



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**MAKROFAJ SİGLEC-10-CD24 TÜMÖR "BENİ YEME"
SİNYALİNİN 12E9 MONOKLONAL ANTİKORU İLE
İMMUNOTERAPÖTİK HEDEFLENMESİ**

Sebiha Esra KOÇAK

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

ANKARA

2022

Kabul ve Onay

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Sebiha Esra KOÇAK tarafından hazırlanan “Makrofaj Siglec-10- CD24 Tümör “beni yeme” Sinyalinin 12E9 Monoklonal Antikoru ile İmmunoterapötik Hedeflenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03.11.2022

İmza

Doç. Dr. Oya Sena AYDOS
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Doç. Dr. Hasibe VERDİ
Başkent Üniversitesi
Üye

İmza

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Kabul Ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler Ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xvi

1.GİRİŞ	1
1.1. Kanser	1
1.2. Bağışıklık Sistemi	4
1.3. Tümör Mikroçevresi ve Bağışıklık Sistemi	7
1.4. Mononükleer Fagosit Sistemi	8
1.5. Fagositoz	10
1.6. Monosit	12
1.7. Makrofajlar	13
1.7.1. M1 Makrofajlar (Klasik Olarak Aktive Olan Makrofajlar)	14
1.7.2. M2 Makrofajlar (Alternatif Olarak Aktive Olan Makrofajlar)	15
1.7.3. Tam (Tümör İlişkili Makrofajlar)	16
1.7.3.1. Tam'ın (Tümör ilişkili makrofajların) protümöral işlevi	19
1.7.3.2. Tam'ın (Tümör ilişkili makrofajların) antitümöral işlevi	20
1.7.3.3. Tam (Tümör ilişkili makrofajlar) için belirteçler	21
1.8. Makrofajlar ve Mikroglia'nın Kökeni ve İşlevi	22
1.8.1. Makrofajların ve Mikroglia'nın Polarizasyonu	24
1.9. Gliomada Makrofajlar ve Mikroglia	25
1.10. Merkezi Sinir Sistemi ve Bağışıklık Sistemi	27
1.11. Glioblastoma Multiforme	30
1.11.1. Glioblastomada Genomik Değişiklikler	32
1.11.1.1. IDH mutasyonları	33
1.11.1.2. p53 mutasyonu	34
1.11.1.3. PTEN mutasyonu	34
1.11.1.4. EGFR amplifikasyonu	35
1.11.1.5. PDGFRA amplifikasyonu	35
1.11.1.6. TERT promotör mutasyonu	36
1.11.1.7. MGMT hipermetilasyonu	36
1.12. GBM'de (Glioblastoma Multiforme'de) Mikroçevre	36
1.12.1. GBM (Glioblastoma Multiforme) Mikroçevresinin Hücresel Bileşenleri	39
1.12.2. GBM (Glioblastoma Multiforme)'de Morfolojik Heterojenlik	42
1.12.3. Glioma Hücre Motilitesinin Moleküler Mekanizmaları:	43
1.12.4. Gen İfadesine Dayalı GBM'lerin Moleküler Sınıflandırması	46
1.13. Gliomajenez	50
1.14. GBM'de (Glioblastoma Multiforme)'de Vaskülarizasyon	51
1.14.1. GBM'de (Glioblastoma Multiforme)'de Kan-Beyin Bariyeri	53

1.14.2. Astrositler	54
1.14.3. Nöronlar	56
1.15. TMZ (Temozolomid)	56
1.15.1. MGMT (Metil Guanin Metil Transferaz)	59
1.15.2. Alkilleyici Ajan ve MGMT (Metil Guanin Metil Transferaz) Promotör Metilasyonu	62
1.16. CSC (Kanser Kök Hücreleri)	63
1.16.1. CSC'lerin (Kanser Kök Hücrelerin) Genel Özelliği	63
1.16.2. Klonal Evrim veya Stokastik Model	69
1.16.3. Kanser Kök Hücre (CSC) veya Hiyerarşik Model	70
1.16.4. CSC (Kanser Kök Hücre) ve Bağışıklık Sistemi Etkileşimi	72
1.17. CD24	75
1.18. Siglec'ler (Sialik Asit Bağlayıcı Ig Benzeri Lektin)	78
1.18.1. Siglec-10 (Sialik Asit Bağlayıcı Ig Benzeri Lektin 10)	83
1.18.2. CD24/Siglec-10 Etkileşimi	83
1.19. İmmünoterapi	87

2. GEREÇ VE YÖNTEM	89
2.1. THP-1 Hücrelerinin Stoktan Çıkartılması	89
2.2. THP-1 Hücre Kültürü:	89
2.2.1. THP-1 Hücrelerinin Kültür Ortamında Çoğaltılması	89
2.2.2. THP-1 Hücrelerinden M0 Makrofaj Eldesi	90
2.2.3. THP-1 Monositik Kaynaklı M0 Makrofajların M1 ve M2 (U266 sup/IL4) Makrofajlara Polarize Edilmesi	90
2.2.4. M0, M1 ve M2 (U266 sup) Makroj Hücrelerinde CD11b, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 Belirteçlerinin Akış Sitometri Analizi	91
2.2.4.1. M0, M1 ve M2(IL4) Makrofaj Hücrelerinin U87WT, U87CD24 Süpernatantları ile Birlikte Muamelesi Sonucu CD206 İfadesi	91
2.3. Agoroz Jel Elektroferezi	92
2.4. İzole Edilen RNA'dan cDNA Sentezi	92
2.5. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR)	93
2.6. U87 MG Hücrelerinin Kültürü	94
2.7. M1, M2(IL4) makrofaj hücreleri ve U87WT hücrelerin DİD-DİO Boyama Protokolü	95
2.8. M0, M1 ve M2(IL4) Makrofaj Hücrelerinin U87WT, U87CD24 Hücreleri ile Ko-Kültürü:	96
2.9. MTT 3-(4,5-Dimetil tiyazol-2) 2,5-Difeniltetrazolyum Bromür Testi	96
2.10. M0, M1 ve M2(IL4) Makrofaj Hücreleri ile U87WT-U87CD24 Hücrelerinin 12E9 Antikoru ile Ko-kültürü	96
2.11. Floresan Mikroskopisi ile Fagositoz Yüzdesinin Belirlenmesi Protokolü	97
2.12. Konfokal Mikroskopisi ile Fagositoz Görüntüsü Alma	97

3. BULGULAR	98
3.1. THP-1 Monosit Hücre Eldesi	98
3.2. THP-1 Hücrelerinden M0 Makrofaj Eldesi	98
3.3. THP-1 Monositik Kaynaklı Makrofajların M1, M2(U266), M2(IL4) Makrofajlara Polarize Edilmesi	99
3.4. M0, M1, M2(U266 sup) Makrofaj Hücrelerinin CD11b, CD11c, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 Akış Sitometri ve Histogram Değerleri	100
3.4.1. M0, M1 ve M2(IL4) Makrofaj Hücrelerinin U87WT, U87CD24 Süpernatantları ile Birlikte Muamelesi Sonucu Akış Sitometri CD206 İfadesi	108

3.4.2. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR	112
3.4.3. M1, M2(U266 sup) Makrofaj Hücrelerinin DİD-Boyaması Sonucu Akış Sitometri Analizi	116
3.5. Antikor Etkinliğinin Araştırılması	117
3.5.1. MTT 3-(4,5-Dimetil tiyazol-2) 2,5-Difeniltetrazolyum Bromür Testi	117
3.6. M1, M2(U266sup) Makrofaj Hücreleri ile U87CD24 Hücrelerinin Ko kültür Analizi	118
3.6.1. M1, M2(U266 sup) Makrofaj Hücreleri ile U87CD24 Hücrelerinin 12E9 Monoklonal Antikoru ile Ko-kültür Analizi	119
3.7. Floresan Mikroskopi ile Fagositoz Yüzdesinin Belirlenmesi ve Konfokal Mikroskopi ile Fagositoz Yüzdesi Belirlenen Hücrelerin Görüntülerinin Alınması	120
4. TARTIŞMA	128
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	133
ÖZET	137
SUMMARY	138
KAYNAKLAR	139

Önsöz

Yüksek lisans tez çalışmamı gerçekleştirme fırsatı tanıyan ve bu süreçte bilgisiyle, tecrübesiyle her zaman ılık tutan, desteğiyle hep yanımda olan sayın danışman hocam Prof.Dr. Asuman SUNGUROğLU'na, immünoloji, kanser ve hücre biyolojisi konusundaki birikimlerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemediği için teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda kullandığım teknikleri öğrenmemde büyük emeği geçen, her aşamada bilgisi ve hoşgörüsüyle büyük katkı sağlayan Dr. Tülin ÖZKAN'a teşekkür ederim.

Deneylerimin her aşamasında, yardımlarını benden esirgemeyen Araştırma Görevlisi Nurbanu GÖNÜLKIRMAZ'a teşekkür ederim.

Aynı zamanda çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan Yüksek lisans arkadaşlarımla Ayla KURT'a, Sunay ZENGİNER'e ve Doktora arkadaşım Nazila FARHANGZAD'a teşekkür ederim. Çalışmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji ailesine teşekkür ederim.

Bana olan sevgilerini, sabırlarını ve desteklerini esirgemeyen, eğitim hayatım boyunca hep yanımda olan aileme teşekkürü bir borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

APC	Antijen Sunan Hücre
AKT	Protein kinaz B
Arg-1	Arginaz-1
B2M	Beta 2 mikroglobulin
BMDM	Kemik iliği kaynaklı makrofaj
CCL	Kemokin (C-C motif) ligandı
CCL 2	Kemokin (C-C motif) ligand 2
CCL 11	Kemokin (C-C motif) ligand 11
CCL 16	Kemokin (C-C motif) ligand 16
CCL 17	Kemokin (C-C motif) ligand 17
CCL 21	Kemokin (C-C motif) ligand 21
CD3	Farklılaşma kümesi 3
CD8	Farklılaşma kümesi 8
CD14	Farklılaşma kümesi 14
CD24	Farklılaşma kümesi 24
CD33	Farklılaşma kümesi 33
CD44	Farklılaşma kümesi 44
CD68	Farklılaşma kümesi 68
CD80	Farklılaşma kümesi 80
CD86	Farklılaşma kümesi 86
CD163	Farklılaşma kümesi 163
CD200	Farklılaşma kümesi 200
CD206	Farklılaşma kümesi 206
CNS	Merkezi Sinir Sistemi
CpG	Sitozin fosfat guanin
CSC	Kanser Kök Hücresi
CTLA 4	Sitotoksik T lenfosit ilişkili protein 4
CTL	Sitotoksik T lenfosit
DC	Dendritik hücre
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA	Deoksiribo nükleik asit
ECM	Hücre dışı matris
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	Epitelyal mezenkimal değişim
FBS	Fetal sığır serum
FGF2	Fibroblast büyüme faktörü
Foxp3	Forkhead box protein 3
GalNAc	N asetil- galaktoz amin
GAM	Glioma ile ilişkili makrofaj/mikroglia
GBM	Glioblastoma Multiforme
GPI	Glikosil fosfoditil inositol
GSC	Glioma Kök Hücre
HIF	Hipoksi ile indüklenebilir faktör
HSP70	Isı şok proteini 70
HSP90	Isı şok proteini 90
Iba 1	İyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekül 1
IDH-1	İzositrat dehidrogenaz-1
IDO	İndoleamin 2,3-dioksijenaz
IFN γ	İnterferon gama
Ig	Immunoglobulin
IL-1	İnterlökin 1
IL-4	İnterlökin-4
IL-6	İnterlökin-6
IL-12	İnterlökin-12
IL-13	İnterlökin-13
IL-1 β	İnterlökin-1 β
IC50	Hücrelerin % 50'sini öldüren konsantrasyon
ITAM	İmmun reseptör tirozin bazlı aktivasyon motifi
ITIM	İmmun reseptör tirozin bazlı inhibisyon motifi
KBB	Kan Beyin Bariyeri
LPS	Lipopolisakkarit

ManNAc	N asetil- d- mannoz amin
M1	Klasik olarak aktive olan makrofaj
M2	Alternatif olarak aktive olan makrofaj
MDSC	Miyeloid türevli baskılayıcı hücreler
MGMT	Metil guanin metil transferaz
MHC 1	Majör doku uygunluk kompleksi 1
MHC 2	Majör doku uygunluk kompleksi 2
MMP2	Matris metaloproteinaz 2
MMP9	Matris metaloproteinaz 9
MTOR	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
MTT	3-(4,5-Dimetil tiyazol-2) 2,5-difeniltetrazolyum bromür
MYD88	Miyeloid Farklılaştırıcı faktör 88
Neu5Ac	N- asetil nöraminik asit
Neu5Gc	N- glikol nöraminik asit
NF-kB	Nükleer faktör-kappa B
NK	Doğal öldürücü hücreler
NLGN3	Nöroligin 3
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
NOS 2	Nitrik oksit sentaz 2
NSC	Nöral kök hücre
OCT4	Oktamer bağlanma transkripsiyon faktörü
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PGE2	Prostaglandin E2
PDGFRA	Platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü
PDL-1	Programlanmış hücre ölüm ligandı-1
PDL-2	Programlanmış hücre ölüm ligandı-2
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
PKB	Protein kinaz b
PMA	Forbol 12-miristat 13-asetat
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5 bifosfat
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5 fosfat

PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
RT-PCR	Gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyon
ROS	Reaktif oksijen türevi
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
Ser/Thr	Serin treonin kinaz
Siglec	Sialik Asit Bağlayıcı Ig Benzeri Lektin
Siglec 10	Sialik Asit Bağlayıcı Ig Benzeri Lektin 10
SHP2	SH2 bölgesi içeren fosfataz 2
SOSC	Sitokin sinyal supresörleri
SOX2	SRY ilişkili yüksek hareketli grup (HMG) protein
STAT-6	Sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü-6
SUP	Supernatant
TAM	Tümör ilişkili makrofaj
TCGA	Kanser genom atlas
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü- β
TGFB	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
TNF- α	Tümör nekroz faktör- α
TH2	T yardımcı hücre 2
THP -1	Akut monositik insan lösemi hücresi- 1
TME	Tümör mikroçevresi
TMZ	Temozolomid
TLR 4	Toll benzeri reseptör 4
Treg	T düzenleyici hücre
U266sup	U266 hücre kültür supernatant
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Kanser Gelişim Süreci	2
Şekil 1.2. Kanser Belirtileri	3
Şekil 1.3. Normal fizyolojik koşullar altında doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık tepkisini aktive eden düzenleyici yolların basitleştirilmiş bir şematik diyagramı	5
Şekil 1.4. Kanser immüno düzenleme	6
Şekil 1.5. Tümör İmmün Kaçış Mekanizması	8
Şekil 1.6. Mononükleer Fagosit Sistemi	9
Şekil 1.7. Makrofafların Fagositik Mekanizmaları	11
Şekil 1.8. Monositin hematopoietik kök hücre progenitöründen olgunlaşması	12
Şekil 1.9. Monosit uyaranları ve Makrofaj Fonksiyonları	14
Şekil 1.10. Tümör Gelişiminde M1 ve M2 Makrofajların Fonksiyonları	16
Şekil 1.11. TAM'ların Tümör İlerlemesi Üzerindeki Etkileri	18
Şekil 1.12. GBM'deki Makrofajların Pro-tümör İşlevleri	20
Şekil 1.13. Tümör İlişkili Makrofajların Fonksiyonları	21
Şekil 1.14. Şekil 1. Makrofaj Polarizasyonu	22
Şekil 1.15. Polarize makrofajlara ait farklı reseptör, sitokin, kemokin ve efektör fonksiyonları	25
Şekil 1.16. GSC'ler tarafından glioblastoma patogenezi ve ilerlemesinde düzenlenen temel fonksiyonlara genel bakış	32
Şekil 1.17. Üç kritik sinyal yolunda sık görülen genetik değişiklikler	33
Şekil 1.18. Glioblastoma Mikroçevresi	39
Şekil 1.19. GBM'in İnflamatuar Tümör Mikroçevresi	42
Şekil 1.20. Glioma alt tipi patogenezinde gözlenen genetik değişikliklerin şematik gösterim	46
Şekil 1.21. GBM 'in Mutasyonel ve Epigenetik Sınıflandırılması	50
Şekil 1.22. Nörogenez ve Gliomagenез Arasındaki İlişki	51
Şekil 1.23. GBM'de (Glioblastoma Multiforme)'de Bozulmuş Kan Beyin Bariyeri	54
Şekil 1.24. Temozolomid Mekanizması	57
Şekil 1.25. Temozolomid Direncinde Rol Oynayan Ana Mekanizmalar	59
Şekil 1.26. TMZ kaynaklı O6-metilguanin Lezyonlarının İşlenmesi	61
Şekil 1.27. Temozolomidin etki mekanizması	63

Şekil 1.28. Kanser kök hücresi ve TME arasındaki ilişki	67
Şekil 1.29. Kanser Kök Hücrelerinin Özellikleri	69
Şekil 1.30. Kanserin Kökeni ve Modelleri	71
Şekil 1.31. Glioblastoma kaynaklı kök hücreler	72
Şekil 1.32. Bağışıklık hücreleri ile kanser kök hücre (CSC) etkileşimi	75
Şekil 1.33. İnsan Hücrelerinde CD24 İfadesi	76
Şekil 1.34. CD24'nin Akt ve ERK aktivasyonu yoluyla kanser gelişimini indükleyen EGFR sinyal yolunu aktive etmesi	77
Şekil 1.35. CD24 Glikoproteini	78
Şekil 1.36. İnsan Siglec Ailesi Reseptörleri	79
Şekil 1.37. Tümör Oluşumu Üzerine Siglec-Sialoglikan Değişikliği	80
Şekil 1.38. Sialik asit, üretimden hücre yüzeyi ifadesine, desialilasyon yoluyla uzaklaştırma, alım, lizozomal sindirim ve yeniden kullanıma kadar olan döngü	82
Şekil 1.39. Farklı Mononükleer Fagositler Tarafından Siglec İfadesi	82
Şekil 1.40. CD24 /Siglec-10 Etkileşimi	84
Şekil 1.41. CD24/ Siglec-10 Etkileşiminin Moleküler Mekanizması	85
Şekil 1.42. CD24 Monoklonal Antikoru ile Tümör Temizlenmesi	85
Şekil 1.43. HMGB1, CD24 ve Siglec-10 tarafından oluşturulan bir trimoleküler kompleks	86
Şekil 1.44. CD24 - Siglec-10 sinyalleşmesinin bloke edilmesi yoluyla tümörle ilişkili makrofaj tarafından kanser hücresi yok etme mekanizması	88
Şekil 2.1. GBM primer hasta hücrelerinin CD133-PE (kırmızı), DAPI (mavi), ve CD24-FITC (yeşil) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü.	94
Şekil 2.2. CD24-pLenti-C-GFP ifade eden U87 GBM hücre serilerinin floresan mikroskop altında görüntülenmesi	95
Şekil 3.1. THP-1 monosit hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü A-10X B-20X	98
Şekil 3.2. THP-1 monosit hücrelerinin 24 ve 48 saat boyunca 100 nM PMA ile uyarılmasıyla elde edilen MO makrofaj hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri A-10X B-20X	98
Şekil 3.3. THP-1 monosit hücrelerinin 72 saat boyunca 100 nM PMA ile uyarılmasıyla elde edilen MO makrofaj hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri A-10X B-20X	99
Şekil 3.4. MO makrofaj hücrelerinin 20 ng/mL IFN- γ + 10 pg/mL LPS ile 24 saat uyarımı ile elde edilen M1 makrofaj hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri A-10X B-20X	99
Şekil 3.5. MO makrofaj hücrelerinin U266 hücre kültür süpernatantı ile 24 saat uyarımı ile elde edilen M2(U266 sup) makrofaj hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri A-10X B-20X	100

Şekil 3.6. MO makrofaj hücrelerinin 48 saat boyunca 20ng/ml IL-4 ile uyarımı ile elde edilen M2(IL4) makrofaj hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri A-10X B-20X	100
Şekil 3.7. İn vitro polarize ettiğimiz M0 Makrofaj Hücrelerinin CD11b, CD14, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 Akış Sitometri İfadeleri	101
Şekil 3.8. İn vitro polarize ettiğimiz M0 makrofajların CD11b, CD14, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 ekspresyon histogramları	102
Şekil 3.9. İn vitro polarize ettiğimiz M1 Makrofaj Hücrelerinin CD11b, CD14, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 Akış Sitometri İfadeleri	103
Şekil 3.10. İn vitro polarize ettiğimiz M1 makrofajların CD11b, CD14, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 ekspresyon histogramları	105
Şekil 3.11. İn vitro polarize ettiğimiz M2 Makrofaj Hücrelerinin CD11b, CD14, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 Akış Sitometri İfadesi	106
Şekil 3.12. İn vitro polarize ettiğimiz M2 makrofajların CD11b, CD14, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 ekspresyon histogramları	107
Şekil 3.13. MO, M1, M2(U266sup) Makrofaj Hücrelerinde CD11B, CD11C, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 ifadelerinin bar grafiği	108
Şekil 3.14. M0 Makrofaj hücrelerinin akış sitometride CD206 ifadesi	108
Şekil 3.15. M0 Makrofaj hücreleri ile U87WT süpernatantlarının akış sitometride CD206 ifadesi	109
Şekil 3.16. M0 Makrofaj hücreleri ile U87CD24 süpernatantlarının akış sitometride CD206 ifadesi	109
Şekil 3.17. M1 Makrofaj hücrelerinin akış sitometride CD206 ifadesi	109
Şekil 3.18. M1 Makrofaj hücreleri ile U87WT hücre süpernatantının akış sitometride CD206 ifadesi	110
Şekil 3.19. M1 Makrofaj hücreleri ile U87CD24 hücre süpernatantının akış sitometride CD206 ifadesi	110
Şekil 3.20. M2(IL4) Makrofaj hücrelerinin akış sitometride CD206 ifadesi	110
Şekil 3.21. M2(IL4) Makrofaj hücreleri ile U87WT hücre süpernatantının akış sitometride CD206 ifadesi	111
Şekil 3.22. M2(IL4) Makrofaj hücreleri ile U87CD24 hücre süpernatantının akış sitometride CD206 ifadesi	111
Şekil 3.23. M0, M0+U87WTsup, M0+U87CD24sup, M1, M1+U87WTsup, M1+U87CD24sup, M2(IL4), M2(IL4) +U87WTsup, M2(IL4) +U87CD24sup uygulanan hücrelerde CD206 ifadesinin Akış Sitometri Grafiği	111

Şekil 3.24. M0, M1 makrofajlarda IL1B ekspresyon analizi	112
Şekil 3.25. M2 makrofajlarda (U266 sup) IL10 ekspresyon analizi	112
Şekil 3.26. M1, M2 (U266 sup) makrofajlarda ve THP-1 monosit hücrelerinde TGFB ekspresyon analizi	113
Şekil 3.27. M2 (U266 sup) makrofajlarda ve THP-1 monosit hücrelerinde TNFA ekspresyon analizi	113
Şekil 3.28. M0, M1 Makrofaj Hücreleri ile THP-1 monosit hücrelerinin CD80 ekspresyon analizi	114
Şekil 3.29. M0, M1 Makrofaj Hücreleri ile THP-1 monosit hücrelerinin CD86 ekspresyon analizi	114
Şekil 3.30. M1, M2 (U266 sup) ile THP-1 monosit hücrelerinin Siglec10 ekspresyon analizi	115
Şekil 3.31. M0+(U87CD24sup), M1, M1+(U87WTsup), M1+(U87CD24sup), M2(IL4), M2(IL4) +(U87WTsup) hücrelerinin Siglec10 ekspresyon analizi	115
Şekil 3.32. M1 makrofaj hücrelerinin (DİD) boyaması sonucu akış sitometri ile yüzdesinin tespit edilmesi	117
Şekil 3.33. M2 (U266 sup) makrofaj hücrelerinin (DİD) boyanması sonucu akış sitometri ile yüzdesinin tespit edilmesi	117
Şekil 3.34. M1 Makrofaj Hücrelerine Farklı Konsantrasyonlarda Uygulanan 12E9 Monoklonal Antikoru MTT Testi ile İfade Edilen % Canlılık Grafiği	118
Şekil 3.35. M2(U266sup) Makrofaj Hücrelerine Farklı Konsantrasyonlarda Uygulanan 12E9 Monoklonal Antikoru MTT Testi ile İfade edilen % Canlılık Grafiği	118
Şekil 3.36. M1 makrofaj (DİD) hücreler ve U87CD24 (GFP) işaretli hücrelerin ko kültürü ile elde edilen 10X inverted mikroskop görüntüsü	119
Şekil 3.37. M2 makrofaj (DİD) hücreler ve U87CD24 (GFP) işaretli hücrelerin ko kültürü ile elde edilen 10X inverted mikroskop görüntüsü	119
Şekil 3.38. M1 makrofaj hücreler ve U87CD24 GFP hücrelerin 12E9 Monoklonal Antikoru ile 24 saat ko kültürü sonucu elde edilen 10x inverted mikroskop görüntüsü	120
Şekil 3.39. M2(U266 sup) (DİD) makrofaj hücreler ve U87CD24 (GFP) hücrelerin 12E9 Monoklonal Antikoru ile 24 saat ko kültürü sonucu elde edilen 10X inverted mikroskop görüntüsü	120
Şekil 3.40. M2 (U266sup) (DİD) makrofaj hücrelerinin U87CD24 (GFP) ifade eden hücrelerle ko kültürü ile elde edilen (100X) floresan mikroskop görüntüleri	121

Şekil 3.41. U87WT (DİO) işaretli hücrelerin 63X konfokal mikroskop görüntüleri A-63X B-63X	121
Şekil 3.42. M1 (DİD) makrofaj hücreleri ve U8WT (DIO) hücrelerinin 12E9 Monoklonal Antikoru ile 24 saat ko kültürü sonucu elde edilen 63X konfokal mikroskop görüntüleri	121
Şekil 3.43. M1 makrofaj (DİD) ve U87CD24 (GFP) hücrelerin 12E9 Monoklonal Antikoru ile 24 saat ko kültürü sonucu elde edilen (63X) konfokal mikroskop görüntüleri	122
Şekil 3.44. M2(U266 sup) (DİD) ve U87CD24(GFP) hücrelerinin 12E9 Monoklonal Antikoru ile ko kültür sonucu elde edilen (63X) konfokal mikroskop görüntüleri	122
Şekil 3.45. M2(IL4) (DİD) hücreleri ile U87CD24(GFP) hücrelerinin 12E9 Monoklonal Antikoru ile ko kültürü sonucu elde edilen (63X) konfokal mikroskop görüntüleri	122
Şekil 3.46. M2(IL4) (DİD) hücreleri ve U87WT(DİO) hücrelerinin 12E9 Monoklonal Antikoru ile ko kültürü sonucu elde edilen (63X) konfokal mikroskop görüntüleri	123
Şekil 3.47. M0 (DİD) hücreleri ve U87WT(DİO) hücrelerinin 12E9 Monoklonal Antikoru ile ko kültürü sonucu elde edilen (63X) konfokal mikroskop görüntüleri	123
Şekil 3.48. M0 (DİD) makrofaj hücreleri ile U87CD24 (GFP) hücrelerin 12E9 Monoklonal Antikoru ile ko kültürü sonucu elde edilen (63X) konfokal mikroskop görüntüleri	123
Şekil 3.49. U87WT (DİO) işaretli hücrelerin 10X floresan mikroskop görüntüleri	124
Şekil 3.50. M1 makrofaj (DİD) hücrelerin konfokal mikroskop görüntüleri A-20X B-63X C-63X	124
Şekil 3.51. Floresan Mikroskop ile Fagositoz Oranlarının Belirlenmesi	124

ÇİZELGELER

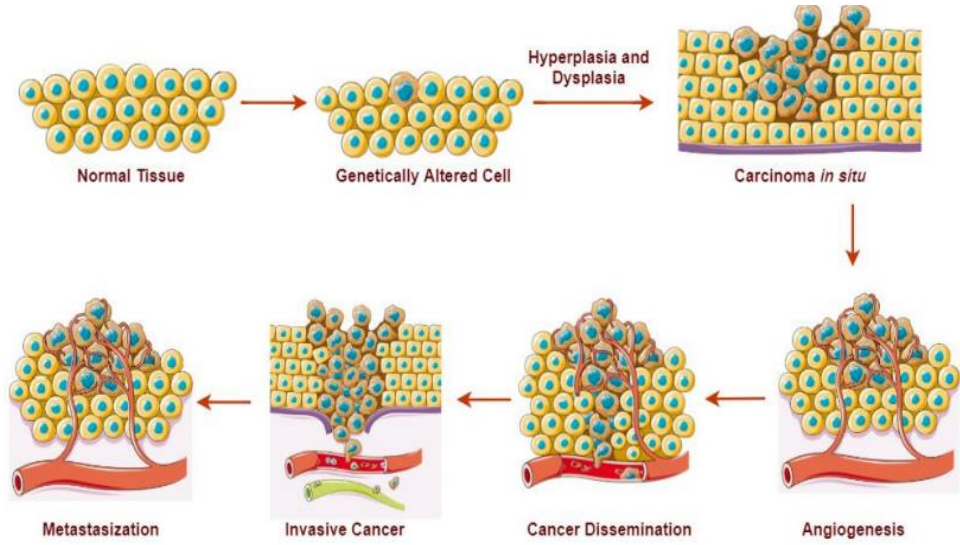
Çizelge 2.1. qRT-PCR Yapılan Genlerin Primer Dizileri	94
Çizelge 3.1. CD80 gen ifadesinin istatistik sonuç tablosu	116
Çizelge 3.2. CD86 gen ifadesinin istatistik sonuç tablosu	116
Çizelge 3.3. U87WT+12E9- hücrelerinde fagositoz oranının durum* hücre Crosstabulation tablosu	125
Çizelge 3.4. U87WT+12E9- hücrelerinde fagositoz oranının istatistik sonuç tablosu	125
Çizelge 3.5. U87WT+12E9 hücrelerinde fagositoz oranının durum* hücre Crosstabulation tablosu	125
Çizelge 3.6. U87WT+12E9 hücrelerinde fagositoz oranının istatistik sonuç tablosu	125
Çizelge 3.7. U87CD24+12E9 hücrelerinde fagositoz oranının durum* hücre Crosstabulation tablosu	126
Çizelge 3.8. U87C24+12E9- hücrelerinde fagositoz oranının istatistik sonuç tablosu	126
Çizelge 3.9. U87CD24+12E9 hücrelerinde fagositoz oranının durum* hücre Crosstabulation tablosu	126
Çizelge 3.10. U87C24+12E9 hücrelerinde fagositoz oranının istatistik sonuç tablosu	127

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

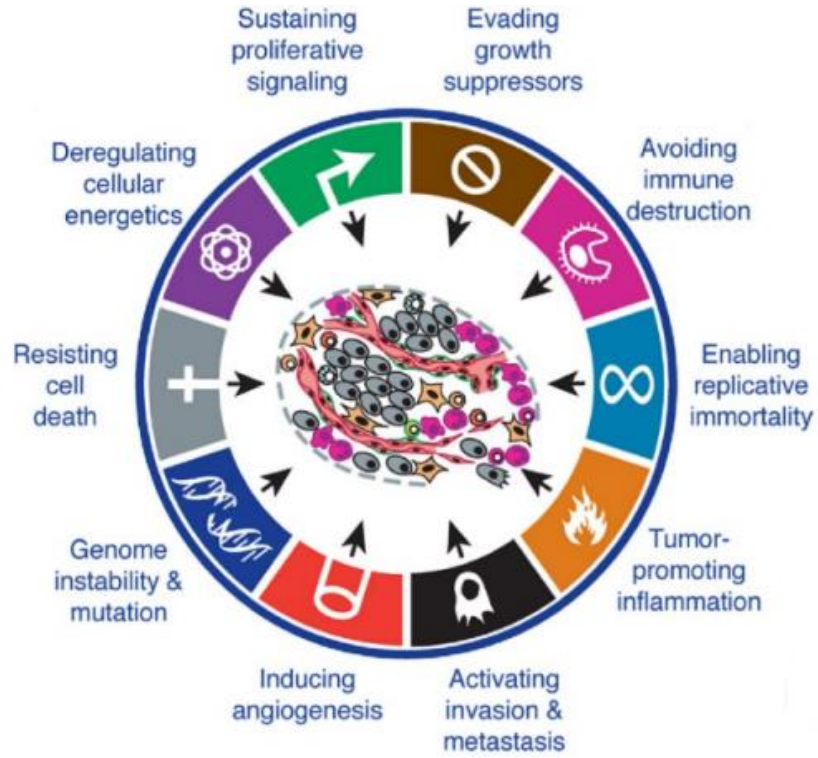
Kanser, dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur ve Amerika Birleşik Devletleri'nde ikinci önde gelen ölüm nedenidir (Siegel ve ark., 2019). Küresel kanser yükünün 2018 yılında 18,1 milyon yeni vakaya ve 9,6 milyon ölüme yükseldiği tahmin edilmektedir. GLOBOCAN (Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı Küresel Kanser Gözlemevi), 2040 yılına kadar dünya çapında her yıl% 61,7 artışla 27,5 milyon yeni kanser vakası olacağını öngörmektedir. Bu öngörülen artışın büyük bir kısmı nüfus artışı ve yaşlanma gibi demografik faktörlerden kaynaklanmaktadır, ancak sosyal ve ekonomik kalkınmaya bağlı bazı kanserlerin artan prevalansı da bir faktördür. Günümüzde en sık teşhis edilen kanser ve kanser ölümünün önde gelen nedeni, ekonomik gelişme derecesine ve buna bağlı sosyal ve yaşam tarzı faktörlerine bağlı olarak ülkeler arasında ve her ülke içinde farklılık göstermektedir (Bray ve ark., 2018). Yüksek gelirli ülkeler tüm kanserler (akciğer, kolorektal, meme ve prostat kanseri dahil) için en yüksek insidans oranlarına sahiptir. Bununla birlikte ölüm oranları azalmaktadır. Düşük ve orta gelirli ülkelerde, enfeksiyona bağlı kanserlerin orantısız yükünü temsil eden mide, karaciğer, özofagus ve rahim ağzı kanseri oranları daha yüksektir ve etkili tarama ve tedaviye erişim eksikliği nedeniyle ölüm oranları yüksek kalmaktadır (Torre ve ark., 2016).

"Kanser" vücut hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde büyümeye ve çoğalmaya başladığı, hücre ölümünü önleyebildiği ve organlar da dahil olmak üzere sağlıklı dokuları istila edip yok etmeye devam ettiği bir durumu tanımlamak için kullanılır (Alberts ve ark., 2008). Kanser önde gelen ölüm nedeni olması nedeniyle yüzyılımızın en çok araştırılan hastalıklarından biridir. Açıktır ki kanser normal hücreleri giderek kötü huylu hale getiren çok süreçli ve çok genli bir hastalıktır.



Şekil 1.1. Kanser Gelişim Süreci (Weinberg 1996, 2004)

Kanserli bir tümör normal dokudan daha sık çoğalan ve kontrolsüz bir şekilde invaziv ve metastatik özelliklere sahip bir hücre kolonisini ifade eder (Roy ve ark., 2016). Mevcut en yeni bilgilere göre kanserin neden olduğu mortalite son on yılda hem erkeklerde hem de kadınlarda azalmış olsa da, Amerika Birleşik Devletleri'nde kardiyovasküler hastalıktan sonra en sık görülen ikinci ölüm nedenidir (Siegel ve ark., 2018; Xu ve ark., 2016). Genel olarak kanser gelişiminin nedeni, hücre döngüsünü düzenleyen bir veya daha fazla proteindeki genetik bir kusurdur. Bazı durumlarda kusurlu gen kalıtsaldır. Diğer bazı durumlarda çevresel kanserojenlere yanıt olarak mutasyonlar meydana gelir. Genel olarak hem kalıtsal hem de çevresel faktörler bir arada bulunur ve kanserin gelişmesi için mutasyonların birikmesi gerekir (Iranzo ve ark., 2018; Zhu ve ark., 2015). Oksidatif stres veya UV radyasyonu gibi çevresel faktörlerden etkilendiğinde hücrenin DNA'sı zarar görür, onarım mekanizmaları devreye girer ve hasarı onarmaya çalışırlar. Onarım mekanizmaları hasarı yeterince onaramaz ise hücre ölüm sinyalleri devreye girer. Ancak bu mekanizmalar bozulursa mutasyona uğramış hücreler çoğalabilir ve hatta zamanla mutasyonların birikmesiyle kanserli bir tümör oluşturabilir (Goldar ve ark., 2015; Torgovnick ve ark., 2015).



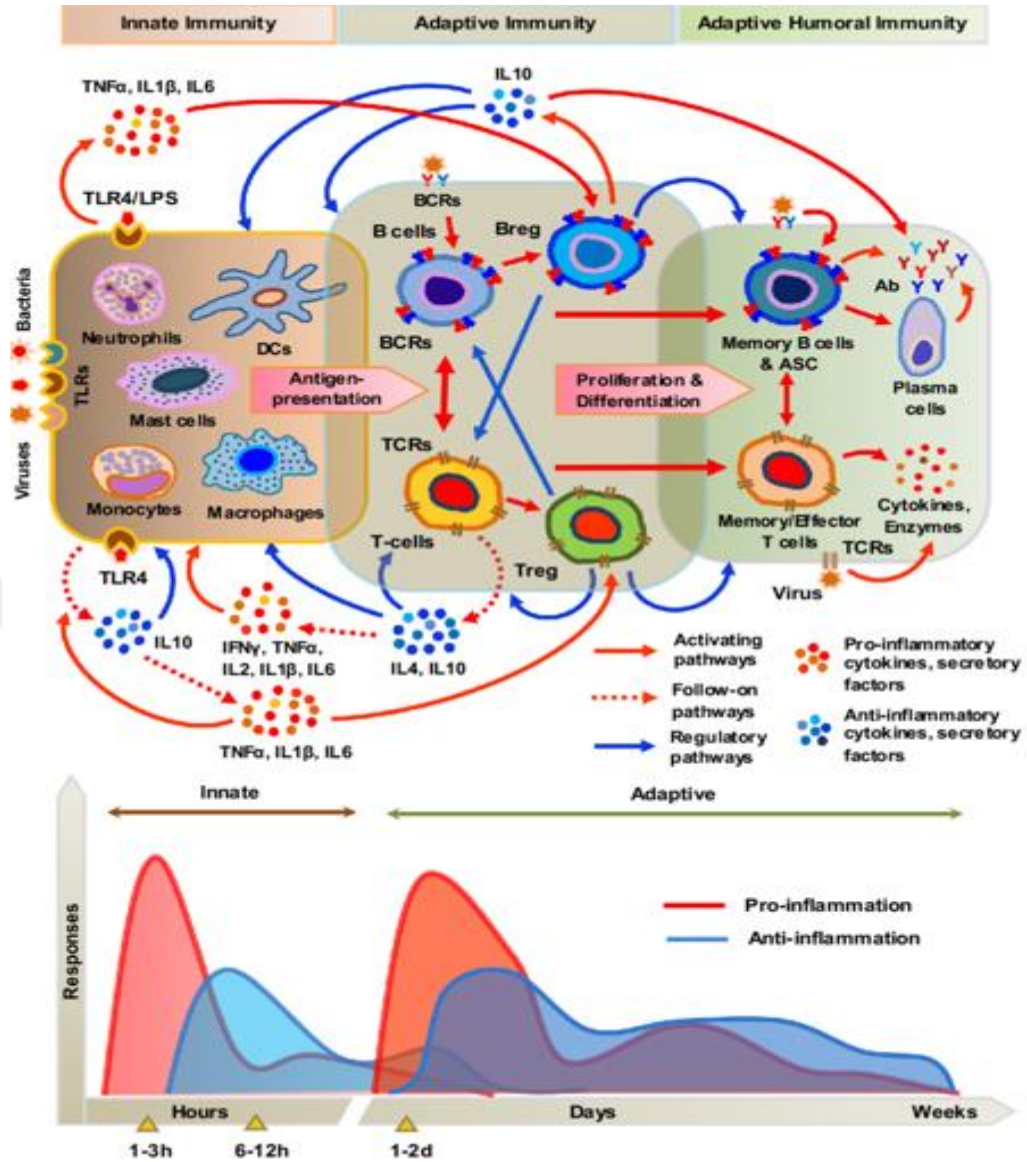
Şekil 1.2. Kanser Belirtileri (Hanahan ve Weinberg 2011)

İlk olarak büyüme ya da büyüme reseptörlerinin aşırı ifadesi ve otokrin aktivasyonuna yol açan büyüme faktörlerinin salgılanması ya da büyüme yollarının aktivasyonuna yol açan kazanılmış mutasyonlar veya negatif düzenleyicilerin aşağı regülasyonu yoluyla elde edilebilir. Ayrıca, anti-büyüme sinyallerine karşı duyarsızlık, hücre döngüsü inhibisyonu ve hücre ölümü ile ilgili genlerin kalıcı olarak baskılanması yoluyla elde edilir, bu da artan genomik kararsızlığa ve başka mutasyonların edinilmesine yol açar. Kanser hücreleri, her hücre döngüsünün sonunda telomerik uzunluğu koruyan bir enzim olan telomerazi yukarı regüle etme yetenekleri nedeniyle telomerlerin kısalmasından ve dolayısıyla yaşlanma/ölümden kaçabilirler. Kanser hücrelerinin hücre ölümünden kaçınmasının bir başka yolu da, DNA hasarının tanınmasını ve programlanmış hücre ölümünün indüklenmesini devre dışı bırakan mutasyonlar edinmektir. Kanser hücrelerinin yüksek enerjiye ihtiyaç duymaları nedeniyle, oksijen ve besin ihtiyacını artırmak için tümörün etrafında yeni damarlar oluşturması söz konusudur. Enerji üretimini en üst düzeye çıkarmak için metabolik yolları deregüle ederler. Bunların dışında kanser hücreleri hücre dışı matrisi ve hücre-

hücre adezyonlarını parçalayan enzimleri salgılamalarına ve böylece çevre dokuları istila etmelerine veya diğer organlara metastaz yapmalarına izin veren mutasyonlar geliştirir. Son olarak kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçabildiği ve tümör mikroçevresini oluşturarak normal hücreleri toplayan tümör iltihabını indükleyebildiği ortaya çıkmıştır (Hanahan ve ark., 2000; Hanahan ve ark., 2011).

1.2. Bağışıklık Sistemi

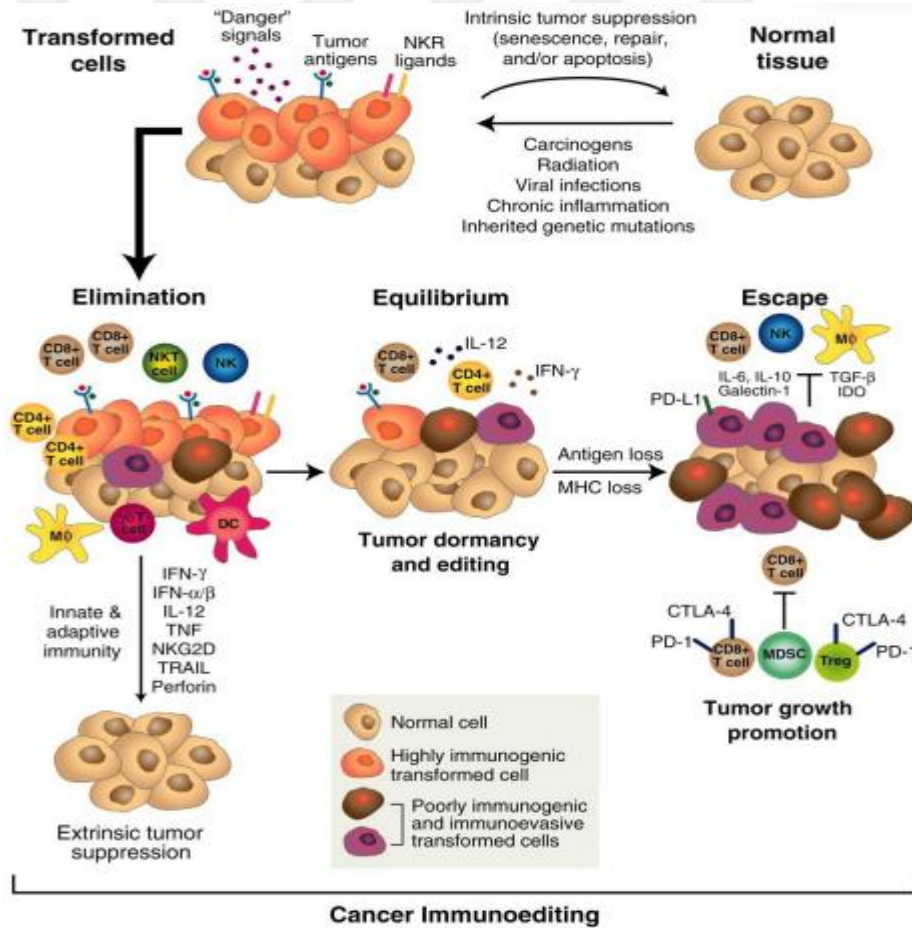
Bağışıklık sistemi anormal çoğalan hücreleri zamanında tespit edip ortadan kaldırma potansiyeline sahiptir. Genel olarak doğuştan gelen bağışıklık ve adaptif bağışıklık olarak iki kategoriye ayrılır. Doğal bağışıklık spesifik olmayan bir şekilde herhangi bir enfeksiyöz ajana veya dönüştürülmüş hücrelere karşı ilk savunma hattını sağlayan hücresel, biyokimyasal, fiziksel ve yapısal koruyucu mekanizmalardan oluşur. Doğal öldürücü hücreler, makrofajlar, granülositler, dendritik hücreler, mast hücrelerini içerir. Adaptif bağışıklık spesifik bir bağışıklık sağlar ve T-lenfositler, B-lenfositler ve bunların sitokinler ve antikorlar dahil olmak üzere humoral araçlarından oluşur (Shiao ve ark., 2015). Bu sistemin başrol oyuncusu T hücreleri tarafından oluşturulmaktadır. Bir tümör hücresi genetik olarak değişip çoğalmaya başlamakta ve bu değişim sırasında farklı proteinler üretmektedir. Bu proteinler MHC üzerinden T hücrelerine sunulmaktadır. Tümör hücrelerine özgün olan T hücreleri bu antijeni tanıdıktan sonra aktif hale gelip tümöre karşı savunma sistemini oluşturmaktadır.



