hastalara göre daha yüksektir.

PD-1.5 polimorfizminin belirli bir genotipinin kolorektal kanser riski ile ilişkili olup olmadığını açıklığa kavuşturmak ve PD-1.5 (C/T) polimorfizminin ve klinikopatolojik özelliklerin ilişkisini açıklığa kavuşturmak için kolorektal kanserli daha fazla hasta içeren daha ileri araştırmaların yapılması gereklidir. Farklı PD-1.5 (C/T) genotiplerinin PD-1.5 molekülü üzerindeki işlevsel sonucunu ortaya çıkarmak için ek bir çalışma da gereklidir.

KAYNAKLAR

- [1] Mira, A. P., Jennifer, E. K., Jacob, R., & Michael, L. (2015). Present and future of immune checkpoint blockade: Monotherapy to adjuvant approaches. *World Journal of Immunology*, 5(1), 1-15.
- [2] Drew, M. P. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12, 252-264. doi:10.1038/nrc3239.
- [3] Rosenberg, S. A., Spiess, P., & Lafreniere, R. (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science*, 233, 1318-1321.
- [4] Matsushita, H., Vesely, M. D., Koboldt, D. C., Rickert, C. G., Uppaluri, R., Magrini, V. J., et al. (2012). Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature*, 482, 400-404.
- [5] Intlekofer, A. M., & Thompson, C. B. (2013). At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology*, 94, 25-39.
- [6] Coussens, L. M., Zitvogel, L., & Palucka, A. K. (2013). Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science*, 339, 286-291.
- [7] Tesniere, A., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Joza, N., Panaretakis, T., Kepp, O., et al. (2008). Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Current Opinion in Immunology*, 20, 504-511.
- [8] Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12, 252-264.
- [9] Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331, 1565-1570.
- [10] Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3, 991-998.
- [11] Dunn, G.P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21, 137-148.
- [12] Dunn, G.P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22, 329-360
- [13] Nirschl, C. J., & Drake, C. G. (2013). Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 19, 4917-4924.

- [14] Zitvogel, L., Tesniere, A., & Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews Immunology*, 6, 715-727.
- [15] Schumacher, T. N., & Schreiber, R. D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*, 348, 69-74.
- [16] Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Campbell, P. J., & Stratton, M. R. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500, 415-421.
- [17] Lucas, S., & Coulie, P. G. (2008). About human tumor antigens to be used in immunotherapy. *Seminars in Immunology*, 20, 301-307.
- [18] Coulie, P. G., Van den E, B. J., Van der, B. P., & Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 14, 135-146.
- [19] Whiteside, T. L. (2014). Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? *Cancer Immunology Immunotherapy*, 63, 67-72.
- [20] Lindau, D., Gielen, P., Kroesen, M., Wesseling, P., & Adema, G. J. (2013). The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology*, 138, 105-115.
- [21] Yang, L., Pang, Y., & Moses, H. L. (2010). TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in Immunology*, 31, 220-227.
- [22] Munn, D. H., & Mellor, A. L. (2013). Indoleamine 2, 3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends in Immunology*, 34, 137-143.
- [23] Zou, W., & Chen, L. (2008). Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*, 8, 467-477.
- [24] Chen, L., & Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell costimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 13, 227-242.
- [25] Ott, P. A., Hodi, F. S., & Robert, C. (2013). CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. *Clinical Cancer Research*, 19, 5300-5309.
- [26] Anagnostou, V. K., & Brahmer, J. R. (2015). Cancer immunotherapy: a future paradigm shift in the treatment of non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 21, 976-984.

- [27] Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., & Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO Journal*, *11*, 3887-3895.
- [28] Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., & Honjo, T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, *11*, 141-151.
- [29] Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani K, Hara M, & Matsumori A. (2001). Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*, *291*, 319-322.
- [30] Bayry, J. (2009). Autoimmunity: CTLA-4: a key protein in autoimmunity. *Nature Reviews Rheumatology*, *5*, 244-245.
- [31] Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, J. A., & Sharpe, A. H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA 4. *Immunity*, *3*, 541-547.
- [32] Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. (1995) Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4. *Science*, *270*, 985-988.
- [33] Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., & Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature Medicine*, *5*, 1365-1369.
- [34] Tamura, H., Dong, H., Zhu, G., Sica, G. L., Flies, D. B., Tamada, K., et al. (2001). B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. *Blood*, *97*, 1809-1816.
- [35] Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., Flies, D. B., van Deursen, J. M., & Chen, L. (2004). B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8+ T lymphocytes. *Immunity*, *20*, 327-236.
- [36] Latchman, Y. E., Liang, S. C., Wu, Y., Chernova, T., Sobel, R. A., Klemm, M., et al. (2004). PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*, 10691-10696.
- [37] Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., et al. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine*, *8*, 793-800.