Şekil 1.3. Normal fizyolojik koşullar altında doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık tepkisini aktive eden düzenleyici yolların basitleştirilmiş bir şematik diyagramı (Nguyen ve ark., 2020)

Kanserde bağışıklık sistemi üç farklı şekilde hareket eder (Shiao ve ark., 2015). Birincisi, bağışıklık sistemi viral enfeksiyonu baskılayarak veya ortadan kaldırarak konakçıyı virüs kaynaklı tümörlere karşı savunabilir. İkincisi, bağışıklık sistemi tümör oluşumuna yardımcı olan inflamatuvar durumun gelişimini engellemek için iltihabı zamanında çözebilir. Üçüncüsü, bağışıklık sistemi tümöre özgü antijenler veya hücrel stres tarafından indüklenen moleküller (immün gözetimi) ile etkileşime girerek tümör hücrelerini spesifik olarak tanıyabilir ve ortadan kaldırabilir. Kanser immüno-düzenleme hipotezine göre, normal hücrelerin genetik değişiminin

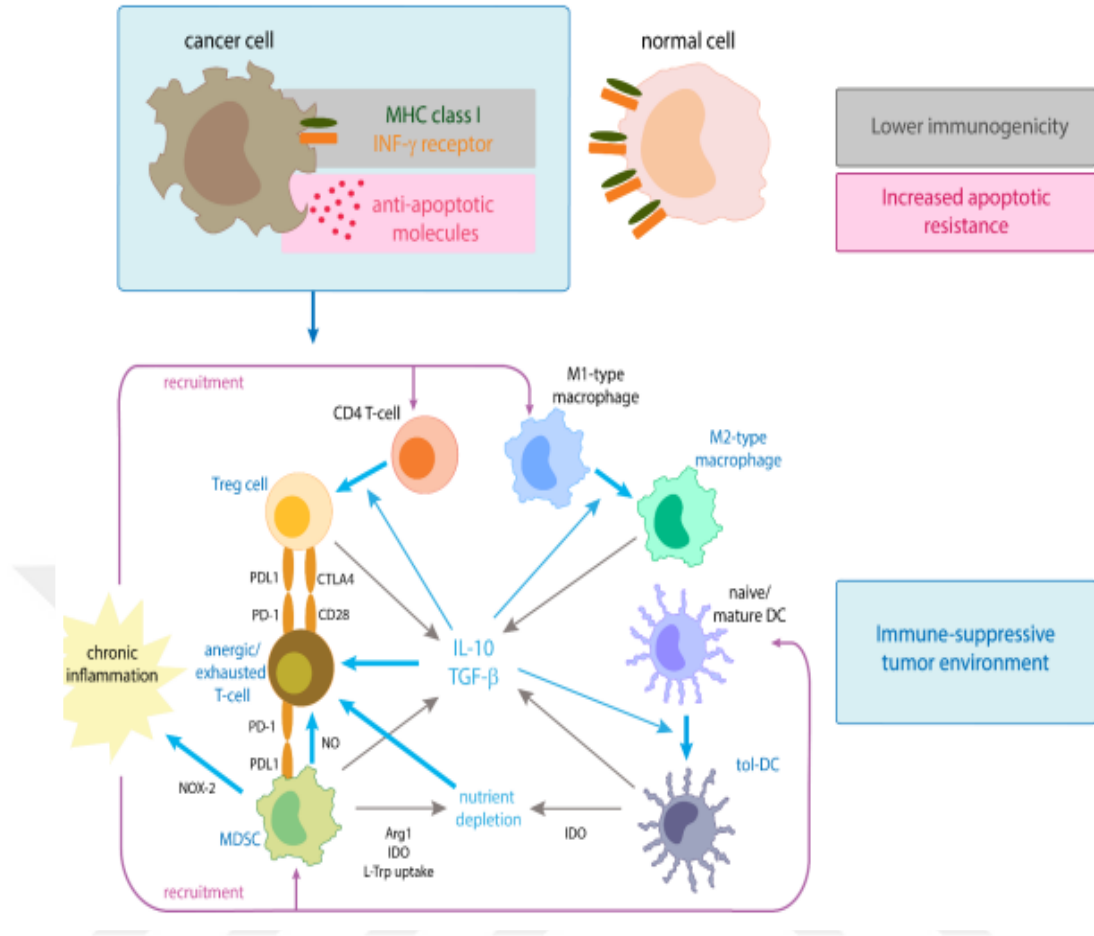
transforme (tümör) hücelere yol açtığını belirtir. Bu hüceler ilk önce doğuştan gelen ($\gamma\delta$ T hüceleri, makrofajlar, dendritik hüceler) ve adaptif (CD4, CD8, NK, NKT hüceleri) bağışıklık sisteminin (“Eliminasyon”) etkisi ile ortamdan yok edilir ve bu da tümör eliminasyonuna yol açabilir. Ancak çoğu durumda tümör mutasyona uğramaya devam eder, bağışıklık sistemi bu duruma adapte olur ve tümörü kontrol altında tutar bu aşama denge aşamasını oluşturmaktadır. Bağışıklık sistemi hücelerinden NK ve CD8+ sitotoksik T hüceleri etkinliğini kaybettiği zaman CD4+ düzenleyici T (Treg) alt klonu IL-10 ve TGF- β üreterek çoğalmaya başlar ardından tümörün metastatik bir forma dönüşmesine neden olur sistem görevini yerine getiremediğinde tümörün bağışıklık kontrolünden kaçtığı aşama devreye girer bu aşama kaçış fazını oluşturmaktadır.



Şekil 1.4.Kanser immüno düzenleme (Schreiber ve ark., 2011)

1.3. Tümör Mikroçevresi ve Bağışıklık Sistemi

Tümör mikroçevresi (TME) yapısında tümör hücresinden daha fazla oranda immün hücresi içerir ve bu ortam sürekli olarak değişkenlik göstermektedir. Stromal hücreler, fibroblastlar ve endotelial hücrelere ek olarak TME doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık hücrelerini içerir. İmmün sistem; anormal çoğalan hücreleri zamanında tespit edip ortadan kaldırma potansiyeline sahiptir. Önceki çalışmalar ağırlıklı olarak kanser bağlamında adaptif bağışıklık hücreleri üzerine odaklanmıştır. Özellikle T lenfositler, güçlü sitotoksik özellikleri nedeniyle daha çok araştırma konusu olmuştur, farklılaşma durumları diğer hücre tipleri için bir model haline gelmiştir ve “Th1/Th2 paradigması” olarak adlandırılmıştır (McGuirk ve ark., 2002). Bu Th1/Th2 paradigması T hücrelerinin farklı sitokin üretimi ile patojene bağımlı immün yanıtları düzenlediğini öne sürmektedir. Th1 hücreleri bir pro-inflamatuar fenotipi temsil eder ve Th2 hücreleri bir immün baskılayıcı fenotipi ortaya çıkarmaktadır. TME ile ilgili literatürün genişlemesiyle doğuştan gelen immün yanıtın T hücre fonksiyonlarını kontrol ederek TME'yi dolaylı olarak etkilemekle kalmayıp aynı zamanda TME'yi esas alarak şekillendirdiği de açıktır. Bu doğuştan gelen immün hücre tipleri arasında makrofajlar (Mφ'ler), dendritik hücreler (DC'ler), nötrofiller, miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC'LER), doğal öldürücü hücreler (NK'LER) ve doğuştan gelen lenfoid hücreler (ILC'LER) bulunur. Mekanik olarak TME içindeki sitokinler, tümör ilerlemesini yönlendiren immün yanıtlarla sonuçlanan immün fonksiyonlarını düzenler. Doğuştan gelen bağışıklık hücreleri hakkında kapsamlı bir anlayış geliştirmek ve bu bilgiyi TME'deki işlevsiz hücreleri hedef alan mevcut tedavilere genişletmek esastır (Hinshaw ve ark., 2019).

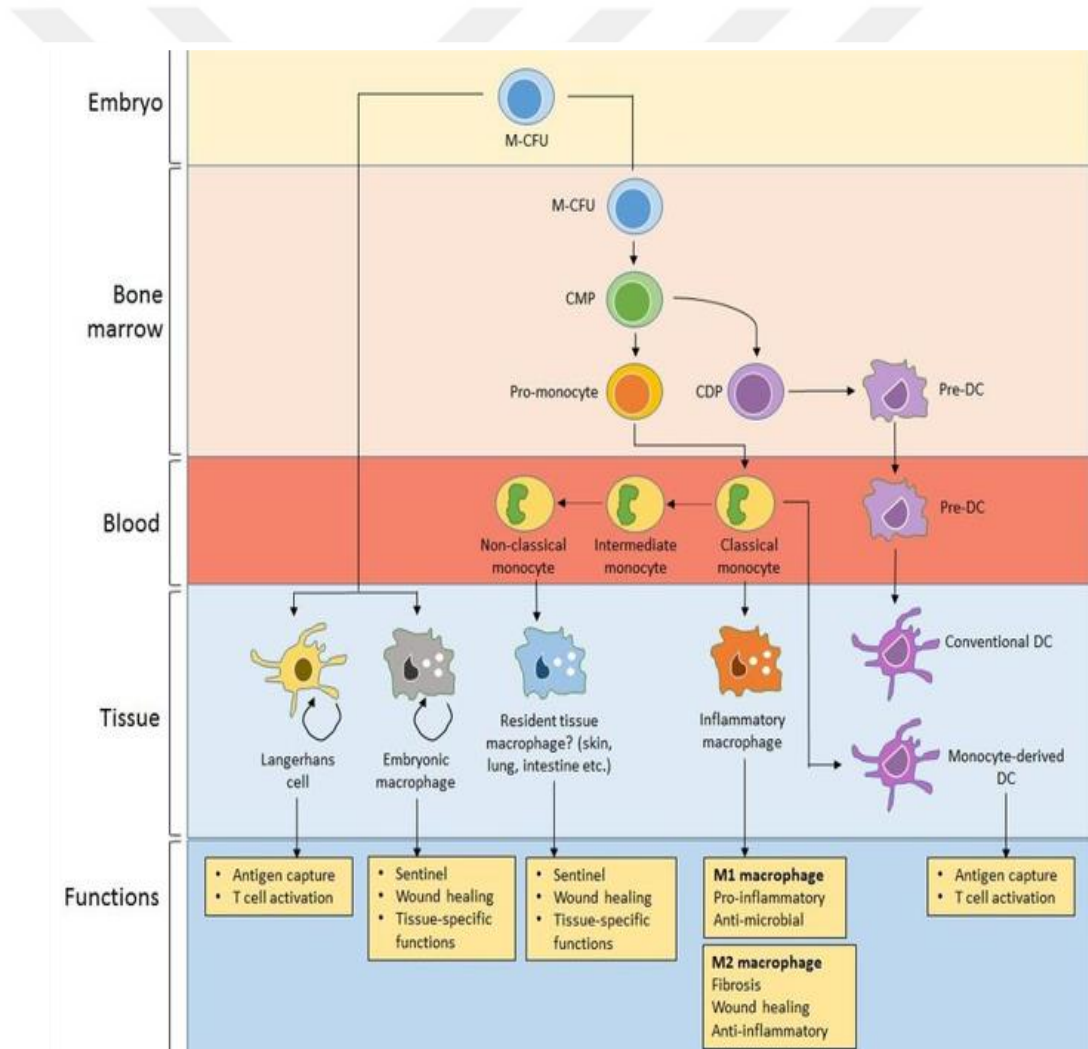


Şekil 1.5. Tümör İmmün Kaçış Mekanizması (Lien Lybart 2017)

1.4. Mononükleer Fagosit Sistemi

İlk olarak 1882'de Ilya Ilyich Mechnikov tarafından denizyıldızında tanımlanmıştır. Fagositler, tüm çok hücreli türlerde organizma homeostazını koruyan evrimsel olarak korunmuş bir lökosit alt kümesidir (Mechnikov ve ark., 1988). Bu hücre tipi özellikle memeli türleri içinde vücuda dağılır ve belirli işlevleri yerine getirmek için her doku içinde bulunur (Schulz ve ark., 2012). Beyin dokusundaki yerleşik makrofajlar olan mikroglia, hafızayı korumak için nörolojik sinaps iletimini kolaylaştırır ve bağışıklık ayrıcalıklı bir ortamda immünolojik bir savunma görevi görür (Paolicelli ve ark., 2011; Nayak ve ark., 2014). Karaciğerdeki makrofaj olan Kupffer hücreleri yabancı patojenik ve atık maddeleri dolaşımdan temizler. Dalak kırmızı pulpa makrofajları, kırmızı kan hücrelerinin geri dönüşümünden sorumludur

(Ganz ve ark., 2012; Hvidberg ve ark., 2005). Derideki Langerhans hücreleri ve akciğer içindeki alveolar makrofajlar gibi koruyucu bariyerlerdeki spesifik makrofaj alt kümeleri hem patojenik materyali temizlemekten hem de lokal inflamatuvarı arttırmaktan sorumludur (Merad ve ark., 2002; Hussell ve ark., 2014). Kan dolaşımındaki monositler immün ve inflamatuvar yanıtları kontrol etmek için bir makrofaj ortamı sağlar (Ajami ve ark., 2011). Monositler, hematopoetik progenitörlerin ürettiği kemik iliğinden ve kemik fonksiyonunu koruyan osteoklastik hücrelerden köken alır. Son olarak plasentanın makrofajları olan Hofbauer hücrelerinin embriyogenez sırasında anneden bebeğe sinyal iletimini sürdürdüğünü gösteren kanıtlar artmaktadır (Brown ve ark., 2014; Renaud ve ark., 2008).

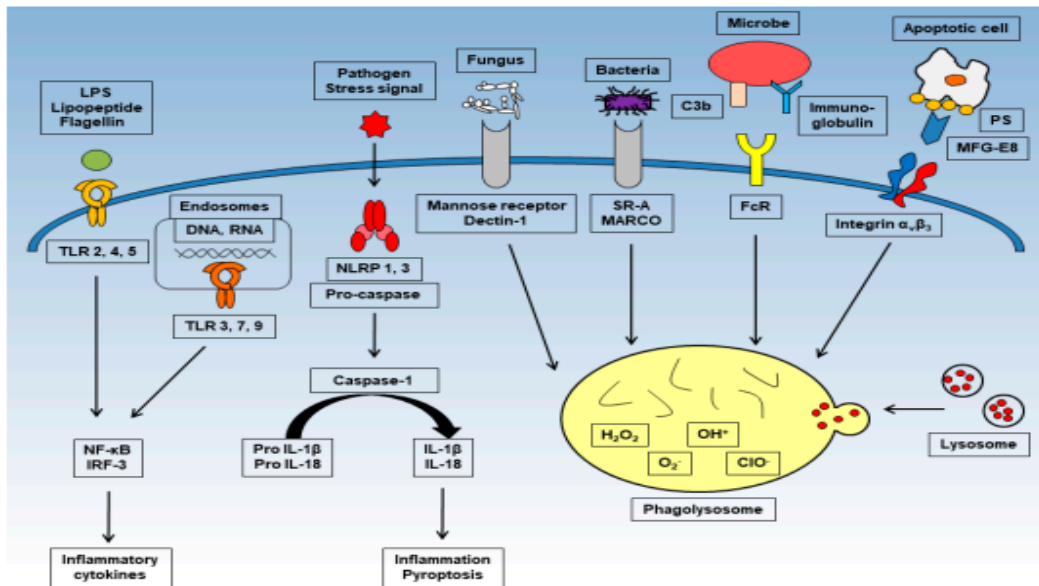


Şekil 1.6. Mononükleer Fagosit Sistemi (Lawrence ve ark.,2011)

1.5. Fagositoz

Fagositoz tek hücreli organizmalarda beslenme için temel bir süreçtir ve aynı zamanda çok hücreli organizmaların hemen hemen tüm hücre tiplerinde bulunur. Bununla birlikte yalnızca profesyonel fagositler adı verilen özel bir hücre grubu fagositozunu yüksek verimlilikle gerçekleştirir (Rabinovitch ve ark., 1995). Makrofajlar, nötrofiller, monositler, dendritik hücreler ve osteoklastlar bu özel hücreler arasındadır. Profesyonel fagositler, adaptif bir bağışıklık tepkisini aktive etmek için mikroorganizmaları uzaklaştırmaktan ve antijenleri lenfositlere sunmaktan sorumludur. Fibroblastlar, epitel hücreleri ve endotel hücreleri de fagositozu düşük verimlilikle gerçekleştirebilir ve bu nedenle profesyonel olmayan fagositler olarak tanımlanır. Bu hücreler mikroorganizmaları sindiremezler ancak ölü hücreleri ortadan kaldırmada ve homeostazı sağlamada önemlidir (Gordon, 2016). Fagositoz 0,5 µm'den büyük partikülleri algılama ve alma işlemidir. Parçacık, kendine özgü bir organel olan fagozoma içselleştirilir. Bu fagozom daha sonra fagozom olgunlaşması olarak bilinen bir süreçte zarının yapısını ve içeriğinin bileşimini değiştirir (Levin ve ark., 2016). Fagozom lizozomlarla birleşerek fagolizozom haline gelir. Bu yeni organel sindirilen parçacığı parçalayabilen enzimler içerir (Canton ve ark., 2014). Fagositler apoptotik hücreler ve mikrobiyal patojenler dahil olmak üzere potansiyel olarak yutulabilecek birkaç farklı parçacığı tanımlayabilir. Reseptörler parçacığı bir hedef olarak algılayarak ve ardından fagositoz için sinyal yollarını başlatarak bu tanımaya aracılık eder. Fagositlerin plazma membran reseptörleri opsonik olmayan veya opsonik reseptörlere ayrılır. Opsonik olmayan reseptörler yutulacak partikül üzerindeki farklı moleküler paternlerini doğrudan tanımlar. Bu reseptörler arasında Dectin-1, Dectin-2, Mincle veya DC-SIGN gibi C42 tipi lektinler; CD33 gibi lektin benzeri tanıma molekülleri; ve çöpçü reseptörler yer alır (Dambuza ve ark., 2015; Li ve ark., 2020; Canton ve ark., 2013). Toll-like reseptörler (TLR'ler) patojenler üzerindeki moleküler paternleri de tespit edebilmelerine rağmen fagositik reseptörler değildirler (Kawai ve ark., 2011). TLR'ler, fagositozun daha verimli hale getirilmesi için fagositik reseptörlerle etkileşim halindedir (Iwasaki ve ark., 2015). Opsonik reseptörler hedef partiküllere bağlı konakçıdan türetilen proteinleri tespit eder. Opsoninler olarak bilinen bu proteinler arasında antikorlar, fibronektin, kompleman, süt yağı globulin (laktadherin) ve mannoz bağlayıcı lektin bulunur (Flannagan ve ark., 2012).

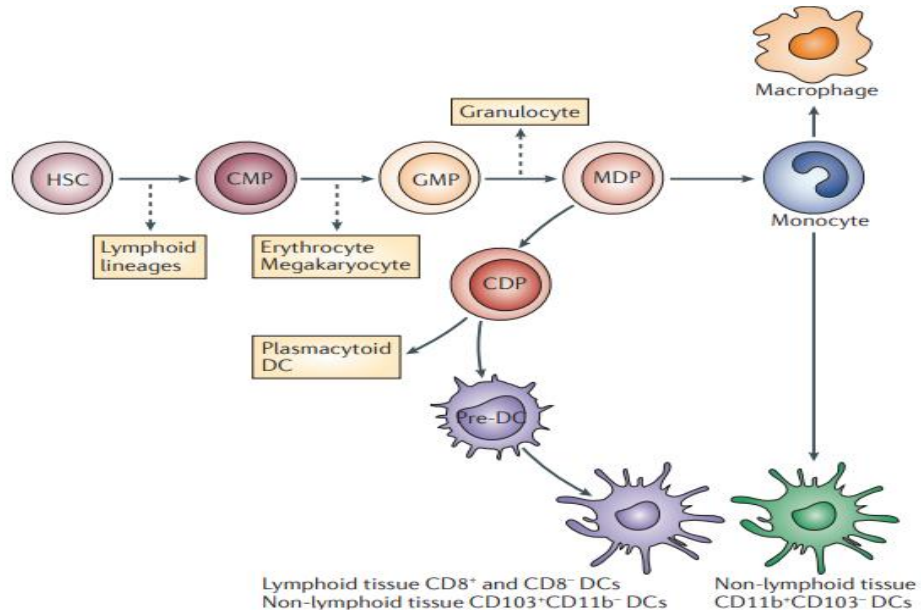
Opsoninler partikülleri fagositozun hedefleri olarak etiketler. Fc reseptörleri (FcR) ve kompleman reseptörleri (CR) en iyi karakterize edilen opsonik reseptörlerdir. FcR'ler, IgG'nin veya IgA antikollarının Fc kısmına bağlanır (Bakema ve ark., 2011). Kompleman reseptörleri partikül üzerinde biriken iC3b gibi aktive edilmiş kompleman bileşenlerine bağlanır (Van Lookeren ve ark., 2007). Bu bağlanmadan sonra fagositik reseptörler aktin hücre iskeletinin ve zardaki lipidlerin yeniden şekillenmesine yol açan sinyal yollarını başlatır, bu da zarın parçacığı kaplayacak şekilde uzamasına neden olur (Freeman ve ark., 2015). Daha sonra zar distal uçta kapanır ve fagozomu oluşturur. Böylece parçacık fagozomun içinde içselleşir. Membran uzaması sırasında fagositik reseptörler hedefe sıralı bir şekilde bağlanır ve fagozom oluşumunun tamamlanmasına yardımcı olur (Freeman ve ark., 2016; Ostrowski ve ark., 2016). Bu erken fagozom geç bir fagozom oluşturmak için endositik veziküllerle ardışık füzyon ve fisyon olaylarına uğrar (Desjardin ve ark., 1995). Geç fagozom lizozomlarla birleşir ve bir fagolizozom olur. Bir fagozomu güçlü bir anti mikrobiyal fagolizozoma dönüştürme süreci, fagozom olgunlaşması olarak bilinir (Levin ve ark., 2016). Fagositoz sürecindeki aşamalar; yutulacak partikülün tespiti, içselleştirme sürecinin aktivasyonu, fagozom adı verilen özel bir vakuol oluşumu ve fagozom olgunlaşması basamaklarını içermektedir.



Şekil 1.7. Makrofafların Fagositik Mekanizmaları (Hirayama ve ark., 2017)

1.6. Monosit

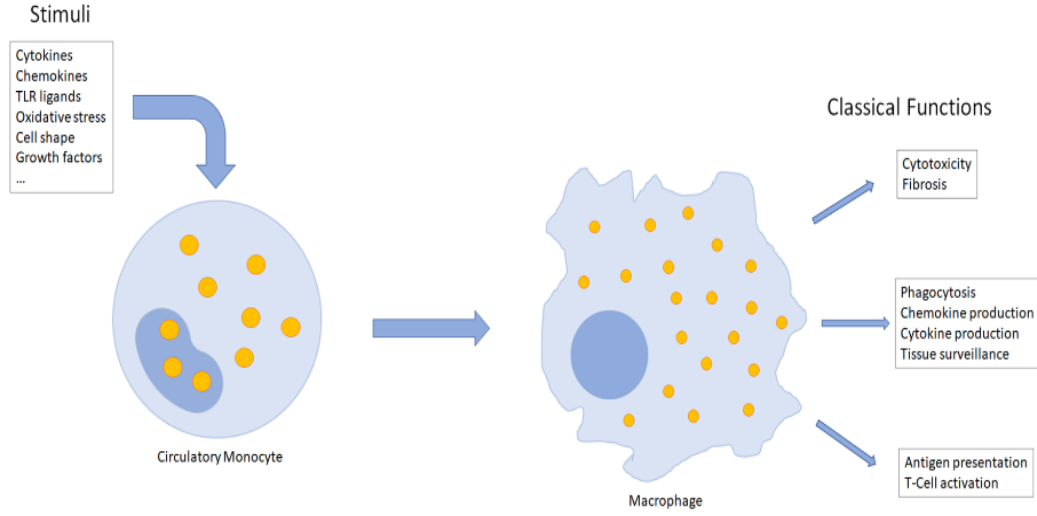
Yerleşik bir insan makrofaj hücre dizisi şu anda mevcut değildir. Araştırmacılar makrofaj davranışını taklit etmek için THP-1 veya U937 hücre dizileri gibi onkojenik monositleri kullanır. Monositler kanda dolaşan lökositlerdir. Monositler CD11b'yi (bir bağlanma integrini) ve CD14'ü (Tolllike Reseptör 4 veya 2 (TLR4/TLR2) ile birleşen ve LPS ile uyarılan sinyal transdüksiyonunu indükleyen bir LPS reseptörü) ifade eder (Taylor ve ark., 2005). Yetişkin kemik iliğinden hematopoietik kök hücrelerden köken alırlar. Monosit soyuna doğru aktive edildiğinde bu kök hücreler Ortak Miyeloid Progenitörlerine (CMP'ler) farklılaşır. Bu CMP'ler Granülosit ve Makrofaj Progenitörleri (GMP'ler) olarak farklılaşır. GMP'ler daha sonra Makrofaj ve Dendritik Hücre Progenitörlerine (MDP'ler) giden bir yol izler. Son olarak insan monositi bu MDP'lerden gelişir. Hematopoietik kök hücreler kanda dolaşan monositlere dönüşmeden önce bir dizi bölünmeden geçmektedir (Chow ve ark., 2011). Monositler bir makrofaj veya dendritik hücre yolu boyunca farklılaşma potansiyeline sahiptir. Makrofaj farklılaşması Runt ile ilgili transkripsiyon faktörünün veya ETS ailesi transkripsiyon faktörü PU.1'i kodlayan RUNX1'in aktivasyonunu gerektirir. PU.1 ifadesi monositin bir makrofaj farklılaşma modelini takip etmesine ve sürdürmesine neden olur (Lawrence ve ark., 2011).



Şekil 1.8. Monositin hematopoietik kök hücre progenitöründen olgunlaşması (Chow ve ark., 2011)

1.7. Makrofajlar

Doğuştan gelen bağışıklık hücreleri arasında monosit türevli makrofajlar (Mφs) en iyi Th1/Th2 paradigmasını yansıtır. Basitçe Mφ'ler inflamatuvar M1 (klasik olarak aktive edilmiş) veya immün baskılayıcı M2'ler (alternatif olarak aktive edilmiş) olarak polarize edilebilir (Yang ve ark., 2017). Mφ'ler fagositoz ve antijen sunumu yoluyla bağışıklık tepkilerini modüle eder ve ayrıca yara iyileşmesinde ve doku onarımında işlev görür, böylece bağışıklık homeostazı için onları gerekli kılar (Chen ve ark., 2015). Mφ'ler dokuya özgüdür ve yara iyileşmesi, doku oluşumu, pıhtılaşma, iltihaplanma ve doku yeniden organizasyonunun tüm aşamalarına katkıda bulunurlar (Peiseler ve ark., 2018). Mφ'ler ilk olarak embriyonun 7. gününde yolk kesesinde ortaya çıkar ve oradan dokuda yerleşik Mφ'ler oluşturmak için periferik dokulara yayılır ancak yetişkin doku Mφ popülasyonlarının çoğu (dalak, akciğer ve deri dahil) fetal karaciğerden köken alır. Yolk kesesi tarafından oluşturulan Mφ'lerin yerini fetal karaciğerden kaynaklanan Mφ'lerin aldığı bilinmektedir. Spesifik olarak fetal karaciğeri kolonize eden hematopoietik kök hücreler monositler de dahil tüm hematopoietik soylara farklılaşır (Varol ve ark., 2015). Kansere bağlamında Mφ alımının bir biçimi kemokinler (CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CXCL1, CXCL2, CXCL4, CX3CL1) tarafından monositler olarak kemik iliğinden köken alır ve buna yanıt olarak Mφ farklılaşmasına yol açar. TME; IL-4, IL-13, IL-10 gibi sitokinlerin salgılanması yoluyla immün baskılayıcı M2 Mφ'leri güçlendirir. Kümülatif olarak bu Mφ'ler tümör kütlelerinin %50'sini oluşturabildiğinden tümör büyümesini ve ilerlemesini sağlar (Kim ve ark., 2016). Meme kanseri, mide kanseri, akciğer kanseri, hepatom ve diğer maligniteler dahil olmak üzere çoğu tümör tipinde yüksek Mφ infiltrasyonu negatif prognozla koreledir ve bu durum M2'lerin kanser ilerlemesindeki rollerini ortaya koymaktadır (Cardoso ve ark., 2014; Wang ve ark., 2018; Zhao ve ark., 2017). Normal doku yeniden modellenmesi, epitel hücre hareketinin düzenlenmesini içerir.



Şekil 1.9. Monosit uyaranları ve Makrofaj Fonksiyonları (Lendeckel ve ark., 2022)

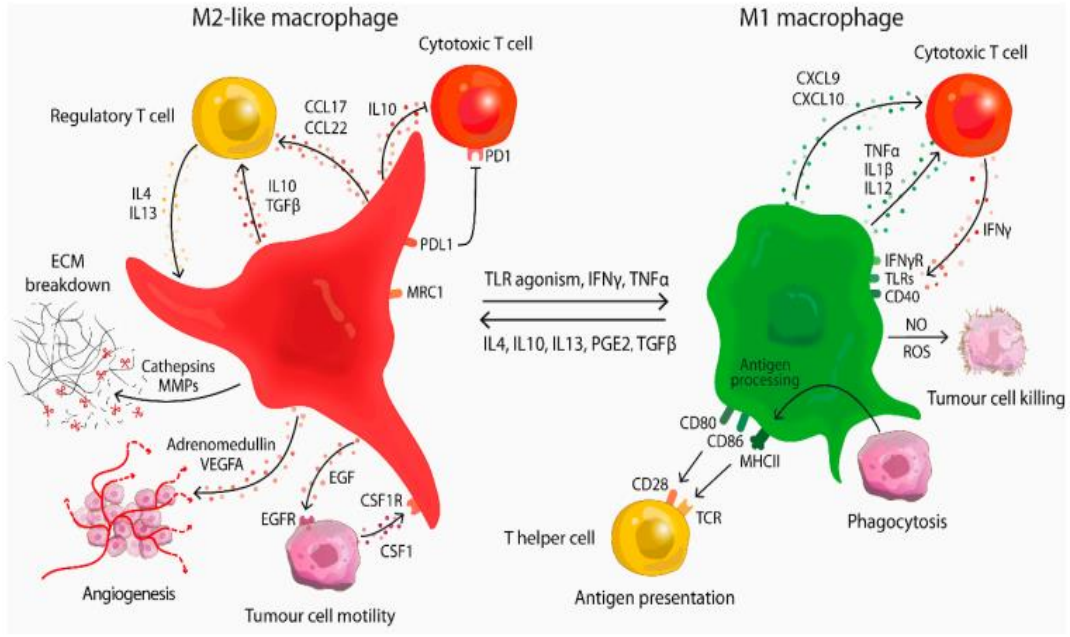
1.7.1. M1 Makrofajlar (Klasik Olarak Aktive Olan Makrofajlar)

Aktive makrofajlar çevresel sinyallere verdikleri yanıtı göre fonksiyonel fenotipe ayrılır. M1 veya klasik olarak aktive olan makrofajlar, bakteriyel lipopolisakkarit (LPS), $IFN\gamma$ veya $TNF-\alpha$ tarafından uyarılır (Karp ve ark., 2012). Bunlar tümörlere ve hücre içi patojenlere karşı etkili bir adaptif bağışıklık tepkisini koordine edebilen proinflamatuvar makrofajlardır (Murray ve ark., 2011). M1 makrofajları, $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-12$, $IL-23$, $IL-6$, ROS gibi yüksek miktarda inflamatuvar sitokin salgılar ve nitrik oksit (NO) üreten oldukça aktif bir iNOS enzimine sahiptir (Chanmee ve ark., 2014; Martinez ve ark., 2014; Mantovani ve ark., 2004). M1 makrofajları yüzeylerinde immün yanıtı başlatmak ve T hücrelerini aktive etmek için önemli olan CD80 (B7-1) ve CD86 (B7-2) ifade eder (Biswas ve ark., 2008). CD80/86, T hücresi kostimülatör molekülü olan CD28 için kritik ligandlardır ve M1 makrofajları üzerinde yüksek oranda ifade edilen belirteçlerden biridir, yapılarında CD86 da ifade etmektedirler (Kigerl ve ark., 2009; Rey-Giraud ve ark., 2012). Yüksek NO üretimini patojenlere ve tümörlere karşı M1 makrofajların kullandığı temel yapılardan biridir. NO membranları kolayca geçebilen ve biyolojik olarak aktif türevler oluşturmak için süperoksit gibi ROS molekülleri ile kimyasal olarak reaksiyona giren küçük bir lipofilik moleküldür (Rahat ve ark., 2013). Tümörlerde konsantrasyonuna bağlı olarak

NO'nun hem tümör önleyici hem de tümör başlatıcı etkileri vardır. (Lechner ve ark., 2005).

1.7.2. M2 Makrofajlar (Alternatif Olarak Aktive Olan Makrofajlar)

Aksine M2 makrofajları IL-4, IL-10, IL-13 ve glukokortikoid hormonları gibi anti-inflamatuvar faktörler tarafından aktive edilir (Van Dyken ve ark., 2013). M2 makrofajları, IL-10 ve TGF- β salgılayarak immünosupresyona aracılık eder ve yara iyileşmesinde kritik bir rol oynar (Martinez ve ark., 2014; Gordon ve ark., 2010). Aktive edici uyarılara yanıt olarak M2 makrofajları M2a, M2b ve M2c, M2d olmak üzere farklı alt tiplere ayrılır (Mantovani ve ark., 2004). M2 makrofajlar, makrofaj mannoz reseptörü (MMR) CD206, çöpçü reseptörü Cd163'ün hücre yüzeyi ifadesi ve çözünür sentezi ile karakterize edilir (Gordon ve ark., 2010; Stein ve ark., 1992). Kemokin ligand 17 (CCL17), IL-10, CCL-18 ve TGF- β gibi faktörlere sahiptir (Lee ve ark., 2001). Yüzey belirteçleri ve sitokinlerin yanı sıra M2 makrofajları arginini metabolize eden ve prolin üreten arginaz enzimini indükler (Martinez ve ark., 2014; Gordon ve ark., 2010). Makrofajların iki aktivasyon durumunu ayırt etmek için L-argininin metabolizmasının ayırt edici bir belirteç olduğu düşünülmektedir (Gordon ve ark., 2003). Arginaz-1 (Arg-1), arginini üre ve ornitine katalize ederek yara iyileşmesine ve fibrozise katkıda bulunan M2 makrofajlarının önemli bir özelliğidir (Gordon ve ark., 2003; Yang ve ark., 2014). Arg-1'in STAT-6 aktivasyonu yoluyla IL-4 ve IL-13 gibi eksojen Th2 sitokinleri tarafından indüklendiği bilinmektedir (Pauleau ve ark., 2004; Wu ve ark., 2017).



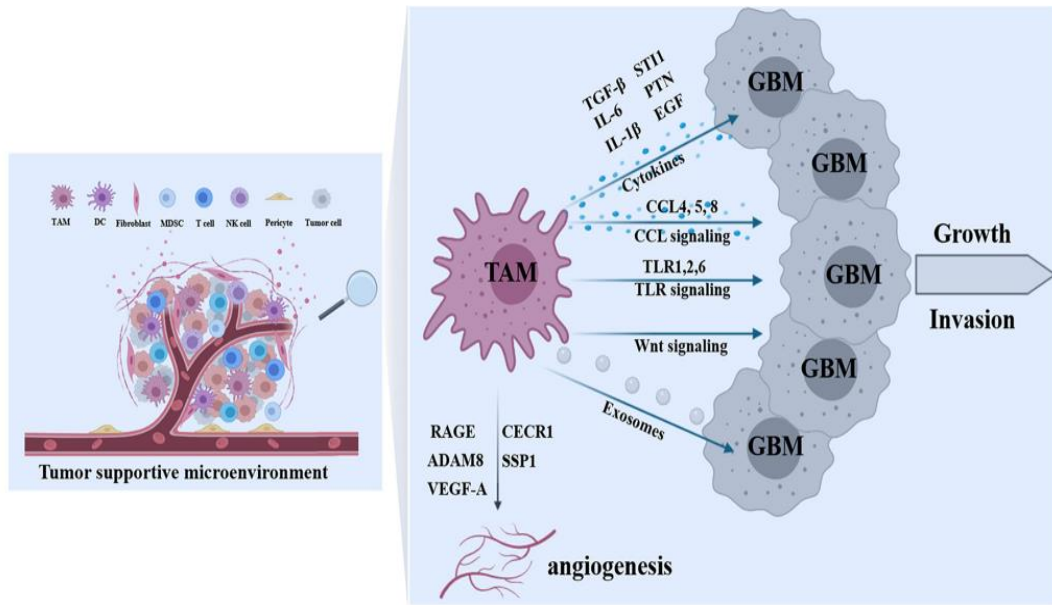
Şekil 1.10. Tümör Gelişiminde M1 ve M2 Makrofajların Fonksiyonları (Van Dalen ve ark., 2018)

1.7.3. Tam (Tümör İlişkili Makrofajlar)

Katı tümörler; neoplastik hücreler, granülositler, makrofajlar (%50'ye kadar) ve mast hücreleri dahil olmak üzere periferik hücreler, fibroblastlar ve epitel hücrelerinden oluşur (Morrison ve ark., 2016; Azizi ve ark., 2018). Makrofajlar sitokin üreten mikroçevre tarafından tümör bölgesine alınır ve bu durumun lokal anoksi, inflamasyon ve yüksek laktik asit seviyeleri ile ilişkili olduğunu öne sürülmüştür. Makrofaj infiltrasyonu ve anjiyogenezin ana belirleyicileri olan CCL2, CCL11, CCL16 ve CCL21 gibi kemokinlerinin meme, akciğer, yemek borusu, yumurtalık ve serviks kanserinde işlev gördüğü gösterilmiştir (Santoni ve ark., 2014; Qui ve ark., 2018). Ayrıca TAM'ler CCL2 üretebilir, bu da sırayla makrofajları TME ortamına alabilecekleri anlamına gelir. Bir dereceye kadar TAM'ler makrofajların alımını genişletebilir (Mantovani ve ark., 2010). Bazı çalışmalar CCL2 yoğunluğuyla TAM'lerin miktarı arasındaki etkileşimin tümör invazyonu ve klinik prognoz ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Farklı mikro çevrelerde yer alan makrofajlar farklı spesifik fenotipler kazanır (Gordon ve ark., 2005). TAM'lerin fenotipleri plastiktir ve yerel mikroçevre tarafından düzenlenir. TAM'lerin tümör dokularındaki miktarlarının

fazlalığı tümör gelişimi ve ilerlemesi ile önemli ölçüde ilişkili olduğu son çalışmalarda doğrulanmıştır. Makrofaj alt türlerinin bölünmesi karmaşıktır. TAM'ler makrofajların klasik bir alt grubu olarak kabul edilmez çünkü bu hücreler kararlı durumda gözlemlenemezler, daha çok inflamasyon ve tümörler gibi spesifik patolojik durumlarla ilişkilidirler. TAM reseptör ailesinden oluşan Tyro3, Axl ve MerTK gibi bazı özel reseptör tirozin kinazlar vardır ve bu reseptörler sadece tümör hücreleri ile etkileşimde değil, makrofaj polarizasyonunda da rol oynarlar (Myers ve ark., 2019). Aktif TAM'ler birkaç özellik açısından M2'ye benzemektedir. Sonuç olarak bazen M2 makrofajlar dar anlamda TAM olarak tanımlanır (Chavez-Galan ve ark., 2015; Murray ve ark., 2014). Bu nedenle TAM'lerin M2 olarak kabul edilmesi yanlıştır (Chavez-Galan ve ark., 2015). TAM'lerin anjiyogenez, tümör invazyonu ve bağışıklığın baskılanması üzerinde etkileri vardır. Bağışıklık hücrelerinin özellikle tanıma süreci ile ilgili olarak ve tümör hücrelerini ortadan kaldıran mekanizmaları çok karmaşıktır. Ortamda çeşitli bağışıklık sistemi bileşenleri söz konusudur ve makrofajlar bu süreçte en önemli hücre grubundan biridir. TAM'ler çeşitli tümörlerde yaygın olarak görülen lökosit infiltratının önemli bir bileşenidir. TAM'lerin tümör ilerlemesindeki rollerinin incelenmesi diğer hücrelerin araştırmaları ile birlikte tümör tedavileri için yeni yöntemler ortaya çıkarmanın yolunu açmıştır. Malign metastatik kanserlere sızan TAM'lerin tümör büyümesini ve metastazı teşvik edebileceği iyi bilinmektedir (Zhou ve ark., 2020). Tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'ler) tümör stromasındaki en belirgin popülasyonlardan birini temsil eder ve TME'de fazla miktarda bulunmalarının birçok kanserde klinik sonuçlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2012). Fare ve insan kanserlerindeki TAM'ler tümör mikroçevresinde immünosupresyonu ve fibrozu indükleyen arginaz (ARG1), interlökin-10 (IL-10) ve dönüştürücü büyüme faktörü β (TGFB) içeren M2 benzeri fenotiplerle ilişkili molekülleri büyük ölçüde ifade eder (Chanmee ve ark., 2014). Tersine IL-12, Tümör Nekroz Faktörü alfa (TNF-alfa) ve Nitrik Oksit Sentaz 2'yi (NOS2) ifade eden M1 benzeri fenotiplere sahip makrofajların prevalansının birçok insan kanserinde olumlu klinik sonuçlarla korele olduğu bildirilmiştir (Ohri ve ark., 2009; Ma ve ark., 2010; Ohri ve ark., 2010). Bununla birlikte bu M1/M2 sınıflandırması tümörlerdeki makrofajların fenotipini ve fonksiyonlarını açıklamak için yeterli değildir çünkü dokudaki makrofajlar doku mikroçevreleri tarafından sürekli olarak şekillendirilen dinamik ve son derece plastik

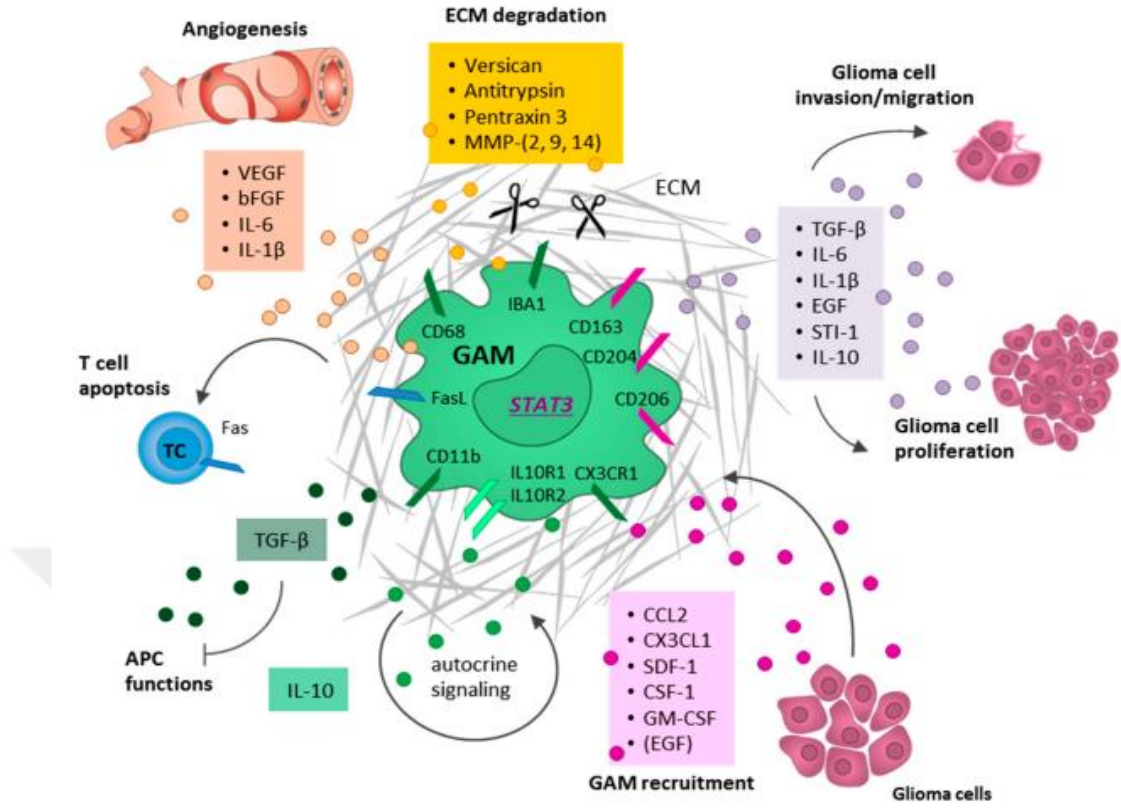
fenotiplerdir aynı zamanda fonksiyonları oldukça heterojendir. GBM'de TAM'lerin belirgin bir protümör rolü vardır ve tümör mikroçevresinde birikimleri tümör derecesi ile koreledir (Ye ve ark., 2012; Markovic ve ark., 2005; Chen ve ark., 2014; Lu ve ark., 2013). İşlevsel olarak TAM'ler düşük seviyelerde inflamatuvar sitokinler üretir ve T hücre aktivitesini indüklemeye kabiliyetinden yoksundur (Hussain ve ark., 2006). Tümörle ilişkili makrofajların (TAM'ler) sayısı tekrarlayan glioblastomlu hastalarda genel sağkalım ile ters ilişkilidir (Lu ve ark., 2013; Zhu ve ark., 2017). Farelerde yapılan çalışmalar TAM'lerin tümör nüksüne aracılık ettiğini göstermiştir (Tabatabai ve ark., 2006; Kioi ve ark., 2010; Walters ve ark., 2014). Yakın zamanda yapılan bir çalışma radyasyonun TAM'lerde glioma proliferasyonunu ve yeniden büyümesini destekleyen nüksetmeye özgü bir fenotipin elde edilmesini indüklediğini göstermiştir (Akkari ve ark., 2020). TAM'ler büyük ölçüde kemik iliği kaynaklı monositlerden köken alır (Cassetta ve ark., 2020; Franklin ve ark., 2014). Beyin tümörlerinde TAM'ler kemik iliği kaynaklı makrofajların (BMDM'LER) ve mikroglia (MG) olarak bilinen yerleşik makrofajların bileşiminden oluşur.



Şekil 1.11. TAM'ların Tümör İlerlemesi Üzerindeki Etkileri (Liu ve ark., 2022)

1.7.3.1. Tam'ın (Tümör ilişkili makrofajların) protümöral işlevi

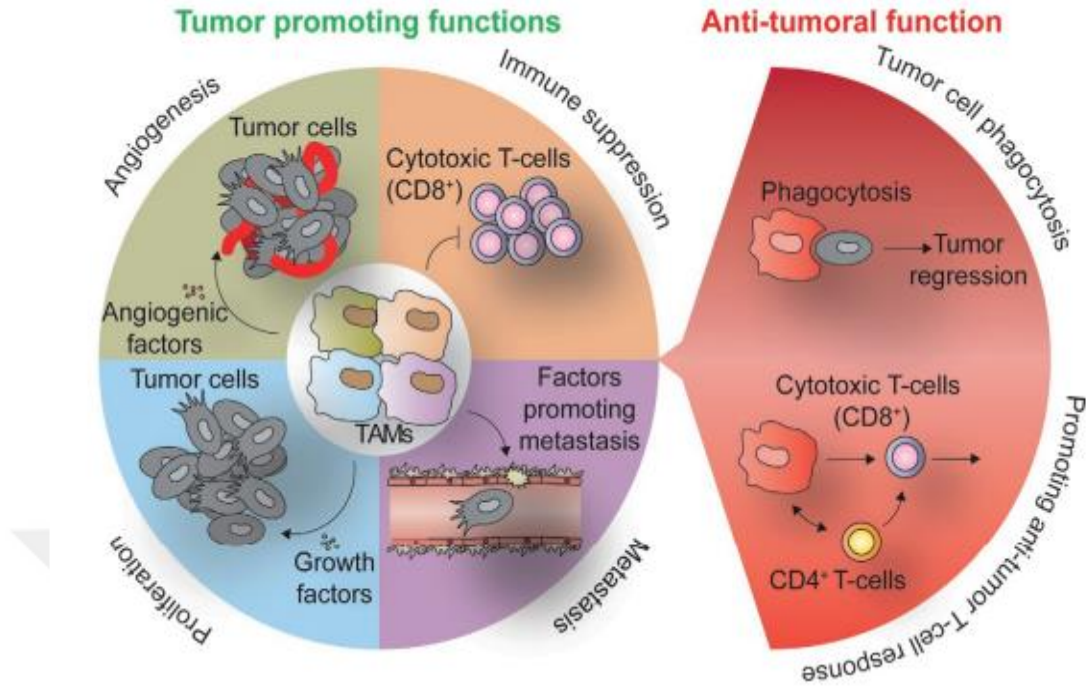
TAM'in; neoanjiyogenezin teşviki, proliferasyon, matris yeniden şekillenmesi ve epitel mezenkimal geçişe (EMT) ve anti-tümör immün yanıtlarının baskılanması dâhil olmak üzere çeşitli protümöral fonksiyonlar yoluyla tümör ilerlemesine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Daha spesifik olarak TAM epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörlerinin üretimi yoluyla tümör hücrelerinin proliferasyonunu uyarır (Grivennikov, Greten ve Karin, 2010; Haque ve ark., 2019). TAM mikroçevresindeki pro ve anti-anjiyojenik faktörlerin dengesini değiştirerek anjiyojenik sürece neden olur bu da tümör neovaskülarizasyonuna yol açar (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bu işlemi yönlendiren mekanizmalardan biri hücre dışı matrisin proteolitik bozunması ile vasküler endotel büyüme faktörü A'nın (VEGF-A) artmış salınımına yol açan TAM'dan matris metaloproteinaz 9'un (MMP9) salınmasıdır (Huang ve ark. 2002; Lee ve ark., 2005; Thurston, 2002). TAM, T hücresi aktivasyonunu doğrudan inhibe eden PD-L1 ve PD-L2 gibi immün kontrol noktalarını ifade ederek immünosupresif bir TME oluşumuna katkıda bulunur (Pollari ve ark., 2018; Santarpia ve ark., 2015). Ek olarak TAM klasik olmayan HLA-E ve HLA-G gibi T hücresi ve NK hücresi aktivasyonunu modüle eden inhibitör reseptörleri de ifade edebilir (Noy ve Pollard, 2014). T hücresi aktivasyonu için gerekli olan CD80 ve CD86 gibi kostimülatör moleküllerin ifadesini azaltır (Yamaguchi ve ark., 2016). TAM; IL-10, dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β), Arginaz 1 (Arg1) ve indoleamin 2,3-dioksijenaz (IDO) gibi sitokinler ve proteinler üretir bu durum immünosupresif ortama katkıda bulunur (Chen ve ark., 2019; Yang ve ark., 2015). Arg1, T hücreleri tarafından kullanılan esansiyel metabolitlerin immün baskılanmasına katkıda bulunmaktadır. Arg1, TCR (T hücre reseptör) sinyallemesinden sonra CD3'ün yeniden ifadeleneğini inhibe eden L-arginini metabolize eder (Rodriguez ve ark. 2004). IDO triptofanı metabolize ederken T hücresi enerjisini ve apoptozu indükleyebilen katabolitler ve Treg (T düzenleyici hücre) hücre popülasyonunun genişlemesini sağlar (Thaker ve ark., 2013).



Şekil 1.12. GBM'deki Makrofajların Pro-tümör İşlevleri (Roesch ve ark., 2018)

1.7.3.2. Tam'ın (Tümör ilişkili makrofajların) antitümöral işlevi

İyi tanımlanmış pro-tümör fonksiyonlarına ek olarak TAM enfeksiyon sırasında fagositoz, antijen sunumu ve sitokin üretimi yoluyla anti-tümör aktiviteye de katkıda bulunabilir (Germic ve ark., 2019). TAM proinflamatuvar bir fenotip gösterir, artmış fagositik aktiviteye ve artan MHC-I ve MHC-II, CD80/86 ifadesi ve Th1 ve CD8+ T hücre aktivitesini uyaran sitokinler yoluyla antijen sunumuna sahiptir (Yang ve ark., 2018). Bu TAM türleri genellikle fare modellerinin TME'sinde bulunmaz ancak mikroçevreyi anti-kanser immün yanıtlarıyla ilişkili daha proinflamatuvar bir fenotipe doğru yeniden polarize ederken ortaya çıkabilir (Etzerodt ve ark., 2019).

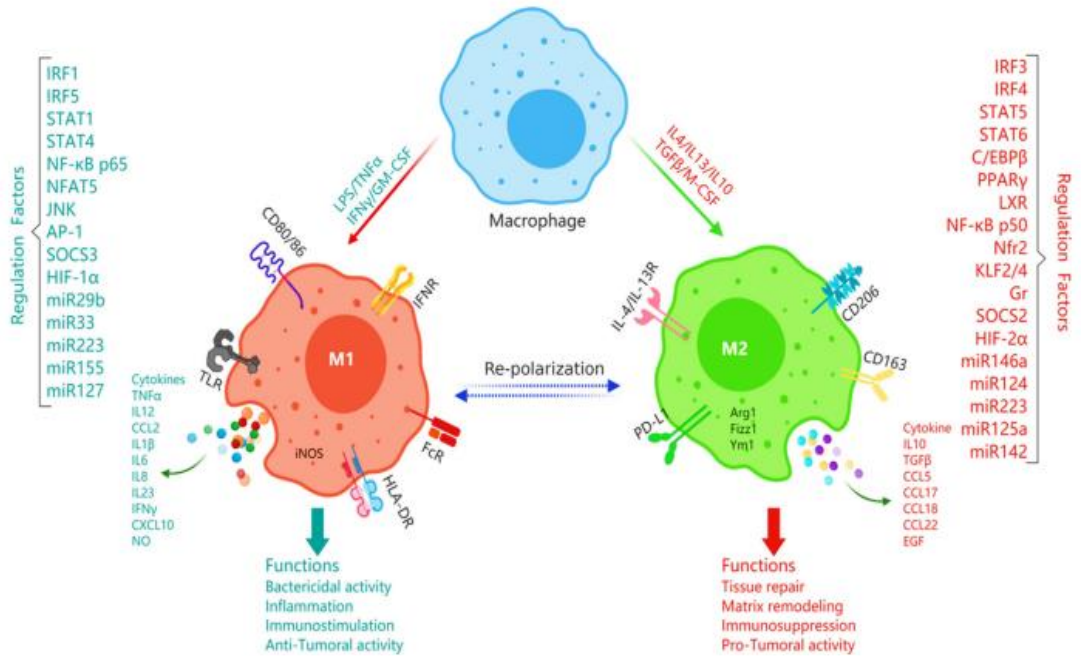


Şekil 1.13. Tümör ilişkili Makrofajların Fonksiyonları (Noy ve ark., 2014; Etzerodt ve ark., 2019)

1.7.3.3. Tam (Tümör ilişkili makrofajlar) için belirteçler

Farklı TAM alt kümelerini birbirinden veya diğer bağışıklık hücrelerinden ayırt etmeye yardımcı olan TAM'lerde farklı bir protein kümesi ifade edilir. Bununla birlikte tek bir belirteç varsa çok azının belirli bir işareti tanımlayabildiğini akılda tutmak önemlidir. Bu nedenle belirli TAM popülasyonlarını tanımlamak için sıklıkla birden fazla belirteç kullanılır. İntegrin alfa M olarak da bilinen CD11b TAM'leri tanımlamak için sıklıkla kullanılır. CD11b heteromerik kompleman reseptörü Makrofaj-1 antijeninin bir alt birimidir. CD11b NK hücresi ve T hücresi alt kümelerinde ifade edilir (Fe ve ark., 2014; McFarland ve ark., 1992; Christensen ve ark., 2001). Bununla birlikte en çok monositler ve granüositler üzerinde ifade edilir. Sonuç olarak CD11b yaygın olarak kullanılan bir pan-miyeloid belirteci haline gelmiştir. TME'deki TAM'lere kıyasla granüositlerin ve lenfositlerin diğer alt kümelerinin düşük miktarda CD11b bulunması göz önüne alındığında CD11b bazen bir "TAM-belirteci" olarak da kullanılır. (Coussens ve ark., 2013; Palucka ve ark.,

2016). CD68 iyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekülü 1 (Iba1) ve CD14'de TAM'a özgü belirteçlerdendir (Cassetta ve ark., 2016; Pinto ve ark., 2019; Bowman ve ark., 2016; Mildner ve ark., 2017). Çoğunlukla sitoplazmik granüllerde bulunan bir glikoprotein olan CD68 murin makrofajlarının nispeten güvenilir bir belirteçidir. CD68 insanlarda da bir belirteç olarak kullanılmasına rağmen dendritik hücreler, endotel hücreleri ve hatta bazı lenfoid altkümeler gibi diğer insan hücre tiplerinde ifadesinin olduğu bildirilmiştir (Goswami ve ark., 2020; Ruffell ve ark., 2015). Iba1 makrofaj ve mikroglia'nın karşılaştırılması ve fagositozunda önemli rol oynar (Ohsawa ve ark., 2000).



Şekil 1.14. Şekil 1. Makrofaj Polarizasyonu (Li ve ark., 2021)

1.8. Makrofajlar ve Mikroglia'nın Kökeni ve İşlevi

Makrofajlar konak savunmasında önemli roller oynayan evrimsel olarak korunmuş hücre tipleridir. Makrofajlar ilkel organizmalarda yalnızca bağışıklık tepkisini düzenlerken aynı zamanda daha yüksek organizmalarda ise diğer miyeloid hücrelerle ve lenfositlerle yakından etkileşime girer. Makrofajlar genellikle kandan

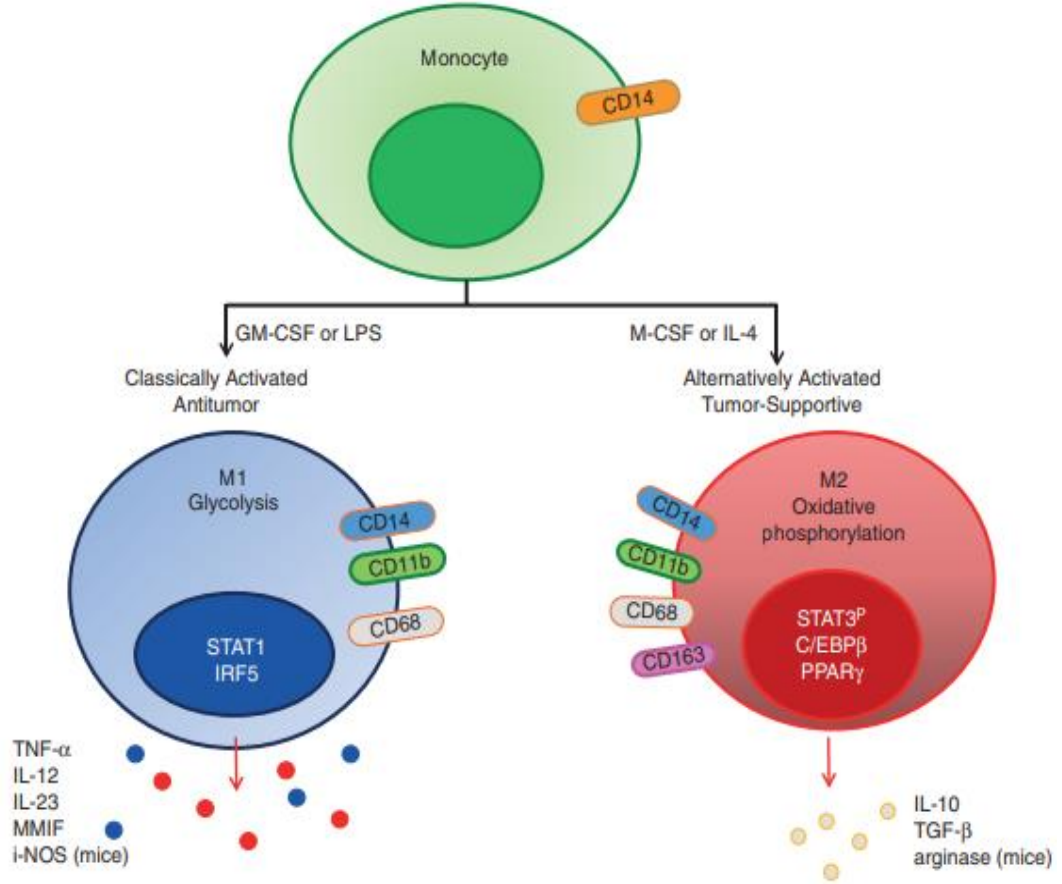
türetilmiş ve inflamatuvar sinyallere yanıt olarak toplanmış olsalar da bazı dokularda yerleşik makrofajları barındırır. CNS, mikroglia olarak bilinen yerel bir makrofaj içerir. Makrofajların ve mikrogliaların kökeni uzun süre tartışılmasına rağmen her iki hücrenin de kemik iliğinde olgunlaşan ortak bir hematopoietik kök hücreden kaynaklanan monositlerden geliştiği düşünülmüştür (Ling ve ark., 1993). Beyin hücresi popülasyonunun yaklaşık %10'unu temsil eden mikroglia'nın erken embriyonik gelişim sırasında yolk kesesinin eritro-miyeloid progenitörlerinden türetildiği kabul edilmektedir (Alliot ve ark., 1999). Normal fizyolojik koşullar altında merkezi sinir sistemi yalnızca yerleşik mikroglia tarafından oluşturulur ve diğer kemik iliğinden türetilen makrofajların varlığı hastalıklı beyinle ilişkilidir (Hoeffel ve ark., 2015; Quail ve ark., 2017).

Mikroglia bağışıklık tepkisinin önemli bir parçası olmasının yanı sıra beyin fizyolojik homeostazında da kritik bir rol oynar. Mikroglia nörogenez ve miyelin oluşumu gibi beyin gelişimi ve işlevi için önemlidir (Wlodarczyk ve ark., 2017). Mikroglia tarafından beyin homeostazının sürdürülmesi apoptotik hücrelerin ve diğer kalıntıların minimum seviyede olması bağışıklık uyarımı ile uzaklaştırılmasını içerir. Buna karşılık makrofajlar apoptotik hücrelerin veya nekrotik hücrelerin fagositozuna aracılık etmek için sadece patolojik koşullar altında beyne sızarlar (Murray ve ark., 2011). Makrofajlar ve mikroglia ölmekte olan hücreler tarafından salınan kemo-çekici maddeleri algılayarak apoptotik hücreleri tespit eder. Bu sözde "beni ye" sinyalleri bu hücreleri apoptotik hücrelere doğru yönlendirir ve "beni ye sinyallerine" bağlanmayı sağlar. Bu hücre-hücre etkileşimi fagositozu başlatır (Sierra ve ark., 2013). Fagositozun ardından makrofajlar ve mikroglia T hücrelerine ilgili antijenler sunduğundan apoptotik hücrelerin fagositozu aynı zamanda doğuştan gelen bağışıklık tepkisi ile adaptif bir bağışıklık tepkisi arasındaki temeli oluşturur. Bu nedenle TAM'ler işlevsiz antijen sunumuna sahiptir (Muraoka ve ark., 2019).

1.8.1. Makrofajların ve Mikroglialinin Polarizasyonu

Makrofajların tarihsel olarak yüksek plastisite sergilediği bilinmektedir ve sırasıyla klasik olarak aktive edilmiş ve alternatif olarak aktive edilmiş makrofajlar olarak da bilinen pro-inflamatuar (M1) ve anti-inflamatuar (M2) fenotiplerine ayrılabilir. Pro-inflamatuar M1 makrofajlar, anti-tümörijenik etkilerde yer alırken immünosupresif M2 makrofajlar, tümör büyümesini, anjiyogenezi ve invazyonu destekleyen pro-tümörijenik mekanizmalarla ilişkilidir (Tong ve ark., 2021). TAM sınıflandırmasında Th1'in proinflamatuar, Th2'nin ise antiinflamatuar olduğu T-yardımcı hücrelere bir benzetmedir (Liu ve ark., 2014). Kemik iliği kaynaklı makrofajlar arasında bu doğal plastisitenin varlığı da mikroglia'nın bir özelliği gibi görünmektedir. Mikroglial polarizasyonu TME'deki mikroglialinin M1- veya M2-fenotiplerine doğru polarizasyon potansiyeli barındırdığını göstermektedir. (Ransahoff ve ark., 2016; Xuan ve ark., 2021; Wu ve ark., 2020; Roesch ve ark., 2018; Walentynowicz ve ark., 2018; Ellert-Miklaszewska ve ark., 2016; Ellert-Miklaszewska ve ark., 2013). Ancak TAM'ler için bu M1/M2 arasındaki ilişkinin ikiden fazla makrofaj fenotipinin basitleştirilmesi olarak kabul edilmektedir (Xue ve ark., 2014; Szulzewsky ve ark., 2016). Bu bağlamda M2 fenotipi M2a, M2b, M2c ve M2d olarak farklı alt sınıflara ayrılmaktadır. Bu farklı durumlar gen ifadeleme profillerine, efektör fonksiyonlarına ve ayrıca kemokin ve sitokin üretim profillerine dayanmaktadır (Roszer ve ark., 2015). Farklı fonksiyonel fenotipler hakkında bildiklerimizin çoğu polarizasyonu indükleyen kanonik kemokinlerin kullanıldığı in vitro deneylere dayanmaktadır. TNF- α , IFN- γ ve LPS polarizasyonu makrofajları M1 fenotipine doğru yönlendirirken, IL-4, IL-10 ve IL-13 gibi sitokinler ise M2 fenotipini indükler (Walker ve ark., 2015). Bununla birlikte in vivo deneyler bu fenotipik indirgemenin daha çeşitli ve karmaşık bir durum olduğunu göstermektedir. Aslında hem hayvanlardan hem de insanlardan alınan tümör örneklerinin tek hücreli RNA dizilimi ve immünohistokimyasal boyaması farklı polarizasyon durumlarının bir arada var olduğunu ortaya çıkarmıştır. Hem M1 hem de M2'nin aynı hücre içinde aynı anda tespit edilebileceğini ortaya koyan tek TAM'ler analiz edilmiştir (Muller ve ark., 2017). Bu durum TME'deki TAM'lerin plastisite ve heterojen bileşimi fikrini destekler ve M1/M2 kavramının ayrı bir aktivasyon durumu olarak değil birlikte

değerlendirilecek bir süreklilik olduğunu göstermektedir (Mantovani ve ark., 2004; Zeiner ve ark., 2019).



Şekil 1.15. Polarize makrofajlara ait farklı reseptör, sitokin, kemokin ve efektör fonksiyonları (Wei ve ark., 2020)

1.9. Gliomada Makrofajlar ve Mikroglia

Glioma TME'sindeki başlıca immün hücreler arasında mikroglia, monosit kaynaklı makrofajlar, nötrofiller ve T hücreleri bulunur. Dağılımları farklı derecelerde glioma ve metastatik beyin tümörleri arasında değişir. GBM'de TAM'ler, tümör kütleindeki en fazla bulunan hücre tipini temsil eder ve toplam kütleinin% 30-50'sini oluşturur (Hambardzumyan ve ark., 2016). Beyindeki maligniteler arasında IDH-yabanıl tip GBM ve metastatik beyin tümörleri en yüksek monosit türevli makrofaj akışına sahiptir (Klemm ve ark., 2020). TAM'lerin infiltrasyonu, GBM' de dahil olmak

üzere farklı kanserlerde tümör derecesi ile artma eğilimindedir (Muller ve ark.,2017). Periferden infiltre makrofajlardaki artışın GBM'de düşük dereceli glioma kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca düşük dereceli gliomalarda kan kaynaklı TAM'lerin daha yüksek infiltrasyonu kötü sağkalım ile korele iken, mikrogliyal yoğunluk ile sağkalım arasında böyle bir korelasyon gözlenmemiştir (Muller ve ark., 2017).

GBM'deki TAM'ler kötü prognoz ve tedaviye direnç ile ilişkili olan M2 polarizasyon belirteçlerinin yüksek ifadesini gösterir (Gjorgjevski ve ark., 2019). IDH mutant GBM'ye kıyasla IDH-yabanıl tipte TAM'lerin oranında daha yüksek bir varyasyon olmasına rağmen IDH-yabanı tip GBM'ye kıyasla IDH-mutant GBM'nin daha düşük bir TAM oranına sahip olduğu bulunmuştur (Poon ve ark., 2019). IDH mutantı GBM'deki TAM'lerin yabanıl tiptekilerine kıyasla daha fazla pro-inflamatuar özellikler gösterdiği gözlemlenmiştir. IDH-yabanıl tip GBM, pro- ve anti-inflamatuar TAM'ler açısından yüksek tümörler arası değişkenliğe sahiptir (Poon ve ark., 2019). Ancak farklı glioma derecelerinde TAM polarizasyonu çeşitlidir ve her zaman net değildir. Farklı makrofajların immünohistokimyasal boyaması gliomalar arasındaki belirteçler diffüz astrositomlar ve GBM ile karşılaştırıldığında pilositik astrositomda (WHO derece I) M2 belirteci olan CD163'ün daha yüksek ifadesi söz konusudur.

Şimdiye kadar yapılan birkaç çalışma gliomaların TME'sine hâkim olan bir immünosupresif TAM fenotipini göstermiştir. Bununla birlikte bu TAM'lerin gliomadaki kesin fenotipi hala tartışmalıdır ve tam olarak tanımlanmamıştır. Sağlıklı dokuya kıyasla GBM'deki CD11b+ hücrelerinin transkriptomik profili pro-tümörijenik veya anti-tümörijenik polarizasyona doğru net bir kayma söz konusu değildir (Szulzewsky ve ark., 2016).

1.10. Merkezi Sinir Sistemi ve Başışıklık Sistemi

Beyin tümörlerinin tedavisindeki son gelişmelere rağmen GBM'nin tedavisi nöroloji alanında zorluk oluşturmaya devam etmektedir. Özellikle malign gliomaların prognozu çeşitli nedenlerle karmaşık bir süreci içerir. İnfiltrate edici büyüme paternlerine ve farklı apoptotik uyarılara dirençlerine ek olarak gliomalar immünosupresif bir fenotip ile karakterize edilir (Parney ve diğeri, 2000b; Gomez ve Kruse, 2006). Beyin tümörlerinin en malign formu olan glioblastoma tümörle ilişkili immünosupresyona sahiptir ancak düşük dereceli gliomalar ve medulloblastomlar ile ependimomlar gibi diğeri tümör varlıkları da immünosupresif özellikler gösterir.

Merkezi sinir sistemindeki (CNS) başışıklık gözetimi vücudun diğeri bölümlerindekilerden biraz farklıdır. Endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve astrositlerden oluşan kan-beyin bariyerinin varlığı lenfositlerin kandan CNS'ye göçünü engeller (Doolittle ve ark., 2005). Kompleman bileşenleri gibi plazma proteinlerinin de beyne kolayca geçmesi engellenir. Mikroglial hücrelerin beyin APC'leri olduğu düşünülse de, ekstraserebral APC'lere kıyasla başışıklık sisteminin diğeri hücrelerine antijen sunma potansiyelinin aynı olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır (Streit ve ark., 2005). Son olarak mikroglia dışında nöronlar ve glial hücreler gibi beyin parankimal hücreleri üzerindeki MHC moleküllerinin ifadesi düşüktür ve bu da antijenlerin optimal sunumunu zorlaştırır (Sikorski ve Lesniak, 2005). Bu gerçekler nedeniyle CNS uzun süredir "başışıklık ayrıcalıklı alan" olarak adlandırılmaktadır. Bununla birlikte CNS'de güçlü başışıklık tepkilerinin meydana geldiğine dair kanıtlar vardır, bu nedenle belki de daha çok "immünolojik olarak özelleşmiş bir bölge" olarak düşünülmektedir. Bu durum CNS'de immünolojik reaksiyon varlığı ile inflamatuvar hastalıklar gibi diğeri patolojik durumlarda görülebilir. Birçok beyin tümöründe kan-beyin bariyeri sağlam değildir, bu nedenle artan sayıda lenfositin CNS'ye girmesine izin verir (Hickey ve diğeri, 1991). Antijen sunma özellikleri çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterilmiştir. Beyinde bulunan T lenfositlerinin servikal lenf düğümlerinde uyarılabileceğine dair kanıtlar vardır. Ancak beyinde klasik bir lenf

drenajının olmaması nedeniyle beyindeki bağışıklık hücreleri ile periferdeki lenf dokuları arasındaki bağlantı hala tam olarak anlaşılamamıştır (Karman ve ark., 2004). Glioma hücreleri özellikle etkin T ve NK-hücre yanıtları için bir ön koşul olan aktive edici ligandları ifade eder (Frieese ve ark., 2003). MHC sınıf I moleküllerinin glioma hücreleri tarafından ifadesi in vitro olarak gösterilmiştir (Parney ve ark., 2000a). Bu durum in vivo koşullarda daha az belirgindir ancak MCH sınıf I moleküllerinin ifadesi ve olası indüksiyonu muhtemel görünmektedir (Balducci-Silano ve ark., 1988). Bununla birlikte MHC sınıf I moleküllerinin malign glioma hücreleri üzerinde oldukça düşük ifadesi antijenlerin sunumunu sınırlar ve güçlü T-hücre yanıtlarını önler. Daha yakın tarihli çalışmalar glioma hücrelerinin antijen sunma özelliklerinde eksiklikler gösterdiğini ve böylece T lenfositleri tarafından etkin tanıma ve parçalanmayı engellediğini göstermiştir (Facoetti ve ark., 2005).

İmmün hücre infiltrasyonu pro-tümörjenik fonksiyonlara aracılık etmek için birlikte seçilen birçok bağışıklık bileşeniyle katı tümörler arasında karmaşık ve çeşitli rollere sahiptir (Thorsson ve ark., 2018). Farklı tümör tiplerinde farklı immün hücre profilleri baskındır fakat birçok etkileşim birkaç katı tümörde tutarlıdır. Örneğin M2-polarize tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'ler) CSC popülasyonlarını kemokin sinyali ve Sonic Hedgehog gibi kök hücre yollarının indüklenmesi yoluyla yaygın olarak destekler (Jinushi ve ark., 2011). TAM'ler ayrıca çoklu kanser türlerinde EMT (Epitelyal Mezenkimal Geçiş) ve CSC (Kanser Kök Hücre) özelliklerini de destekler (Fan ve ark., 2014, Li ve ark., 2018a).

Bağışıklık kaçışı tümör başlangıcında kritik bir rol oynar. CSC'ler tümörjenez ortamını temsil ettiğinden genellikle immünosupresiftirler. CSC'ler çeşitli mekanizmalar yoluyla bağışıklık hücreleri tarafından öldürülmekten kaçınır. Örneğin, CD133+ glioblastoma CSC'leri ve ABCB5+ melanom CSC'leri, T hücre saldırısından kaçmak için MHC sınıf I moleküllerini (insan HLA-A, HLA-B ve HLA-C) aşağı regüle eder (Di Tomaso ve ark., 2010, Schatton ve ark., 2010). Glioblastoma CSC'leri antijen sunma ve sunum yolları kapasitesini azaltmak için antijen işleme (TAP) ile

ilişkili düşük moleküler ağırlıklı protein (LMP) ve taşıyıcının ifadesini azaltır (Di Tomaso ve ark., 2010). CSC'lerde Toll benzeri reseptör 4'ün (TLR4) düşük ifadesi doğuştan gelen bağışıklık baskılamasından kaçınmalarına yardımcı olur (Alvarado ve ark., 2017).

Artan kanıtlar CSC'lerin tümör mikroçevresindeki bağışıklık tepkisini yeniden şekillendirmedeki rolünü de desteklemektedir. CSC'ler anti-tümör immün tepkisini azaltan TGF- β ve IL4 gibi birçok immünosupresif molekül salgılar (Nappo ve ark., 2017). TGF- β , Foxp3'e bağımlı ve bağımsız yollar aracılığıyla düzenleyici T hücresi aktivasyonunu indüklerken aktif T hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder (Fantini ve diğerleri, 2004, Oh ve ark., 2017, Thomas ve Massagué, 2005). TGF- β doğal öldürücü hücreleri inaktive eder ve pro-onkojenik M2 makrofaj polarizasyonunu destekler (Ganesh ve Massagué, 2018). Ayrıca glioblastoma CSC'leri M2 makrofajlarını TME'ne almak için periostin (POSTN) salgılamaktadır (Liu ve ark., 2014, Zhou ve ark., 2015). Sitokinler bağışıklık hücreleri arasında hücreler arası iletişimi sağlayan ve doğrudan bağışıklık tepkilerine yardımcı olan küçük moleküllerdir. Bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu IL-1 β , IL-6, TNFa, IL-10, IL-1 reseptör antagonisti (IL-1Ra) ve TGF β dahil olmak üzere pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinlerin üretimine ve salgılanmasına yol açar (Janeway ve ark., 2002). Bu sitokinler gen ifadenmesini meydana getirirken aynı zamanda hücre sinyalleşmesini başlatmak için karşılık gelen reseptörlerine bağlanır. CNS sitokinlerin düşük ifadesini korur ancak inflammatuar sitokinler (IL-1, IL-6 ve TNFa), CNS immün hücre aktivasyonunun ardından hızla yukarı regüle edilir.

Yerleşik CNS bağışıklık hücreleri tarafından inflammatuar sitokin üretimi inflammatuar sinyalleri yaymak ve patojenlere fizyolojik tepkiler vermek için gereklidir. Periferik immün aktivasyon, yerleşik CNS immün hücreleri tarafından inflammatuar sitokin üretimi olmaksızın CNS'ye yeterince sinyal veremez çünkü sitokinler kısa ömürlüdür ve CNS parankiminden kolayca yayılmazlar. Sitokin üretimine uyarının kaynağına ve yoğunluğuna bağlı olarak birkaç hücresel sinyal yolu aracılık eder.

Örneğin, IL-1 reseptörüne IL-1 bağlanması mitojenle aktive olan protein kinazı (MAPK) ve nükleer faktör- κ B (NF- κ B) inflammatuar sinyalleşme kaskadlarını başlatan yolakları aktive eder (Parker ve ark., 2002; Lawrence ve ark., 2009).

Anti-inflammatuar sitokinler MAPK ve NF- κ B sinyalinin inhibisyonu yoluyla inflammatuar sitokinlerin transkripsiyonunu ve translasyonunu doğrudan azaltabilir (Strle ve ark., 2001). Ek olarak anti-inflammatuar sitokinler inflammatuar sitokin üretimini azaltan ve hücrel onarım süreçlerini destekleyen sitokin sinyal yollarının baskılayıcısını indükler (Baker ve ark., 2009). Anti-inflammatuar sitokinlerin üretimi ve salgılanması CNS'de özellikle önemlidir çünkü nöronlar sınırlı rejeneratif kapasiteye sahiptir.

1.11. Glioblastoma Multiforme

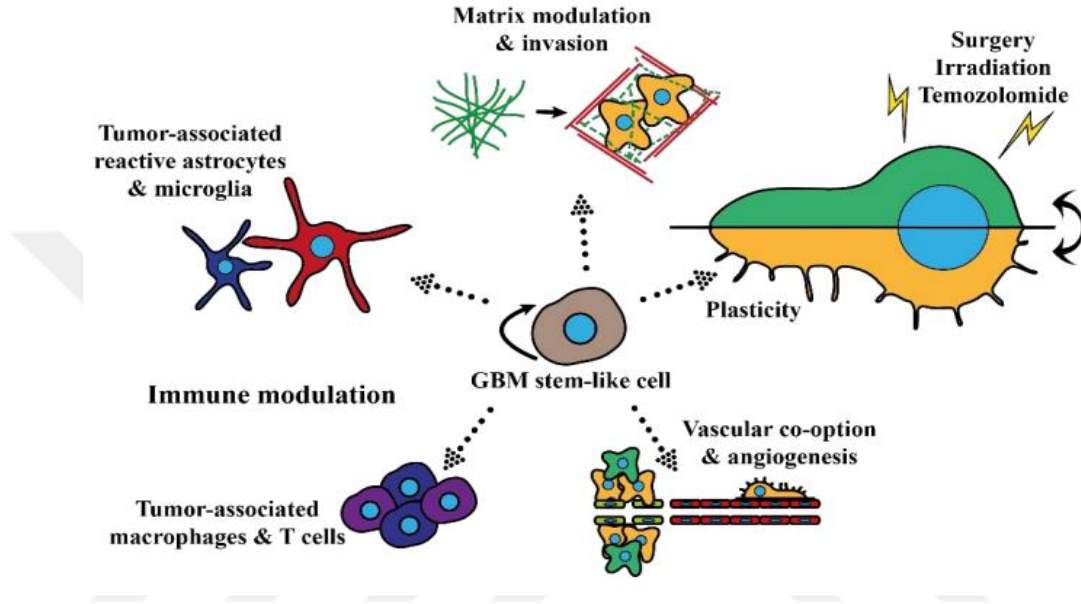
Glioblastoma (GBM), yetişkinlerde merkezi sinir sisteminin en sık görülen primer tümör tipidir ve yenilikçi tanı stratejileri ve yeni tedavilerin geliştirilmesine rağmen kötü olan prognozu önemli ölçüde iyileşmemiştir (Deorah ve ark., 2006; Reardon ve ark., 2012). Kompleks ve yeniden üretilmeyen tanılar ve kemoterapi rejimlerine duyarlılığı veya direnci doğru bir şekilde tahmin edememe ve ayrıca optimal CNS biyoyararlanımının daha az olması, hastalığın kötü prognozuna katkıda bulunmuştur. Kanser ilerlemesi mutasyon birikiminin bir kanser hücresinin genomunun sağlıklı bir hücreninkinden sapmasına neden olduğu bir süreç olan somatik evrim tarafından desteklenir. Bununla birlikte GBM gelişimi farklı genetik ve moleküler sapmalardan oluşan karmaşık bir ağ yoluyla meydana gelmesi ve ana sinyal yollarında önemli değişikliklere yol açması bakımından dikkate değerdir. Son yıllarda kanıtlanmış veriler ortaya çıkmış ve tümörlerin genetik anormalliklere ek olarak spesifik genetik değişiklikleri barındıran çok sayıda kanserli hücre popülasyonundan oluştuğunu göstermiştir (Loeb ve ark., 2011). Tümörlerdeki bu heterojenlik karakterize edilen genetik instabileden ve tüm neoplazmalara eşlik eden artan mutasyon oranlarından genetik ve epigenetik modifikasyonlar yoluyla Darwin'in en

uygun klonların seçiminden kaynaklanır (Gerlinger ve ark., 2010). GBM'ler beyin parankimi boyunca geniş ölçüde dağıldıkları için ve ayrıca yüksek düzeyde vaskülarizasyon nedeniyle öldürücüdür, bu da maksimum cerrahi rezeksiyonu ulaşılamaz hale getirir. Bu nedenle hücre göçünü, dağılmasını ve anjiyogenezi inhibe etmek için tümöre özgü ilaç hedeflerine ve farmakolojik ajanlara duyulan ihtiyaç çok büyüktür. GBM gelişimine yatkın olan kalıtsal özellikler yoktur bu nedenle karakterize edilen tüm genetik değişiklikler somatik ve edinilmiş sapmalardır.

Gliomalar tüm beyin ve merkezi sinir sistemi tümörlerinin yaklaşık% 30'unu ve tüm malign beyin tümörlerinin %80'ini oluşturur. Glioma sıklığına rağmen bu tümörlerin etiyolojisi büyük ölçüde bilinmemektedir (Goodenberger ve ark., 2012). Gliomalar (Dünya Sağlık Örgütüne göre) nöroepitelyal tümörler, astrositik neoplazmlar, oligodendrogliyal, oligoastrositik, ependimal ve koroid pleksus tümörleri olarak sınıflandırılmaktadır (Schwartzbaum ve ark., 2006).

Glioblastoma (GBM; Dünya Sağlık Örgütüne göre derecesi IV glioma) merkezi sinir sisteminin en yaygın ve ölümcül görülen intrinsik beyin tümörüdür (Stupp ve ark., 2009). Günümüzde GBM hastalarında cerrahi rezeksiyonu takiben radyoterapi ve Temozolomid (TMZ) uygulamasını içeren kemoterapi uygulanmaktadır (Stupp ve ark., 2005). Vakaların çoğu erkeklerde ortaya çıkar. Olguların GBM %60'ında tümör de novo başlatırken, diğer GBM %40'ında daha düşük dereceli bir beyin tümörünün malign gelişimi ile ortaya çıkar. GBM oluşma oranı bir dereceye kadar erkeklerde kadınlara göre daha yüksektir (1.6:1) (Thakkar ve ark., 2014). Yakın zamanda teşhis edilen GBM'de ortalama sağkalım oranı 8 ila 15 aydır. Tekrarlayan GBM 'de ortalama sağkalım oranı sadece 3 ila 9 aydır. Kapsayıcı olarak 5 yıllık sağkalım oranı sadece %5'tir (Vredenburgh ve ark., 2007). Bunun nedeni GBM tümörleri fenotipik, hücresel, genetik ve epigenetik heterojenlik gösterirler ve GBM tümörlerinin tedaviye yanıt verememesindeki önemli bir sorunun tümör içindeki GBM kök hücrelerinin (GSC'LER) kendini yenileme özelliğine sahip alt popülasyonlarından dolayı çeşitli tedavilere karşı oldukça dirençli olmasından kaynaklanmaktadır (Bao ve ark., 2006;

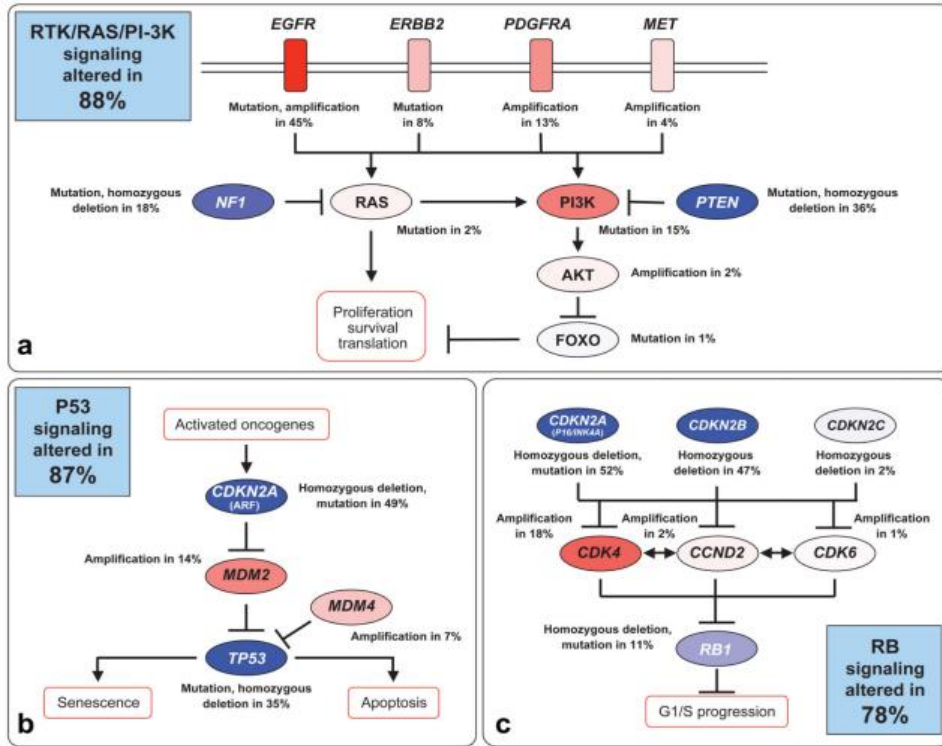
Safa ve ark., 2015., Singh ve ark., 2004., Jackson ve ark., 2015). Bu durum tümör rezeksiyonunu imkânsız hale getirmektedir. Tanı anında daha az agresif görünen (WHO'e göre derecesi 2 ve 3 olan) gliomalar 5-10 yıl içinde kötü evreye ilerlemektedirler. Beyin fonksiyonları üzerinde meydana gelen bu yıkıcı etki beraberinde bilişsel ve duygusal eksikliklere de neden olmaktadır (Zong ve ark., 2012).



Şekil 1.16. GSC'ler tarafından glioblastoma patogenezi ve ilerlemesinde düzenlenen temel fonksiyonlara genel bakış

1.11.1. Glioblastomada Genomik Değişiklikler

Büyük ölçekli genomik DNA analizi gibi mevcut teknolojiler glioblastomun genetik evriminden kaçmıştır. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyona (CGH) göre epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) lokusu ile kromozom 7p kazanımı ve fosfataz ve tensin homologu (PTEN) lokusu ile kromozom 10q kaybı en sık görülen değişikliklerdir (Inda ve ark., 2003). Bunun yanında IDH, p53, PTEN gibi gen mutasyonları ve bunların RTK/RAS/PI3K, p53 sinyali ve RB sinyali dahil ilgili sinyal yolları gliomagenezde kritik öneme sahiptir (Cancer Genome Atlas.; 2008).



Şekil 1.17. Üç kritik sinyal yolunda sık görülen genetik değişiklikler (The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network 2008)

1.11.1.1. IDH mutasyonları

IDH1'in ana işlevi izositratı a-ketoglutarata (a-KG) dönüştürmektir, bu arada kofaktör nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP⁺) NADPH'ye oksitlenir. Bununla birlikte mutasyona uğramış IDH, a-KG'yi bunun yerine 2-hidroksiglutarat (2-HG)'ye düşürür ve NADPH'den NADP⁺ üretir. 2-HG'nin artması ve a-KG'nin azalması, hücre farklılaşmasını bloke etme hipoksi ile indüklenebilir faktör 1α'nın (HIF1α) aktivasyonu ve bunun aşağı yöndeki faktörlerinin indüklenmesi gibi çeşitli yollarla tümör gelişimini teşvik edebilir (Lu ve ark., 2012; Wang ve ark., 2014; Sasaki ve ark., 2012). Glioblastomlarda IDH1/2 mutasyonları primer glioblastoma vakalarının %5'ine kadar bulunabilirken sekonder glioblastomların neredeyse %80'inde mevcuttur (Yan ve ark., 2009).

1.11.1.2. p53 mutasyonu

ARF-MDM2-p53 yolunun glioblastomların yaklaşık %87'sinde düzensiz olduğu bulunmuştur (Cancer Genome Atlas., 2008). TP53 mutasyonlarını, CDKN2A/ARF'nin silinmesini ve/veya MDM2 ve/veya MDM4 amplifikasyonlarını içerir. MDM2 geni 12q kromozomunda yer alır ve glioblastomların yaklaşık %10-15'inde amplifiye edilir (Cancer Genome Atlas., 2008). TP53 mutasyonları sekonderde (%65) birincil (%30) glioblastomlara göre daha yaygındır (Nagpal ve ark., 2006). p53 bir tümör baskılayıcıdır ve DNA onarımını, hücre yaşlanmasını, hücre ölümünü ve metabolizmayı düzenler (Kastenhuber ve ark., 2017). Onkogen aktivasyonuna yanıt olarak ARF, normalde p53'ü bozan E3 ubiquitin ligaz proteini MDM2'yi inhibe etme yeteneğine sahiptir böylece p53'ün stabilizasyonuna neden olur. MDM2 aynı zamanda p53'ün aşağı akış hedef genidir ve p53 seviyesi bir geri besleme döngüsünde bu şekilde kontrol edilir. MDM2'nin p53'e bağlanmasını inhibe etmek p53'ün anında stabilizasyonuna neden olur. Mutant p53, MDM2 genini indükleyemez ve bu nedenle mutant p53, tümörlerde daha yüksek seviyelerde birikebilir ancak bu söz konusu mutasyona bağlı olabilir (Lukashchuk ve ark., 2007). p53 mutantlarının bir alt kümesi, glioblastomada mikrogliya veya monosit iltihabını çektiği bildirilen ve hastalarda daha kısa sağkalım ile korele olan fonksiyon kazanımı (GOF) mutantları olarak fonksiyonel olarak sınıflandırılabilir (Ham ve ark., 2019).

1.11.1.3. PTEN mutasyonu

PTEN, bir tümör baskılayıcı gendir ve 10q kromozomunda yer alır. PTEN'in ana işlevi, fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)/AKT yollarını negatif olarak düzenlemek ve hücre büyümesini, metabolizmasını ve hayatta kalmasını kontrol etmektir (Lee ve ark., 2018). Mutasyon veya delesyon yoluyla PTEN inaktivasyonu glioblastomun %36'sında meydana gelir. PTEN kaybı AKT/mTOR aktivitesini artırarak glioblastoma hücrelerinin çoğalmasını destekler. PTEN ve yaban tip p53'e sahip hücreler birbirlerinin tümör baskılayıcı işlevini geliştirirler. PTEN, p53'ün bozulmasını inhibe edebilirken p53 promotörüne bağlanarak PTEN'i aktive edebilir (Stambolic ve ark., 2001; Mayo ve ark., 2002). Tersine yaban tip PTEN ve mutant p53 ifade eden

hücrelerde PTEN'in bir tümör teşvik edici özelliğe sahip olduğu söylenebilir. PTEN MDM2'nin inaktivasyonu yoluyla mutant p53'ün bozunmasını ve ayrıca mutant p53 proteininin doğrudan stabilizasyonunu inhibe eder, burada PTEN inhibisyonu hücre proliferasyonunu ve tümör büyümesini baskılar (Li ve ark., 2008).

1.11.1.4. EGFR amplifikasyonu

EGFR kromozom 7p üzerinde bulunur. EGFR amplifikasyonu glioblastomaların %40'a kadarında meydana gelir ve ayrıca EGFR mutasyonları (EGFRvIII), amplifiye EGFR'li tümörlerin yarısında meydana gelir. EGFRvIII ekzon 2 ve 7'de delesyonlar yani hücre dışı alanda 267 amino asit kaybı olan mutasyona uğramış bir EGFR formudur ve ligandlara daha az bağlanma kapasitesi gösterir (Hatanpaa ve ark., 2010). Glioblastomda, yaban tip EGFR ve EGFRvIII her zaman birlikte ifade edilir ancak EGFRvIII daha tümörijeniktir ve hücrelerde PI3K/AKT, RAS ve MAPK yollarını aktive eder. EGFRvIII ve yaban tip EGFR glioma hücrelerinde otokrin/parakrin halkalar oluşturur; burada EGFRvIII'li hücreler, yaban tip olan hücrelerin çoğalması için heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü a (TGFa) gibi ligandlar sağlar (Ramnarain ve ark., 2006).