- [38] Ostrand-Rosenberg, S., Horn, L. A., & Haile, S. T. (2014). The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity. *Journal of Immunology*, 193, 3835-3841.
- [39] Thompson, R. H., Kuntz, S. M., Leibovich, B. C., Dong, H., Lohse, C. M., Webster, W. S., et al. (2006). Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Research*, 66, 3381-3385.
- [40] Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., & Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 12293-12297.
- [41] Hirano, F., Kaneko, K., Tamura, H., Dong, H., Wang, S., Ichikawa, M., et al. (2005). Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Research*, 65, 1089-1096.
- [42] Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q., Hwu, W. J., Topalian, S. L., Hwu, P., et al. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *The New England Journal of Medicine*, 366(26), 2455-2465.
- [43] Powles, T., Eder, J. P., Fine, G. D., Braithel, F. S., Loriot, Y., Cruz, C., et al. (2014). MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*, 515, 558-562.
- [44] Herbst, R. S., Soria, J. C., Kowanetz, M., Fine, G. D., Hamid, O., Gordon, M. S., et al. (2014). Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*, 515, 563-567.
- [45] Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., et al. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *The New England Journal of Medicine*, 366(26), 2443-2454.
- [46] Taube, J. M., Klein, A., Brahmer, J. R., Xu, H., Pan, X., Kim, J. H., et al. (2014). Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clinical Cancer Research*, 20, 5064-5074.
- [47] Young, J. M., Jorgensen, M., & Solomon, M. (2015). Optimal delivery of colorectal cancer follow-up care: improving patient outcomes. *Patient Related Outcome Measures*, 6, 127-138.
- [48] Gonzalez-Pons, M., & Cruz-Correa M. (2015). Colorectal cancer biomarkers: where are we now? *BioMed Research International*, Article ID149014, 14 pages.

- [49] Singh, P. P., Sharma, P. K., Krishnan, G., & Lockhart, A. C. (2015). Immune checkpoints and immunotherapy for colorectal cancer. *Gastroenterology Report*, 3(4), 289-97. doi: 10.1093/gastro/gov053.
- [50] Deschoolmeester, V., Smits, E., Peeters, M., & Vermorken, J. B. (2013). Status of active specific immunotherapy for stage II, stage III, and resected stage IV colon cancer. *Current Colorectal Cancer Reports*, 9(4), 380-390.
- [51] Kocián, P., Šedivcová, M., Drgáč, J., Cerná, K., Hoch, J., Kodet, R., et al. (2011). Tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells in human colorectal cancer: their relationship to KRAS mutational status and disease recurrence. *Human Immunology*, 72(11), 1022-1028.
- [52] Deschoolmeester, V., Baay, M., Specenier, P., Lardon, F., & Vermorken, J. (2010). A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: one step closer to targeted therapy. *Oncologist*, 15(7), 699-731.
- [53] Markman, J. L., & Shiao, S. L. (2015). Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 6(2), 208-223.
- [54] Oberg, A., Samii, S., Stenling, R., & Lindmark, G. (2002). Different occurrence of CD8+, CD45RO+, and CD68+ immune cells in regional lymph node metastases from colorectal cancer as potential prognostic predictors. *International Journal of Colorectal Disease*, 17, 25-29.
- [55] Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, 313, 1960-1964.
- [56] Pagès, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Asslaber, M., Tosolini, M., Bindea, G., et al. (2009). In situ cytotoxic and memory T-cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 5944-5951.
- [57] Chen, T. T. (2015). Milestone survival: a potential intermediate endpoint for immune checkpoint inhibitors. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(9). pii: djv156. doi: 10.1093/jnci/djv156.
- [58] Brahmer, S. L., & Pardoll, D. M. (2013). Immune checkpoint inhibitors: making immunotherapy a reality for the treatment of lung cancer. *Cancer Immunology Research*, 1(2), 85-91.
- [59] Brahmer, J. R., Drake, C. G., Wollner, I., Powderly, J. D., Picus, J., Sharfman, W. H., et al. (2010). Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical

activity, pharmacodynamics and immunologic correlates. *Journal of Clinical Oncology*, 28(19), 3167-3175.