1.11.1.5. PDGFRA amplifikasyonu

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü- α (PDGFRA) amplifikasyonu glioblastomun yaklaşık %13'ünde bulunur. Mutant PDGFRA, PDGFRA amplifikasyonu ile glioblastomaların %40'ında meydana gelen tekrarlayan bir gen yeniden düzenlemesidir. Amplifiye edilmiş PDGFRA yüksek tirozin kinaz aktivitesi ve transformasyon potansiyeli ile glioblastomda onkojenik özelliklere sahiptir (Ozawa ve ark., 2010).

1.11.1.6. TERT promotör mutasyonu

Telomeraz ters transkriptaz geni (TERT) 5p15.33 kromozomunda yer alır. TERT kendi RNA'sını kullanarak telomerlerin uzunluğunu korumak için hareket eder (Killela ve ark., 2013). TERT mutasyonları glioblastomun %69'unda sıklıkla meydana gelir ve daha yüksek glioblastoma riski ile ilişkilidir (Yuan ve ark., 2016).

1.11.1.7. MGMT hipermetilasyonu

MGMT, guaninin O6 pozisyonundan alkil eklentilerini çıkarabilen 10q26.3 kromozomu üzerinde bulunur, bu nedenle DNA onarımında bir işlevi vardır. MGMT hipermetilasyonu, GBM'nin yaklaşık %50'sinde gözlenir ve MGMT'nin promotör alanındaki sitozin-fosfat-guanin (CpG) ada bölgelerinde meydana gelir (Wick ve ark., 2014). MGMT'nin hipermetilasyonu DNA onarım işlevini susturur ve DNA replikasyonu sırasında baz yanlış onarımına neden olur. Glioblastomda MGMT metilasyonu olan hastalar alkilleyici kemoterapiye daha iyi yanıt verir (Hegi ve ark., 2008).

1.12. GBM'de (Glioblastoma Multiforme'de) Mikroçevre

Glioblastoma sadece tümör hücrelerini değil aynı zamanda tümör mikroçevresini oluşturan immün hücreler, astrositler ve vasküler hücreler gibi tümör dışı hücreleri de içeren intratümöral olarak heterojen bir tümördür. Tümör mikroçevresi, glioblastoma patogenezinde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar.

GBM dokusunun büyük bir kısmı infiltrate mikroglia ve makrofajlardan oluşur. İnterlökin-10 (IL-10), İnterlökin-6 (IL6), transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β), prostaglandin E2 (PGE2) gibi immün baskılayıcı faktörler, GBM hücrelerine karşı immün yanıtı bastırır, dendritik hücrelerin (DC'ler) düzenleyici bir fenotipe dönüşümünü teşvik eder ve (Treg'ler) hücreler FOXP3 + düzenleyici T'nin aktivasyonunu teşvik eder. Hipoksinin ve ardından HIF-1a ve VEGF üretiminin ifadesinin de Treg aktivasyonuna ve immün baskılanmaya neden olduğu bildirilmiştir.

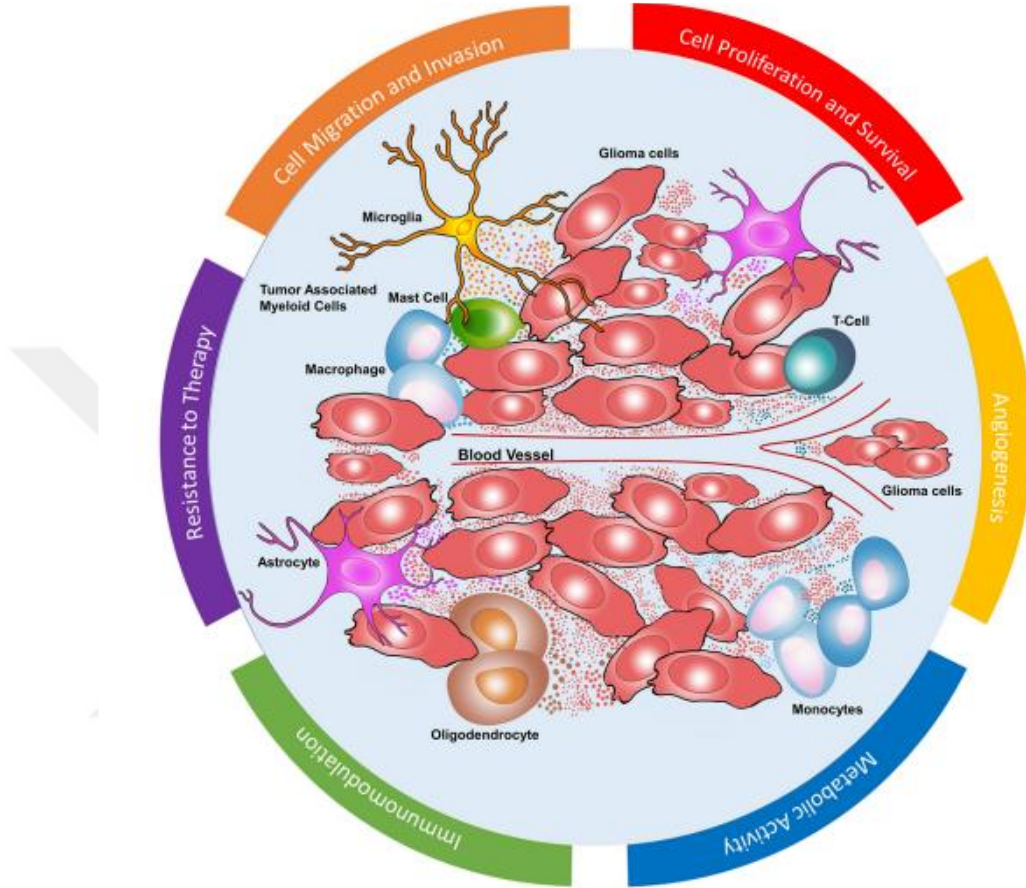
GBM'lerden izole edilen makrofajlar M1 (pro-inflamatuar) ve M2 (anti-inflamatuar) fenotiplerine doğru polarize olma eğilimindedir. Fonksiyon ve hücre yüzeyi belirteci olarak M2 makrofajlarına benzeyen tümörle aktive makrofajların (TAM'ler), tümör içinde hayati bir rol oynadığı gösterilmiştir.

TAM'lerin matris bozulmasına neden olduğu ve GBM hücrelerinin ve GSC'lerin hayatta kalmasını arttırdığı bildirilmiştir. GBM içindeki hipoksik mikro ortamların, mikroglia aktivasyonunu TAM'lere dönüştürdüğü bildirilmiştir (Jackson ve ark., 2017; Nduom ve ark., 2015; Razavi ve ark. 2016).

GBM mikroçevresi içinde naif T hücrelerinin aktivasyonu sadece antijen sunan hücreler (APC'ler) üzerindeki majör histo-uyumluluk kompleksleri (MHC'ler) ile teması değil aynı zamanda yardımcı uyarıcı reseptörlerin aktivasyonunu da gerektirir (Driessens ve ark., 2009; Sharpe ve Abbas 2006). GBM'nin belirgin bir özelliği TME içinde değişken yoğunlukta meydana gelen hipoksidir. Hipoksi, onkogenlerin ve transkripsiyon faktörlerinin ifadesini indükleyen hipoksi ile indüklenebilir faktörleri (HIF'ler) ve ayrıca büyüme faktörü β 'yı dönüştüren anjiyopoietinler gibi proanjiojenik faktörleri aktive eden ve yukarı regüle eden GBM'nin etkili bir özelliği olarak kabul edilir (Hnahan ve ark., 2011). Hipoksi ayrıca makrofajların TGF- β ve IL-6 salgıladığı inflammatuar nişi oluşturan makrofajların ve mikrogliaların metabolik programlanmasına ve mikroçevreye alınmasına katkıda bulunur aynı zamanda GSC popülasyonunun genişlemesini kolaylaştırır (Ho ve ark., 2017). GSC'lerin sürdürülebilirliğini korumak hem EC'ler tarafından salınan NO hem de siklik guanozin monofosfat gibi biyomoleküllere de bağlıdır (Hira ve ark., 2018). Son zamanlarda yapılan araştırmalar fibroblast büyüme faktörünün (FGF-2) GBM'nin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını ve GSC'lerin varlığını koruyarak temel FGF-2'nin GSC'ler üzerindeki etkisine ilişkin daha fazla araştırma için umut verici bir alan ortaya çıkarmıştır (Hley ve ark., 2014). Çalışmalar GSC'lerin GBM'nin hücresele heterojenliğinden yüksek oranda sorumlu olan yeni tümörler oluşturma kabiliyetine sahip GBM içindeki nadir bir hücre alt kümesini temsil ettiğini varsaymıştır (Holland

ve ark., 2001; Lathia ve ark., 2015). Glioma ile ilişkili mikroglia/makrofajların (GAM'ler) sayısı neredeyse tümör hücrelerinin sayısına eşittir. Güçlü kanıtlar GAM'lerin diğer miyeloid hücrelerle birlikte gliomaların immünolojik özellikleriyle sıkı bir şekilde ilişkili olduğundan GAM'lerin tümör ilerlemesini desteklediğini kanıtlamıştır (Li ve ark., 2012). Örneğin GAM'ler GBM hücrelerinden MMP2 ve MMP9 salınımını destekleyen TGF- β salgılar; bu matris metaloproteazlar GBM'nin invazivliğini arttırmak için kollajen ve elastin gibi ECM bileşenlerinin bozunması için kritik öneme sahiptir (Ye ve ark., 2012). Öte yandan TGF- β , mikroglia/makrofajların immünosupresif bir M2 fenotipine polarizasyonunu destekler ve GAM'lerin T hücre proliferasyonunu inhibe etme kapasitesini artırarak tümör ilerlemesini destekler (Wu ve ark., 2010). Perisitler EC'ler ve GSC'ler arasındaki etkileşim tümör anjiyogenezine katkıda bulunan sinyal ağlarını oluşturur (Raza ve ark., 2010). Spesifik olarak perisit-EC etkileşimleri tümör damar sistemi ile yakından ilişkili makrofajları toplayan endotelial bağlantıların oluşumundan sorumludur (Charles ve ark., 2011). Perisitler nöral glial antijen 2 (NG2), kondroitin sülfat proteoglycan 4 (CSPG4) ve α -düz kas aktin (α -SMA) ifade ederek vasküler olgunlaşmayı destekler. Hem tümör hem de stromal hücrelerin bir bileşeni olarak görev yapan NG2/CSPG4, tümör büyümesini destekler (Siebzehnrubl ve ark., 2011). GBM neoanjiyogenezinde, neovasküler ünitenin temel bir unsuru olan artmış perisitler, KBB'nin bozulması ile birlikte neovaskülarizasyonun iyi bir belirteci olarak kabul edilir (Schiffer ve ark., 2018). ECM mikroçevrenin hücreyel olmayan bileşenini oluşturur ve CNS'nin normal fizyolojisine katkıda bulunan bir biyokimyasal sinyal kaynağı olarak işlev görür (Lau ve ark., 2013). Dinamik ECM beyin hacminin yaklaşık %20'sini oluşturur (De Gooijer ve ark., 2018). GBM hücreleri ve ECM arasındaki etkileşimler tümör hücresi invazyonunu, maligniteyi ve göçü düzenler. GBM'deki patolojik koşullar altında ECM agrin kan damarlarının bazal laminasından kısmen kaybolur ve daha sonra tenasin ile değiştirilir (Rascher ve ark., 2002). Hyaluronik asit (HA), CD44, MMP9 ve hiyalüronidazlar 1/2/3 (Hyal 1/2/3) gibi ECM bağlayıcı proteinlerin tümü GBM'nin invazyonunu ve infiltrasyonunu kolaylaştıran ECM'nin yeniden şekillenmesi üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir. Glioma hücreleri stromal hücrelerin nişinde bulunur ve tümör destekleyici bir ortam oluşturmak için işlevlerini değiştirmek üzere onlarla iletişim kurar. GBM'de TME glioma hücreleri, özelleşmiş glioma kök hücreleri

(GSC), yerleşik glial hücreleri (oligodendrositler, astrositler, ependimal hücreler, mikrogliya) içeren stromal hücreler, monositler, makrofajlar ve lenfositler gibi infiltre edici immün hücrelerden oluşur (Abels ve ark., 2019; Broekman ve ark., 2018).



Şekil 1.18. Glioblastoma Mikroçevresi (Yekula ve ark., 2019)

1.12.1. GBM (Glioblastoma Multiforme) Mikroçevresinin Hücresel Bileşenleri

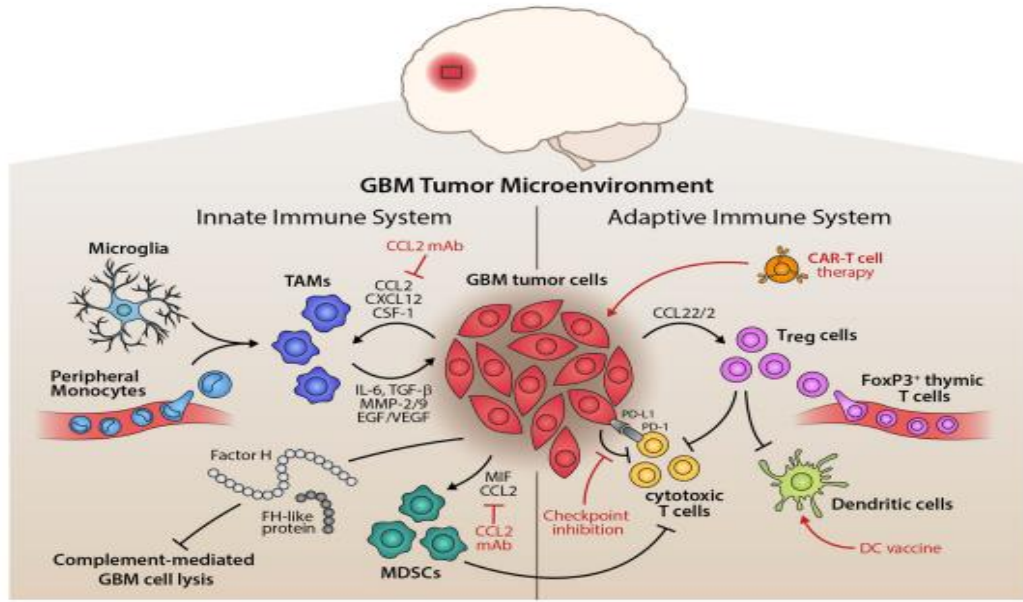
GBM'nin TME'si hücresel bileşimi ve bağışıklık hücrelerine erişilebilirliği açısından benzersizdir. TME'yi benzersiz kılan faktörler aynı zamanda yüksek düzeyde bağışıklık bastırıcı ve "soğuk" TME fenotipine katkıda bulunmaktadır. Sürekli mutasyona uğrayan tümör hücrelerinin aksine TME'nin stroması genetik olarak stabil bir terapötik hedeftir. Bu stromal hücrelerin neden olduğu

immünoşpresyonun azaltılması fonksiyonel efektör T hücre infiltrasyonunu teşvik etme ve tedavi için yeni fırsatlar oluşturma potansiyeline sahiptir (Tomaszewski ve ark., 2019). GBM'de tümör mikroçevresinin (TME) yanı sıra hastalar arasında önemli hücreşel ve moleküler heterojenlik söz konusudur. Glioblastoma mikroçevresi hücre dışı matris (ECM), büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler ve hipoksi ve asidoz gibi spesifik koşullar ile birleştirilmiş çeşitli kanserli ve kanserli olmayan hücrelerden oluşur (Schifer ve ark., 2018; Chen ve ark., 2017; Christensen ve ark., 2008). Tüm bu kilit hücreler glioma nişinde farklı şekilde dağıtılır, tümörün farklı kısımlarını dinamik olarak dönüştürür ve TME'deki aralarındaki iletişim veya karışıklık glioma büyümesi, proliferasyonu, invazyonu, nüksü ve tümör anjiyogeneşinde çok önemli bir rol oynar (Yekula ve ark., 2019). Bu bağlamda GBM ECM'nin, protein ve protein olmayan içerik düzeylerinde belirgin değışiklikleri tetikler ve hatta ECM'nin hücrelerinkine kıyasla hacmini artırır ve bu da tümör büyümesine yol açar (Belousov ve ark.2019; Chintala ve ark., 1996; Müşumeci ve ark., 2015). Normal beyin dokusunda astrositler ve oligodendrositler matrisi oluşturur ancak neoplastik koşullarda GBM hücreleri matrisi pro-invaziv olarak değıştirir (Barber ve ark., 2006; Pope ve ark., 2012).

GBM'lerin ortak özelliklerinden biri çeşitli anjiyojenik faktörler ve kemokinler nedeniyle geniş neoanjiyogeneş ve anormal arterlere sahip en vasküler tümörlerden biri olmalarıdır (Vleeschouwer ve Glioblastoma 2017). GBM'deki anormal vaskülarizasyon esas olarak vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF'ler) yoluyla anjiyojenik faktörlerin yukarı regölasyonuna bağlanır (Dieterich ve ark., 2012; Giusti ve ark., 2016). Yeni kan damarı oluşumu kan ağının genişlemesine, geçirgenliğin artmasına ve endotel hücrelerinin çoğalmasıyla damar genişlemesine yol açar. Bu olaylarla ilgili olarak kan-beyin bariyeri (KBB) bozulur ve beyin ödemine, interstisyel basınç artışına ve inflamasyona yol açar (Chiorean ve ark., 2014; Treps ve ark., 2017). Diğer bir tehdit oluşturan durum ise tümör damarları tıkanığında hipoksi ve nekroza yol açabilen oksijen iletimi ile ilgilidir (Ponte ve ark., 2017; Monteiro ve ark., 2017). Astrositler beyinde ve GBM mikroçevresinde çok önemli bir rol oynar. Yapısal destek, homeostaz, oksidatif strese karşı koruma, enerji depolama ve sinaptik organizasyon ve yeniden şekillenme bu hücrelerin en hayati rolleridir (Perrin ve ark., 2019;

Tomaszewski ve ark. 2019). Histolojik incelemeye göre beyin yüzeyinin yaklaşık %99'u bu hücrelerden oluşmaktadır (Watkins ve ark., 2014). Ayrıca astrositler tarafından nörotrofik faktörlerin ve sitokin salgılanmasının uyarılması GBM'de tümör büyümesi ve tedaviye direnç üzerinde dikkate değer bir etkiye sahiptir (Pietras ve ark., 2014). Kan beyin bariyeri oluşumu bu hücrelerin bir diğer kritik rolüdür (Le ve ark., 2003; Wolburg ve ark., 2009). Normal beyin dokusunda nöronlar güçlü mitojenik sinyaller üreterek nöral ve oligodendrosit öncü hücrelerinin büyümesini uyarır (Park ve ark., 2017; Boso ve ark., 2019). Bu hücreler GBM hücre içeriğinin bir kısmını içerir ve astrositler gibi tümör gelişimine yol açar.

GBM ile ilişkili makrofajlar /mikroglia GBM tümör kütlelerinin% 30 ila% 50'sini oluşturur. Hemen hemen tüm GBM neoplastik olmayan hücreler arasında kanla taşınan makrofajlar ve beyinde yerleşik mikroglia bulunur (Rossi ve ark., 1987). En kritik GBM hücrelerinden biri olarak kabul edilen bu hücreler glioma proliferasyonunu ve göçünü teşvik eder ayrıca immün etkilere sahiptir. Kanser hücrelerinden salınan faktörlerden kaynaklanan çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler salgırlar (Brandenburg ve ark., 2016; Müller ve ark. 2015; Zhu ve ark., 2016). Lenfositler hücre kombinasyonunun küçük bir bölümünü oluşturmalarına rağmen glioma hücrelerine karşı önemli bir savunucu görevi görürler (Orrego ve ark. 2018). CD8 + sitotoksik T hücreler ve CD4 + yardımcı T hücreler, GBM mikroçevresindeki ana lenfositlerdir (Han ve ark., 2014a; Yang ve ark., 2010). Doğal öldürücü (NK) hücreler, GBM tümörlerine sızan başka bir lenfosit türüdür (Castriconi ve ark., 1950). Bu büyük granüler lenfositler tümör hücrelerine karşı doğuştan gelen ve adaptif olanlar da dâhil olmak üzere her iki bağışıklık türüne de katılırlar (Papamichail ve ark. 2004).



Şekil 1.19. GBM'in İnflamatuar Tümör Mikroçevresi (DeCordova ve ark., 2020)

1.12.2. GBM (Glioblastoma Multiforme)'de Morfolojik Heterojenlik

GBM'ler, beynin intrinsik glial hücrelerinden kaynaklandığı düşünülen malign glioma spektrumunun bir parçasıdır ancak son çalışmalar bu varsayımı daha da detaylandırmıştır (Friedmann ve ark., 2012). Yaygın olarak kullanılan Dünya Sağlık Örgütü Sınıflandırma Sistemine (WHO)'ne göre malign gliomalar, köken aldıkları varsayılan hücrelere histolojik ve immünohistokimyasal benzerliklerine göre alt tiplerdir ve histolojik özelliklere göre derecelendirilir (yani mitotik figürler, nekroz, vasküler endotel hiperplazisi) (Louis ve ark., 2007). Bu sisteme göre GBM'ler yüksek derecede malign davranışlarını yansıtan derece IV neoplazmlardır (en az şiddetli ve IV ila en şiddetli anlamına gelir). Teşhis için kullanılan morfolojik ve immünohistokimyasal özellikler malign gliomaların teşhis ve derecelendirilme şeklini değiştirmiştir (Louis ve ark., 2012).

Bununla birlikte moleküler mekanizmayı ortaya çıkaran genomik teknolojilerin varlığı GBM kavramını tanımlamak için basit ama ufuk açıcı bir klinik gözlem olarak hastalığı yeniden şekillendirmiştir. Klinik olarak çoğu hasta de novo derece IV

lezyonlarla (birincil GBM'ler) başvururken, hastaların sadece küçük bir kısmı düşük dereceli gliomlardan (ikincil GBM'ler) başvurmaktadır. Önemli olarak bu iki klinik sunumun birincil GBM'lerde epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve fosfataz ve tensin homolog (PTEN) anormallikleri ile ikincil tümörlerde ise TP53 lezyonları gibi farklı moleküler korelasyonlar mevcuttur. İkincil GBM'ler nadir olmakla birlikte GBM'lerin %5 ila %10'unu oluşturur, heterojen moleküler özellikleri ve klinik seyri nedeniyle GBM tanımını yeniden şekillendirilmiştir (Ohgaki ve ark., 2013).

1.12.3. Glioma Hücre Motilitesinin Moleküler Mekanizmaları:

En kötü huylu beyin tümörü olan Glioblastoma (GBM), karmaşık bir biyolojiye sahiptir ve onlarca yıllık araştırmaya rağmen hala pek çok şey bilinmemektedir. GBM merkezi nekroz ve mikrovasküler proliferasyon sergileyerek kendisini düşük dereceli gliomlardan ayırır. Hızlı ve oldukça infiltratif bir büyüme ile karakterizedir. GBM'de ekstrakraniyal metastazlar oldukça nadirdir; tümör hücresi invazyonu ve metastazı, GBM yayılımının ana özellikleridir (Johansen ve ark., 2016).

Glioma hücreleri sağlıklı beyni istila etmek için esas olarak kan damarları ve aksonların etrafındaki perivasküler boşluk olmak üzere iki yol kullanır (Cuddapah ve ark., 2014). Glioma hücrelerinin yalnızca bir yolu diğerine göre mi kullandığı yoksa diğer yolların da mı kullanıldığı tam olarak anlaşılmamıştır. Ek olarak glioma hücrelerinin istila için bir yolu diğerine tercih etmeye nasıl karar verdiği bilinmemektedir. Bir glioma hücresinin hareket etmesine zemin hazırlayan çeşitli hücresel ve çevresel gereksinimler vardır. Örneğin göç eden hücreler, enerji metabolizmasında, genellikle hipoksik koşullar tarafından indüklenen değişiklikler gösterir (Kathagen ve ark., 2016; Horing ve ark., 2012). Sitokinler, kemokinler, beslenme yoksunluğu ve hipoksi, transkripsiyon faktörlerinin (TF'ler) ifadesinde değişikliklere ve ardından protein ifadesinin değişmesine neden olur (Lu ve ark., 2010). Bu bağlamda iyon kanalları, nörotransmitterler, proteazlar, kemokinler ve sitokinlerin farklı ifadesi, hareket halindeki glioma hücreleri olarak tespit edilmiştir

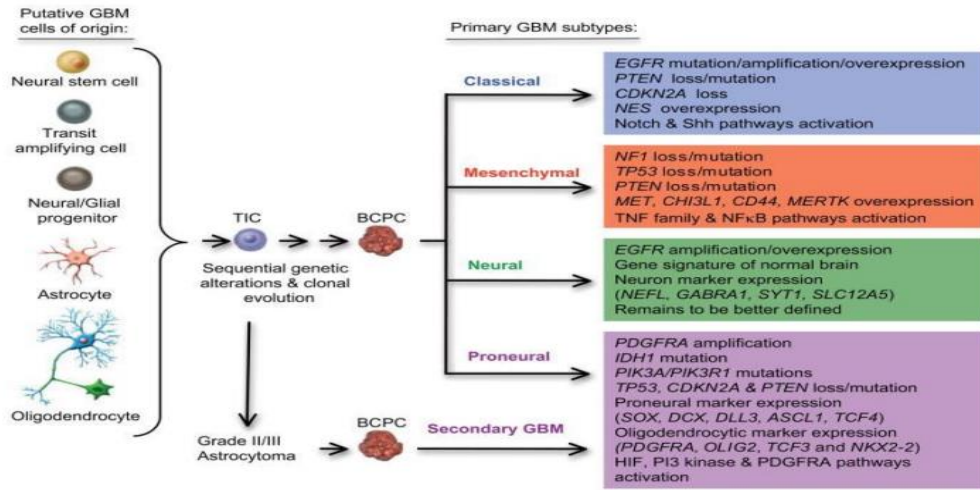
(Demuth ve ark., 2004). Transkripsiyonel değişikliklerin yanı sıra glioma hücrelerinin hücre iskeleti hücre hareketine izin verecek şekilde yeniden düzenlenmeli, hücre yapışması azaltılmalı ve tümör hücresi küçük perivasküler boşluğa sığacak şekilde küçültülmelidir. Ayrıca hücre dışı matrisin (ECM), glioma hücre istilasına izin vermek için yeniden modellenmesi veya yok edilmesi gerekir (Gladson ve ark., 1999). Astrositler veya endotel hücreleri gibi komşu neoplastik olmayan hücrelerle glioma hücrelerinin etkileşimi glioma hücre göçü için önemlidir (Bougnaud ve ark., 2016 ; Da Fonseca ve ark., 2013). Glioma hücrelerinin invazyon ve metastaz için kullandığı farklı süreçlere ve mekanizmalara glioma hücrelerinin hareketliliğini düzenleyen sinyal kaskadları aracılık eder.

Glioma hücreleri her ikisi de yüksek mekanik sertlik gösteren kan damarları veya beyaz madde yollarının miyelinli sinir lifleri gibi önceden var olan yapıları kullanarak sağlıklı beyin parankimine sızar (Rao ve ark., 2003; Lefranc ve ark., 2015). ECM sertliği, hücre hareketliliğinin önemli bir düzenleyicisidir. Hücrelerin daha sert bir ECM alanına doğru hareketine mekanotaksis denir (Lo ve ark., 2000). Perivasküler boşlukta olduğu gibi daha sert bir ECM glioma hücre göçünü destekler (Ulrich ve ark., 2009). Sertlik glioma derecesine göre değişir. İnvaziv GBM'nin kollajen, fibronektin (FN) ve laminin gibi sertlik artırıcı faktörler ürettiği bilinmektedir. Ek olarak glioma hücreleri serebral vaskülatürün bazal membranının bileşenlerini glioma ilerlemesi ile ilişkili olan tenascin (TN)-C'yi aşırı ifade eder (Mahesparan ve ark., 2003). Glioma hücreleri endotel hücreleri tarafından üretilen bradikinin gibi kemoatraktanlar tarafından kan damarlarının etrafındaki perivasküler boşluğa alınır (Montana ve ark., 2011).

Ayrıca glioma hücreleri üzerindeki kemokin reseptörlerinin aşırı ifadesi perivasküler invazyon ile ilişkilendirilmiştir (Yadav ve ark., 2016). Bilinen ikinci bir glioma hücre istilası yolu olan beyaz madde yolları boyunca hücre hareketine çekici veya itici faktörler olarak hareket eden aksonal kılavuz moleküller adı verilen çeşitli proteinler aracılık eder.

Tümörlerin güvenilir şekilde tanımlanması etkili tedavilerin geliştirilmesi için bir ön koşuldur. GBM'de bulunan hücrelerin heterojenliği nedeniyle sabit bir tanımlama yapmak oldukça zordur (Scott ve ark., 1995; Kim ve ark., 2014). Başlangıçta GBM olarak tanımlanan bir tümör sonraki analizlerde farklı tipte olabilir (Kim ve ark., 2014). Bu tutarsızlıklar GBM'nin açık bir şekilde tanımlanmasına izin verecek araçlara olan ihtiyacı haklı çıkarmaktadır. GBM herhangi bir metastatik bileşenin yokluğunda daha yüksek dereceli tümör (evre IV) olarak tanımlanan tek katı tümördür. Diğer tüm katı tümörler doku infiltrasyonuna, hücre farklılaşması derecesine, mitotik indekse ve metastatik invazyona bağlı olarak sınıflandırılabilir. GBM'nin karmaşıklığı ve heterojenliği nedeniyle, 2007 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) beyin tümörlerinin sınıflandırması hücrelerin mitotik indeksleri ve moleküler kriterleri ile birlikte histolojik profiline dayanmaktaydı (Louis ve ark., 2007). Bu sınıflandırmada farklı GBM türleri listelenmiştir: Bunlar; saf astrositom, oligoastrositom ve nöro-astrositomdur. 2016 WHO sınıflandırması öncelikle tümörün genetik profiline dayanan yeni bir yaklaşım geliştirmiştir (Louis ve ark., 2016). En dikkate değer değişiklikler izositrat dehidrojenaz (IDH) durumunda (mutasyona uğramış ve yaban tip) ve 1p19q birlikte delesyonunun saptanmasındadır. Mitotik indeks ve hücrelerin histolojik yapısı ile ilişkili bu yapı terapötik şemanın yönlendirilmesine yardımcı olur. Bu şekilde mevcut WHO sınıflandırması sadece tümörün yapısını belirlemeye izin vermekle kalmaz aynı zamanda terapötik yöntem için bir seçim yapılmasına da olanak tanır.

Gen ifade profillerine dayanarak, GBM'ler klasik, pronöral, nöral ve mezenkimal dört alt sınıfa ayrılır. Bu sınıflar tümör agresifliği, ilerlemesi ve/veya prognozu bakımından farklılık gösterir (Van Meir ve ark., 2010).



Şekil 1.20. Glioma alt tipi patogenezinde gözlenen genetik değişikliklerin şematik gösterimi (Van Meir ve ark., 2010)

GBM'ler, düşük dereceli glioma tümörlerinden (derece II veya III astrositom) malign transformasyon yoluyla gelişen birincil (de novo) veya ikincil olarak tanımlanır (Ohgaki ve ark., 2007). Aynı tümör içinde çeşitli moleküler alt sınıfların saptanabileceği gösterilmiştir (Sottoriva ve ark., 2013). Literatürde pronöral ve nöral GBM alt tiplerinin subventriküler zonda veya yakınında ortaya çıktığı mezenkimal ve klasik alt tiplerin ise subventriküler zonun distalinde ortaya çıktığı bildirilmektedir (Jovcevska ve ark., 2019).

1.12.4. Gen İfadesine Dayalı GBM'lerin Moleküler Sınıflandırması

Glioblastom izositrat dehidrojenaz 1 ve 2 (IDH1 / 2) mutasyonlarının yokluğu veya varlığı ile ilişkili primer veya sekonder glioblastom olarak sınıflandırılabilir. Glioblastomların çoğunluğu yabancı tip IDH1/2 ile primerdir ve nöral kök hücreler, glial progenitörler veya astrositler gibi farklılaşmış hücreler neoplastik olmayan hücrelerden kaynaklanır (Zong ve ark., 2012). Sekonder glioblastoma ile karşılaştırıldığında primer glioblastoma yoğun tedaviden sonra bile daha kötü bir prognoza sahiptir. İleri yaştaki (> 60 yaş) hastalar daha da kısa bir sağkalıma sahiptir. Sekonder glioblastom sıklıkla IDH1 veya IDH2 mutasyonunu barındırır düşük

dereceli gliomadan ilerler ve daha iyi prognoza sahiptir (Louis ve ark., 2016; Ohgaki ve ark., 2013).

2010'da Verhaak ve arkadaşları, GBM'leri ayrı kategorilerde gruplamak için somatik mutasyonları, DNA kopya sayısı değişikliklerini ve gen ifade profilini analiz etmişlerdir (Verhaak ve ark., 2010). Bu çalışma sayesinde moleküler ve gen ifade profillerinin spesifik kümelenmesine dayalı olarak dört GBM alt tipi (Klasik, Pronöral, Nöral ve Mezenkimal) oluşturmuşlardır. Klasik kategori, p16INK4A ve p14ARF delesyonu ile birlikte EGFR amplifikasyonunun daha fazla baskın olduğunu TP53 mutasyon oranlarının azaldığını göstermiştir. Histolojik olarak, Klasik alt tip, astrositlerle daha tutarlı özellikler göstermiştir. Pronöral kategorisinin daha yüksek oranda PDGFR amplifikasyonu, TP53 mutasyonu, LOH ve IDH1 mutasyonu olduğu bulunmuştur. Bu tümörler en çok oligodendrositlerle uyumlu olan histolojik özelliklere sahiptir. Pronöral alt tiplerini barındıran hastalar daha genç ve tedaviye daha iyi yanıt vermişlerdir. Nöral alt tipin daha yüksek derecede nöronal belirteç ifadesine sahip olduğu bulunmuştur. Mezenkimal alt tipin PTEN ve Akt değişiklikleriyle birlikte daha yüksek derecede NF1 mutasyonlarına sahip olduğu tespit edilmiştir.

Klasik alt tip sınıfındaki GBM'ler gen amplifikasyonu ve gen kaybı oluşturan mutasyonlar gösterir (Verhaak ve ark., 2010). Taranan tüm klasik alt tiplerde diğer GBM tümör alt tiplerinde de görülen kromozom 10 kaybı ve kromozom 7 amplifikasyonu meydana gelir. Ancak yüksek düzeyde epidermal büyüme faktörü (EGFR) mutasyonları başlıca klasik tümörlerde gözlenirken diğer GBM alt tiplerinde nadiren görülür (Verhaak ve ark., 2010). Klasik tümörler ayrıca tümör baskılayıcı TP53 mutasyonunun olmaması ile karakterize edilirken pronöral tümörlerin çoğunluğu TP53 mutasyonu oluşturur (Phillips ve ark., 2006). Ek olarak pronöral alt tip, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü A'daki (PDGFRA) değişiklikler ve IDH1'deki nokta mutasyonu olmak üzere iki farklı özelliğe sahiptir (Verhaak ve ark., 2010). GBM tümörleri tümü nöronal belirteçler olan NEFL, GABRA1, SYT1 ve

SLC12A5'in nöral mevcut ifadesi olarak sınıflandırılır. Bu farklı tümör alt tipleri hala bilinmeyen ancak GBM'nin heterojenliğini yansıtan farklı prognoz ve tedavilere yanıt verebilir (Verhaak ve ark., 2010).

GBM'ler bilinen bir öncü olmadan ortaya çıkan primer (de novo) veya düşük dereceli bir tümörün zaman içinde GBM'ye dönüştüğü sekonder tümör olarak sınıflandırılabilir. GBM'lerin çoğunluğu primer GBM'dir ve bu hastalar daha yaşlı olma eğilimindedir, sekonder GBM'li hastalardan daha kötü prognoza sahiptir (Wilson, Karajannis ve Harter, 2014).

Birincil ve ikincil GBM'ler histolojik olarak ayırt edilemez. Tarihsel olarak ikisi arasındaki ayrım klinik geçmişe dayanmaktadır. Bununla birlikte bu tümörlerin genetik, epigenetik ve moleküler profilinin daha derinlemesine anlaşılmasıyla ayrım daha net hale gelmiştir.

Klinik ve görüntüleme kriterlerine dayalı ikincil GBM'lerin insidansı izositrat dehidrojenaz (IDH) durumu tarafından tahmin edilenden biraz daha düşüktür (sırasıyla %5'e karşı %6-13) (Ohgaki ve ark., 2004; Ohgaki ve ark., 2005; Dropcho ve ark., 1996). Klinik olarak ikincil GBM tanısı alan hastalar birincil GBM'si olanlardan ortalama 17 yaş daha gençtir (Ohgaki ve ark., 2004; Dropcho ve ark., 1996); daha genç bir hasta grubuna yönelik bu önyargı, IDH mutasyonları olan hastalar için IDH1 durumu ile çok yakından ilişkilidir (Watanabe ve ark., 2009; Ichimura ve ark., 2009). IDH-mutant GBM'li hastalarda klinik seyir daha az agresif davranışın göstergesi olarak önemli ölçüde daha uzundur (Ohgaki ve ark., 2004; Ohgaki ve ark., 2005; Watanabe ve ark., 2009).

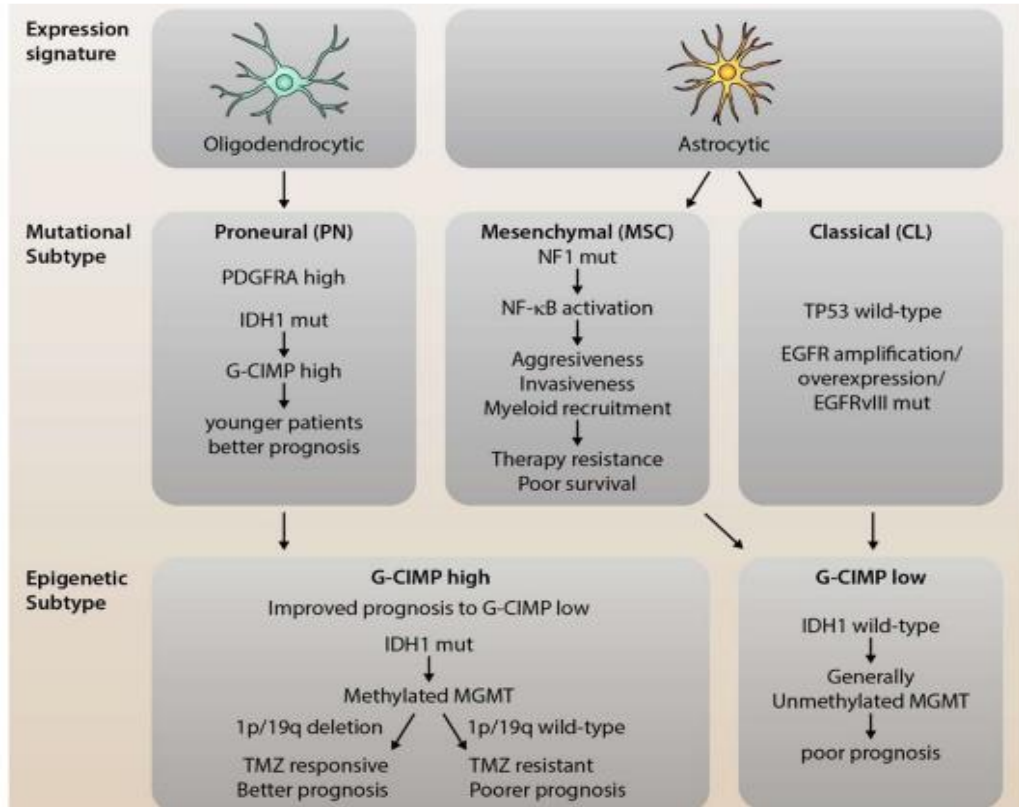
Primer ve sekonder GBM'lerin çoğunluğu tümör hücrelerinin hücre döngüsü kontrol noktalarından kaçan, kontrolsüz hücre proliferasyonuna, artan hücre sağkalımına yol açan, ayrıca yaşlanmadan ve apoptoz yollarından kaçmasına izin veren değişikliklere sahiptir (Chen, McKay ve Parada., 2012).

Primer ve sekonder GBM'ler arasında moleküler değişiklikler ve gen ifade paternleri arasında değişiklikler fark edilmiştir. Primer GBM için EGFR, PDGFRA, PTEN, TP53, NF1 ve CDKN2A/B'de ve TERT promotör mutasyonlarında değişiklikler gösterir ancak IDH1/2 mutasyonlarında değişiklik göstermez (Tabatabai ve ark., 2010; Vigneswaran ve ark., 2015).

Sekonder GBM'ler önceden var olan düşük dereceli bir gliomadan GBM'ye ilerleyen ve büyük ölçüde pronöral alt gruba giren tümörlerdir. Bu ikincil GBM'ler IDH1 ve 2'deki (izositrat dehidrojenaz) mutasyonların yanı sıra yukarı regüle edilmiş PDGFRA sinyalleme ile p53 mutasyonları ve kromozom 19q kaybı sıklıkla görülür (Alifieris ve Trafalis, 2015; Wilson ve ark., 2014; Genç, Jamshidi, Davis ve Sherman, 2015). Moleküler grupları tanımlamak için TCGA tarafından GBM'nin kapsamlı genomik ve transkriptomik profiline göre çoğu tümörün EGFR ve PDGFRA gibi reseptörlerdeki mutasyonlar/amplifikasyonlar yoluyla sinyal veren reseptör tirozin kinaz (RTK); PI3K ve PTEN gibi ortak onkogenik yollarda değişiklikleri barındırdığı bulunmuştur (McLendon ve ark., 2008; Brennan ve ark., 2013).

GBM kendi TME'si (Tümör mikroçevresi) ile sürekli iletişim halindedir ve TME, GBM'nin tümör oluşumuna ve ilerlemesine katkıda bulunur (Schiffer ve ark., 2015, 2018). GBM TME'si, hücre dışı matris, glioma kök hücreleri (GSC'ler) gibi tümör hücreleri ve endotel hücreleri, perisitler, mikroglia, bağışıklık hücreleri, oligodendrositler, nöronlar, astrositler ve miyeloid baskılayıcı hücreler de dahil olmak üzere tümör olmayan hücrelerden oluşan heterojen bir yapıya sahiptir (Roberts ve ark., 2020). Çözünür proteinler, DNA, mRNA ve kodlayıcı olmayan RNA'lar içeren hücre dışı veziküller GBM ve TME arasındaki iletişimi sağlar ve bu veziküller anjiyogeneze, apoptozdan kaçınmaya ve ilaçlara karşı dirence katkıda bulunur (Materredona ve ark., 2019; Simon ve ark., 2020). GBM hücrelerinin ince membran kanallarıyla (tünelleme nanotüpleri) iletişim kurduğu gösterilmiş ve elde edilen sonuçlar bu nanotüplerin GBM hücrelerinin temozolomidden (TMZ) ve iyonlaştırıcı radyasyon tedavisinden korunmasına aracılık ettiğini ortaya koymuştur (Valdebenito ve ark., 2020).

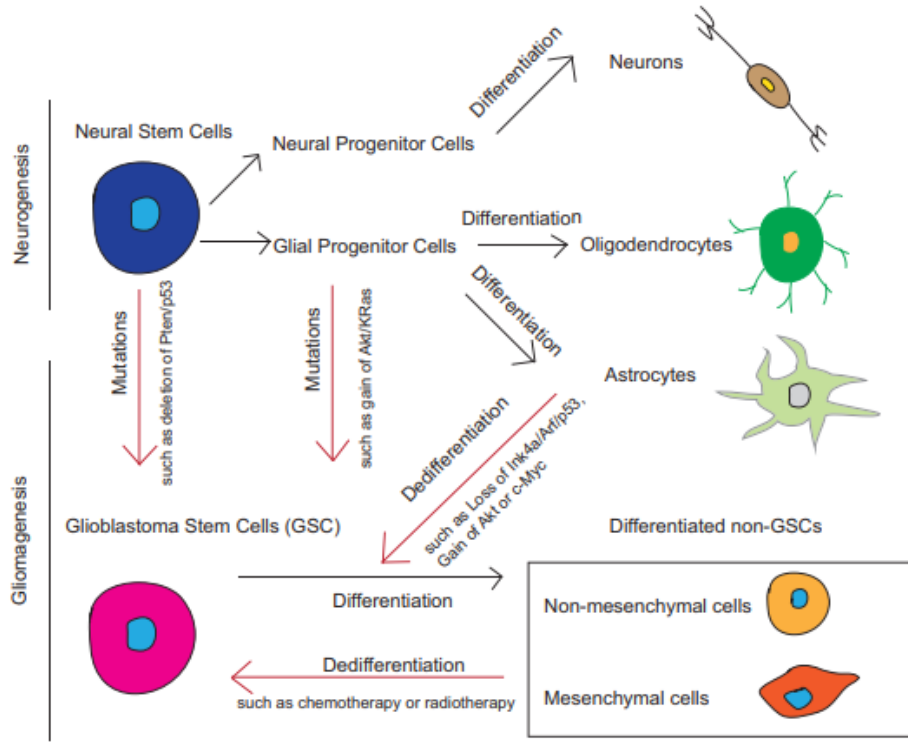
GBM'nin kökeninin kesin hücresi hala tartışmalı bir konudur. Literatürde subventriküler bölgenin nöral kök hücrelerinin (NSC'LER) ve oligodendrosit öncü hücrelerinin GBM hücresi için iki adayı temsil ettiği bildirilmiştir (Fan ve ark., 2019). Ayrıca çeşitli çalışmalar GBM'nin glial ve astrosit öncü hücrelerinin malign transformasyonundan ve astrositlerin ve nöronların farklılaşmasından kaynaklanabileceğini öne sürmüştür (Fan ve ark., 2019; Altmann ve ark., 2019; Matarredona ve ark., 2019).



Şekil 1.21. GBM 'in Mutasyonel ve Epigenetik Sınıflandırılması (DeCordova ve ark., 2020)

1.13. Gliomajenez

Primer glioblastomun kökeni hakkında glioblastoma kök hücrelerinden (GSC'ler), progenitör hücrelerden veya astrositlerden farklılaşma yoluyla üç teori önerilmiştir.



Şekil 1.22. Nöroenez ve Gliomagenez Arasındaki İlişki (Min Guo 2020)

Normal nöroenezde, nöral kök hücreler (NSC'ler) nöral ve glial progenitörlere yol açar. Daha sonra nöral progenitörler nöronlara farklılaşır ve glial progenitör hücreler oligodendrositlere ve astrositlere farklılaşır. Bununla birlikte gliomagenез sırasında, onkogenik genlerin aktivasyonunu veya baskılayıcı genlerin kaybını indükleyen mutasyonlar, nöral kök hücrelerde, progenitörlerde veya astrositlerde meydana gelebilir ve bu da glioma kök hücrelerinin (GSC'ler) oluşmasına neden olabilir. GSC'ler mezenkimal olmayan ve mezenkimal glioma hücrelerine farklılaşabilir ve tümör oluşturabilir. Öte yandan bazı terapi uyarıları glioma hücrelerinin GSC'lere farklılaşmasını indükleyebilir.