- [60] Greenwald, R. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2005). The B7 family revisited. *Annual Review of Immunology*, 23, 515-548.
- [61] Rozali, E. N., Hato, S. V., Robinson, B. W., Lake, R. A., & Lesterhuis, W. J. (2012). Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012: Article ID 656340, 8 pages doi:10.1155/2012/656340.
- [62] Wu, X., Zhang, H., Xing, Q., Cui, J., Li, J., Li, Y., et al. (2014). PD-1+ CD8+ T cells are exhausted in tumours and functional in draining lymph nodes of colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer*, 111(7), 1391-1399.
- [63] Ge, J., Zhu, L., Zhou, J., Li, G., Li, Y., Li, S., et al. (2015). Association between co-inhibitory molecule gene tagging single nucleotide polymorphisms and the risk of colorectal cancer in Chinese. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(9), 1533-1544.
- [64] Mojtahedi, Z., Mohmedi, M., Rahimifar, S., Erfani, N., Hosseini, S., & Ghaderi, A. (2012). Programmed death-1 gene polymorphism (PD-1.5 C/T) is associated with colon cancer. *Gene*, 508(2), 229-232.
- [65] Hua, D., Sun, J., Mao, Y., Chen, L.-J., Wu, Y.-Y., et al. (2012). B7-H1 expression is associated with expansion of regulatory T cells in colorectal carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 18(9), 971-978.
- [66] Arai, Y., Saito, H., & Ikeguchi, M. (2012). Upregulation of TIM-3 and PD-1 on CD4+ and CD8+ T cells associated with dysfunction of cell-mediated immunity after colorectal cancer operation. *Yonago Acta Medica*, 55(1), 1-9.
- [67] Drosner, R. A., Hirt, C., Viehl, C. T., Frey, D. M., Nebiker, C., Huber, X., et al. (2013). Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 49(9), 2233-2242.
- [68] Heinemann, K. (2013). Toward a molecular classification of colorectal cancer: the role of microsatellite instability status. *Frontiers in Oncology*, 3, 272. doi: 10.3389/fonc.2013.00272.
- [69] Le, D. T., Uram, N. J., Wang, H., Bartlett, B. R., Kemberling, H., Eyring A. D., et al. (2015). PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 372(26), 2509-2520. doi: 10.1056/NEJMoa1500596.
- [70] Lipson, E. J., Sharfman, W. H., Drake, C. G., Wollner, I., Taube, J. M., Anders, R. A., et al. (2013). Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. *Clinical Cancer Research*, 19(2), 462-468.

- [71] Betts, G., Jones, E., Junaid, S., El-Shanawany, T., Scurr, M., Mizen, P., et al. (2012). Suppression of tumour specific CD4+ T cells by regulatory T cells is associated with progression of human colorectal cancer. *Gut*, 61(8), 1163-1171.
- [72] Wang, Y., Wang, X., & Zhao, R. (2015). The association of CTLA-4 A49G polymorphism with colorectal cancer risk in a Chinese Han population. *International Journal of Immunogenetics*, 42(2), 93-99.
- [73] Wang, L., Jing, F., Su, D., Zhang, T., Yang, B., Jiao, S., et al. (2015). Association between CTLA-4 rs231775 polymorphism and risk of colorectal cancer: a meta analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(1), 650-657.
- [74] He, H., Deng, T., & Luo, H. (2015). Association between cytotoxic T-lymphocyte antigen-4+ 49A/G polymorphism and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(3), 3752-3760.
- [75] Llosa, N. J., Cruise, M., Tam, A., Wicks, E. C., Hechenbleikner, E. M., Taube, J. M., et al. (2015). The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discovery*, 5(1), 43-51.
- [76] Lin, Y. C., Mahalingam, J., Chiang, J. M., Su, P. J., Chu, Y. Y., Lai, H. Y., et al. (2013). Activated but not resting regulatory T cells accumulated in tumor microenvironment and correlated with tumor progression in patients with colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 132(6), 1341-1350.
- [77] Svensson, H., Olofsson, V., Lundin, S., Yakkala, C., Björck, S., Börjesson, L., et al. (2012). Accumulation of CCR4+CTLA-4 hiFOXP3+ CD25 hi regulatory T cells in colon adenocarcinomas correlate to reduced activation of conventional T cells. *PLoS ONE*, 7(2), Article ID e30695.
- [78] Scurr, M, Ladell, K., Besneux, M., Christian, A., Hockey, T., Smart, K., et al. (2014). Highly prevalent colorectal cancer-infiltrating LAP+ Foxp3- T cells exhibit more potent immunosuppressive activity than Foxp3+ regulatory T cells. *Mucosal Immunology*, 7(2), 428-439.
- [79] Chung, K. Y., Gore, I., Fong, L., Venook, A., Beck, S. B., Dorazio, P., et al. (2010). Phase II study of the anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody, tremelimumab, in patients with refractory metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(21), 3485-3490.
- [80] Zhu, C., Anderson, A. C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S. J., et al. (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature Immunology*, 6(12), 1245-1252.

- [81] Xu, B., Yuan, L., Gao, Q., Yuan, P., Zhao, P., Yuan, H., et al. (2015). Circulating and tumor-infiltrating Tim-3 in patients with colorectal cancer. *Oncotarget*, 6(24), 20592-20603.
- [82] Arai, Y., Saito, H., & Ikeguchi, H. (2012). Upregulation of TIM-3 and PD-1 on CD4+ and CD8+ T cells associated with dysfunction of cell-mediated immunity after colorectal cancer operation. *Yonago Acta Medica*, 55(1), 1-9.
- [83] Shin, D. S., & Ribas, A. (2015). The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next? *Current Opinion in Immunology*, 33, 23-35. doi: 10.1016/j.coi.2015.01.006.
- [84] Goldberg, M., & Drake, C. (2011). LAG-3 in cancer immunotherapy. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 344, 269-278.
- [85] Camisaschi, C., Casati, C., Rini, F., Perego, M., De Filippo, A., Triebel, F., et al. (2010). LAG-3 expression defines a subset of CD4+CD25 highFoxp3+ regulatory T cells that are expanded at tumor sites. *Journal of Immunology*, 184(11), 6545-6551. doi: 10.4049/jimmunol.0903879.
- [86] Gagliani, N., Magnani, C. F., Huber, S., Gianolini, M. E., Pala, M., Licona-Limon, P., et al. (2013). Coexpression of CD49+ and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nature Medicine*, 19(6), 739-746.
- [87] Blackburn, S. D., Shin, H., Haining, W. N., Zou, T., Workman, C. J., Polley, A., et al. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Immunology*, 10(1), 29-37. doi: 10.1038/ni.1679.
- [88] Chen, J., & Chen, Z. (2014). The effect of immune microenvironment on the progression and prognosis of colorectal cancer. *Medical Oncology*, 31(8), 82. doi: 10.1007/s12032-014-0082-9.
- [89] Denoed, J., & Moser, M. (2011). Role of CD27/CD70 pathway of activation in immunity and tolerance. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(2), 195-203.
- [90] Jacobs, J., Deschoolmeester, V., Zwaenepoel, K., Rolfo, C., Silence, K., Rottey, S., et al. (2015). CD70: an emerging target in cancer immunotherapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 155, 1-10.
- [91] Claus, C., Riether, C., Schürch, C., Matter, M. S., Hilmenyuk, T., & Ochsenbein, A. F. (2012). CD27 signaling increases the frequency of regulatory T cells and promotes tumor growth. *Cancer Research*, 72(14), 3664-3676.
- [92] Jacobs, J., Zwaenepoel, K., Rolfo, C., Van den Bossche, J., Deben, C., Silence, K., et al. (2015). Unlocking the potential of CD70 as a novel immunotherapeutic target for non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 6(15), 13462-13475.