1.14. GBM'de (Glioblastoma Multiforme)'de Vaskülarizasyon

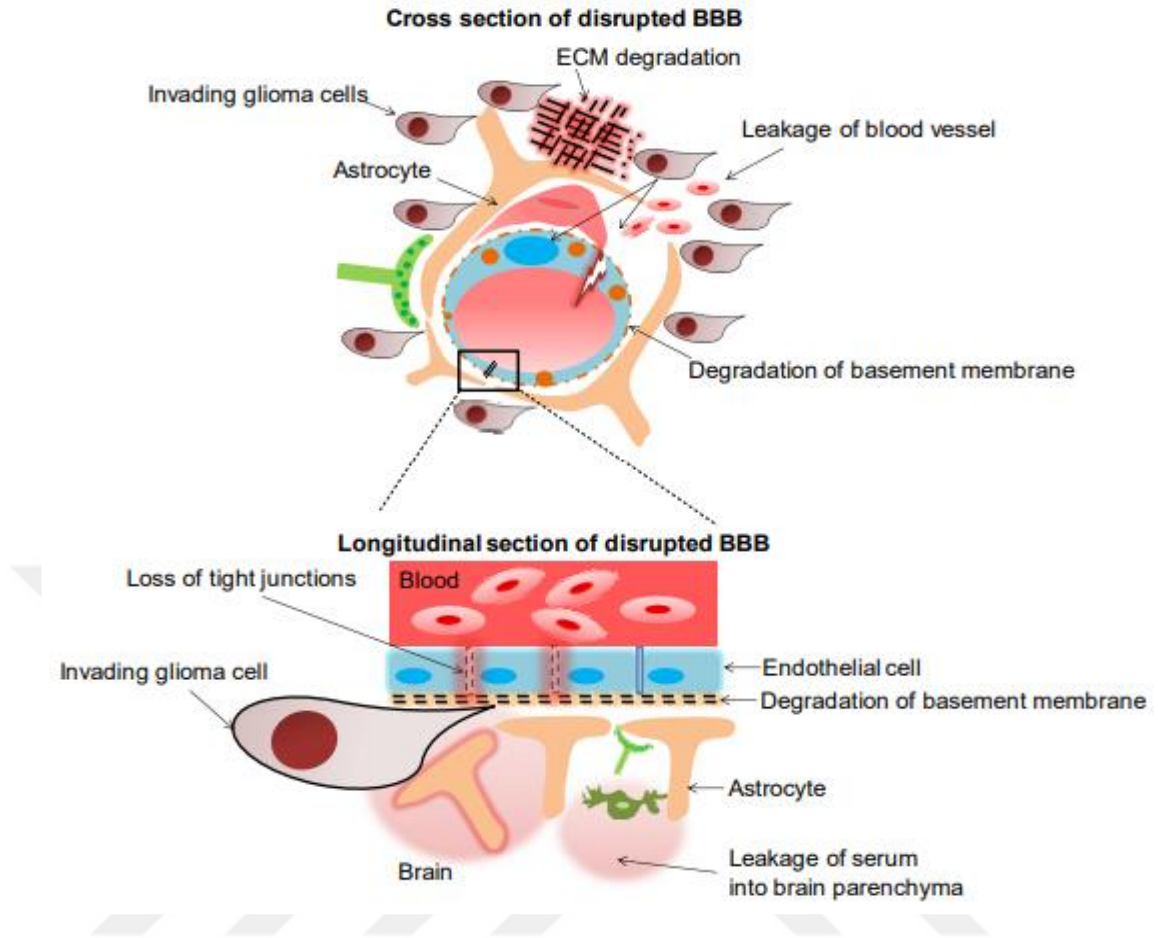
GBM'ler neo-anjiyogenez, hiperdilate ve sızdıran damarları gösteren anormal bir vaskülatür ile endotel hücrelerinin ve perisitlerin kötü organize olmuş vasküler yapılar oluşturduğu vasküler glomerüler yapıları nedeniyle en vaskülarize tümörlerden biridir

(Wesseling ve ark., 1997). Esas olarak tümör hücreleri veya infiltre edici immün hücreler tarafından ifade edilen gliomlarda çeşitli anjiyojenik faktörlerin ve kemokinlerin varlığı söz konusudur. Bununla birlikte GBM'deki vasküler anormallikler ağırlıklı olarak kan-beyin bariyerinin (KBB) 'nin bozulmasına neden olan yüksek düzeyde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) seviyelerine bağlanır. Kan beyin bariyeri (KBB) arasındaki iyon ve moleküllerin transferini sıkı bir şekilde düzenleyen bir nörovasküler birim oluşturan endotelial hücreler, perisitler ve astrositlerden oluşur (Daneman ve ark., 2015; Zlokovic ve ark., 2011). Bariyerdeki bozukluk, tümör dokusuna sızan plazma ve sıvı ile damar geçirgenliğini indükler böylece beyin ödemi ve interstisyel basıncı indükler. Bu değişiklikler aynı zamanda vasküler işlevi de tehlikeye atar ve yavaş kan akışına neden olarak GBM içinde tutarsız oksijen sunumuna yol açar. Buna karşılık tümör damarları tıkanığında GBM'nin bir başka özelliği olan psödopallisading nekroza dönüşebilen lokal hipoksik alanlar gelişir. Bu koşullar aynı zamanda proanjiyojenik ve immüno-supresif özellikler ortaya çıkaran makrofajlar gibi doğuştan gelen bağışıklık hücrelerini de tümör mikroçevresine çeker böylece tümör damar sisteminin bu zayıf perfüze alanlara doğru genişlemesine yardımcı olur. GBM vaskülatürünün çoğunlukla anjiyogenez ile genişlemesine rağmen tümör damarlarındaki mevcut endotel hücrelerinin ve kemik iliği kaynaklı vasküler progenitörlerin proliferasyonu neovaskülarizasyonu teşvik edebilir (Du ve ark., 2008). Daha yakın zamanlarda fare GBM modellerinde soy izleme deneyleri ve hastadan türetilen GBM'deki endotel hücrelerinin genetik mutasyonel analizi GBM'deki endotelial hücrelere veya perisitlere farklılaşma yetenekleriyle glioma kök hücrelerinin (GSC'ler) başka bir vasküler bileşen kaynağı olduğunu ortaya çıkarmıştır (Wang ve ark., 2010; Soda ve ark., 2011; Ricci ve ark., 2010; Cheng ve ark., 2013). GBM vaskülatürünün heterojen yapısı, tümöre karşı potansiyel ilaçlar için önemli rolünü etkilemekle kalmaz aynı zamanda hücresel yapışmayı ve bağışıklık hücrelerinin diapedezisini etkileyen yapışkan özelliklerini de değiştirir. Bu bağlamda VEGF yükselmesinin anormal ve anjiyojenik bir vaskülatür oluşturma yanısıra tümöre reaktif T hücrelerinin ekstrasvazasyonunu da engellediğini ve GBM dahil olmak üzere tümörlerin konakçı immüno-gözetiminden kaçmasını sağlayan immün baskılayıcı bir mikro ortamı desteklediği bilinmektedir (Motz ve ark., 2013). VEGF, anjiyojenik damarlardaki ICAM1 ve VCAM1 yapışma

moleküllerini azaltır ve böylece immün T-efektör hücrelerinin tümöre infiltrasyonunu ve DC'lerin olgunlaşmasını doğrudan engeller. Antijene özgü düzenleyici T hücrelerini (Treg'ler) etkinleştirir. Bu durum GBM'nin immünosupresif bir yapı kazanmasına ve ardından düşük CTL (sitotoksik T lenfosit) sızmasına katkıda bulunur.

1.14.1. GBM'de (Glioblastoma Multiforme)'de Kan-Beyin Bariyeri

TME'nin immün olmayan bir diğer önemli bileşeni kan-beyin bariyeridir (KBB). KBB, moleküllerin ve hücrelerin sıkı bir şekilde düzenlenmesine izin veren beynin önemli bir özelliğini oluşturur (Daneman ve ark., 2015). KBB, astrosit, endotel hücreleri ve perisitlerle etkileşimi yoluyla oluşturulur. KBB, intravenöz ajanlarla beyin malignitelerini tedavi ederken sıklıkla görülen zayıf kemoterapötik etkinliğe katkıda bulunan yapılardan biri olarak kabul edilir (Wang ve ark., 2019; Bhowmik ve ark., 2015; Harder ve ark., 2018). GBM'de KBB sadece inflamasyon ve fiziksel distorsiyon nedeniyle değil, aynı zamanda kan damarlarının sızıntısına katkıda bulunan artan vaskülerite nedeniyle de tehlikeye girer (Wolburg ve ark., 2012; Dubois ve ark., 2014). Vaskülatürün distrofik büyümesi geçirgen damar duvarlarının heterojenliğine ve ayrıca tümörlerin artan perfüzyonuna katkıda bulunur. Bu artan anjiyogenez esas olarak TME'deki yüksek miktarlarda vasküler endotelyal büyüme faktöründen (VEGF) kaynaklanmaktadır. VEGF, hücre içi adezyon molekülü 1 (ICAM1) ve vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM1) adezyonundaki azalma yoluyla immün hücre ekstrasvazasyonunun azalmasına da neden olur (Momeny ve ark., 2017; Yang ve ark., 2018). Sonuç olarak KBB'deki bazı bağışıklık hücrelerinin tümör mikroçevresine girmesine ortam hazırlar. Tümörlerin merkezi nekrotik alanlarındaki zayıf kan akışı oksijen dağıtımını azaltır, makrofajları tümör mikroçevresine çeken hipoksik bölgelerin oluşumuna katkıda bulunur ve immünosupresif fenotipleri meydana getirir (Guo ve ark., 2016; Wang ve ark., 2016).



Şekil 1.23. GBM’de (Glioblastoma Multiforme)’de Bozulmuş Kan Beyin Bariyeri (Cuddapah ve ark., 2014)

1.14.2. Astrositler

Astrositler homeostazı koruyarak beyinde yapısal destek sağlar. Tipik olarak PVN’de lokalizedirler ve KBB’nin korunmasında önemli bir rol oynarlar (Wolburg ve ark., 2009). Astrositlerin glioma hücrelerinin proliferasyonunu destekleyen nörotrofik faktörlerin salgılanması yoluyla pro-tümör fonksiyonlarına sahip oldukları düşünülmektedir (Pietras ve ark., 2014). Beyinde aktive olan astrositler farklı yaralanma biçimleri sırasında beyin dokusunun onarımını sağlamak için büyüme faktörleri ve sitokinler sağlar. Bu süreç, beyindeki yara iyileşmesinin bir mekanizması olan reaktif gliozis olarak adlandırılır (Sofroniew ve ark., 2015). TME’de bu büyüme faktörlerinin tümör büyümesini desteklediği ve tedaviye direnç aracılık ettiği gösterilmiştir (Quail ve ark., 2016). İçinde büyüme faktörlerini sağlamanın yanı sıra

tümör invazyonu için uygun bir ortam oluşturan metalloproteinazları da salgırlar (Le ve ark., 2003). GBM gibi bazı CNS patolojilerinde, astrositler moleküler, hücrel ve fonksiyonel değişikliklere uğrarlar bu durum lezyon bölgesinde hücre proliferasyonunun aktivasyonunun yanı sıra hipertrofi ile karakterize edilen astrogliosis adı verilen bir süreç yoluyla reaktif astrositlere dönüştürölür. En önemlisi astrogliosis, nestin, vimentin, sinyal reseptörleri (c-MET), transkripsiyon faktörleri (STAT-3), büyüme faktörleri (beyinden türetilen nörotrofik faktör (BDNF) ve büyüme/farklılaşma faktörü 15'ten oluşan ara filamentlerin yukarı regülasyonu ile ilişkilidir. (GDF-15), hücre yapışma proteinleri (CD44) ve hücre dışı matris bileşenleri (kollajenler) doku onarımını destekler (Liddelov ve ark., 2017). Reaktif astrositler inflamatuvar sitokinleri (C-C motifli kemokin ligandı 2 (CCL2) ve interlökin 6 (IL-6) ve NO salgılar, böylece nöroinflamatuvar yanıtları şiddetlendirir. GBM mikroçevresinin ana bileşenlerinden biri olan astrositler tümör hücreleriyle temas ettiklerinde reaktif bir fenotip oluşturur. Reaktif astrositler tarafından salgılanan büyüme faktörleri, kemokinler, sitokinler ve diğer çözünür maddeler, stroma ve epitelyal GBM hücreleri arasında devam eden astrosit aktivasyonunu ve sinyal aktarımını düzenlemek için görev alırlar. Glioma-astrosit etkileşimleri tarafından tetiklenen astrosit fenotipi, yüksek konsantrasyonda GFAP ve connexin 43 (CX43) ifade eder ve glioma hücre invazyonu için bir ortam oluşturur (Gagliano ve ark.,2009). GBM tarafından TGF- β 1 sinyal yolu ve glioma-astrosit etkileşimleri sırasında reaktif astrositlerle ifade edilen MMP2'nin yukarı regülasyonu GBM hücrelerinin parankimal infiltratif kapasitesine yardımcı olur (Ye ve ark., 2012). Ayrıca reaktif astrositler tarafından salgılanan stromal hücre kaynaklı faktör-1 (SDF1), GBM hücrelerinin kontrolsüz proliferasyonunu uyarır (Bajetto ve ark., 2006). Bu nedenle reaktif astrositler, GBM'nin TME'sinde önemli bir salgı kaynağıdır bu durum anormal hücre proliferasyonuna neden olarak GBM malignitesini arttırır ve tümör mikroçevresinde malign bir dönüşümü tetikler (Henrik ve ark., 2019). Astrositler, beyin ortamının önemli düzenleyicileri ve CNS'deki tümör hücresi kaderinin ana belirleyicileridir. Beyin tümörü hücreleri perivasküler nişte olduğunda endotel hücresini çevreleyen astrositler aracılığıyla kan-beyin bariyerini bozabilir (Watkins ve ark., 2014). Astrositler beyin tümörlerinin varlığı ile aktive edilir. GSC, aktive edilmiş astrositlerde p53'ü aşağı regüle edebilir ve böylece onları tümör önleyici bir duruma dönüştürür

(Biasoli ve ark., 2014). Ayrıca, astrositlerin beyin tümörü hücreleri ile fiziksel etkileşiminin endotelin üretimi ve Notch yolu ile CSC'nin kendini yenilemesi yoluyla tedaviye direncin önemli bir belirleyicisi olduğu gösterilmiştir (Kim ve ark., 2015; Lee ve ark., 2016; Xing ve ark., 2013).

1.14.3. Nöronlar

Nöronlar, tümörlerin oluşumuna ve büyümesine katkıda bulunduğu düşünülen astrositler gibi beyne özgü bir hücre tipidir. Nöronlar, nöral kök hücre büyümesini teşvik etmek için beyinde mitojenik sinyaller sağlar (Liu ve ark., 2011). Son çalışmalar nöron türevli nöroligin-3'ün (NLGN3) tümör intrinsik PI3K sinyali yoluyla tümör hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığını göstermektedir. Ayrıca insanda GBM NLGN3 ifadesinin sağkalım ile ters ilişkili olduğu gösterilmiştir (Venkatesh ve ark., 2015).

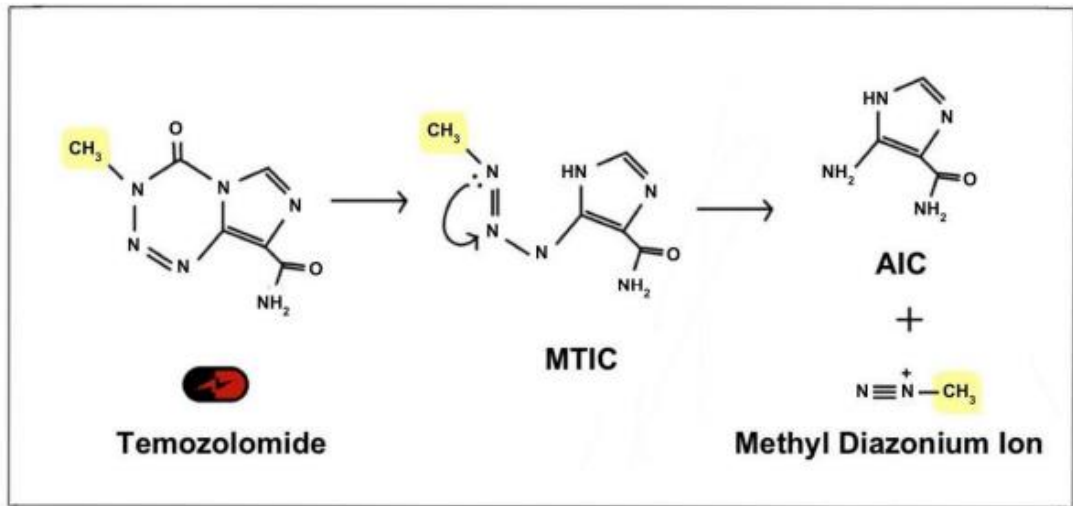
1.15. TMZ (Temozolomid)

TMZ, GBM tedavisi için standart kemoterapi olmasına rağmen TMZ yanıtı GBM'de değişkenlik gösterir (Stupp ve ark., 2005). TMZ direnci olan GBM'de tümör ilerlemesini veya nüksünü önlemek zordur (Nakada ve ark. 2012; Van Meir ve ark., 2010).

TMZ (194 Da) ağırlığına sahip küçük bir lipofilik moleküldür ve imidazotetrazin sınıfı oral bir alkilleyici ajandır (Zhang ve ark., 2012). TMZ'nin sitotoksitesinin, DNA'da O6-metilguanin (O6 MeG) oluşumundan kaynaklandığı düşünülmektedir. DNA replikasyonu sırasında timin ile yanlış eşleşme meydana gelir ve daha sonra DNA hasarına neden olur (Kanzawa ve ark., 2003). Temozolomid oral uygulamadan sonra hızla emilir sonrasında fizyolojik pH'da spontan hidrolize uğrayarak aktif metaboliti 5-(3-metil-triazeno)-imidazol-4-karboksamide dönüşür. 5-(3-metil-triazeno)-imidazol-4-karboksamid, guaninin O6 pozisyonunun metilasyonu

yoluyla DNA hasarına neden olur. Bununla birlikte O6-metilguaninden farklı DNA eklentileri de metilleyici ajanlar tarafından indüklenen sitotoksistelerde rol oynayabilir (Tentori ve ark., 1998).

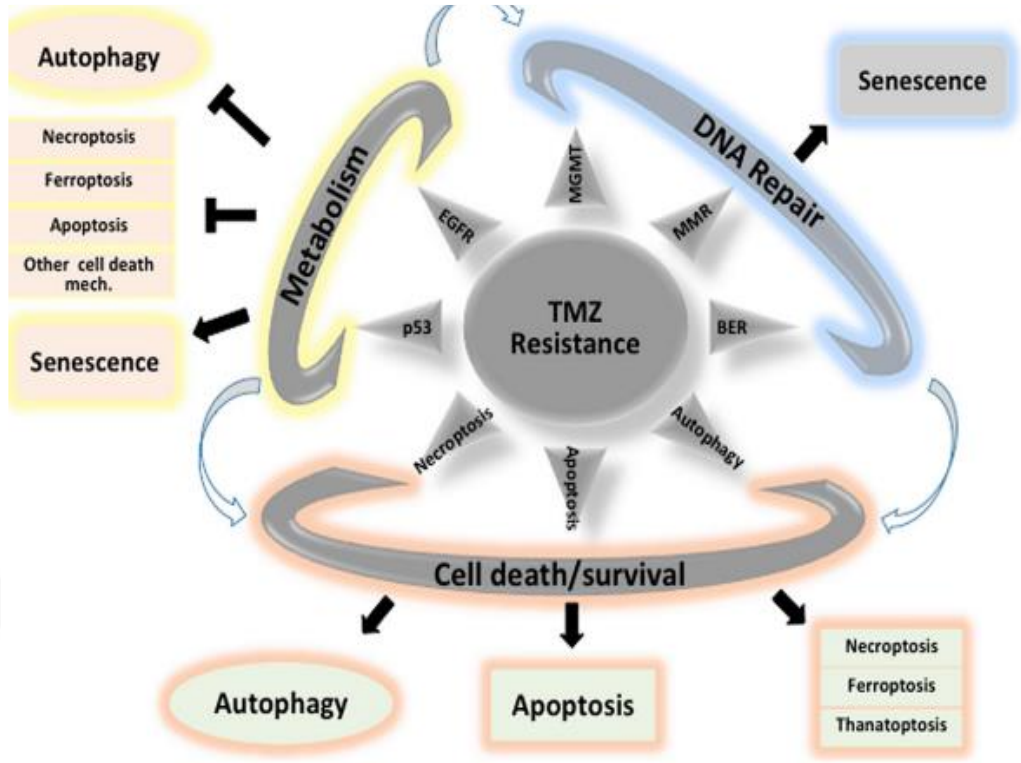
O6-metilguanin-DNA metiltransferaz proteini, en çok çalışılan DNA onarım aktivitelerinden biridir (Mitra ve ark., 2007; Tubbs ve ark., 2007). İlk olarak 1977'de bakterilerde keşfedilen aktivite kısa bir süre sonra kemirgen ve insan hücrelerinde tanımlanmıştır (Samson ve ark., 1997; Mitra ve ark., 2007). O6-metilguanin DNA metiltransferaz ifadesi çoğu gliomada korunur (Preuss ve ark., 1995, 1996; Silber ve ark., 1999).



Şekil 1.24. Temozolomid Mekanizması (Singh ve ark., 2019)

DNA alkilleyici ilaç TMZ, yüksek dereceli GBM'ye karşı terapötik aktiviteye sahip tek ilaçtır ve radyoterapi ile birlikte bu tümörlerin standart tedavisinin bir parçası haline gelmiştir (Stupp ve ark., 2005). TMZ ağızdan alındığında %100 biyoyararlıdır ve küçük boyutu ve lipofilik özellikleri nedeniyle kan-beyin bariyerini geçebilir (Danson ve ark., 2001). Kanseri hücrelerinde TMZ, G2/M'de hücre döngüsü durmasını indükler, bunu apoptoz indüksiyonu takip eder. DNA düzeyinde TMZ, guanin üzerindeki N7 ve O6'ya ve adenin üzerindeki O3 bölgelerine farklı DNA onarım yollarını tetikleyen metil grupları ekler. Bununla birlikte DNA'daki guaninin O6

pozisyonundaki metilasyonun kapsamı, TMZ'nin toksisitesinin yanı sıra terapötik aktivite ile de ilişkilidir (Talhaoui ve ark., 2017). Guanin metilasyonunun sonuçlarından biri sitozin yerine timin ile anormal bir eşleşmedir bu da verimli baz değişim onarımı ve DNA yanlış eşleşme onarımının yokluğunda mutasyonlara yol açar (Talhaoui ve ark., 2017). O6-metilguanin DNA metiltransferaz (MGMT), guaninin O6 pozisyonunu demetile eden ve böylece TMZ etkisine karşı koyan bir DNA onarım enzimidir. Yaklaşık %50 GBM hastası, çoklu TMZ uygulamasından yarar görür ve bu etkinlik promotör üzerinde DNA metilasyonu ile MGMT'nin susturulması ile ilişkilidir (Karayalan ve ark., 2010). MGMT promotörünün folat gibi küçük metil grupları tarafından metilasyonunun ifadesini susturduğu ve sonuç olarak MGMT ifade eden GBM'de TMZ etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir (Cartron ve ark., 2012; Esteller ve ark., 2000; Hervouet ve ark., 2009). MGMT ifadesi, TMZ tedavisi üzerine MGMT negatif tümörlerde indüklenebilir (Christmann ve ark., 2010). Bu nedenle MGMT biyokimyasal rolünden beklendiği gibi GBM'deki TMZ direncinin ana modülatörü gibi görünmektedir. TMZ direncinde rol oynayan bir diğer önemli faktör de p53'tür ancak işlevi net olarak belirlenmemiştir. GBM'deki p53 mutasyonlarının çoğu işlev kazancıdır (Zhang ve ark., 2018). İşlevsel olmayan p53'e sahip GBM hücre hatları, TMZ'ye önemli ölçüde daha duyarlıyken, p53'ün küçük molekülle aktivatörlerinin in vivo olarak GBM ksenograftlarında TMZ etkilerini etkin bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir (Belter ve ark., 2020; Dinca ve ark., 2008). p53 yaban tip hücrelerde TMZ, Ser15 ve Ser46'da p53'ün fosforilasyonunu desteklemektedir. Bu iki post-translasyon modifikasyon hayatta kalma ve ölümden zıt işlevlere sahip olduğundan bunların TMZ direncindeki rolü belirsizdir. Sonuç olarak p53'ün TMZ'nin üzerindeki etkisi translasyonel modifikasyon sonrası oranı ile ilgili olabilir (He ve ark., 2019).



Şekil 1.25. Temozolomid Direncinde Rol Oynayan Ana Mekanizmalar (Oliver ve ark., 2020)

1.15.1. MGMT (Metil Guanin Metil Transferaz)

O⁶metilguanin DNA metiltransferaz (MGMT), temozolomid gibi alkilleyici ajanlar tarafından indüklenen hasarın onarılmasında rol oynayan bir DNA onarım proteindir. MGMT promotörünün (MGMTp) metilasyonu MGMT genini susturur ve tümör hücrelerinin bu tür hasarı onarma yeteneğini azaltır. MGMTp metilasyonu ayrıca hem anaplastik astrositomlar hem de glioblastomalar için uygun bir prognoz sağlar (Louis ve ark., 2016; Wick ve ark., 2009; Weller ve ark., 2012; Stupp ve ark., 2005; Hegi ve ark., 2005; Gilbert ve ark., 2013).

MGMT memeli ve insan hücrelerinde ekzojen ve endojen alkilatörler tarafından üretilen O⁶-alkilguanin eklentilerinin genotoksik etkilerini önler (Tubbs ve ark., 2007; Kaina ve ark., 2007; Pegg, 2000). MGMT aktivitesi normal dokular arasında büyük ölçüde değişir, beyinde genellikle düşük ifade seviyelerine sahiptir ve ayrıca bireyler

arasında büyük farklılıklar gösterir. Özellikle MGMT nakavt farelerin canlılığının kanıtladığı gibi MGMT memeli gelişimi için gerekli değildir (Gerson, 2004). Bununla birlikte nakavt hayvanlar terapötik alkilatörler dahil olmak üzere alkilleyici ajanların zararlı etkilerine karşı yüksek hassasiyet gösterirler. Bu bulgular nöro onkoloji ile ilgilidir ve MGMT'nin memeli hücrelerinde in vivo olarak O6-alkilguanin kaynaklı sitotoksisteye direnci desteklediğini gösterir (Kaina ve ark., 2010; Hansen ve ark., 2007).

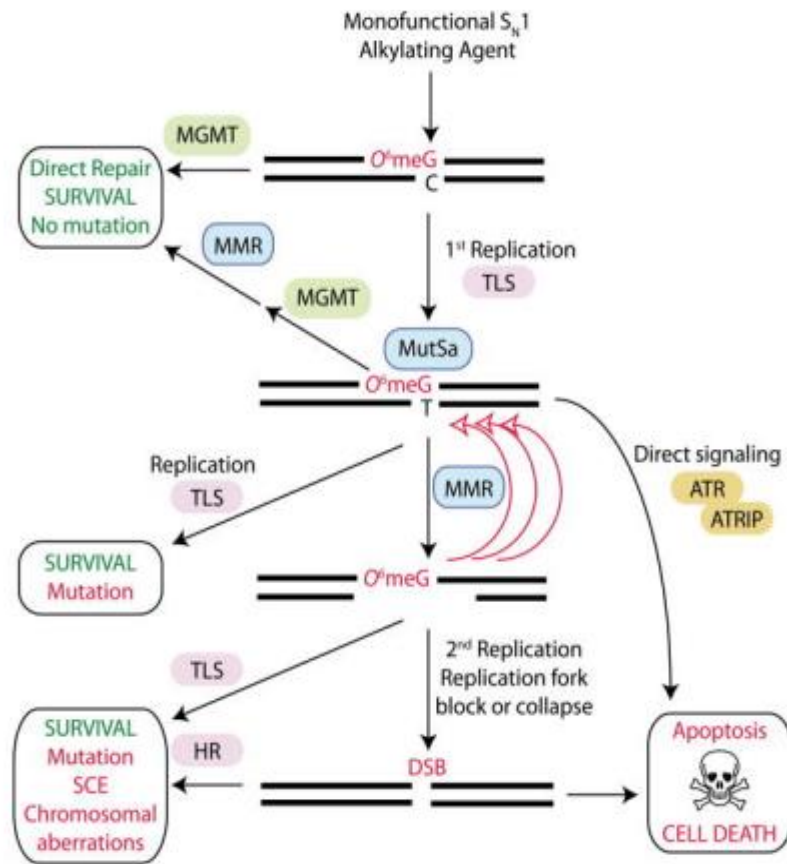
MGMT guaninin O6 pozisyonundan bir metil grubunu çıkararak TMZ kaynaklı DNA hasarını ortadan kaldıracılabilmektedir ya da TMZ direnci meydana getirebilmektedir (Jiang ve ark., 2012). MGMT seviyesi CpG adalarındaki sitozin fosfat guanin (CpG) metilasyonunun yoğunluğu ile ters orantılı olduğundan MGMT promotörünün azalmış metilasyonu TMZ kemoterapisinden sonra sağkalımı artırır (Van Niftrik ve ark., 2010).

TMZ ile tedavi edilen GBM hastalarında MGMT promotör metilasyonunun (MGMT inaktif veya susturulmuş) aktif MGMT'li hastalarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde iyileştirilmiş genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım (PFS) ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu nedenle MGMT metilasyon durumu bu tedaviler için öngörücü bir belirteç olarak kullanılabilir.

MGMT metilasyonu olan tümörlerin TMZ ile tedaviden sonra nüks üzerine azalmış bir metilasyon oranına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu MGMT promotör metilasyonundaki azalmanın TMZ'ye terapötik direnç elde etmek için bir mekanizma olduğunu düşündürmektedir (Park ve ark., 2012). MGMT metilasyonunda değişikliğe yol açan mekanizmaların daha derinden anlaşılması ve bunların TMZ direncine katkısı kapsamlı GBM tedavisi için temel oluşturmaktadır. Klinik çalışmalardan elde edilen yeni ortaya çıkan kanıtlar lomustin ve TMZ'nin bir kombinasyon tedavisinin MGMT metilasyonu olan hastalar için birinci basamak tedavi olarak kullanıldığında genel

sağkalımı iyileştirebileceğini ve GBM tedavisinin başlarında DNA onarım enzimlerini hedeflemenin ve karakterize etmenin klinik önemini daha da ortaya koyduğunu göstermektedir (Herrlinger ve ark., 2019).

TMZ ile tedavi edilen hastaların en az %50'si O6-metilguanin metiltransferazın (MGMT) aşırı ifadesinden ve/veya farklı kemo-dirençle ilişkili moleküler yolların aktivasyonu nedeni ile TMZ'e yanıt vermemektedir.



Şekil 1.26. TMZ kaynaklı O6-metilguanin Lezyonlarının İşlenmesi (Fu ve ark., 2012)

TMZ, DNA'nın alkilasyonuna neden olmakta dolayısıyla DNA hasarı ile birlikte tümör hücresi ölümüne yol açmaktadır (Messaoudi ve ark., 2015). TMZ'nin sitotoksitesinin birincil neden olduğu kaynağın PI3K/Akt/mTOR yolunun aktivasyonu ile ilaç direncinin gelişmesine yol açtığı ve bu durumun ilacın terapötik etkisini azalttığı düşünülmektedir (Stupp ve ark., 2005). Aktive edilmiş bir PI3K /Akt

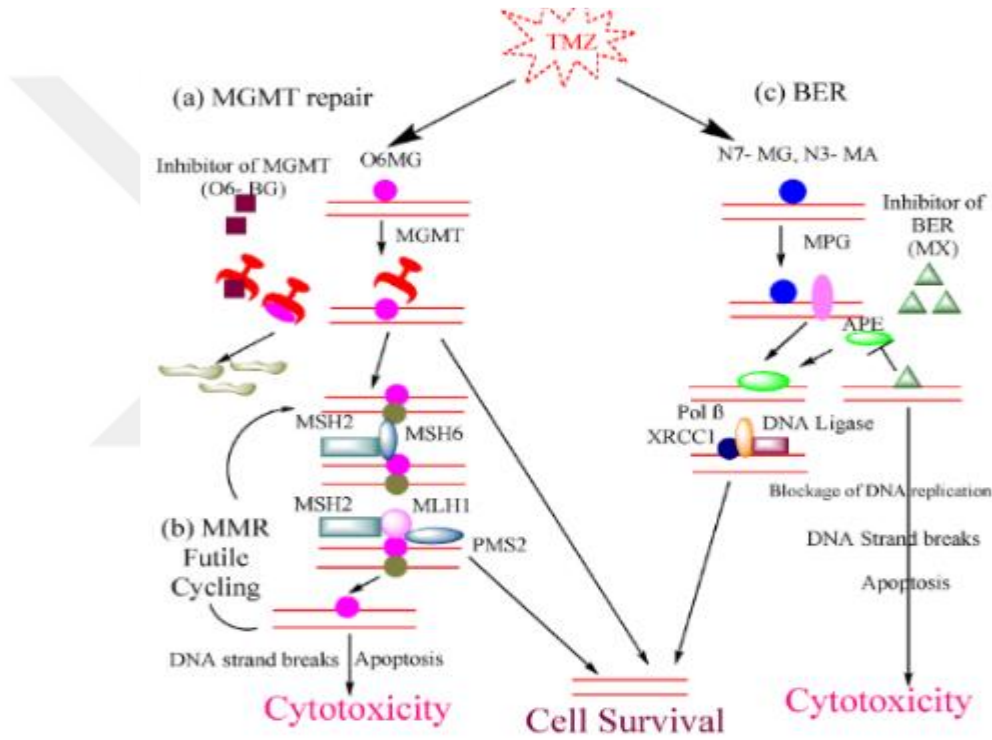
/mTOR yolu olan GBM hastaları onkojenik aktivasyonu olmayan hastalardan daha kötü prognoza sahiptir (Chakravarti ve ark., 2004). Bu yol büyüme faktörleri ve diğer hücre dışı uyaranlar tarafından aktive edilir ve EGFR gibi birkaç reseptör tirozin kinaz dahil olmak üzere hücre metabolizması, büyüme ve hayatta kalma gibi birçok biyolojik süreci düzenler. Protein kinaz B (PKB) olarak da bilinen Akt, her ikisi de fosfatidil-3,4,5 trisfosfat (PIP3) ile hücre zarına alındığında fosfoinositide bağımlı protein kinaz 1 (PDK1) tarafından fosforile edilen sitoplazmik bir Ser/Thr kinazdır. PIP3 fosfatidilinositol-3,4-bifosfattan (PIP2) fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) ve geri fosfataz ve tensin homolog (PTEN) ile dönüştürülür (Sami ve ark., 2013).

TMZ direnç mekanizmasının açıklığa kavuşturulması ilaç etkinliğini arttırmak için esastır ve önemli bir temel oluşturabilir. Bu nedenle GBM’de maligniteyi yönlendiren moleküler yolların daha iyi anlaşılmasına ve spesifik olarak tümör hücrelerini ve tümör mikroçevresini hedefleyen çeşitli ajanların geliştirilmesine acil ihtiyaç duyulmaktadır.

1.15.2. Alkilleyici Ajan ve MGMT (Metil Guanin Metil Transferaz) Promotör Metilasyonu

GBM'nin standart tedavisinde kullanılan Temozolomid DNA'yı birden fazla bölgede alkilleyerek tümör hücresi ölümünü indükleyen bir alkilleyici ajandır. O6-metilguanin DNA metiltransferaz (MGMT) tarafından kodlanan ve kendisini tüketerek bu alkilasyon işlemi tersine çevirebilen bir tür tamir proteini olarak işlev görür (Hegi ve ark., 2005; Brighiadori ve ark., 2016). Bu nedenle MGMT promotör metilasyonu güçlü bir prognostik biyobelirteçtir ve en azından teorik olarak radyoterapiyle birlikte TMZ ile tedavi edilen hastalara fayda sağlar (Hegi ve ark., 2005; Esteller ve ark., 1999). Çalışmalar ameliyat sonrası TMZ kemoterapisinin 6 ay içinde başlatılmasının daha iyi olduğunu göstermiştir (Sun ve ark., 2015; Balana ve ark., 2020). TMZ'nin radyoterapi ile kombine etkisi hastalar arasında farklılık gösterdiğinden MGMT promotörünün durumunun değerlendirilmesi önemli kabul edilmiştir. MGMT promotörünü ölçmenin en iyi tanı yöntemi olduğu konusunda

uluslararası fikir birliği diye bir şey yoktur. GBM'li hastalarda MGMT metilasyon düzeyini değerlendirmek için çeşitli gelişmeler olmuştur (McAleenan ve ark., 2021; Mansouri ve ark., 2019; Raghavan ve ark., 2020; Tzadiris ve ark., 2021). MGMT promotörünün metilasyon seviyesi ile karşılık gelen proteinin seviyesi arasında herhangi bir öngörücü ilişki yoktur. Klinik deneyler TMZ'nin yüksek MGMT ifadesi ile GBM'nin tekrarlamasına yol açabileceğini göstermiştir (Brandner ve ark., 2015). TMZ'ye direncin MGMT gen füzyonu veya yeniden düzenleme mutasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Oldrini ve ark., 2020).



Şekil 1.27. Temozolomidin etki mekanizması. (M. Esteller ve ark., 2000; M.E. Hegi ve ark., 2004; A.W. Tolcher ve ark., 2003)

1.16. CSC (Kanser Kök Hücreleri)

1.16.1. CSC'lerin (Kanser Kök Hücrelerin) Genel Özelliği

Biriken kanıtlar kanser hücrelerinin dirençli fenotipine doğru ilerlemesinin ve tümör mikroçevresindeki dinamik değişikliklerin, radyoterapiye genel adaptif tümör

yanıtı ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Klinik ve laboratuvar verileri, tümörlerin, tümör mikroçevresinde ve radyo dirençte ayrılmaz bir rol oynayan kanser kök hücreleri (CSC'ler veya kök benzeri kanser hücreleri olarak adlandırılan, tümör başlatan hücreler) içerdiğini göstermektedir. Kanser kök hücrelerinin varlığından uzun süredir şüphelenilmektedir ve bu, yakın zamanda tümör hücrelerinin yalnızca küçük bir bölümünün koloniler veya yeni tümörler oluşturabildiğini gösteren kanıtlarla desteklenmektedir (Bonnet ve Dick 1997; Al-Hajj ve ark. 2003). IL-1a, IL-6 ve IL-8 gibi metastaz için gerekli olan pro-invaziv genlerin ifadelerinin arttığı gösterilmiştir (Sheridan ve ark., 2006). CSC'lerin radyo-direnç ve kemo-direnç sergilediği görülmektedir. Genotoksik stres koşullarına (IR ve kemoterapi gibi) maruz kalan tümör hücreleri, proliferasyon yollarını aktive eder ve tümör radyo-direnci ile sonuçlanan pro-apoptotik yolları inhibe eder. Bu CSC yolaklarında yer alan moleküller tümör radyo-duyarlılığını artırmak için potansiyel hedeflerdir.

CSC'ler başlangıçta in vivo tümörleri başlatabilen CD133 için pozitif hücrelerin bir alt popülasyonunu tanımlayan Singh ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Bu nedenle “tümör başlatıcı hücreler” olarak adlandırıldılar (Singh ve ark., 2004). GBM'ler gibi katı tümörler, iki farklı teori ile açıklanan yüksek derecede heterojen yapı ile karakterize edilir. Birinci teori olan stokastik modele göre, tümör hücreleri aynı genetik mutasyonları (homojen) paylaşır ve heterojenlik hem içsel hem de dışsal faktörlerin sonucudur. İkinci teori olan hiyerarşi modeline göre, hücreler farklılaşma aşaması açısından farklıdır ve sadece küçük bir alt küme olan CSC'ler tümör büyümesini ve ilerlemesini başlatabilir (Catolana ve ark., 2011). Bu alt popülasyon giderek artan bir şekilde tümör başlangıcı ve nüksünün yanı sıra terapötik direncin nedeni olarak kabul edilmektedir. CSC'leri çalışırken karşılaşılan zorluk, büyük ölçüde onları tam olarak tanımlayamamaktır (Abbaszadegan ve ark., 2017). CD133 klasik olarak bu hücre alt grubu ile ilişkilendirilse de, normal nöral kök hücrelerde de ifade edilir. Bu nedenle GBM kök hücreleri söz konusu olduğunda bu biyobelirtecin uygunluğu hala bir tartışma konusudur. Gerçekten de, CD133neg hücrelerinin sıçan beyinlerine implante edildiğinde tümörleri indükleyebildiği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2008). Sonuç olarak bu alt popülasyonu tanımlamak için ek belirteçlere ihtiyaç

olduğu kabul edilmektedir. Bu işaretleyiciler arasında CD44 ve ABC taşıyıcıları muhtemelen en güvenilir olanlardır. Sox2, Oct4, Bmi1 ve Nanog gibi transkripsiyon faktörlerinin de CSC'lerinin özelliklerine katkıda bulunduğu bilinmektedir (Yi ve ark., 2016).

Tümör oluşumu metastaz ve terapötik relapslardaki anahtar rolleri nedeniyle CSC'ler, özellikle GBM için ana biyolojik ve terapötik hedefler olarak görünmektedir (Boman ve ark., 2008; Islam ve ark., 2015; Lathia ve ark., 2015; Gilbert ve ark., 2009). Bu hücresel durum CSC'lerin saflaştırılmasına ve karakterizasyonuna izin veren yöntemlerin keşfini, geliştirilmesini ortaya çıkarır (Boman ve ark., 2008; Islam ve ark., 2015; Lathia ve ark., 2015; Gilbert ve ark., 2009). Bununla birlikte tümör hücre popülasyonunun heterojenliği, CSC'lerin tümör kütlesi içindeki nadirliği (kanser türüne bağlı olarak %1-5), özelliklerini doğru bir şekilde tanımlamadaki zorluk ve karakterizasyon yöntemlerinin dayandığı kriterler büyük zorluklar oluşturmaya devam etmektedir (Islam ve ark., 2015; Lathia ve ark., 2015; Diogo ve ark., 2012; Tirino ve ark., 2013).

Bir kök hücre fenotipine sahip kanser hücrelerinin varlığının ilk göstergesi, farklılaşmamış hücrelerin tercihen tümörjenik olmayan farklılaşmış hücrelere yol açtığını gösteren teratomların çalışmasından geldiği bilinmektedir [16]. CSC hipotezi bu veriler doğrultusunda önerilmiş ve tümörlerin malign kök hücreler ve onların iyi huylu benzerlerinin bir arada bulunduğu popülasyonu içerdiği öne sürülmüştür.

CSC'ler bir hayvan konakçıya nakledildiğinde kendi kendini yenileme, farklılaşma ve tümörjenite yeteneklerine sahip küçük bir tümör hücresi alt popülasyonunu temsil eder (Yu ve ark., 2012).

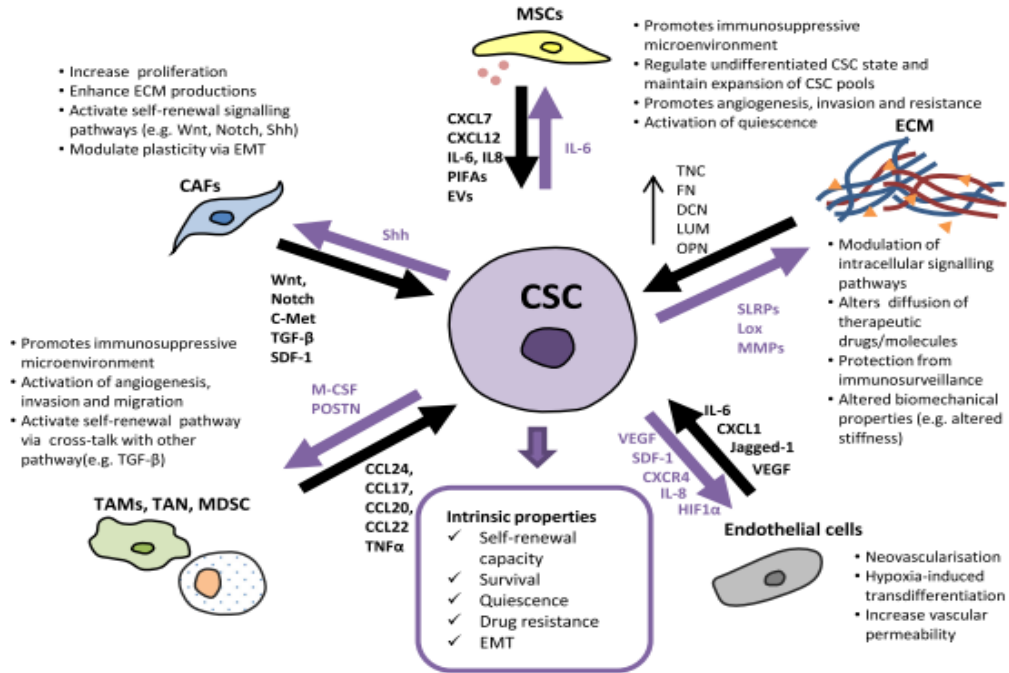
CSC'ler ilk olarak akut miyeloid lösemide bulunmuştur (Bonnet D. ve ark., 1997). Sonrasında melanom, osteosarkom, lösemi, meme, kolorektal, beyin, prostat, pankreas, yumurtalık, karaciğer ve akciğer dahil olmak üzere çok çeşitli tümör tiplerinde tanımlandı (Visvader ve ark., 2012).

Bir tümör, süresiz olarak kapasite kazanmış bir tümörijenik kanser hücresi tarafından başlatılan anormal bir organ olarak görülebilir (Weissman ve ark., 2000; Morrison ve ark., 1997). Birçok gözlem normal kök hücreler ve tümörijenik hücreler arasındaki analogilerin uygun olabileceğini düşündürmektedir. Hem normal kök hücreler hem de tümörijenik hücreler, geniş proliferatif potansiyele ve yeni (normal veya anormal) dokulara yol açma kabiliyetine sahiptir. Hem tümörler hem de normal dokular, farklı fenotipik özelliklere ve farklı proliferatif potansiyellere sahip heterojen hücre kombinasyonlarından oluşur (Fidler ve ark., 1977; Fidler ve ark., 1982; Heppner ve ark., 1984; Nowell ve ark., 1986). Çoğu tümör klonal orijinli olduğundan tümörijenik kanser hücreleri sınırsız çoğalma potansiyeline sahip kanser hücrelerinin yanı sıra sınırlı veya hiç çoğalma potansiyeli olmayan kanser hücreleri de dahil olmak üzere fenotipik olarak çeşitli soylara yol açmaktadır. Bu durum tümörijenik kanser hücrelerinin, normal kök hücrelerin kendi kendini yenilemesine ve farklılaşmasına benzer süreçlerden geçtiğini göstermektedir (Feoran ve ark., 1987).