- [93] Jacobs, J., Smits, E., Lardon, F., Pauwels, P., & Deschoolmeester, V. (2015). Immune Checkpoint Modulation in Colorectal Cancer: What's New and What to Expect? *Journal of Immunology Research*, Article ID 158038, 16 pages. doi.org/10.1155/2015/158038.
- [94] Ryan, M. C., Kostner, H., Gordon, K. A., Duniho, S., Sutherland, M. K., Yu, C., et al. (2010). Targeting pancreatic and ovarian carcinomas using the auristatin-based anti-CD70 antibody-drug conjugate SGN-75. *British Journal of Cancer*, 103(5), 676-684. doi: 10.1038/sj.bjc.6605816. Epub 2010 Jul 27.
- [95] Thomas, L. J., He, L. Z., Marsh, H., & Keler, T. (2014). Targeting human CD27 with an agonist antibody stimulates T-cell activation and antitumor immunity. *Oncoimmunology*, 3(1), e27255.
- [96] Schaer, D. A., Hirschhorn-Cymerman, D., & Wolchok, J. D. (2014). Targeting tumor-necrosis factor receptor pathways for tumor Immunotherapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2(7), 9 pages. doi: 10.1186/2051-1426-2-7. eCollection 2014.
- [97] Dhainaut, M., Coquerelle, C., Uzureau, S., Denoed, J., Acolty, V., Oldenhove, G., et al. (2015). Thymus-derived regulatory T cells restrain pro-inflammatory Th1 responses by downregulating CD70 on dendritic cells. *The EMBO Journal*, 34(10), 1336-1348. doi: 10.15252/embj.201490312. Epub 2015 Mar 18.
- [98] CDX-1127 Program Update, November 2013 at SITC 2013, <http://files.shareholder.com/downloads/ABEA-39HH7S/0x0x-704503/ec60d100-ddca-49e3-b42a4e964f540fcd/SITC%20webcast%20slides%2011%206%20final.pdf>.
- [99] Linch, S. N., McNamara, M. J., & Redmond, W. L. (2015). OX40 agonists and combination immunotherapy: putting the pedal to the metal. *Frontiers in Oncology*, 5(34). doi: 10.3389/fonc.2015.00034. eCollection 2015.
- [100] Cepowicz, D., Zaręba, K., Gryko, M., Stasiak-Bermuta, A., & Kędra, B. (2011). Determination of the activity of CD134 (OX-40) and CD137 (4-1BB) adhesive molecules by means of flow cytometry in patients with colorectal cancer metastases to the liver. *Polski Przegląd Chirurgiczny*, 83(8), 424-429. doi: 10.2478/v10035-011-0066-9.
- [101] Petty, J. K., He, K., Corless, C. L., Vetto, J. T., & Weinberg, A. D. (2002). Survival in human colorectal cancer correlates with expression of the T-cell co-stimulatory molecule OX-40 (CD134). *The American Journal of Surgery*, 183(5), 512-518.
- [102] Pedroza-Gonzalez, A., Verhoef, C., Ijzermans, J. N., Peppelenbosch, M. P., Kwekkeboom, J., Verheij, J., et al. (2013). Activated tumor-infiltrating

CD4+ regulatory T cells restrain antitumor immunity in patients with primary ormetastatic liver cancer. *Hepatology*, 57(1), 183-194.

- [103] Sahaer, D. A., Budhu, S., Liu, C., Bryson, C., Malandro, N., Cohen, A., et al. (2013). GITR pathway activation abrogates tumor immune suppression through loss of regulatory T-cell lineage stability. *Cancer Immunology Research*, 1(5), 320-231. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0086.
- [104] Mitsui, J., Nishikawa, H., Muraoka, D., Wang, L., Noguchi, T., Sato, E., et al. (2010). Two distinct mechanisms of augmented antitumor activity by modulation of immunostimulatory/inhibitory signals. *Clinical Cancer Research*, 16(10), 2781-2791. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3243. Epub 2010 May 11.
- [105] Powderly, J. D., Gutierrez, M., Wang, D., Chae, Y. K., Mahadevan, D., Braiteh, F. S., et al. (2015) .Aphase 1b/2, openlabel study to evaluate the safety and tolerability of MEDI6469 in combination with immune therapeutic agents or therapeutic mAbs in patients with selected advanced solid tumors or aggressive B-cell lymphomas. *Journal of Clinical Oncology*, 33, supplement, abstract TPS3091, 2015, Proceedings of the ASCO Annual Meeting.
- [106] Vinay, D. S., & Kwon, B. S. (2014). 4-1BB (CD137), an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy. *BMB Reports*, 47(3), 122-129.
- [107] Bartkowiak, T., & Curran, M. A. (2015). 4-1BB agonists: multi-potent potentiators of tumor immunity. *Frontiers in Oncology*, 5(117), 16 pages. doi: 10.3389/fonc.2015.00117. eCollection 2015.
- [108] Cepowicz, D., Gryko, M., Zaręba, K., Stasiak-Bermuta, A., & Kędra, B. (2011). Assessment of activity of an adhesion molecule CD134 and CD137 in colorectal cancer patients. *Polski Przegląd Chirurgiczny*, 83(12), 641-645. doi: 10.2478/v10035-011-0102-9.
- [109] Dimberg, J., Hugander, A., & Wågsäter, D. (2006). Expression of CD137 and CD137 ligand in colorectal cancer patients. *Oncology Reports*, 15(5), 1197-1200.
- [110] Jung, H. W., Choi, S. W/, Choi, J. I. L, & Kwon, B. S. (2004). Serum concentrations of soluble 4-1BB, and 4-1BB ligand correlated with the disease severity in rheumatoid arthritis. *Experimental and Molecular Medicine*, 36(1), 13-22.
- [111] Chen, S. H., Pham-Nguyen, K. B., Martinet, O., Huang, Y., Yang, W., Thung, S. N., et al. (2000). Rejectionof disseminated metastases of colon carcinoma by synergism of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation. *Molecular Therapy*, 2(1), 39-46.

- [112] Mazzolini, G., Murillo, O., Atorrasagasti, C., Dubrot, J., Tirapu, I., Rizzo, M., et al. (2007). Immunotherapy and immunoescape in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, *13*(44), 5822-5831.
- [113] Elgueta, R., Benson, M. J., de Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y., & Noelle, R. J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunological Reviews*, *229*(1), 152-172.
- [114] Barth, R. J., Fisher, D. A., Wallace, P. K., Channon, J. Y., Noelle, R. J., Gui, J., et al. (2010). A randomized trial of ex vivo CD40L activation of a dendritic cell vaccine in colorectal cancer patients: tumor-specific immune responses are associated with improved survival. *Clinical Cancer Research*, *16*(22), 5548-5556. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2138. Epub 2010 Sep 30.
- [115] Honeychurch, J., Cheadle, E. J., Dovedi, S. J., & Illidge, T. M. (2015). Immuno-regulatory antibodies for the treatment of cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *15*(6), 787-801.
- [116] Baxendale, A. J., Dawson, C. W., Stewart, S. E., Mudaliar, V., Reynolds, G., Gordon, J., et al. (2005). Constitutive activation of the CD40 pathway promotes cell transformation and neoplastic growth. *Oncogene*, *24*(53), 7913-7923.
- [117] Georgopoulos, N. T., Merrick, A., Scott, N., Selby, P. J., Melcher, A., & Trejdosiewicz, L. K. (2007). CD40-mediated death and cytokine secretion in colorectal cancer: a potential target for inflammatory tumour cell killing. *International Journal of Cancer*, *121*(6), 1373-1381.
- [118] Shaw, N. J., Georgopoulos, N. T., Southgate, J., & Trejdosiewicz, L. K. (2005). Effects of loss of p53 and p16 function on life span and survival of human urothelial cells. *International Journal of Cancer*, *116*(4), 634-639.
- [119] Palmer, D. H., Hussain, S. A., Ganesan, R., Cooke, P. W., Wallace, D. M., Young, L. S., et al. (2004). CD40 expression in prostate cancer: a potential diagnostic and therapeutic molecule. *Oncology Reports*, *12*(4), 679-682.
- [120] Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., et al. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of Experimental Medicine*, *192*(7), 1027-1034.
- [121] Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., et al. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*, *2*(3), 261-268. PMID: 11224527.

- [122] Gardner, E. J. (1951). A genetic and clinical study of intestinal polyposis, a predisposing factor for carcinoma of the colon and rectum. *The American Journal of Human Genetics*, 3(2), 167-176.
- [123] Okazaki, T., & Honjo, T. (2007). PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *International Immunology*, 19(7), 813-824. PMID: 17606980.
- [124] Lv, F., Gao, Y. F., Zhang, Z. H., Zhang, T. C., Pan, F. M., Cui, M. F., et al. (2011). Polymorphisms in programmed death-1 gene are not associated with chronic HBV infection in Chinese patients. *World Journal of Hepatology*, 3(3), 72-78. doi: 10.4254/wjh.v3.i3.72.
- [125] Erfani, N., Razmkhah, M., Talei, A. R., Pezeshki, A. M., Doroudchi, M., Monabati, A., et al. (2006). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 promoter variants in breast cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 165(2), 114-120.
- [126] Ohigashi, Y., Sho, M., Yamada, Y., Tsurui, Y., Hamada, K., Ikeda, N., et al. (2005). Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(8), 2947-2953.
- [127] Finger, L. R., Pu, J., Wasserman, R., Vibhakar, R., Louie, E., Hardy, R. R., et al. (1997). The human PD-1 gene: complete cDNA, genomic organization, and developmentally regulated expression in B cell progenitors. *Gene*, 197(1-2), 177-187.
- [128] Kong, E. K., Prokunina-Olsson, L., Wong, W. H., Lau, C. S., Chan, T. M., Alarcón-Riquelme, M., et al. (2005). A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese. *Arthritis and Rheumatism*, 52(4), 1058-1062.
- [129] Hua, Z., Li, D., & Xiang, G. (2011). PD-1 polymorphisms are associated with sporadic breast cancer in Chinese Han population of Northeast China. *Breast Cancer Research and Treatment*, 129(1), 195-201. doi: 10.1007/s10549-011-1440-3.
- [130] Lee, S. H., Lee, Y. A., Woo, D. H., Song, R., Park, E. K., Ryu, M. H., et al. (2006). Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korean population. *Arthritis Research Therapy*, 8(6), R163.
- [131] Lin, S. C., Yen, J. H., Tsai, J. J., Tsai, W. C., Ou, T. T., Liu, H. W., et al. (2004). Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 50(3), 770-775.
- [132] Liu, X., Hu, L. H., Li, Y. R., Chen, F. H., Ning, Y., & Yao, Q. F. (2011). Programmed cell death 1 gene polymorphisms is associated with ankylosing