Tüm genom dizilemesindeki ilerlemeler malign tümörlerin dikkate değer genetik karmaşıklığını farklı genotip ve fenotiplere sahip hücre alt popülasyonlarının varlığını ortaya çıkarmıştır (Fisher R. ve ark., 2013). Tümör içindeki kanser hücrelerinin farklı genotipleri, hücrelere farklı biyolojik özellikler ve fenotipler kazandırarak tümör içi ve tümörler arası heterojenite için ortam sağlar (Presetyanti ve ark., 2017). CSC modeli kanser hücreleri arasındaki bu fenotipik ve fonksiyonel heterojenliği açıklar (Shackleton ve ark., 2009; Clevers ve ark., 2011; Meacham ve ark., 2013; Reya ve ark., 2001).

CSC'lerin ya yetişkin dokuda yerleşik kök hücrelerden ya da farklılaşma süreciyle pluripotent bir duruma yeniden programlanmış farklılaşmış hücrelerden kaynaklandığı öne sürülmüştür (Walcher ve ark., 2020). CSC hipotezi, birçok heterojenik kanserin, tümörü oluşturan hücrelerin farklılaşma kapasitesine dayalı olarak hiyerarşik bir biçimde organize edildiğini öne sürer (Cole ve ark., 2020). Bu hiyerarşik düzenin sağlıklı kök hücreler tarafından kurulan normal doku hiyerarşisini özetlediği öne sürülmüştür. Böylece CSC'ler tümör içinde mevcut olan bir dizi farklı hücre tipini oluşturarak hücreler heterojenlik gösterir (Clevers ve ark., 2011). Bununla birlikte yerleşik hiyerarşi kalıcı değildir ve belirli koşullar altında terminal olarak farklılaşmış hücreler farklılaştıkça ve CSC özelliklerini yeniden kazandıkça tersine çevrilebilir (Medema ve ark., 2013; Meacham ve ark., 2013).

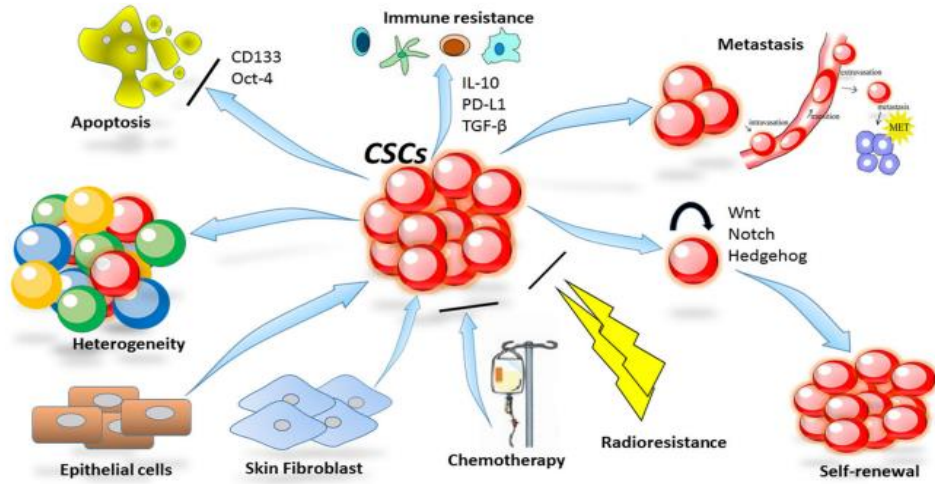
CSC'lerin tümör mikroçevresinde (TME) değişikliklere neden olan kemo- ve radyoterapötiklere yanıt olarak fenotipik ve fonksiyonel görünümünde değişikliklerle sonuçlanan yüksek plastisite sergilediği gösterilmiştir (Walcher ve ark., 2020).



Şekil 1.28. Kanser kök hücresi ve TME arasındaki ilişki (Ayob ve ark., 2018)

CSC'ler onları diğer tümör hücrelerinden ayıran bir dizi benzersiz özelliğe sahiptir. CSC'lerin kanserin başlaması, ilerlemesi, metastaz, nüks ve ilaç direncinden sorumlu olduğuna inanılmaktadır (Visvader ve ark., 2008). Birçok tümör türünde, bazı CSC'ler metastazı yönlendiren spesifik genlerin ifadelereinin yukarı regülasyonu yoluyla epitelyal mezenkimal geçiş profilleri elde eder. CSC'lerin kendi kendini yenileme ve kanser hücrelerinin heterojen soylarına farklılaşma yetenekleri nedeniyle ilaç direncinden ve kanserin nüksetmesinden sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (Phi ve ark., 2018). İlaç direnci CSC'lerin hareketsiz hale gelme, aldehit dehidrojenaz gibi enzimlerin ifadelerini yukarı regüle etme ve hücrelerden kemoterapötik eliminasyonu artıran düşük hücre içi ilaç konsantrasyonları ile sonuçlanan anti-apoptotik proteinlerin ve çoklu ilaç direnç pompalarının ifadelerini yukarı regüle etme yetenekleriyle ilişkilendirilmiştir (Cole ve ark., 2020).

CSC'ler tümörün başlatılmasında ve sürdürülmesinde çok önemli bir rol oynar. CSC'ler tümördeki hücrelerin büyük kısmını oluşturan fenotipik olarak farklı ve kısmen farklılaşmış veya daha az tümörijenik olmayan kanser hücrelerine yol açan küçük bir alt popülasyondur. CSC'ler, mikroçevrenin kök hücre davranışlarını düzenlediği özel nişlerde bulunur. Nişler CSC'leri korumak için sinyaller yayan farklı kanserli olmayan hücre popülasyonlarından oluşur. CSC'nin önemli bir özelliği radyasyon tedavisinin yanı sıra kemoterapötik ajanlara karşı potansiyel dirençleri olup mevcut kanser tedavileri için ciddi bir zorluk oluşturmaktadır (Reya ve ark. 2001; Jordan ve ark. 2006). CSC'nin kök olmayan kanser hücrelerinden daha fazla radyo-dirençli olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle tedavi başarısızlığından ve tümör nüksetmesinden sorumlu olduğuna inanılmaktadır (Baumann ve ark., 2008; Singh ve ark., 2004; Lathia ve ark., 2015).



Şekil 1.29. Kanser Kök Hücrelerinin Özellikleri (Atashzar ve ark., 2020)

1.16.2. Klonal Evrim veya Stokastik Model

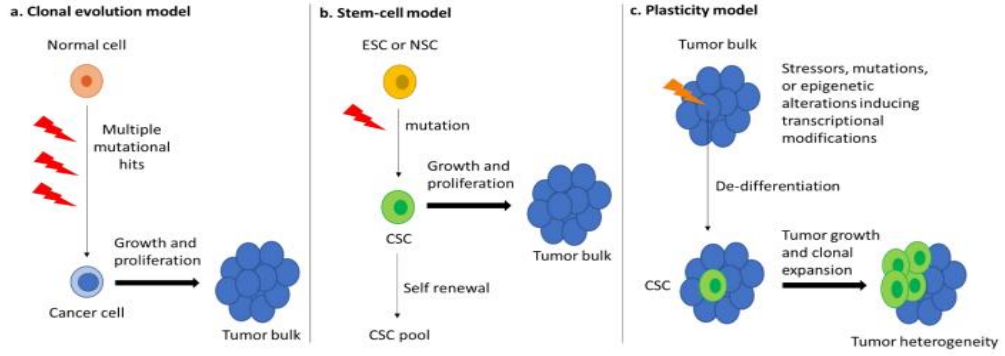
Klonal evrim hipotezi çoğu kanserin tek bir değişmiş hücreden kaynaklandığı ve bir tümör içindeki her hücrenin eşit derecede hücreden oluştuğu fikrine dayanır. Hücre soyunun neoplastik bir "klon" olarak genişlemesi tümörün başlamasını ve ilerlemesini kolaylaştırır. Neoplastik hücreler, neoplastik olmayan hücrelere kıyasla genetik olarak kararsızdır. Orijinal klondaki genetik kararsızlık çoğu hayatta kalmayan yeni genetik varyantların ortaya çıkmasına neden olur. Bununla birlikte seçici büyüme avantajına sahip bu birkaç varyant tümör içinde baskın alt popülasyonlar haline gelmek üzere genişler ve zamanla tümörün ilerlemesine neden olur. Tümör içinde çoklu alt popülasyonların devam eden varlığı heterojenlik için ortam sağlar. Bu model belirli bir tümördeki hem genetik hem de epigenetik heterojenliği oluşturur ve bir tümör hücre popülasyonunun giderek artmasına neden olur (Nowell ve ark., 1986; Stratton ve ark., 2009). Bu teori GBM'lerin birçok mutasyona sahip olduğunu ortaya koyan genom çapında çalışmalarla daha da desteklenmiştir ve bu, GBM içindeki alt klonal heterojenliğin ve klon içi genetik çeşitliliğin varlığını yansıtmaktadır (Brennan ve ark., 2013; Patel ve ark., 2014). Kemo ve radyoterapi gibi tedavilere bazı tümör alt popülasyonları daha dirençli özellikler gösterdikleri ve koruyucu bir konum veya bu

faktörlerin bir kombinasyonunu kazandıkları için hayatta kalır. Bu dirençli alt popülasyonlar tümörün nüksetmesinden sorumludur.

1.16.3. Kanser Kök Hücre (CSC) veya Hiyerarşik Model

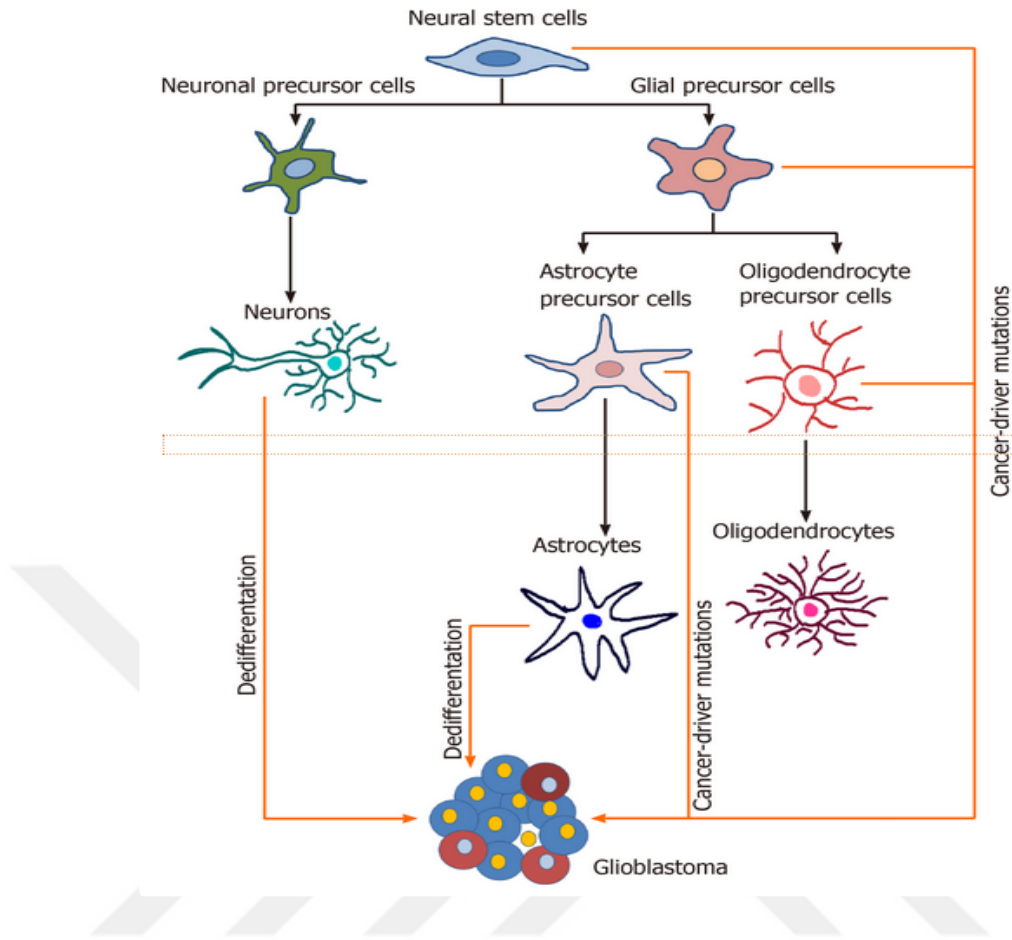
CSC hipotezi, hücre orijini ne olursa olsun birçok kanserin farelere transplantasyonu sonucunda kendini yenileme, çok yönlülük ve tümör başlatma gibi farklı özelliklere sahip CSC'lerden oluştuğu hiyerarşik organizasyonlar olduğunu öne sürmektedir. CSC'ler, mikroçevrenin kök hücre davranışlarını düzenlediği özel nişlerde bulunur. Nişler CSC'leri korumak için sinyaller yayan farklı kanserli olmayan hücre popülasyonlarından oluşur. CSC'ler geleneksel tedavilere dirençlidir ve tedaviden sonra tümör nüksetmesinden sorumlu oldukları düşünülmektedir (Singh ve ark., 2004; Lathia ve ark., 2015).

GSC'ler (Glioma kök hücreler) katı tümörlerde tanımlanan ilk CSC'ler arasındadır (Singh ve ark., 2004). GSC'ler GBM heterojenliğine en büyük katkıda bulunan hücrelerden biridir; bu hücreler yüksek bir çoğalma hızı ve kendi kendini yenileme kapasitesine sahiptir (Escamilla ve ark., 2020). Aynı zamanda çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneği, arttırılmış invaziv kapasite, artan anjiyogenik kapasite sergiler (Auffinger ve ark., 2015; Boyd ve ark., 2021). GSC'ler genellikle CD133 (Prominin 1), CD44, NANOG, SOX2, OCT4, POU sınıf 3 homeobox 2 (POU3F2), MYC proto-onkogen (c-Myc), Spalt Like TF 2 (SALL2) ve KAT8 gibi spesifik belirteçleri ifade eder (Ferreira ve ark., 2016; Suva ve ark., 2014). GBM hücrelerinin GSC ve GSC dışı durumlar arasında karşılıklı dönüşüm yapabildikleri bildirilmiştir (Gimple ve ark., 2019). Ek olarak tek bir GBM tümörünün farklı GSC alt kümelerini içerdiği bulunmuştur (Jin ve ark., 2017).



Şekil 1.30. Kanserın Kökeni ve Modelleri (Sofi, Robi R., 2021)

GBM ve diğerk tümör tiplerinden yapılan çeşitli çalışmalar CSC'lerin insan glioblastoma biyopsilerinin perinekrotik bölgelerinde hipoksik tümör nişlerini zenginleştirildiğine dair kanıt sağlamıştır (Seidel, S ve ark., 2010). Hipoksi, kendini yenileme ve farklılaşmada rol oynayan genlerin aktivasyonu yoluyla kök hücre fenotipini teşvik eder ve tümör hücrelerini ve CSC'leri kemo ve radyoterapiden korur. Bu nedenle hipoksi, CD133, SOX2, OCT4, nestin ve KLF4 dahil olmak üzere çeşitli CSC belirteçlerinin ifadelerini oluşturmakta ve CSC'lerin nörosfer oluşturma yeteneğindeki artış tümörlerin kök hücre özelliklerini kazanmalarına neden olmaktadır (Seidel, S., ve ark., 2010; Soeda, A., ve ark., 2009; Bar, E., ve ark., 2010).



Şekil 1.31. Glioblastoma kaynaklı kök hücreler (Sameer Agnihotri ve ark., 2012)

1.16.4. CSC (Kanser Kök Hücresi) ve Bağışıklık Sistemi Etkileşimi

İmmün hücre infiltrasyonu pro-tümörjenik fonksiyonlara neden olduğu için birçok bağışıklık bileşeniyle katı tümörler arasında karmaşık ve çeşitli bir rol oynar (Thorsson ve ark., 2018). Farklı tümör tiplerinde farklı immün hücre profilleri baskındır ancak birçok etkileşim birkaç katı tümörde tutarlıdır. Örneğin M2-polarize tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'ler), CSC popülasyonlarını kemokin sinyali ve Sonic hedgehog gibi kök hücre yollarının indüklenmesine neden olur (Jinushi ve diğerleri, 2011). TAM'ler çoklu kanser türlerinde EMT ve CSC özelliklerini destekler (Fan ve ark., 2014; Li ve ark., 2018a).

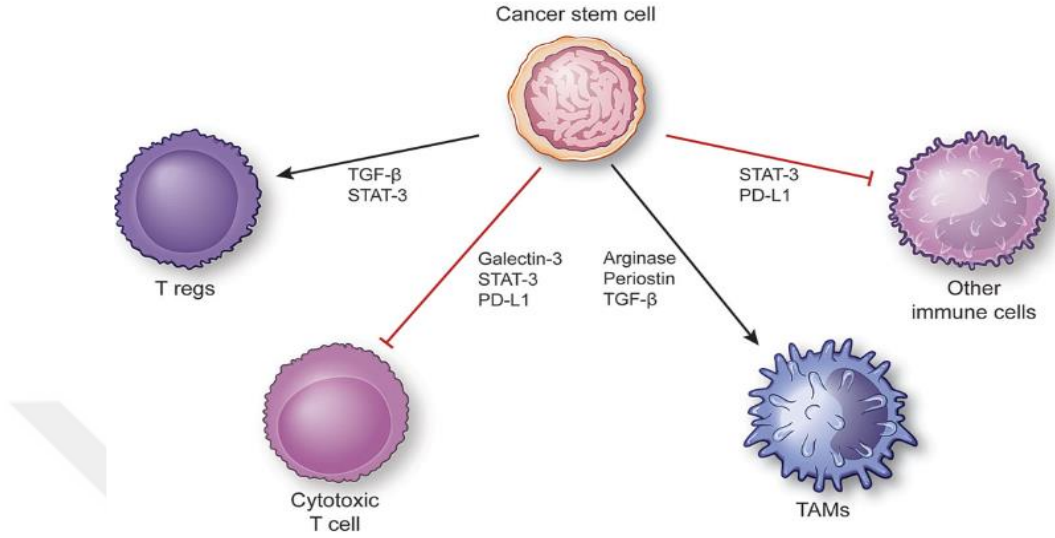
Bağıışıklık kaçıış, tümör başlangıcında kritik bir rol oynar. CSC'ler tümörjenezin temel itici güçlerini temsil ettiğinden genellikle immünosupresiftirler. CSC'ler, çeşitli mekanizmalar yoluyla bağıışıklık hücreleri tarafından öldürölmekten kaçınır. Örneğın, CD133+ glioblastoma CSC'leri ve ABCB5+ melanom CSC'leri, T hücre saldırısından kaçmak için MHC sınıf I moleküllerini (insan HLA-A, HLA-B ve HLA-C) aşığı regöle eder (Di Tomaso ark., 2010, Schatton ve ark., 2010). Glioblastoma CSC'leri antijen sunma ve sunum yolları kapasitesini azaltmak için antijen işleme (TAP) ile ilişkili düşük moleköler ağırlıklı protein (LMP) ve taşıyıcının ifadelerini azaltır (Di Tomaso ve ark., 2010). CSC'lerde Toll benzeri reseptör 4'ün (TLR4) düşük ifadesi doğuştan gelen bağıışıklık baskılamasından kaçınmalarına yardımcı olur (Alvarado ve ark., 2017).

Yapılan çalışmalar CSC'lerin tümör mikroçevresindeki bağıışıklık tepkisini yeniden şekillendirmedeki rolünü de desteklemektedir. CSC'ler anti-tümör immün tepkisini azaltan TGF- β ve IL4 gibi birçok immünosupresif moleköl salgılar (Nappo ve ark., 2017). TGF- β , Foxp3'e bağımlı ve bağımsız yollar aracılığıyla düzenleyici T hücresi aktivasyonunu indüklerken aktif T hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder (Fantini ve ark., 2004; Oh ve ark., 2017; Thomas ve Massagué, 2005). TGF- β doğal öldürücü hücreleri inaktive eder ve pro-onkojenik M2 makrofaj polarizasyonunu destekler (Ganesh ve Massagué, 2018). Glioblastoma CSC'leri M2 makrofajları tümör mikroçevresine alarak periostin (POSTN) salgılamaktadır (Liu ve ark., 2014; Zhou ve ark., 2015). Son zamanlarda araştırmalar tümör hücresi oluşumuna, invazyonuna ve terapötik dirence doğrudan katkılarına ek olarak CSC'lerin tümör mikroçevresindeki immün gözetimi zayıflatarak dolaylı olarak tümör gelişimine katkıda bulunduğunu ortaya çıkarmaya başlamıştır. CSC'lerin kendileri esas olarak in vivo immün aracılı reddi önlemek için immünojenisitelerini değıştirerek bağıışıklık sisteminden kaçma yeteneğine sahiptir. Çok çeşitli preklinik modeller CSC'leri tümör ilerlemesi ve terapi direnci ile ilişkilendirmiştir ve bu hücre popölasyonunun seçici ablasyonunun tümörjenik büyümeyi inhibe etmede etkili olduğunu göstermiştir (Qi ve ark., 2012). CSC'ler immünosupresif faktörlerin salgılanması veya ifade etmesi yoluyla tümör bağıışıklığını engeller. Çalışmalar CSC'lerin majör histo-uyumluluk kompleksi I

(MHC I) ve inhibitör birlikte uyarıcı molekül B7 homolog 1 B7-H1 (programlanmış ölüm ligand 1, PD-L1 olarak da bilinir) ifadelerinde antijen sunan hücreleri kısmen taklit ettiğini göstermiştir fakat aktive edici yardımcı uyarıcı moleküller CD40, CD80 ve CD86'dan yoksundur. Uygun ortak uyarıcı sinyaller olmadan efektör T hücreleri antijen sunumunu takiben anergiye indüklenir, bu da onları etkinleştirilemez hale getirir. Parsa ve arkadaşları, tümör hücresi tarafından ifade edilen PD-L1'in, konakçı T hücreleri ile hücre-hücre temasını kolaylaştırdığını efektör T hücresi aktivasyonunu ve sitokin üretimini baskıladığını göstermiştir (Parsa ve ark., 2007). Bu gözlemler CSC'lerin daha fazla TGFB salgıladığını gösteren sonuçları ortaya çıkarmıştır (Lottaz ve ark., 2010). Bu durum TGFB'nin MHC II ifadesinin antijen sunumunu zayıflatmasına ve ayrıca immün baskılayıcı Treg hücre popülasyonunun ortamda birikmesine bağlı olduğunu göstermektedir (Focaetti ve ark., 2005; Wei ve ark., 2010). Wei ve arkadaşları, galektin-3'ün GBM'de CSC salgılamasının naif ve aktive T hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü tetiklediği bunun sonucunda da CSC popülasyonunun genişlemesini mümkün kılarak tümör içi efektörünü daha da azalttığı bir ileri besleme mekanizması sunmuştur ve bu durum intratümör efektör immün hücre popülasyonunu azaltmaktadır.

GBM'de immün baskılayıcı sitokinlerin salgılanmasına ek olarak CSC'ler tümörlü hücreleri bir araya getirme yeteneğine sahiptir. Örneğin, TAM'lerin glioma mikroçevresine aktarılmasında CSC'leri aracılık eder. Wu ve arkadaşları, koloni uyarıcı faktör-1 (CSF-1), C-C motif ligand 2 (CCL2) ve makrofaj inhibitör sitokin 1 (MIC-1), CSC'de zenginleştirilmiş faktörlere maruz kaldıktan sonra in vitro makrofaj göçünün önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Bu durum, CSF-1- ve CCL2 aracılı alımın, monosit havuzunun immün baskılayıcı M2 fenotipine doğru polarizasyonu ile sonuçlandığını göstermiştir (Wu ve ark., 2010). Benzer bir çalışma CSC'lerin periostin sekresyonu yoluyla tümör mikroçevresine TAM alımına aracılık ettiğini ortaya koymuştur. Periostin ifade seviyeleri TAM yoğunluğu ile doğru orantılıyken GBM hasta sağkalımı ile ters orantılıdır. CSC'lerde periostinin bozulması, tümör mikroçevresindeki M2- TAM'lerin sıklığını azaltmıştır ve tümör destekleyici

özellikleri ortadan kalkmıştır, tümör büyümesi inhibe edilmiştir. Bu durum GBM'de CSC'den türetilen ksenograftlarla farelerde sağkalımı artırmıştır.



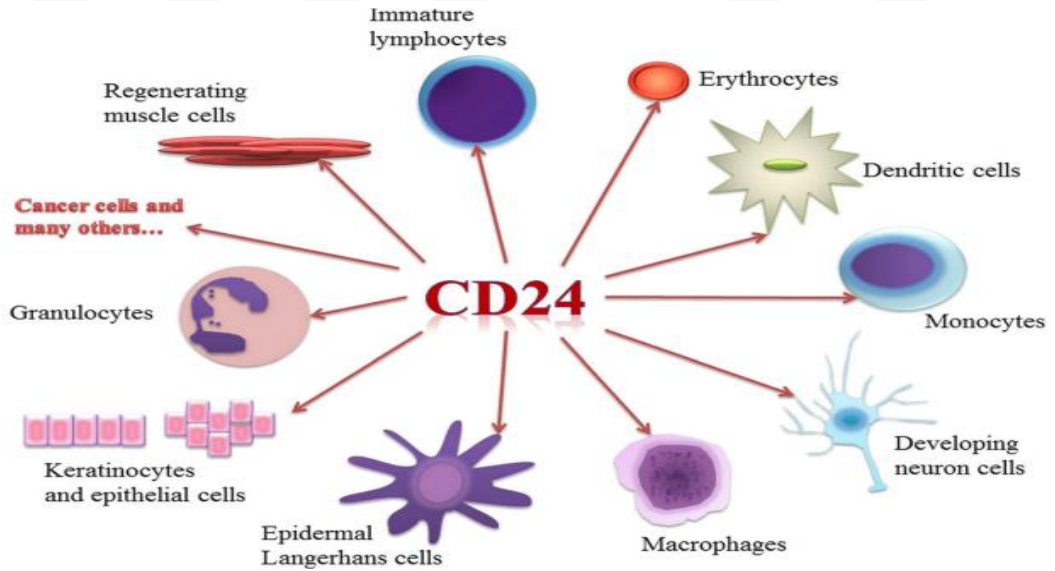
Şekil 1.32. Bağışıklık hücreleri ile kanser kök hücre (CSC) etkileşimi. (Silver ve ark., 2015)

1.17. CD24

Farklılaşma kümesi (CD)24, bir glikosil-fosfatidil-inositol (GPI)-bağlı glikoproteindir. Küçük bir protein çekirdeğine sahip ancak geniş N-bağlı ve O-bağlı glikosilasyona sahip bir zar proteinidir. CD24, bağışıklık sisteminin birçok hücresi tarafından aynı zamanda insan kanserlerinde sıklıkla aşırı ifadeleri söz konusudur (Kristiansen ve ark., 2004; Lim ve ark., 2005). İlk tanımından bu yana CD24'ün önemi farklı alanlarda gösterilmiştir. İmmünolojide CD24 öncelikle T lenfosit tepkileri için bir kostimülatör molekül ve otoimmünitenin bir düzenleyicisidir (Fang ve ark., 2010). Kanserde CD24 hücre göçünü, istilasını ve proliferasyonunu düzenler ve daha kötü prognozun biyobelirtecidir. Kanser kök hücreleri (CSC'ler) için varsayılan bir belirteçdir (Kristiansen ve ark., 2004; Lim ve ark., 2005; Sagiv ve ark., 2008; Lee ve ark., 2009; All- Hajj ve ark., 2003). Bu kadar küçük bir GPI bağlantılı hücre yüzeyi molekülünün biyolojide bu kadar önemli rollere sahip olması şaşırtıcıdır. Bağışıklık sisteminde CD24 hücre proliferasyonu ve klonal genişlemenin düzenlenmesinde önemlidir (Fang ve ark., 2010). Yakın zamanda tümör hücreleri üzerindeki CD24'ün

bağışıklık sistemi üzerinde fren görevi görebileceği bildirilmiştir. Barkal ve arkadaşları, bağışıklık sistemi ve tümör hücrelerinin interfazında CD24'ün yeni rolüne dikkat çekmiştir.

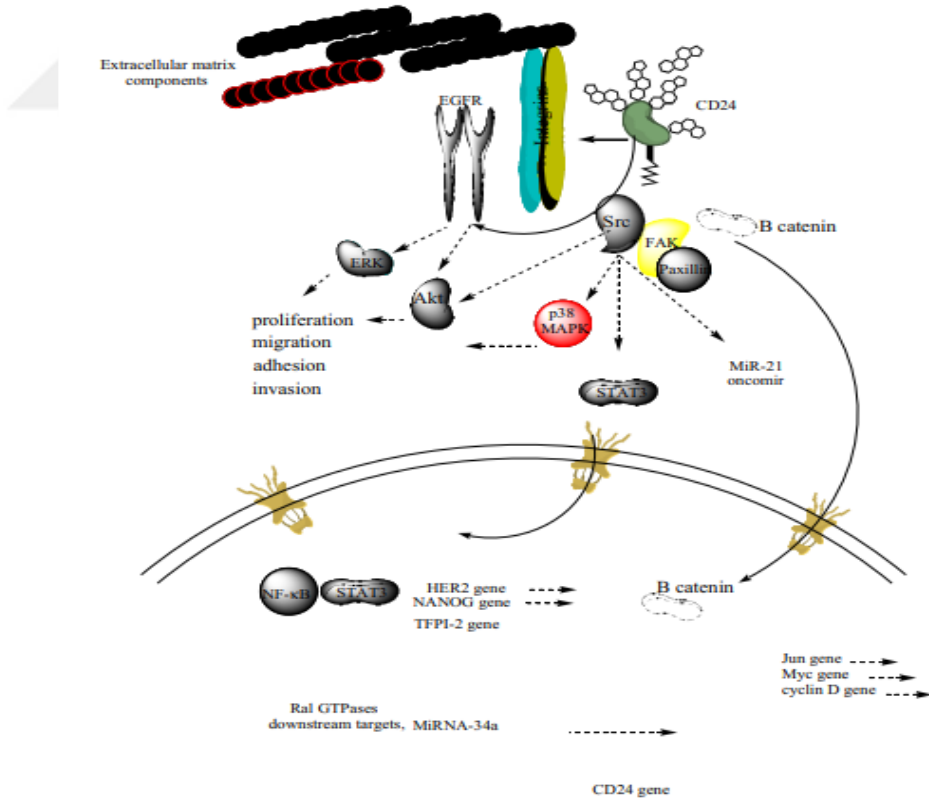
Yeni fagositoz inhibitörlerinden CD24'ün yumurtalık kanseri (OvCa) veya üçlü negatif meme kanserleri (TNBC) üzerindeki “beni yeme” sinyali olarak adlandırılan bir antifagositik yüzey proteini gibi davrandığını göstermiştir. İnsanlarda CD24 B lenfositleri, monositleri, granülositleri ve lenfoid tümör hücre dizileri üzerinde ifade edilir. CD24 biyolojisinin anlaşılmasının ilişkili glikanlar hakkında bilgi sahibi olunması gerekliliğini göstermektedir. Diğer membran proteinleri gibi CD24'ün glikosilasyonu, glikosiltransferazların hücresel repertuarına bağlı olarak hücre tipine özgüdür (Alterman ve ark., 1990). CD24'ün ifadesi plazma zarında, sitoplazmada, ve hatta çekirdekte tanımlanmıştır (Kwon ve ark., 2015; Majores ve ark., 2015; Choi ve ark., 2005; Weichert ve ark., 2005; Ahmed ve ark., 2009). GPI bağlantılı molekül olan CD24 normal hücrelerde öncelikle plazma zarında lokalizedir.



Şekil 1.33. İnsan Hücrelerinde CD24 İfadesi (Tan ve ark., 2016)

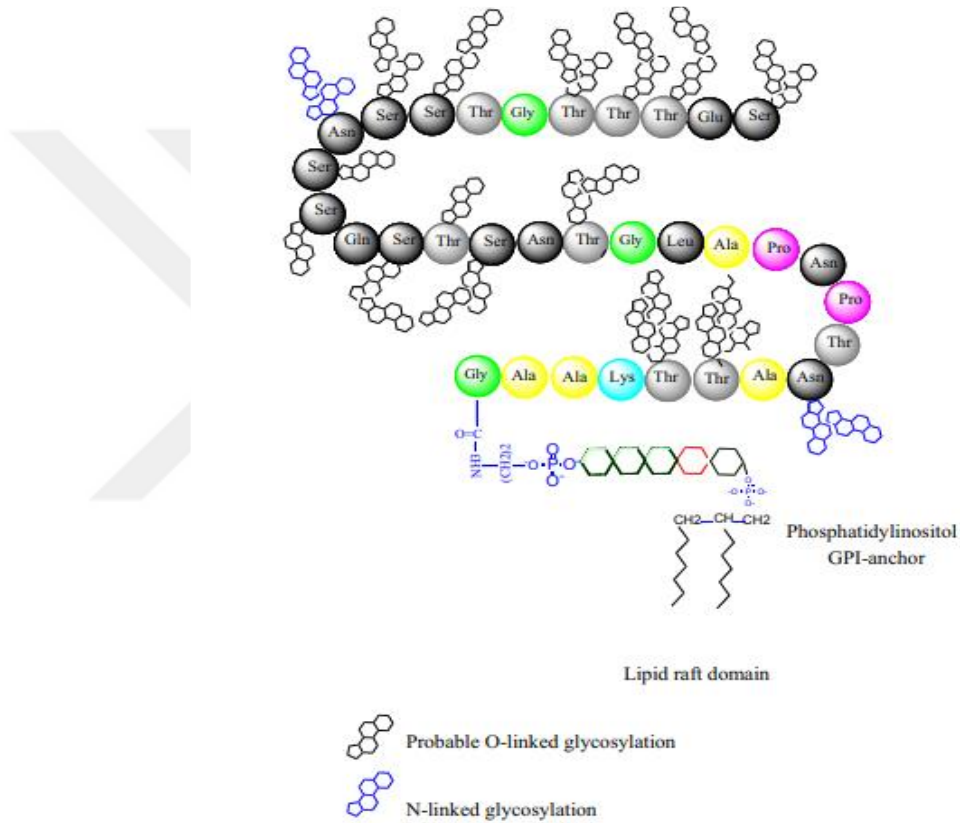
CD24 çeşitli hematopoietik hücrelerde ve hematopoietik olmayan hücrelerde yaygın olarak ifade edilir (Fang ve ark., 2010). CD24'ün progenitör hücrelerde veya

metabolik olarak aktif hücrelerde daha yüksek seviyelerde ifade edildiğini ancak terminal olarak farklılaşmış hücrelerde daha düşük seviyelerde ifade edildiğini öne sürer (Fang ve ark., 2010). CD24 meme kanseri, pankreas kanseri, ve glioma gibi çeşitli kanserlerde ve kanser kök hücrelerinde önemli ölçüde yüksek ifade seviyeleri göstermiştir. CD24'nin aşırı ifadesi kanserin patolojik derecesi veya prognozu ile pozitif olarak ilişkilidir (Kristiansen ve ark., 2004; Rostoker ve ark., 2015; Rao ve ark., 2015). CD24; SRC, FAK, STAT3 gibi sinyal moleküllerini aktive ederek kanser hücresinin proliferasyonuna, metastazına neden olur ve böylece tümörün ilerlemesine aracılık eder. CD24 aşağı regülasyon aracılığıyla Src kinazların aktivasyonuna yol açmaktadır. Aktive edilmiş olan Src ise STAT3 ve FAK'ı fosforile etmektedir. CD24 fagositik hücrelerin yüzeyinde Siglec 10 ile etkileşime girerek kanser hücrelerini fagositozdan korur (Altevogt ve ark., 2020). Aktive edilmiş STAT3, NANOG ifadesini indükler. Ayrıca CD24, Akt ve ERK aktivasyonu yoluyla kanser gelişimini indükleyen EGFR sinyal yolunu aktive eder (Eyvazi ve ark., 2018).



Şekil 1.34. CD24'nin Akt ve ERK aktivasyonu yoluyla kanser gelişimini indükleyen EGFR sinyal yolunu aktive etmesi (Eyvazi ve ark., 2018)

Literatürde kanser kök hücre belirteçlerini ifade etmeyen kanser hücre hatlarında bu belirteçler aşırı ifade edildiğinde bu hücrelerin kanser kök hücre fenotipi gösterdikleri bulunmuştur. Örneğin, yumurtalık kanseri üzerine yapılan bir çalışmada CD24 ifadesi düşük olan Caov-3 hücrelerine CD24 transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. CD24 ifade etmeyen Caov-3 hücreleri ile ifade eden hücreler karşılaştırıldığında, CD24 ifade eden Caov-3 hücre serisinde hücre çoğalmasında, koloni oluşturmada ve invazyonda bir artış gözlemlenmiştir (Nakomura ve ark., 2017).

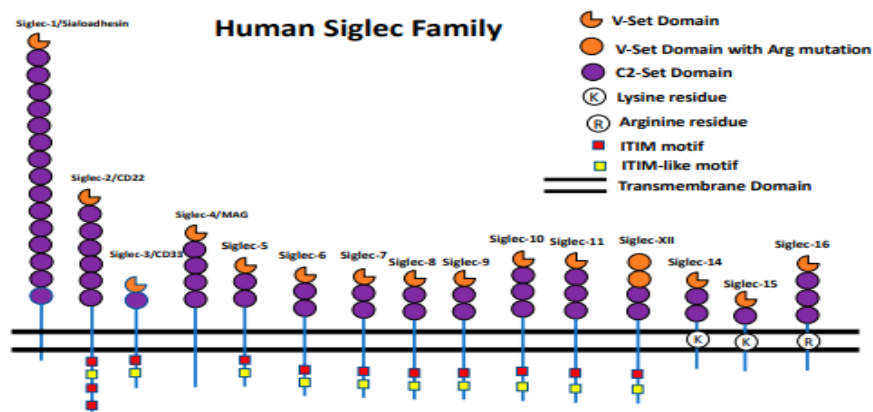


Şekil 1.35. CD24 Glikoproteini (Eyvazi ve ark., 2018)

1.18. Siglecler (Sialik Asit Bağlayıcı Ig Benzeri Lektin)

Siglecs, hücre dışı bir yapısal alan, bir transmembran yapısal alan ve bir hücre içi yapısal alandan oluşan tip I immüoglobulin benzeri transmembran proteinlerdir. Hücre içi alan kısa bir lizin içeren kuyruk ve bir N-terminal bağlayıcı Ig alanından ve değişken sayıda C2-tipi yapısal alanlardan oluşan hücre dışı bir yapısal alana

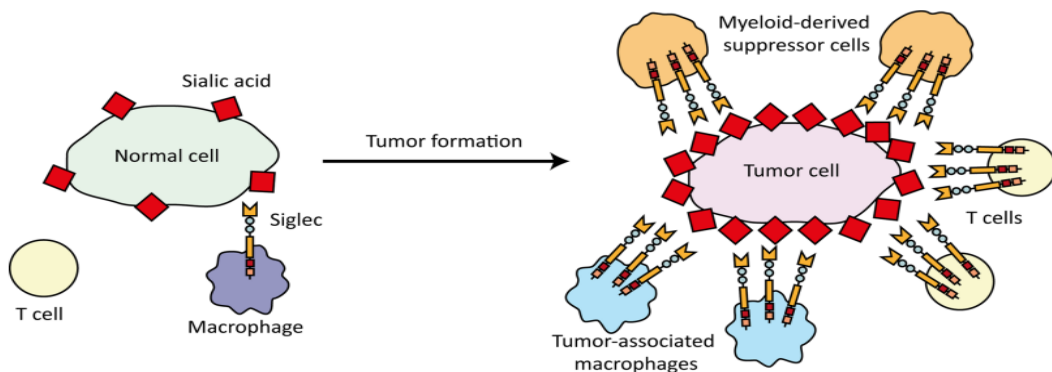
bölünmüştür (Duan ve ark., 2020). Siglec üyeleri, immünoresptör tirozin bazlı aktivasyon motifi (ITAM) ve immünoresptör tirozin bazlı inhibisyon motifi (ITIM) dahil olmak üzere her molekül içindeki spesifik motiflere bağlı olarak aktive edici veya inhibe edici etkiler gösterebilir (Flores ve ark., 2019). İnhibitör Siglecs, Siglec-3, Siglec-5, Siglec-7, Siglec-9 ve Siglec-10'u içerir ve bunların hücre içi bölgeleri, tirozin fosfatazları (SH2 alanı içeren) olarak inhibitör sinyalleri ileten ITIM ve ITIM benzeri alanları içerir (Crocker ve ark., 2007; Rosenstock ve ark., 2021). Siglecs ITAM alanını taşıyan DAP12 ile etkileşime girebilen transmembran bölgesindeki pozitif yüklü kalıntıya bağlı olarak aktive edilmiş hücre içi sinyaller üretme yeteneklerine göre de sınıflandırılabilir. İnsan Siglec-4, Siglec-14, Siglec-15, Siglec-16 ve fare Siglec-H bu sınıflandırmaya aittir (Crocker ve ark., 2007; Macauley ve ark., 2014). Siglecs, balıklar, amfibiler, kuşlar, sürüngenler ve memeliler gibi farklı omurgalı türlerinde ifade edilir. Dizi koruma derecesine göre klasik korunmuş Siglec'ler ve CD33 ile ilişkili Siglec'ler olarak da sınıflandırılabilirler. 400 milyon yıl önce eski omurgalılarda var olan evrimsel olarak korunmuş Siglec'ler arasında Siglec-1 (CD169), Siglec-2 (CD22), Siglec-4 ve Siglec-15 bulunur. Bununla birlikte CD33 ile ilişkili Siglec genleri, memeli evrimi sırasında gen duplikasyonu, ekson kaybı ve gen dönüşümü gibi çoklu işlemler nedeniyle hızla gelişmiştir ve CD33 ile ilgili önemli farklılıklara neden olmuştur.



Şekil 1.36. İnsan Siglec Ailesi Reseptörleri (Siddiqui ve ark., 2019)

Çoğu Siglec sitoplazmik alanlarında hücre sinyalleşmesinin düzenlenmesine katılan düzenleyici motiflere sahiptir (Macauley ve ark., 2014; Varki ve ark., 2015; Bochner ve ark., 2016; Pillai ve ark., 2012). Siglecs, tüm memeli hücrelerinde bulunduğundan bağışıklık hücrelerinin kendinden ve kendinden olmayanı ayırt etmesine yardımcı olabilir ve istenmeyen bağışıklık tepkilerini önlemek için bağışıklık kontrol noktaları olarak görev alır (Macauley ve ark., 2014; Varki ve ark., 2015; Lubbers ve ark., 2018). Siglecs'in bağışıklık hücresi fonksiyonlarındaki çeşitli rolleri aydınlatılmaya başlanırken çoğu bağışıklık hücresinde ifade edilmeleri onları hem yararlı hem de zararlı olan çeşitli hücresel bağışıklık tepkilerinde görev alan bir rol üstlendirmiştir. Ayrıca hücre sinyalleşmesini düzenleyen koreseptörler olarak çeşitli hastalıklarda terapötik fayda için immün hücre yanıtlarını artırma veya susturma stratejilerinin geliştirilmesi için hedef olarak daha fazla tanınmalarına neden olmuştur (Macauley ve ark., 2014; Pillai ve ark., 2012; Lubbers ve ark., 2018; Daly ve ark., 2019; Fraschilla ve ark., 2017; Bull ve ark., 2016; Li ve ark., 2018).

Siglec'lerin işlevleri ifade edildikleri çeşitli hücre tiplerine, taşıdıkları inhibitör/uyarıcı motiflere ve TME'deki tümör hücreleri ile stromal hücreler arasındaki etkileşimlerde yer alan bağlandıkları spesifik ligandlara göre belirlenir. Geleneksel olarak Siglec ailesinin çoğu üyesi makrofajlar, miyeloid hücreler, B hücreleri ve hatta T hücreleri gibi başlıca immün hücre tiplerinde ifade edilir (Bull ve ark., 2014).

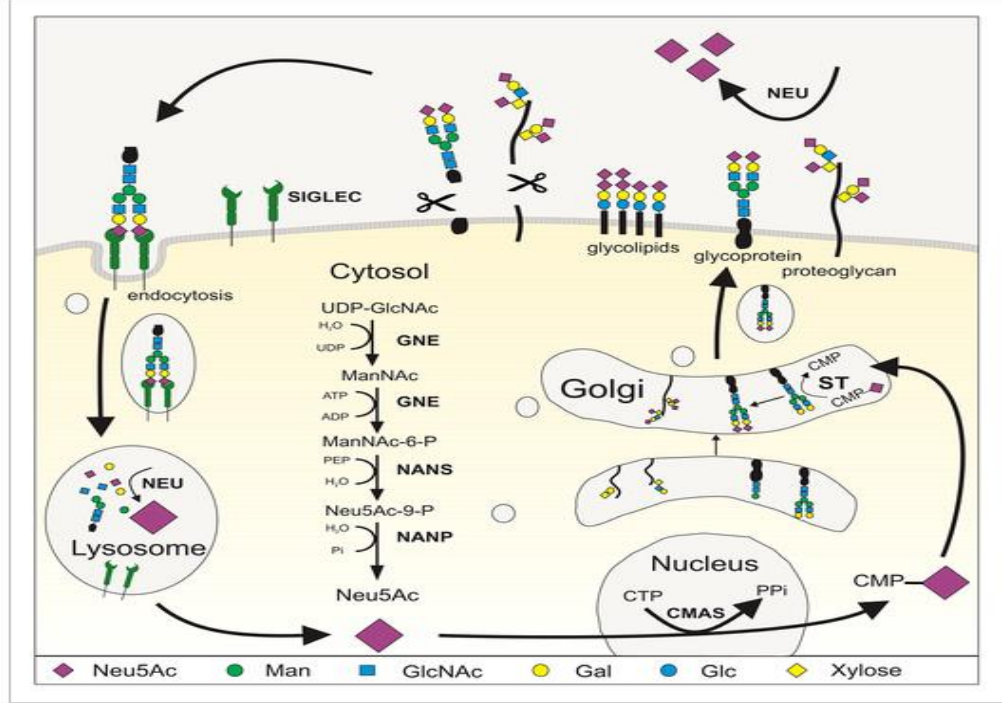


Şekil 1.37. Tümör Oluşumu Üzerine Siglec-Sialoglikan Değişikliği (Van Houtum ve ark., 2021)

Sialik asit (Sia), nöraminik asit türevleri olan dokuz karbon monosakarit ailesi için genel bir terimdir. Sia omurgalıların hücre yüzeyinde ifade edilen glikolipidlerin ve glikoproteinlerin şeker zincirlerini sonlandıran tipik kalıntıdır (Angata ve ark., 2002; Varki ve ark., 2017). Omurgalılarda N-asetilnöraminik asit (Neu5Ac), N-glikolilnöraminik asit (Neu5Gc) ve deaminonöraminik asit (Kdn) olmak üzere üç ana Sias türü vardır. Çoğu memeli Neu5Ac ve Neu5Gc üretirken insanların Neu5Gc üretme kapasitesi söz konusu değildir (Varki ve ark., 2017). Sias metilasyon, sülfatlama, laktilasyon, asetilasyon ve laktonizasyon gibi çeşitli post-translasyonel modifikasyonları ile değiştirilebilir, sialoglikoproteinler ve sialoglikolipidler oluşturmak için "sialilasyon" adı verilen bir işlem olan şeker zincirlerine eklenebilir. Böylece Sia ailesi farklı yapılara sahip 50'den fazla üyeden oluşmaktadır (Angata ve ark., 2002).

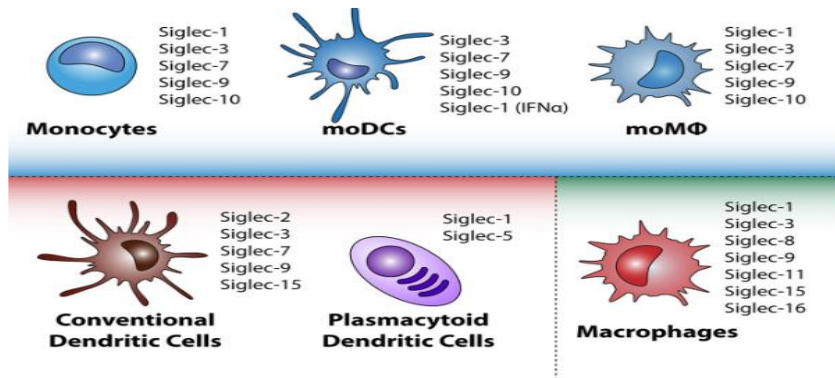
Sia'nın biyosentezi sitozolde gerçekleşir ve bu süreç dört adım ve üç enzim içerir. İki işlevli glukozamin (UDP-N-asetil)-2-epimeraz/N-asetilmannosamin kinaz tarafından iki hız sınırlayıcı adım gerçekleştirilir (Keppler ve ark., 1999). GNE, üridin difosfat-N-asetilglukozaminden (UDP-GlcNAc) N-asetil-d-mannozamine (ManNAc) dönüşümü katalize eder ve ManNAc'ı fosforile ederek N-asetil-mannozamin 6-fosfat (ManNAc-6-P) oluşturur. ManNAc-6-P daha sonra yoğunlaştırılır ve Neu5Ac'yi oluşturmak için iki aşamada defosforile edilir. Çekirdekte Neu5Ac aktif CMP-Neu5Ac'yi oluşturmak için sitidin monofosfat N-asetilnöraminik asit sentetaz ile sitidin 5-monofosfat (CMP) ile konjuge edilir (Munster-Kuhnel ve ark., 2004). CMP-Neu5Ac'nin çekirdekten Golgi aygıtına taşınmasından sonra, sialiltransferazlar Neu5Ac'yi bir galaktoza (Gal), bir N-asetilgalaktozamine (GalNAc) veya çeşitli protein veya lipidlerin başka bir Sia kalıntısına konjuge eder (Chen ve ark., 2010). İnsanlar, Sia kalıntıları ve alttaki alıcı şeker arasında farklı bağlantılar (a2,3-, a2,6-, a2,8-) kullanarak farklı alıcı şekerlere (Gal, GalNAc, Sia) Sia ekleyen yaklaşık 20 farklı sialiltransferaz içerir. Ayrıca Sias intersialil bağlantıları yoluyla farklı derecelerde polimerizasyona sahip homopolimerler oluşturabilir. Örneğin polisialik asit (polySia), 10 ila 200 arasında bir polimerizasyon derecesine sahip a2,8-bağlı

Neu5Ac monomerlerinin bir homopolimeridir ve gelişmekte olan CNS'de yüksek oranda ifade edilir (Schnaar ve ark., 2014).



Şekil 1.38. Sialik asit, üretimden hücre yüzeyi ifadesine, desialilasyon yoluyla uzaklaştırma, alım, lizozomal sindirim ve yeniden kullanıma kadar olan döngü (Klaus ve ark., 2021)

Sialik asitler, bağışıklık sistemini Siglecs yoluyla çeşitli şekillerde modüle edebilir ve antikor aracılı patojenlerin temizlenmesini etkiler (Maurer ve ark., 2018).



Şekil 1.39. Farklı Mononükleer Fagositler Tarafından Siglec İfadesi (Lubbers ve ark., 2018)

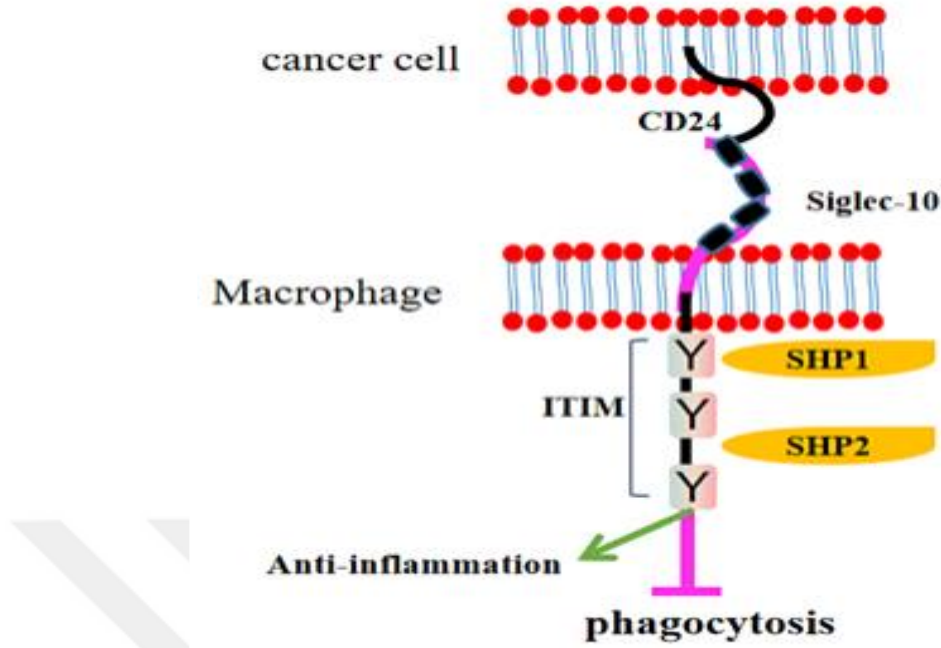
Nöraminidazlar veya sialidazlar olarak adlandırılan spesifik glikosidazlar, sialik asidi oligosakkaritlerden hidrolize edebilir. Esas olarak hücre içi keseciklerde bulunan bu enzimler salgılanabilir böylece hücre zarı üzerinde bulunan sialile yapıların profilini değiştirir ve ifadeleri birçok farklı kanser türünde düzensizdir (Lubbers ve ark., 2018).

1.18.1. Siglec-10 (Sialik Asit Bağlayıcı Ig Benzeri Lektin 10)

Siglec-10, immün reaktiviteleri baskılamak için ağırlıklı olarak NK hücreleri, B hücreleri, monosit türevli dendritik hücreler ve antijenle aktive olan CD4+ T hücrelerinde bulunan CD33 ile ilişkili bir Siglec reseptörü taşıyan bir ITIM inhibitörüdür (Zhang ve ark., 2015;). Tipik Siglec-10 ligandları ağırlıklı olarak lökositlerde ifade edilen CD24 ve CD52 gibi ağır gliko silatlı moleküllerdir (Barkal ve ark., 2019; Bandala Sanchez ve ark., 2013). Siglec-10, çeşitli patofizyolojik süreçlerde yer alan hücre yüzeylerine maruz kalan sialoglikanları seçici olarak tanıyan inhibitör I tipi bir lektindir. Siglec-10'un bağışıklık hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde oynadığı kilit rol onu geniş bir hastalık yelpazesine karşı immünoterapötiklerin geliştirilmesi için potansiyel bir hedef haline getirmiştir. Bununla birlikte proteinin kristal yapısı şimdilik çözülmemiştir ve Siglec-10'un kompleks glikanlarla etkileşimlerinin atomik tanımı daha önce çözülmemiştir (Forgione ve ark., 2020).

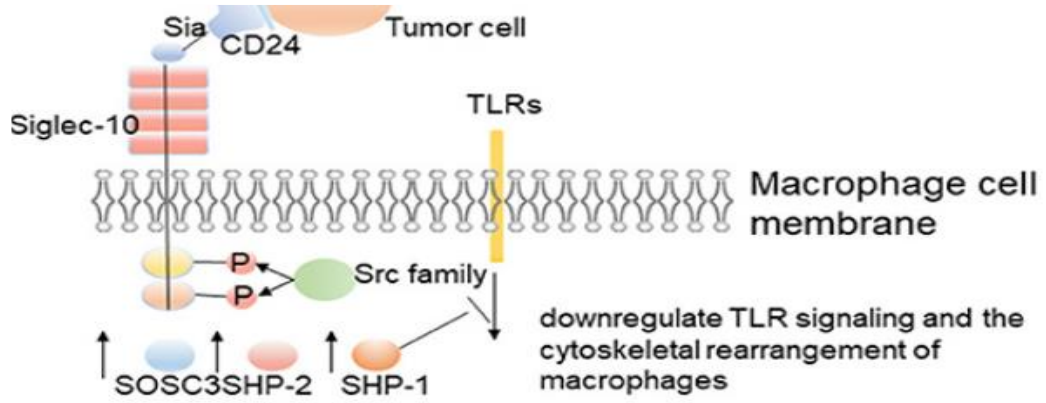
1.18.2. CD24/Siglec-10 Etkileşimi

Siglec10 sitoplazmik alanda ITIM'ler içeren bağışıklık sisteminin çeşitli hücrelerindeki diğer bağışıklık bastırıcı reseptörlere benzemektedir. Siglec-10, kanser hücreleri üzerindeki CD24 ligandını bağlar ve hücre içi ITIM alanları, tirozin fosfatazlar SHP-1 ve SHP-2'yi alır ve böylece makrofajların fagositozunu engeller. CD24 ve Siglec-10 arasındaki ilişkinin monoklonal antikorlar tarafından genetik olarak ortadan kaldırılması ve ayrıca CD24-Siglec-10 etkileşimlerinin bloke edilmesi CD24 ifade eden tüm insan tümörlerinde fagositozu önemli ölçüde artırabilir.

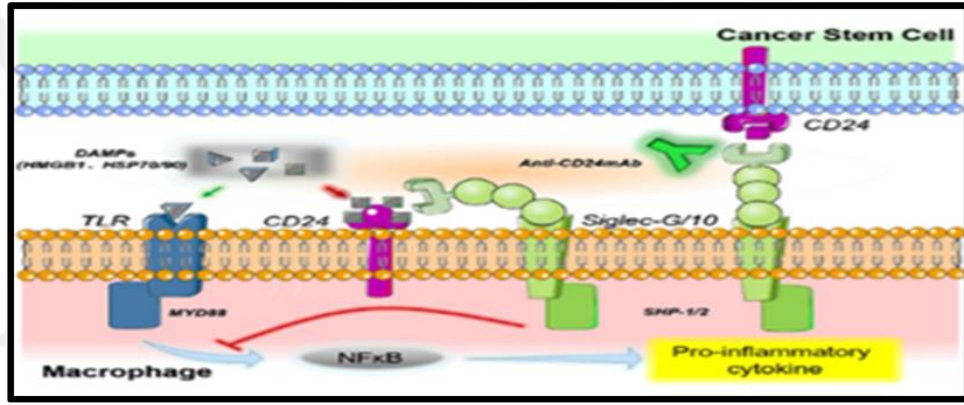


Şekil 1.40. CD24 /Siglec-10 Etkileşimi (Tian ve ark., 2022)

CD24, Siglec-10 etkileşimi sonrasında SRC ailesi tirozin kinazları SIGLEC10'un hücre içi bölgesinde SHP-1 ve SHP-2 (SHP'ler SOSC negatif regülatörleridir ve sitokin sinyal aktivatörleridir) fosfatazların aracılık ettiği anti-inflamatuar ve anti fagositik sinyal iletim yollarının etkinleşmesine yol açmaktadır. SOSC (Sitokin sinyal supresörleri) proteinleri makrofajlar ve dendritik hücreler gibi doğal bağışıklık sistemi hücrelerinin çok önemli düzenleyicisidirler. SOSC proteinleri Toll Like reseptör üzerinden oluşan immün yanıt sırasında aktive olurlar. Siglecler sialik asit içeren ligandlara bağlanır ve inhibitör reseptörler olarak rol oynarlar. Sialik asit glikan zincirlerinin ucuna eklenir. Bu glikanlar glikokalikslerin önemli bir bileşenidir. CD24 ve SIGLEC-10 arasındaki etkileşim makrofajların fagositoz yapabilirliğini baskıladığı için CD24'ü yüksek ifade eden tümörlerin immün kaçıışı desteklenmekte ve bu tümörler fagositozla yok edilememektedir.

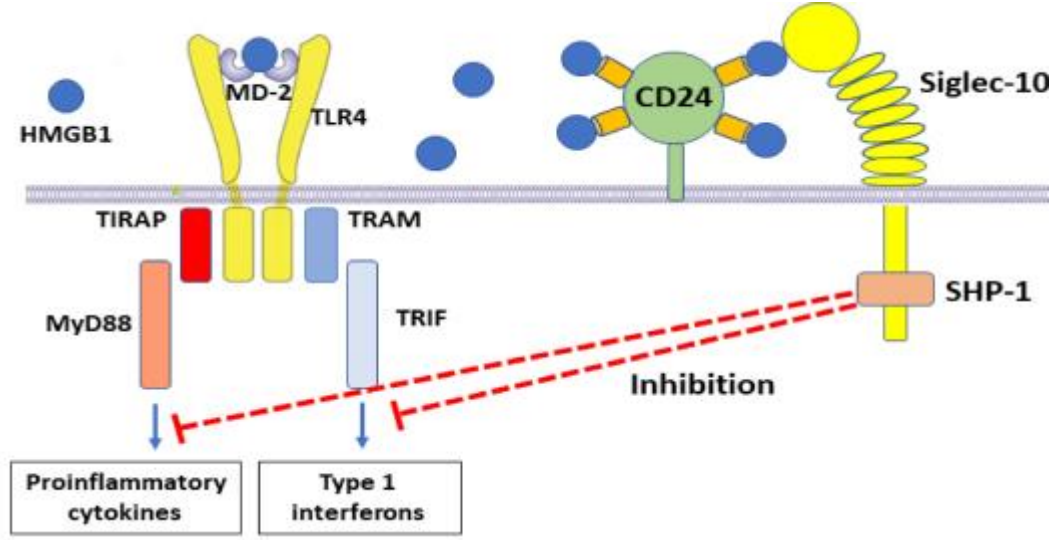


Şekil 1.41. CD24/ Siglec-10 Etkileşiminin Moleküler Mekanizması (Sammar ve ark., 2016)



Şekil 1.42. CD24 Monoklonal Antikoru ile Tümör Temizlenmesi (Wu ve ark., 2021)

CD24; (HMGB1), (HSP70/HSP90) ile birleşir ve nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) aktivasyonunu inhibe eder. Makrofajların yüzeyindeki Siglec-10'un ve tümör hücresi yüzeyindeki CD24 arasındaki etkileşimin bağışıklık reseptörleri tirozin önleyici motif (ITIM) sinyalleri yoluyla DAMP'lere bağlanması, iltihaplanma sürecini bloke eder. CD24 antikorunun varlığında bu inflamatuvar "frenleme" sinyali ciddi şekilde etkilenir ve sitokin fırtınalarının ortaya çıkmasına neden olur (Chen ve ark., 2009).



Şekil 1.43. HMGB1, CD24 ve Siglec-10 tarafından oluşturulan bir trimoleküler kompleks (Andersson ve ark., 2021)

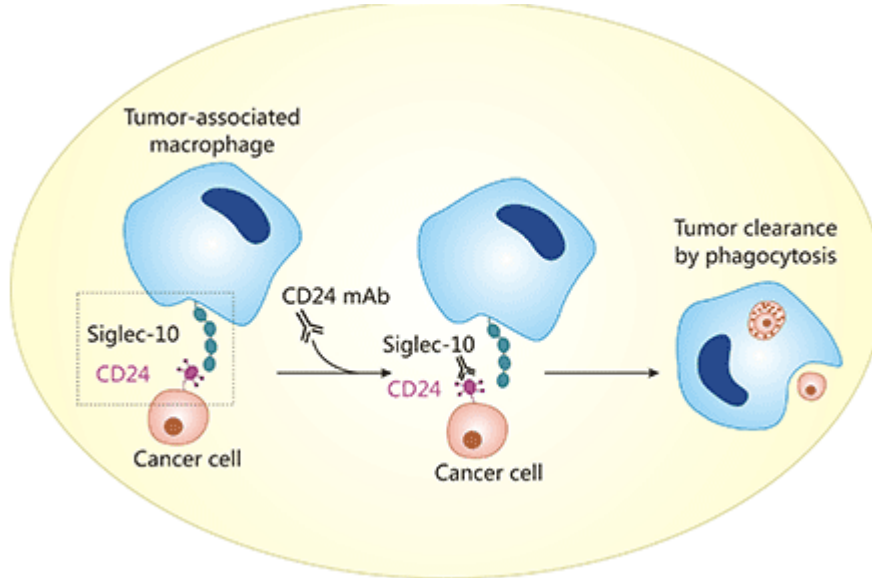
Doğal bağışıklık sistemi ve inflamatuvar yanıtta TLR'ler önemli sinyal transdüksiyon membran proteinleridir. Patojenlere karşı savunmada ilk sırayı alan TLR'lerin etkinleşmesi ile savaşılan patojenler öldürülür veya vücuttan uzaklaştırılır. TLR'ler yapılarında yüksek oranda korunmuş bölgeler içermekle birlikte bu bölgelere ligandları ve ko-reseptörleri aracılığıyla bağlanmaktadır. TLR'ler inflamatuvar süreci başlatmak için spesifik ligandları tanıyarak mikrogliyal fagositoz, sitokin salıverilmesi ve adaptif immün yanıt için gerekli yardımcı uyarıcı moleküllerinin salıverilmesi gibi olayları tetikleyerek NF- κ B gibi sinyal moleküllerini etkinleştirir. Mikroglialarda bu hücreleri etkinleştiren ve nöroinflamatuvar yanıtı başlatan çeşitli TLR'ler eksprese edilmektedir. TLR'ler spesifik patojeni tanımada rol oynayan hücre dışı lösine zengin tekrar (LRR) bölgeleri ve sitoplazmik bölgede sinyal yolunda rol alan Toll/IL-1 reseptör (TIR) bölgeleri içermektedir. Bir adaptör protein olan miyeloid farklılaştırıcı faktör 88 (MyD88) TIR bölgeleri aracılığıyla TLR'lere bağlanarak birçok sinyal transdüksiyon yolunu ve NF κ B'yi etkinleştirerek inflamasyona neden olmaktadır. TLR3 dışında tüm TLR'ler MyD88 tarafından etkinleştirilir.

1.19. İmmünoterapi

İmmünoterapi, canlı organizmalardaki maddeleri kullanarak bağışıklık sisteminin kanserle savaşmasına yardımcı olan biyolojik bir kanser tedavisi türüdür. Normalde kanser hücreleri tarafından ifade edilen proteinlere bağlanan ve işlevlerini engelleyen antikorları kullanan, bağışıklık sisteminin etkisine dayanan sistematik bir tedavidir (Sudhakar ve ark., 2009). Bağışıklık sistemi anormal hücreleri tespit edip öldürebilir, ancak kanser hücreleri genetik değişiklikler veya yüzeylerindeki proteinlerin ifadesi sayesinde bu durumdan kaçır, yani bağışıklık sistemi onları anormal olarak tanımaz. Tümörler ve bağışıklık hücreleri arasındaki karmaşık etkileşim nedeniyle, koruyucu antitümör bağışıklığı oluşturmak için sıklıkla kombinasyon tedavisi kullanılır (Dogan ve ark., 2009). İmmünoterapiler hastalıkla savaşmak amacıyla hastanın bağışıklık sisteminin kullanıldığı tedavi yöntemidir. Kanser immünoterapisi, kanserle savaşmak için vücudun bağışıklık sistemini kullanan klinik tedavileri ifade eder. Genel olarak immünoterapi üç alt kategoriye ayrılabilir; Bunlar aktif immünoterapi, pasif immünoterapi ve immünomodülatör tedavidir. İmmünomodülatör tedavi, kanser hücrelerini hedeflemek için bağışıklık sistemini aktive eden endojen kemokinlerin ve sitokinlerin kullanılmasıdır. İmmünomodülatör tedaviye bir örnek, IL-2'nin kemoterapi ile kombinasyon halinde kullanılmasıdır (Farkona ve ark., 2016). Pasif immünoterapi ise tümör hücrelerinde spesifik olarak ifade edilen bir antijeni hedef alan monoklonal antikorların kullanılmasıdır. Bu tip immünoterapi, doğrudan tümör antijeni üzerinde etkili olan bir monoklonal antikorun kullanımını kullandığı ve dolayısıyla bağışıklık sisteminin daha geniş bir aktivasyonunu gerektirmediği için pasif olarak kabul edilir. Pasif immünoterapilerin aksine, aktif immünoterapiler tümörü tanımak ve onunla savaşmak için vücudun bağışıklık sisteminin aktivasyonunu sağlar (Farkona ve ark., 2016).

İmmünoterapide destekleyici rollerine ek olarak, makrofajlar gelecekteki kanser immünoterapisinde umut verici bir hedef haline gelebilir (Mills ve ark., 2012 ; Cavaillon ve ark., 2011). Onkoterapide makrofajlarla ilgili birçok hedef ve farmakolojik ajan son incelemelerde özetlenmiştir (Beltraminelli ve ark., 2020; Pathria

ve ark., 2019). Kanser immünoterapisinde makrofajları hedeflemenin çeşitli avantajları vardır. Düşük infiltrasyon T hücre bazlı antikanser tedavisi için önemli bir engeldir ve makrofajlar, tümör mikroçevresine infiltre olan bağışıklık hücrelerinin ~%30-50'sini oluşturur. Dolaşımdaki monositler tümörlerde infiltre makrofajların ana kaynağıdır ve periferik kan mononükleer hücrelerinin erişilebilirliği klinikte makrofaj bazlı bir tedavi stratejisi benimsenirse çalışmayı kolaylaştırır. Şu anda genellikle kanser hücrelerinin insanlarda endojen hücrelerden kaynaklandığına inanılmaktadır. Çok sayıda tümöre özgü antijen tanımlanmış olsa bile çoğu spesifik antijen hala birkaç normal hücrede bulunur. Buna karşılık tüm kanser hücreleri tümör heterojenliği nedeniyle sadece bir spesifik antijeni ifade etmez. Spesifik antijen ifade eden kanser hücrelerinin temizlenmesi yalnızca geçici ve sınırlı antitümör etkinliği ile sonuçlanabilir. Bununla birlikte doğuştan gelen bir bağışıklık hücresi türü olarak makrofajlar, belirli bir antijeni hedeflemeden tümör baskılayıcı bir işlev sergileyebilmektedir (O'Sullivan ve ark., 2012; Mills ve ark., 1992).



Şekil 1.44. CD24- Siglec-10 sinyalleşmesinin bloke edilmesi yoluyla tümörle ilişkili makrofaj tarafından kanser hücresi yok etme mekanizması (Barkal ve ark., 2019)

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. THP-1 Hücrelerinin Stoktan Çıkartılması

Donmuş haldeki stok hücreleri çoğaltmak için, hücrelerin içerisinde saklandığı kriyovialler -80°C 'deki buzdolabından alındı ve hızlı bir şekilde çözölmüştür. Çözölen hücre süspansiyonu; 15ml'lik santrifüj tüpünde bulunan %10 FBS ve %1 P/S içeren RPMI 1640 (1:1) besiyeri içine alınmıştır. Santrifüj tüpü 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır ve tüpün tabanındaki hücre peleti üzerine 2 ml besiyeri ilave edilerek pipetaj ile hücrelerin süspanse hale gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra tüp üzerine 4 ml daha besiyeri ilave edilmiştir ve 6 ml'lik hücre süspansiyonu 25cm^2 'lik hücre kültürü kapları içersine alınarak 37°C 'ye %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edilmiştir.

2.2. THP-1 Hücre Kültürü:

İlk defa akut monositik lösemili bir yaşındaki erkeğin periferik kanından elde edilmiş olan THP-1 (akut monositik insan lösemi) hücreleri, monosit/makrofaj farklılaşmasını ve fonksiyonunu incelemek için kullanılan en yaygın hücre hattıdır. Ankara Üniversitesi Tıp Fakölte Tıbbi Biyoloji ABD'nda mevcut olan THP-1 hücreleri, %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 L-glutamin, % 1 pen/strep ile takviye edilmiş RPMI 1640 besiyerinde %5 CO_2 'li etüvde 37°C 'de kültür ortamında steril koşullarda çoğaltılmıştır.

2.2.1. THP-1 Hücrelerinin Kültür Ortamında Çoğaltılması

THP-1 insan monosit hücreleri, %10 fetal sığır serum, %1 L-glutamin, %1 penisillin/streptomisin içeren RPMI-1640 besiyerinde, %5 CO_2 'li etüvde, %95 bağıl nem'de 37°C 'de kültür ortamında çoğaltılmıştır. Kültür flasks konfluent duruma

ulaştığında alt kültürlerle ayrılarak büyümesi sağlanmıştır. Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı – 80°C'ye kaldırılarak çalışmanın sonraki deneyleri için stoklanmıştır.

2.2.2. THP-1 Hücrelerinden M0 Makrofaj Eldesi

THP-1 hücreleri phorbol-12-miristat-13-asetat (PMA) ile uyarıldıklarında makrofaj benzeri hücrelere farklılaşır. İn vitro olarak THP-1 monosit hücrelerinden makrofaj hücrelerinin elde edilmesinde kullanılan PMA uyarınının doz ve zaman optimizasyonu, her koşul için qRT-PCR ile hedef genler denetlenerek ilgili yapıldı. Bu hedef genler monosit için CD14; PMA uyarımı ile oluşturulmuş M0 makrofajları için ise CD11B (genel makrofaj belirteci), CD36, CD68, CD71'dir. THP-1 hücreleri 0.5×10^6 konsantrasyonda 1 ml besiyeri içerisinde 24 kuyucuklu plakalara ekildi. THP-1 (M0) makrofaj aktivasyonunu uyarmak için bu hücreler (24-48-72) saat boyunca 50-200 nM phorbol 12-miristat 13-asetat (PMA) içeren RPMI 1640 besiyeri içerisinde kültürlendi.

2.2.3. THP-1 Monositik Kaynaklı M0 Makrofajların M1 ve M2 (U266 sup/IL4) Makrofajlara Polarize Edilmesi

(M0) makrofaj hücreleri 10 pg/ml LPS ve 20 ng/ml IFN- γ ile değişik sürelerde muamele edilerek THP-1 (M1) makrofaja dönüşümünün sağlanması gerçekleştirildi. Kültür koşulları qRT-PCR deneylerinden hedef M1 makrofaj polarizasyonunun kültür koşulları (CD80, TNF-alfa, IL-1beta, IL-6) belirteç genlerinin yüksek ifadesi ve akış sitometri analizi belirlenerek optimize edilmiştir. (M0) makrofaj hücrelerinin (M2) makrofaj hücrelerine polarizasyonunu sağlamak için bu hücreler hem (U266 sup) süpernatantı 24 saat muamele edilirken (Chen ve ark., 2017) yaptığı çalışma referans alınarak diğer taraftan (20 ng/mL) Interlökin (IL-4) ile 48 saat sürede muamele edilmiştir. (M2) makrofaj polarizasyonunun kültür koşulları hem akış sitometri analizi ve qRT-PCR deneylerinden hedef M2 belirteç genlerinin (CD206, CD200, IL10, TGF-beta) yüksek ifadesi ile belirlenerek optimize edilmiştir.

2.2.4. M0, M1 ve M2 (U266 sup) Makroaj Hücreslerinde CD11b, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 Belirteçlerinin Akış Sitometri Analizi

M0, M1 ve M2 (U266 sup) makroaj hücreleri ayrı ayrı tripsine edilmiştir. Tripsine edilen hücreler 15 ml'lik tüplere aktarılmıştır ve 1200 RPM'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst kısım atılmıştır ve hücrelerin üzerine 1 ml besiyeri sayılmıştır. Her bir işaretleme için 1×10^6 hücre ependorflara alınmıştır. Hücreler 2 kere PBS ile yıkanmıştır. İkinci yıkama sonunda hücrelerin üzerine tampon solüsyonu ve 2ul CD11b, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 monoklonal antikoları eklenerek 10 dakika karanlıkta ve 4°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler hazırlanan tampon solüsyonu ile iki kere yıkanmıştır. Daha sonra pelete 100ul tampon solüsyonu eklenmiştir. 10000 hücre sayılarak hücre yüzey belirteçlerinin protein oranları ACCURI C6 Akım Sitometri cihazında ölçülmüştür ve analiz edilmiştir.

2.2.4.1. M0, M1 ve M2(IL4) Makroaj Hücreslerinin U87WT, U87CD24 Süpernatantları ile Birlikte Muamelesi Sonucu CD206 İfadesi

6 kuyucuklu plakalarda M0, M1, M2(IL4) ile farklılaştırılan makroaj hücrelerinin her biri ayrı ayrı M0-U87WT, M0-U87CD24, M1-U87WT, M1-U87CD24, M2-U87WT M2-U87CD24 hücrelerinin süpernatantları ile bir araya getirilmişlerdir. Ardından tripsine edilmiş olan hücreler 15 ml'lik tüplere aktarılmıştır ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst kısım atılmıştır ve hücrelerin üzerine 130ul taze besiyeri eklenmiştir. CD206 antikoru ile muamele edilecek olan hücreler öncesinde 5ul Fc bloklama reseptör ile muamele edilmiştir. Ardından hücreler 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Her bir işaretleme için 1×10^6 hücre ependorflara alınmıştır. Hücreler 2 kere RPMI besiyeri ile yıkanmıştır. İkinci yıkama sonunda hücrelerin üzerine RPMI besiyeri ve 5ul CD206 monoklonal antikoru eklenerek 10 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler RPMI besiyeri ile iki kere yıkanmıştır. Daha sonra pelete 100ul RPMI besiyeri eklenmiştir. 10000 hücre sayılarak hücre yüzey belirteçlerinin protein oranları ACCURI C6 Akım Sitometri cihazında ölçülmüştür ve analiz edilmiştir.

2.3. Agoroz Jel Elektroferezi

Elde edilen RNA örnekleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. %1'lik agaroz jelin hazırlanışı şu şekilde yapılmıştır: 100 ml 1X TBE tampon bir beher içerisine alınarak üzerine 1 gr toz agaroz tartılıp eklenmiştir. Beher mikrodalga fırında 300°C'de yaklaşık 2 dk ısıtılarak agarozun erimesi ve su içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Beherin dış yüzeyi musluk altına tutularak el yakmayacak kıvama gelene kadar bir miktar soğuması sağlanmıştır. Behere 2 µl Bio-safety boya eklenerek karıştırılmış ve jel tankında donmaya bırakılmıştır. Donan jel, içerisinde 1X TBE tamponu bulunan elektroforez tankına aktarılmıştır. Nükleaz içermeyen sudan 8 ul, RNA örneklerinden 2 µl, DNA yükleme tamponundan 2 µl karıştırılarak jeldeki kuyucuklara 10 µl yüklenmiştir. Örnekler 80 voltta 25 dk yürütülmüş ve daha sonra jel görüntüleme cihazında görüntülenmiştir.



Şekil 2.1. Agoroz jel elektroforezinde M0, M1 ve M2 makrofaj genlerinin görüntüsü

2.4. İzole Edilen RNA'dan cDNA Sentezi

İzole edilen RNA örneklerinden tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezleme işlemleri için, BioRad iScript cDNA Sentez Kiti kullanılmıştır. Toplam tepkime hacmi 20 µL olarak hesaplanmıştır. Her kuyu için 5x iScript tepkime karışımından 5 µL, iScript Reverse Transkriptaz enziminden, RNA numunesinden 4 µL ve nükleaz yoksun özellikli sudan 11 µL eklenmiştir. cDNA sentez basamakları şu şekilde gerçekleştirilmiştir.

Priming 5 dakika, 25°C

Ters Transkripsiyon 20 dakika, 46°C

Ters Transkripsiyon İnaktivasyon 1 dakika, 95°C

cDNA sentezi gerçekleştirilen örnekler, kantitatif PCR analizi işlemine kadar -20°C'de saklanmıştır.

2.5. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR)

Elde edilen cDNA'lar SYBR Green ile birlikte PCR sırasında kullanılarak PCR ürünün saptanması, PCR ürününün miktarının analizine olanak sağlamıştır. Normalizasyon için referans gen kullanılarak gen ekspresyon analizi yapılmıştır. SYBR Green floresans boyası ve Biorad CFX Connect cihazı kullanılarak qRT-PCR yapılmıştır. Bütün genlerin ifade seviyeleri internal kontrole göre normalize edilmiştir. Primerler, GC içerikleri (%GC), erime sıcaklıkları (T_m) ve dimer oluşturup oluşturmadıkları (dG) dikkate alınarak PerlPrimer programı kullanılarak belirlenmiş ve elde edilen primer sekansları NCBI/Primer Blast web-sitesinden faydalanılarak özgünlükleri denetlenmiştir. Tüm uygulamalar en az üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Akış sitometri yöntemi ile belirlenen M0, M1, M2 makrofajların farklılaşmasını kanıtlamak amacıyla bazı genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile belirlenmiştir.

Polarize makrofajlardan M0 polarize makrofaja özgü yüzey belirteci olan genlerinin (CD11b, CD36, CD38, CD71) yüksek ifadesi ile belirlenerek optimize edilmiştir. (M1) makrofaj polarizasyonunun kültür koşulları qRT-PCR yöntemi kullanılarak (CD80, CD86, TNF-alfa, IL-1beta, IL-6) yüksek ifadesi ile belirlenerek optimize edilmiştir. THP-1 (M0) makrofaj hücrelerinin THP-1 (M2) makrofaj hücrelerine polarizasyonunu sağlamak için bu hücreler 1:1 oranında RPMI besiyeri ve U266 hücrelerinin süpernatantı ile 24 saat boyunca birlikte muamele edilmiştir. Diğer taraftan THP-1 (M2) makrofaj hücrelerine polarizasyonunu sağlamak için 48 saat 20

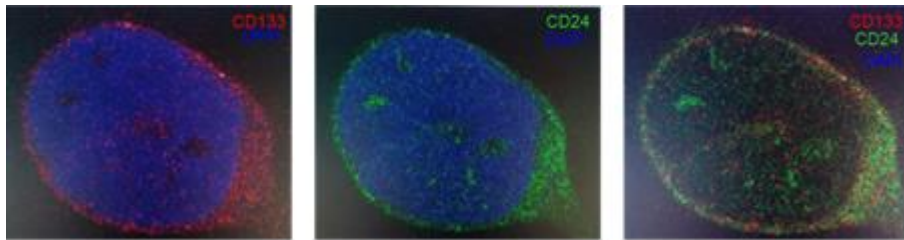
ng/ml IL4 ile muamele edilen hücrelerin (M2) makrofaj polarizasyonunun kültür koşulları qRT-PCR deneylerinden hedef M2 belirteç genlerinin (Siglec10, IL10, TGF-beta) yüksek ifadesi ile belirlenerek optimize edilmiştir. Genlerinin ifadesi kantitatif olarak analiz edilmiştir. İlk olarak hücrelerden izole edilen RNA örneklerinden 1000 ng kullanılarak iScript enzimi (BioRAD) ile cDNA sentezlenmiştir.

IL1B F: AGCTACGAATCTCCGACCAC	IL1B R: CGTTATCCCATGTGTCTGAAGAA
IL6 F: ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	IL6 R: CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG
IL10 F: GCCTAACATGCTTCGAGATC	IL10 R: TGATGTCTGGGTCTTGGTTC
TGFB F: TGAACCCGTGTTGCTCTC	TGFB R: TGAACCCGTTGATGTCCAC
TNFA F: AGCCCATGTTGTAGCAAACC	TNFA R: TGAGGTACAGGCCCTCTGAT
SIGLEC-10 F: ATCTCAACGGCATTCTCCA	SIGLEC-10 R: GGTGTGGCTTTCTGATTCC

Çizelge 2.1. qRT-PCR Yapılan Genlerin Primer Dizileri

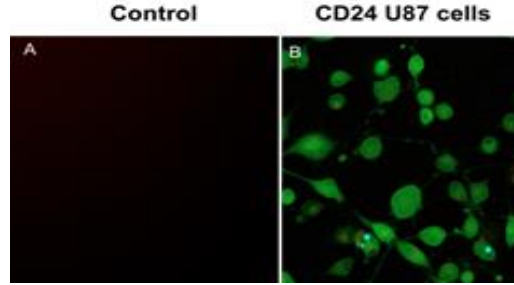
2.6. U87 MG Hücrelerinin Kültürü

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD’nda mevcut olan insan yabancı U87 MG hücreleri ve CD24 yüksek ifade ettirilen U87-CD24-yüksek hücrelerin %10 Fetal Sığır Serum (FBS), %1 penisilinstreptomisin, %1 L-glutamin, DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) içeren özel besiyerinde %5 CO₂’li etüvde 37°C’de kültür ortamında çoğaltılmıştır. Hücrelerin konfluent durumuna göre 2-3 günde bir pasajları gerçekleştirilmiştir. Tübitak destekli 1003 Proje kapsamında lentiviral yöntemle CD24- yüksek ifade ettirilen U87-CD24-yüksek hücreler elde edilmiş ve kültürleri başarılı şekilde yapılmıştır ve bu hücreler şu an -80 °C’de muhafaza edilmektedir.



Şekil 2.2. GBM primer hasta hücrelerinin CD133-PE (kırmızı), DAPI (mavi), ve CD24-FITC (yeşil) ile boyanmış konfokal mikroskobu görüntüsü.

CD24 ifade edilmeyen WTU87 MG GBM hücrelerinde CD24 geninin lentiviral stabil transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu U87CD24 GFP+ hücreler AB Dalımızda mevcuttur.



Şekil 2.3. CD24-pLenti-C-GFP ifade eden U87 GBM hücre serilerinin floresan mikroskop altında görüntülenmesi

2.7. M1, M2(IL4) makrofaj hücreleri ve U87WT hücrelerin DİD-DİO Boyama Protokolü

6 kuyucuklu plakalar içinde steril cam lamellere ekimi gerçekleştirilip M0 makrofaj hücrelerine farklılaştırılan hücrelere 24saat 10pg/mL LPS ve 20 ng/mL IFN- γ ile 24 saat muamele edilip M1 (DİD) makrofajlara farklılaştırılan hücreler ile U87WT (DİO) hücreler bir araya getirildi. Verilen boya etiketleme çözeltisinin 1 mL normal besiyerine 5 μ l'sini boyama solüsyonu ekleyerek hazırlandı. Boyama solüsyonunun 5 μ l'si lamellerin köşesine pipetlendi tüm hücreler kaplanana kadar 6 kuyucuklu plakalar kapatıldı ve hafifçe çalkalandı. Lameller 37 °C'de inkübe edildi. Boyama solüsyonu uzaklaştırıldı ve lameller üç kez PBS ile yıkandı. Her yıkama döngüsü için, hücreler taze, ısıtılmış besiyeri ile kaplandı, 10 dakika inkübe edildi ve ardından lamellerin kenarına kurutma kâğıdı ile dokunarak fazla besiyeri yavaşça boşaltıldı ve lameller 37⁰ C etüve yerleştirildi.

2.8. M0, M1 ve M2(IL4) Makrofaj Hücrelerinin U87WT, U87CD24 Hücreleri ile Ko-Kültürü:

6 kuyucuklu plakalar içinde steril cam lameller üzerine 600.000 M0, M1 ve M2 makrofaj olacak şekilde hücrelerin ekimi yapılmıştır. 1.200.00 U87WT ve U87CD24 hücreler sayılmıştır ve makrofaj hücreleri ile bir araya getirilmeden önce DİO boyama solüsyonu ile boyama işlemi gerçekleştirilip 24 saat 37°C etüvde bekletilmiştir. 24 saat sonra U87WT ve U87CD24 hücreleri ile M0, M1 ve M2(IL4) makrofaj hücrelerinin ko kültür işlemi gerçekleştirilmiştir. Kokültüre alınan hücreler 6 kuyucuklu plakalarda 37°C etüvde 24 saat bekletilmiştir.

2.9. MTT 3-(4,5-Dimetil tiyazol-2) 2,5-Difeniltetrazolyum Bromür Testi

M1 ve M2(U266 sup) hücrelerde 12E9 MoAb'ın IC50 (12E9: 10ug/ml) değeri belirlenmiştir. Hücre kültüründe elde edilen hücre dizilerine ait hücrelerden 96 kuyucuklu plakın her bir kuyucuğuna 40.000 hücre olacak biçimde ekim yapılmıştır. Kuyucuklara 100 µl hücre besiyeri karışımı şeklinde ekim yapılmıştır. Bu hücreler 37°C'de, %5 CO2'li etüvde bir gece (16/24 saat), bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda hücrelerin üzerine farklı (kontrol, 1/4, 1/8, 1/16 ve 1/32) konsantrasyonlarda 12E9 eklenmiştir. Spektrofotometrede 570 nm'de ölçüm yapılmıştır.

2.10. M0, M1 ve M2(IL4) Makrofaj Hücreleri ile U87WT-U87CD24 Hücrelerinin 12E9 Antikoru ile Ko-kültürü

M0, M1, M2(IL4) makrofaj hücreleri, U87-CD24-GFP ve U87-WT-DİO hücreleri ile 12E9 monoklonal antikorusunun değişik derişimlerinde muamele edilmiştir. Kontrol olarak U87-CD24-yüksek-GFP-pozitif hücreler ve U87-CD24-düşük hücreler 12E9 monoklonal antikoru ile 24 saat muamele edilmiştir.

2.11. Floresan Mikroskopi ile Fagositoz Yüzdesinin Belirlenmesi Protokolü

DİD işaretli M0, M1, M2(IL4) makrofaj hücreleri DİO boyaması gerçekleştirilen U87WT ve U87CD24GFP kanser hücreleri ile 24 saat boyunca 37°C'de muamele edilmiştir. 12E9 monoklonal antikor uygulanan ve uygulanmayan 1.200.000 hedef kanser hücresi 600.000 makrofaj oranında DMEM besiyeri içerisinde ko-kültürü yapılmıştır. Sonrasında +%10 FBS içeren DMEM besiyerinde iki kez yıkanmıştır. Oluşturulacak olan fagositoz deney plakaları 37 °C inkübatöre kaldırılmış ve 24 saat sonra floresan mikroskobunda gözlemlenmiştir. Fagositoz olayları toplam DİD işaretleri makrofaj hücrelerinin içine DİO işaretli U87WT ve GFP işaretli U87CD24 hücrelerinin alınması ile hesaplanmıştır. Fagositoz yüzdesi maksimum normalize edilerek hesaplanmıştır.

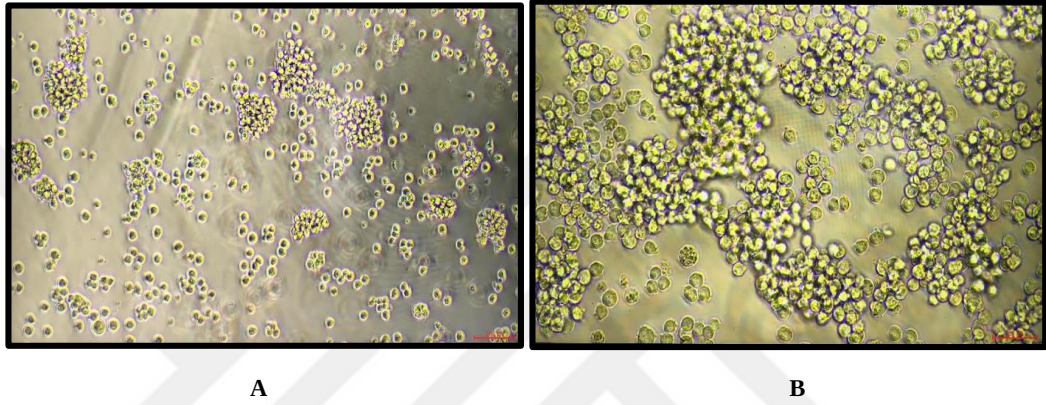
2.12. Konfokal Mikroskopi ile Fagositoz Görüntüsü Alma

Floresan mikroskopta belirlenen fagositoz oranlarının görüntüsü konfokal mikroskop ile de alınmıştır.