- spondylitis in Chinese Han population. *Rheumatology International*, 31(2), 209-213.
- [133] Meng, Q., Liu, X., Yang, P., Hou, S., Du, L., Zhou, H., et al. (2009). PDCD1 genes may protect against extraocular manifestations in Chinese Han patients with Vogt–Koyanagi–Harada syndrome. *Molecular Vision*, 15, 386-392.
- [134] Savabkar, S., Azimzadeh, P., Chaleshi, V., Nazemalhosseini Mojarad, E., & Aghdaei, H. A. (2013). Programmed death-1 gene polymorphism (PD-1.5 C/T) is associated with gastric cancer. *Gastroenterology Hepatology from Bed to Bench*, 6(4), 178-182.
- [135] Tang, W., Chen, Y., Chen, S., Sun, B., Gu, H., & Kang, M. (2015). Programmed death-1 (PD-1) polymorphism is associated with gastric cardia adenocarcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(5), 8086-8093.
- [136] Yousefi, A., Karimi, M., Shamsdin, S., Mehrabani, D., Hosseini, S., Erfani, N., et al. (2013). PD-1 Gene Polymorphisms in Iranian Patients with Colorectal Cancer. *Laboratory Medicine*, 44(3), 241-244.
- [137] Haghshenas, M. R., Naeimi, S., Talei, A., Ghaderi, A., & Erfani, N. (2011). Program death 1(PD1) haplotyping in patients with breast carcinoma. *Molecular Biology Reports*, 38(6), 4205-4210.
- [138] Qiu, H., Zheng, L., Tang, W., Yin, P., Cheng, F., & Wang, L. (2014). Programmed death-1 (PD-1) polymorphisms in Chinese patients with esophageal cancer. *Clinical Biochemistry*, 47(7-8), 612-617.
- [139] Li, Z., Li, N., & Zhu, Q. (2013). Genetic variations of PD1 and TIM3 are differentially and interactively associated with the development of cirrhosis and HCC in patients with chronic HBV infection. *Infection Genetics and Evolution*, 14, 240-246. doi: 10.1016/j.meegid.2012.12.008.
- [140] Li, X. F., Jiang, X. Q., Zhang, J. W., & Jia, Y. J. (2016). Association of the programmed cell death-1 PD1.5 C>T polymorphism with cervical cancer risk in a Chinese population. *Genetics and Molecular Research*, 15(1), gmr.15016357.
- [141] Zlobec, I., Karamitopoulou, E., Terracciano, L., Piscuoglio, S., Iezzi, G., Muraro, M. G., et al. (2010). TIA-1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein improves the prognostic performance of CD8 in mismatch repair-proficient colorectal cancer. *PLOS One*, 5(12), 4282.
- [142] Liang, M., & Fu, J. (2008). Triptolide inhibits interferon-gamma-induced programmed death-1-ligand 1 surface expression in breast cancer cells. *Cancer Letters*, 270(2), 337-341. doi: 10.1016/j.canlet.2008.05.025.
- [143] Dehaghani, A. S., Kashef, M. A., Ghaemnia, M., Sarraf, Z., Khaghanzadeh, N., Fattahi, M. J., et al. (2009). PDCD1, CTLA-4 and p53 gene

polymorphism and susceptibility to gestational trophoblastic diseases. *The Journal of Reproductive Medicine*, 54(1), 25-31.

- [144] Yin, L., Guo, H., Zhao, L., & Wang, J. (2014). The programmed death-1 gene polymorphism (PD-1.5 C/T) is associated with non-small cell lung cancer risk in a Chinese Han population. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(12), 5832-5836. eCollection 2014.
- [145] Ivansson, E. L., Juko-Pecirep, I., & Gyllensten, U. B. (2010). Interaction of immunological genes on chromosome 2q33 and ifng in susceptibility to cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 116(3), 544-548.
- [146] Prokunina, L., Castillejo-Lopez, C., Oberg, F., Gunnarsson, I., Berg, L., Magnusson, V., et al. (2002). A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nature Genetics*, 32(4), 666-669.
- [147] Ferreiros-Vidal, I., Gomez-Reino, J. J., Barros, F., Carracedo, A., Carreira, P., Gonzalez-Escribano, F., et al. (2004). Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus: evidence of population-specific effects. *Arthritis and Rheumatism*, 50(8), 2590-2597.
- [148] Nielsen, C., Hansen, D., Husby, S., Jacobsen, B. B., & Lillevang, S. T. (2003). Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens*, 62(6), 492-497.
- [149] Ni, R., Ihara, K., Miyako, K., Kuromaru, R., Inuo, M., Kohno, H., et al. (2007). PD-1 gene haplotype is associated with the development of type 1 diabetes mellitus in Japanese children. *Human Genetics*, 121(2), 223-232.
- [150] Prokunina, L., Padyukov, L., Bennet, A., de Faire, U., Wiman, B., Prince, J., et al. (2004). Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope. *Arthritis and Rheumatism*, 50(6), 1770-1773.
- [151] Kroner, A., Mehling, M., Hemmer, B., Rieckmann, P., Toyka, K. V., Maurer, M., et al. (2005). A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 58(1), 50-57.
- [152] Tang, W., Wang, Y., Jiang, H., Liu, P., Liu, C., Gu, H., et al. (2015). Programmed death-1 (PD-1) rs2227981 C > T polymorphism is associated with cancer susceptibility: a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(12), 22278-22285.
- [153] Cooper, J. D., Smyth, D. J., Bailey, R., Payne, F., Downes, K., Godfrey, L. M., et al. (2007). The candidate genes TAF5L, TCF7, PDCD1, IL6 and ICAM1 cannot be excluded from having effects in type 1 diabetes. *BMC Medical Genetics*, 8(71), 14 pages. doi: 10.1186/1471-2350-8-71.

- [154] Dong, W., Gong, M., Shi, Z., Xiao, J., Zhang, J., & Peng, J. (2016). Programmed Cell Death-1 Polymorphisms Decrease the Cancer Risk: A Meta-Analysis Involving Twelve Case-Control Studies. *PLoS One*, *11*(3), 19 pages. DOI:10.1371/journal.pone.015244.
- [155] Braun-Prado, K., & Petzl-Erler, M. L. (2007). Programmed cell death 1 gene (PDCD1) polymorphism and pemphigus foliaceus (fogo selvagem) disease susceptibility. *Genetics and Molecular Biology*, *30*(2), 314-321.
- [156] Miller, S., Dykes, D., & Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, *16*(3), 1215.
- [157] Naghoosi, H., Mohebbi, S. R., Tahaei, S. M. E., Azimzadeh, P., Romani, S., Hosseini Razavi, A., et al. (2012). Lack of the association between single nucleotide polymorphism in programmed cell death 1 gene and susceptibility to chronic hepatitis B infection in the Iranian population. *Koomesh Journal*, *14*(1), 91-96.

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Yosra, Lamami.
Doğum Tarihi/Yeri : 08/12/1983/ Tripoli, Libya.
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : yosralamami@gmail.com.



Eğitim Geçmişi

Lise : Sukina bent Alhussien (2001)
Lisans : Zooloji Tripoli University, Tripoli, Libya (2005).

İş Deneyimi

Mikrobiyoloji Araştırma Grubu, Biyoteknoloji Araştırma Merkezi, Twisha, Tripoli, Libya. 2007-2008
Hücre Biyolojisi Araştırma Grubu, Biyoteknoloji Araştırma Merkezi, Twisha, Tripoli, Libya. 2008-2017 (halen)