3. BULGULAR

3.1. THP-1 Monosit Hücre Eldesi

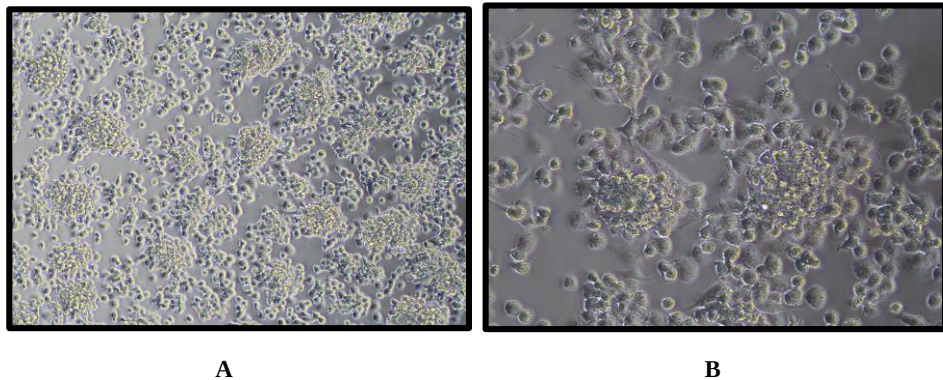
THP-1 monosit hücrelerinin hücre kültüründe çoğaltılması sonucu elde edilen inverted mikroskop görüntüsü Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



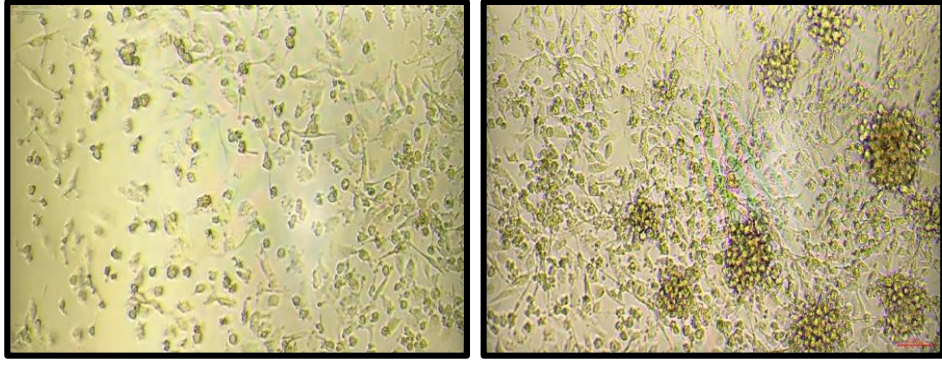
Şekil 3.1. THP-1 monosit hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü A-10X B-20X

3.2. THP-1 Hücrelerinden M0 Makrofaj Eldesi

THP-1 monosit hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat boyunca 100 nM PMA ile uyarılmasıyla elde MO makrofaj hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri Şekil 3.2. ve 3.3 ‘de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. THP-1 monosit hücrelerinin 24 ve 48 saat boyunca 100 nM PMA ile uyarılmasıyla elde edilen MO makrofaj hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri A-10X B-20X



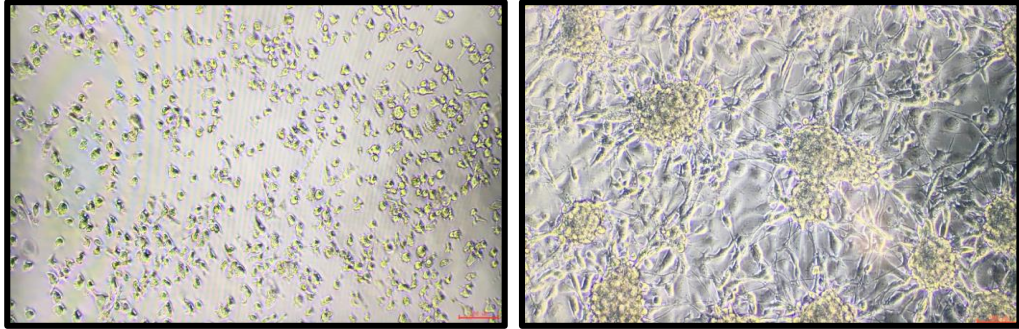
A

B

Şekil 3. 3. THP-1 monosit hücrelerinin 72 saat boyunca 100 nM PMA ile uyarılmasıyla elde edilen MO makrofaj hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri A-10X B-20X

3.3. THP-1 Monositik Kaynaklı Makrofajların M1, M2(U266), M2(IL4 Makrofajlara Polarize Edilmesi

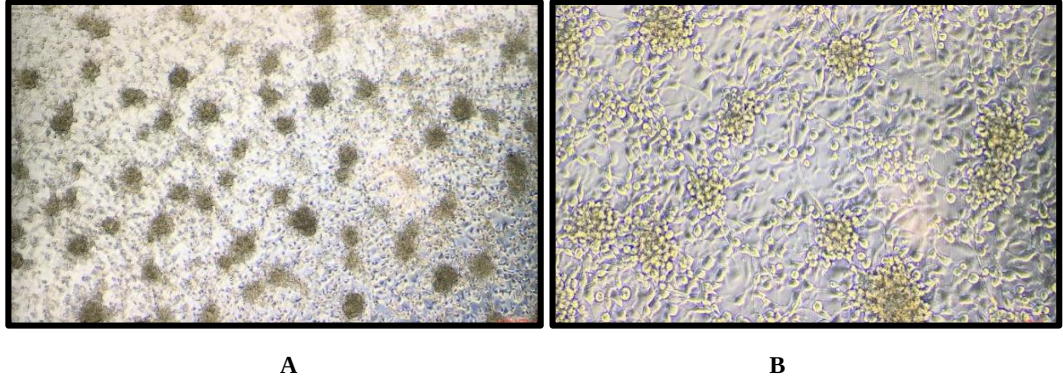
THP-1 insan monosit hücreleri, M0 (100 nM PMA, 72 saat), M1 (20 ng/mL IFN- γ + 10 pg/mL LPS, 24 saat), M2 (U266 süpernatantı ile RPMI besiyeri 1:1 oranında (500 μ l/500 μ l) 24 saat inkübasyonu gerçekleştirilirken aynı zamanda 48 saat boyunca 20ng/ml M2(IL-4) ile muamele edilmiştir. Bu hücrelerin inverted mikroskop görüntüleri Şekil 3.4'te, 3.5'te ve 3.6.'da gösterilmiştir.



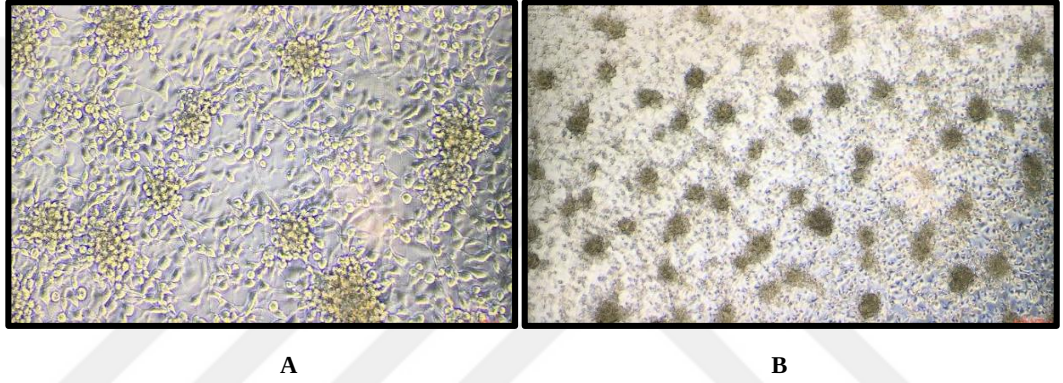
A

B

Şekil 3.4. MO makrofaj hücrelerinin 20 ng/mL IFN- γ + 10 pg/mL LPS ile 24 saat uyarımı ile elde edilen M1 makrofaj hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri A-10X B-20X



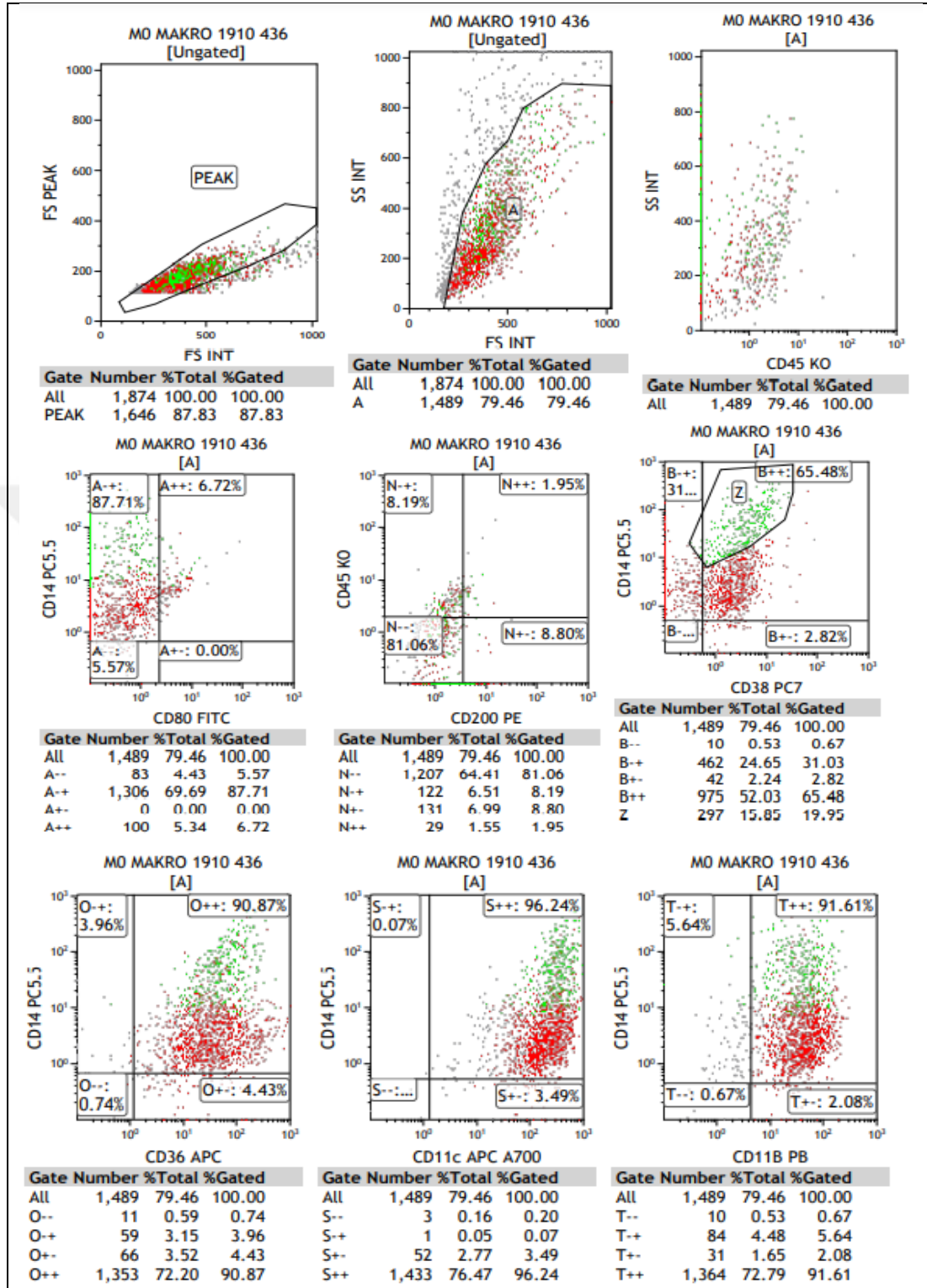
Şekil 3.5. MO makrofaj hücrelerinin U266 hücre kültür süpernatantı ile 24 saat uyarımı ile elde edilen M2(U266 sup) makrofaj hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri A-10X B-20X



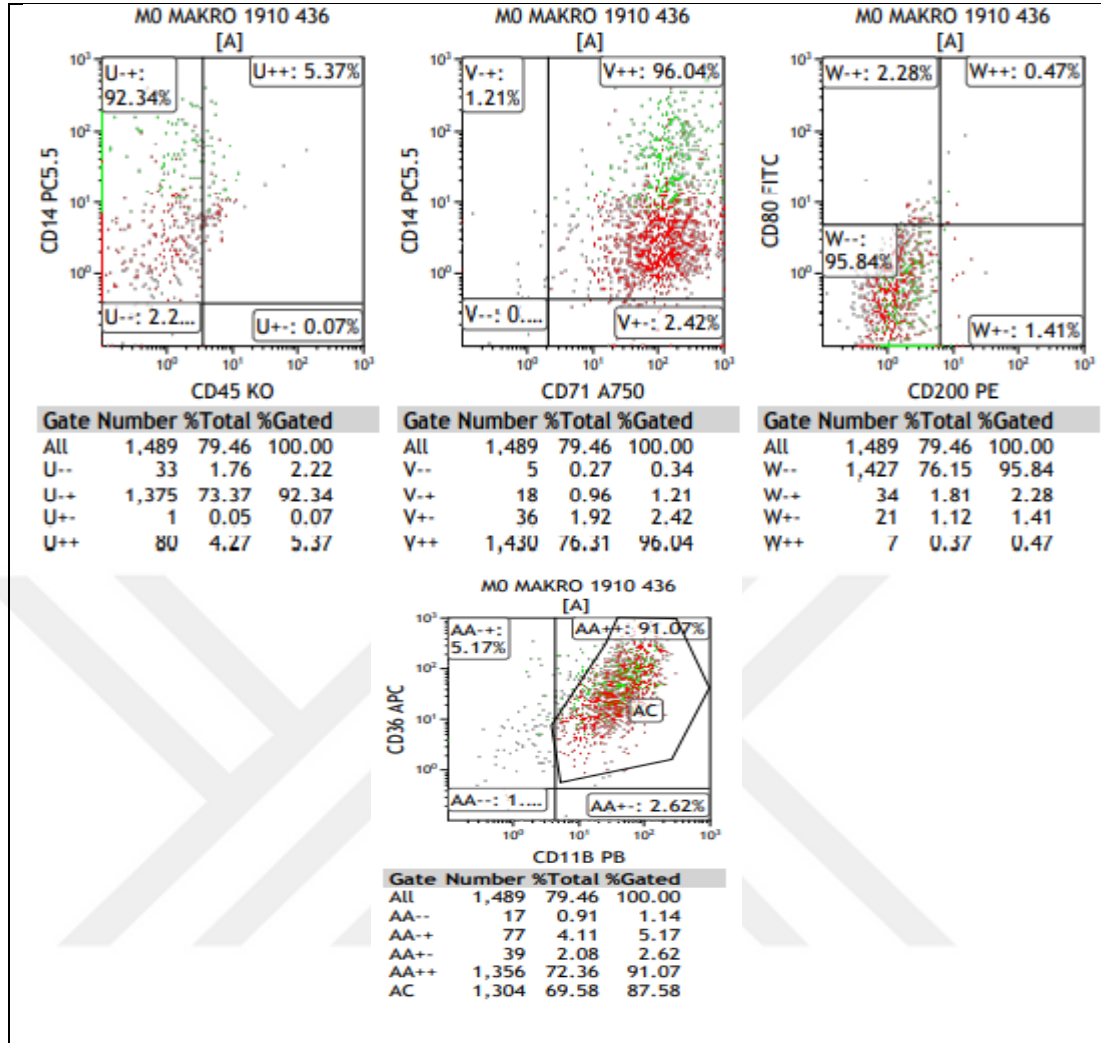
Şekil 3.6. MO makrofaj hücrelerinin 48 saat boyunca 20ng/ml IL-4 ile uyarımı ile elde edilen M2(IL4) makrofaj hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri A-10X B-20X

3.4. M0, M1, M2(U266 sup) Makrofaj Hücrelerinin CD11b, CD11c, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 Akış Sitometri ve Histogram Değerleri

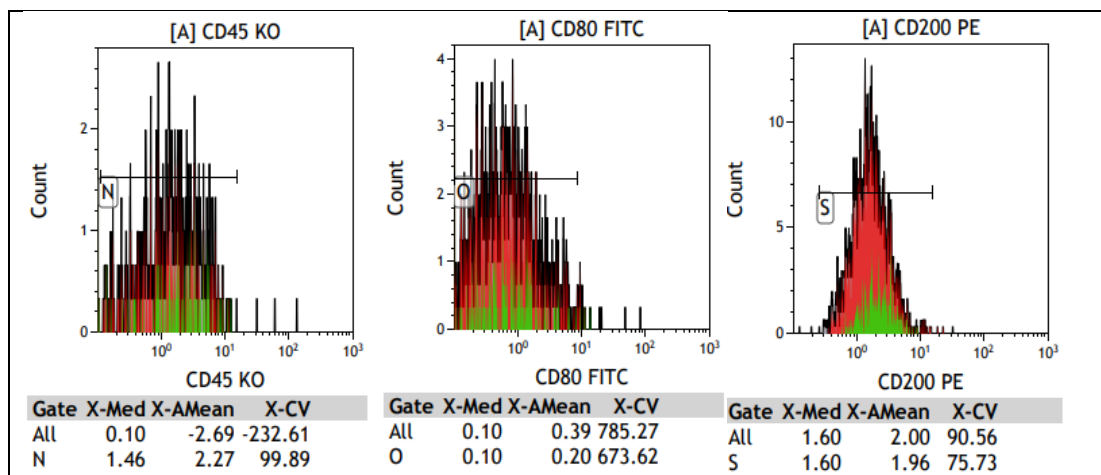
MO, M1, M2(U266sup) makrofaj hücrelerinde CD11b, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 Akış Sitometri ve histogram değerleri Şekil 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14'te gösterilmiştir.



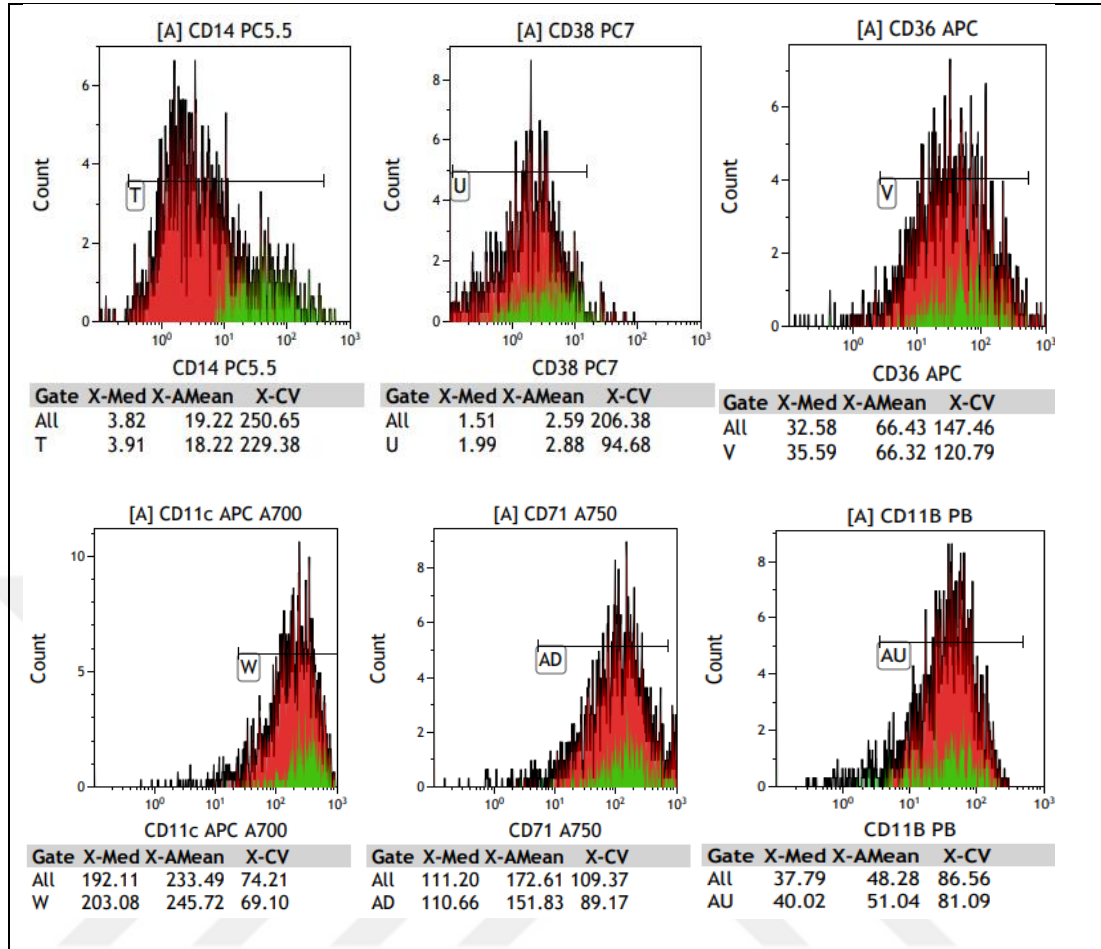
Şekil 3.7. İn vitro polarize ettiğimiz M0 Makrofaj Hücrelerinin CD11b, CD14, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 Akış Sitometri İfadeleri



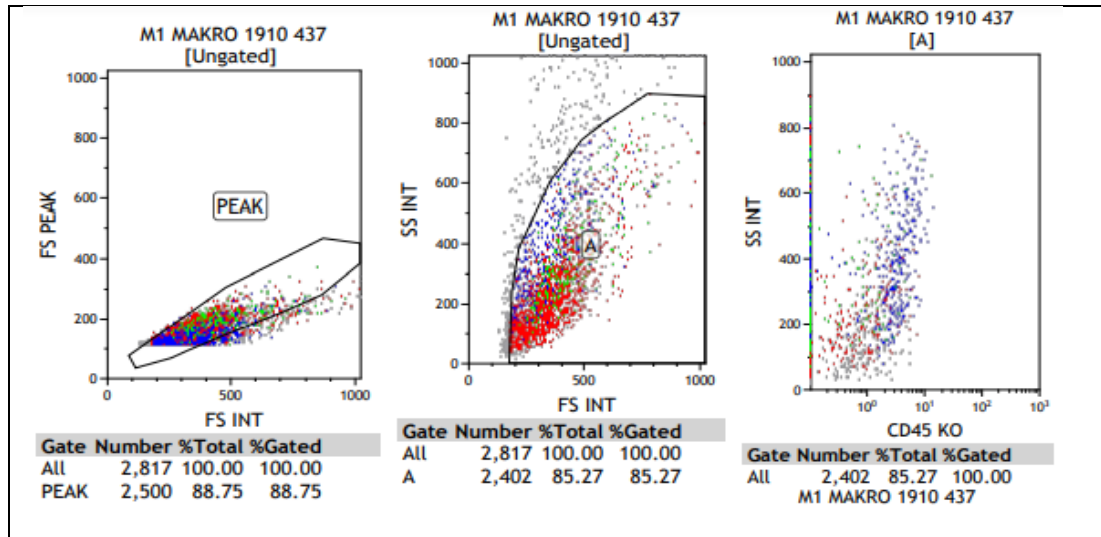
Şekil 3.7. Devamı. İn vitro polarize ettiğimiz M0 Makrofaj Hücrelerinin CD11b, CD14, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 Akış Sitometri İfadeleri



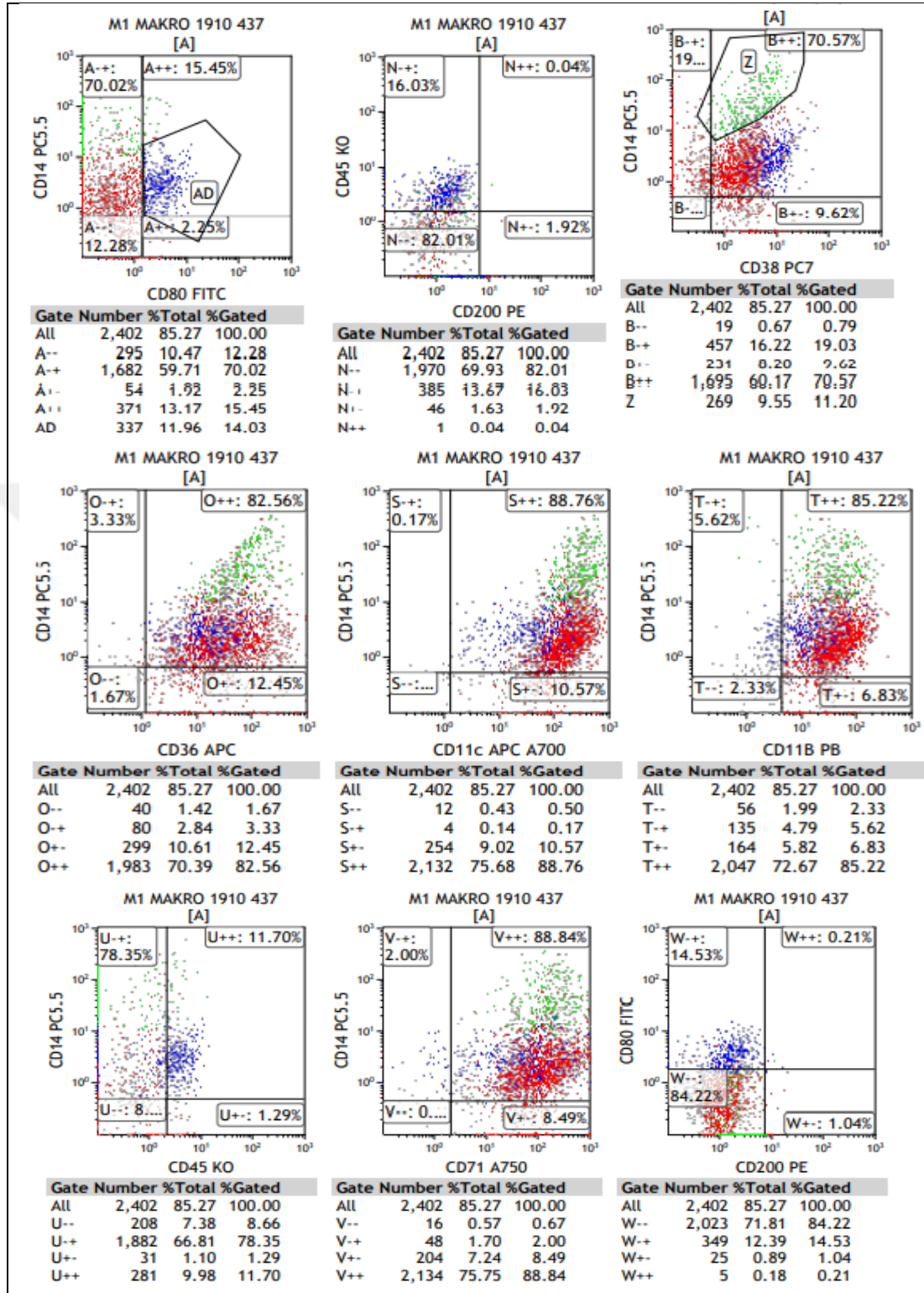
Şekil 3. 8. İn vitro polarize ettiğimiz M0 makrofajların CD11b, CD14, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 ekspresyon histogramları



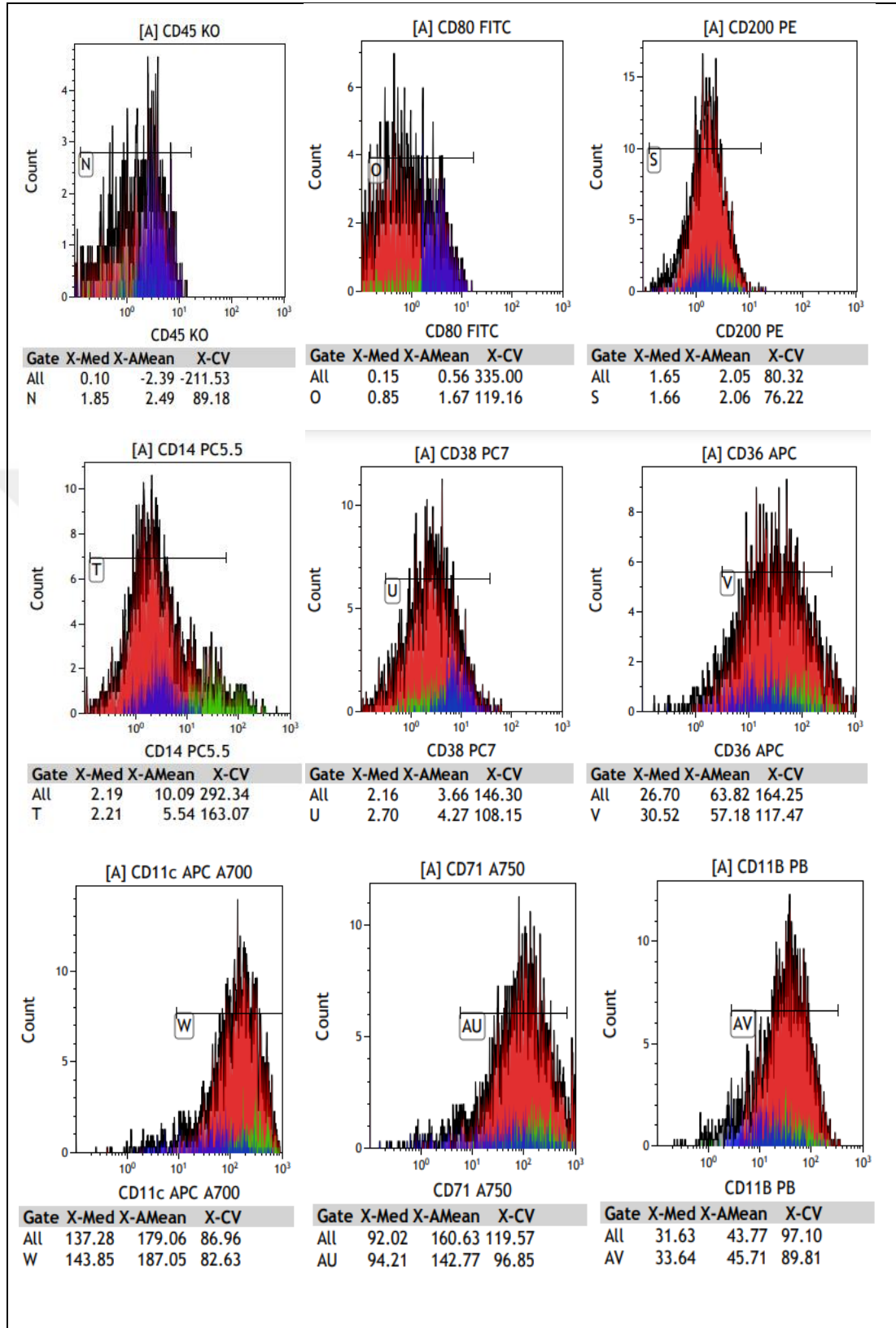
Şekil 3.8. Devamı. İn vitro polarize ettiğimiz M0 makrofajların CD11b, CD14, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 ekspresyon histogramları



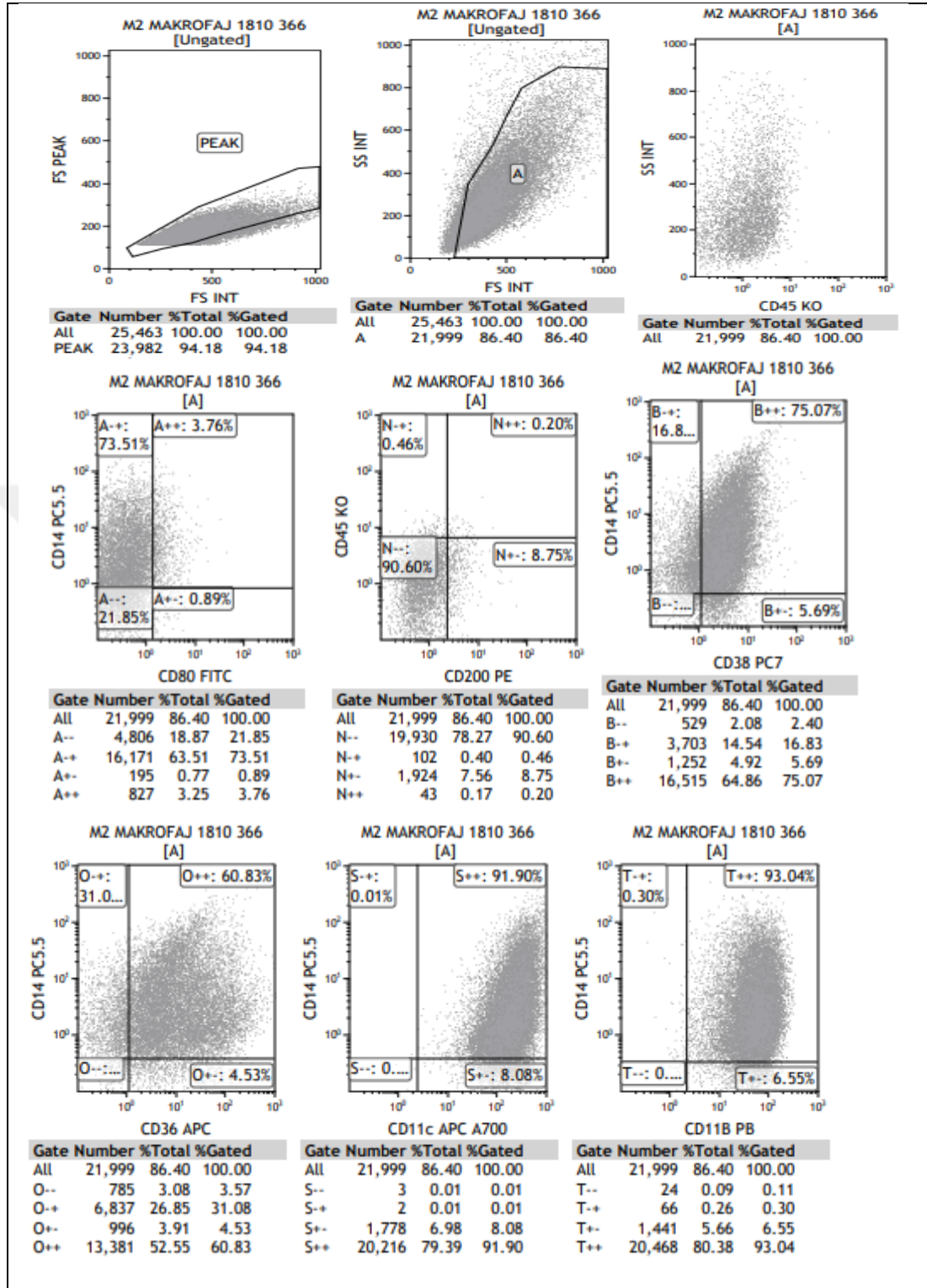
Şekil 3.9. İn vitro polarize ettiğimiz M1 Makrofaj Hücrelerinin CD11b, CD14, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 Akış Sitometri İfadeleri



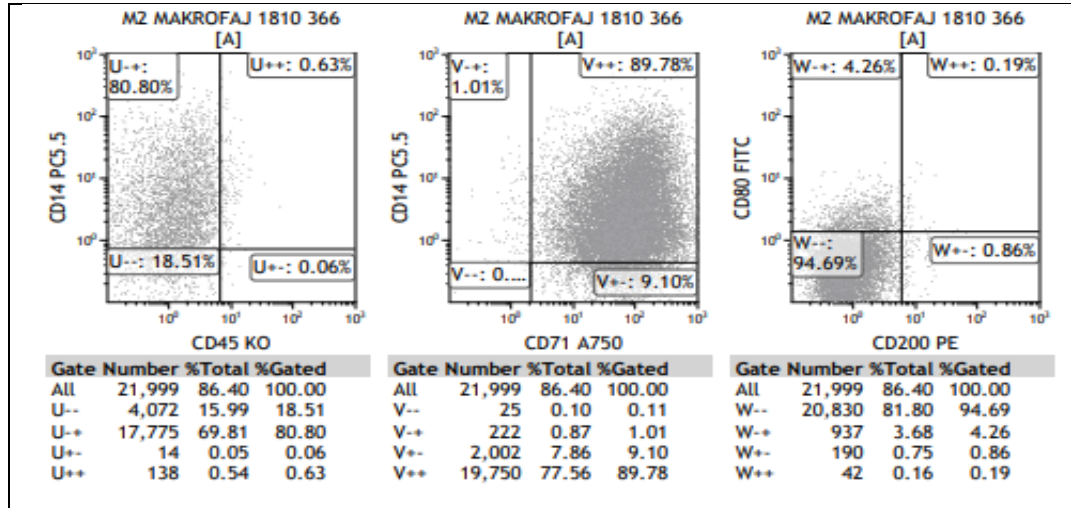
Şekil 3.9. Devamı. İn vitro polarize ettiğimiz M1 Makrofaj Hücrelerinin CD11b, CD14, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 Akış Sitometri İfadeleri



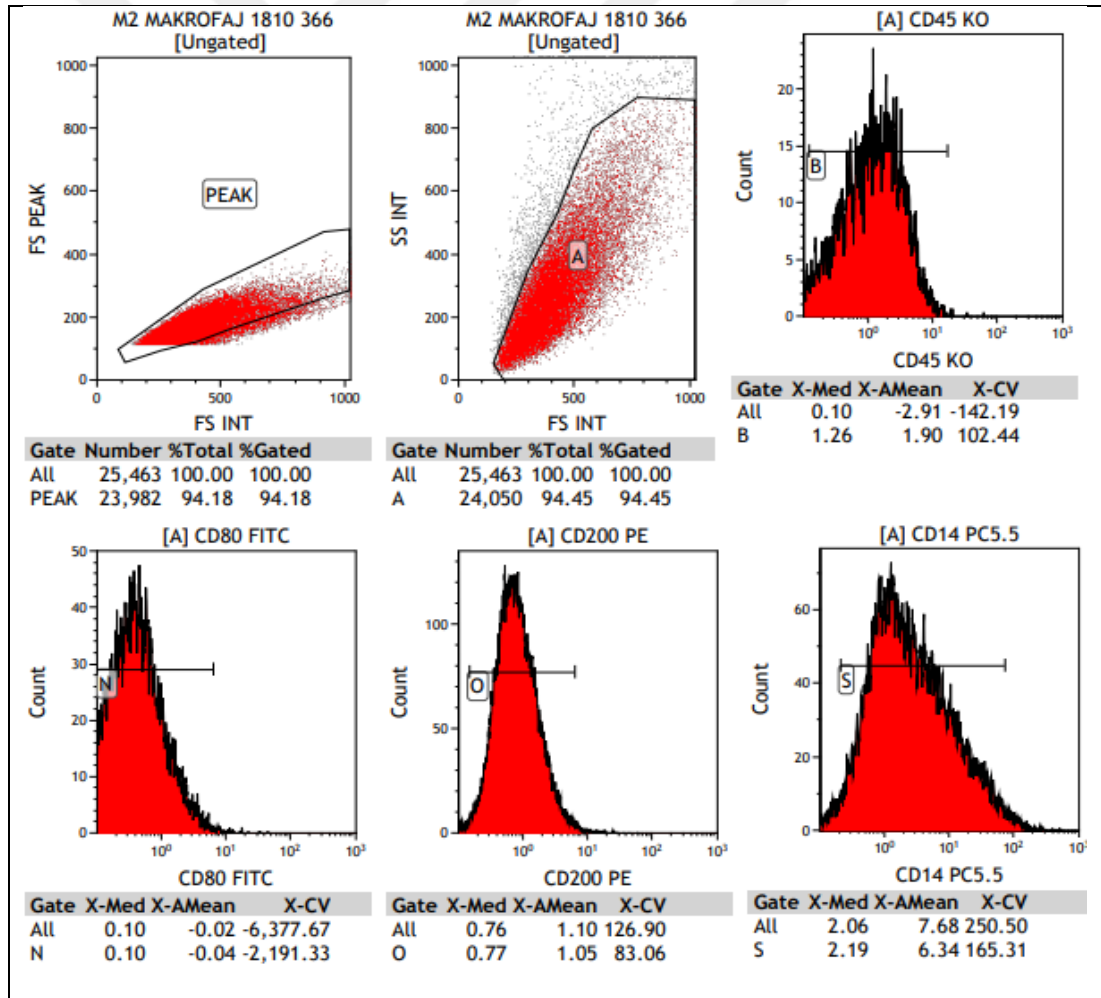
Şekil 3.10. İn vitro polarize ettiğimiz M1 makrofajların CD11b, CD14, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 ekspresyon histogramları



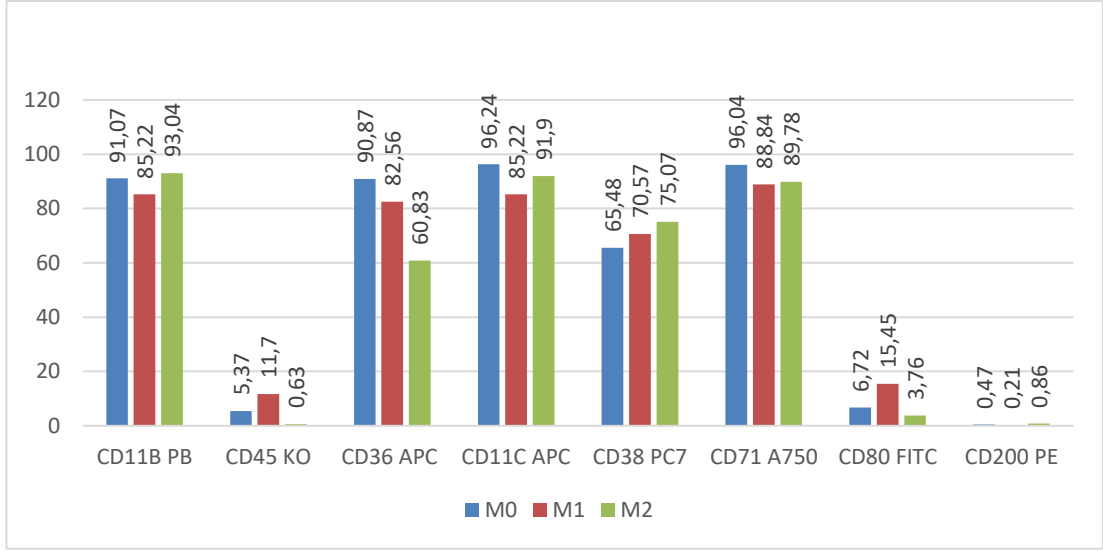
Şekil 3.11. İn vitro polarize ettiğimiz M2 Makrofaj Hücrelerinin CD11b, CD14, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 Akış Sitometri İfadesi



Şekil 3.11. Devamı. İn vitro polarize ettiğimiz M2 Makrofaj Hücrelerinin CD11b, CD14, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 Akış Sitometri İfadesi



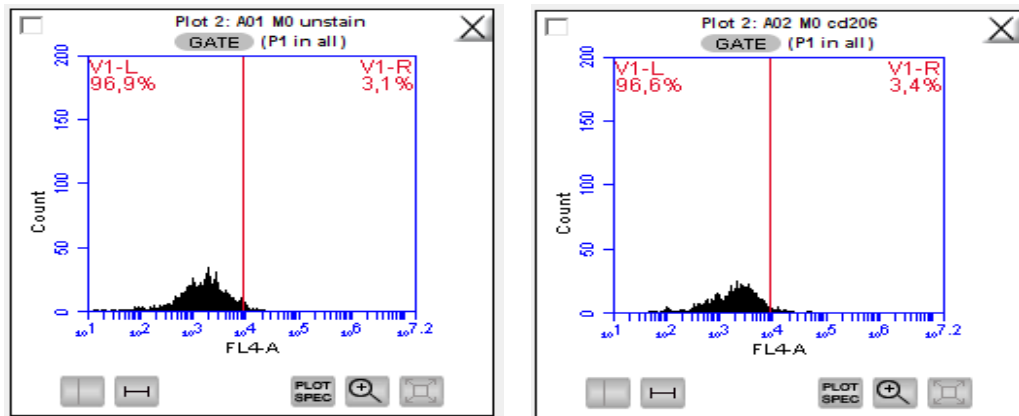
Şekil 3.12. İn vitro polarize ettiğimiz M2 makrofajların CD11b, CD14, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 ekspresyon histogramları



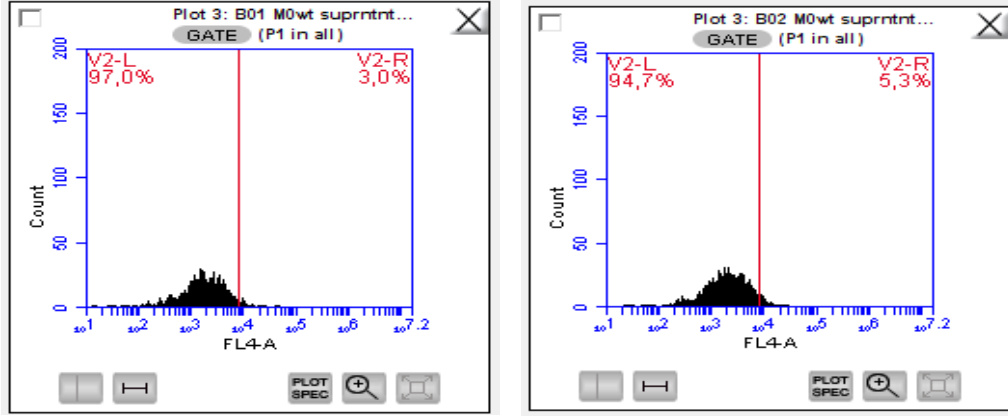
Şekil 3.13. M0, M1, M2(U266sup) Makrofaj Hücrelerinde CD11B, CD11C, CD36, CD38, CD45, CD71, CD80, CD200 ifadelerinin bar grafiği

3.4.1. M0, M1 ve M2(IL4) Makrofaj Hücrelerinin U87WT, U87CD24 Süpernatantları ile Birlikte Muamelesi Sonucu Akış Sitometri CD206 İfadesi

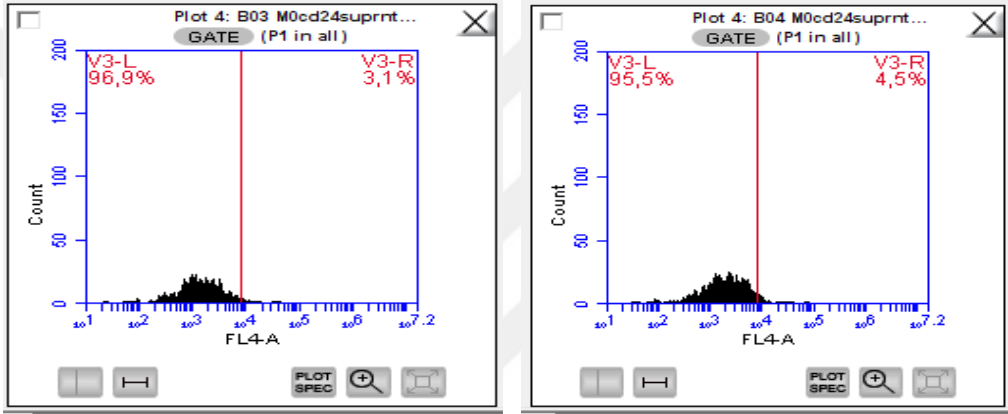
M0, M1, M0+U87WT, M0+U87CD24, M1+U87WT, M1+U87CD24, M2(IL4), M2(IL4) +U87WT, M2(IL4) +U87CD24 makrofaj hücreleri ile U87WT ve U87CD24 hücre süpernatantlarının akış sitometrideki ifadeleri Şekil 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.22, 3.23, 3.24'te gösterilmiştir.



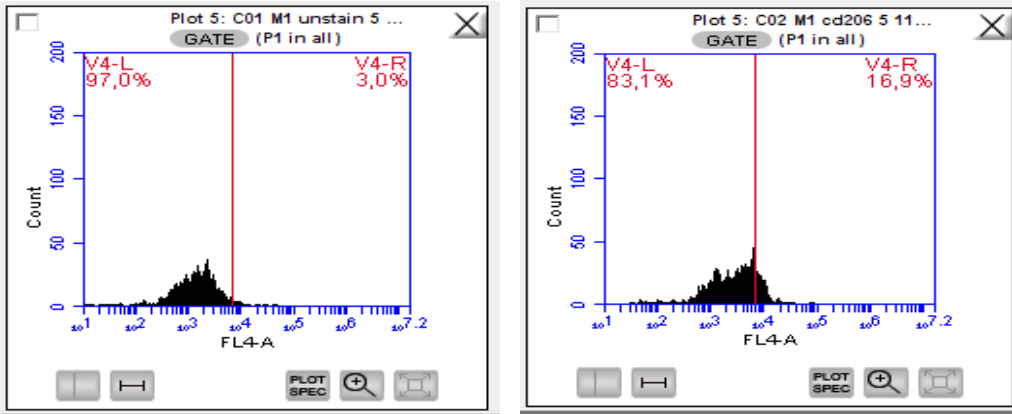
Şekil 3.14. M0 Makrofaj hücrelerinin akış sitometride CD206 ifadesi



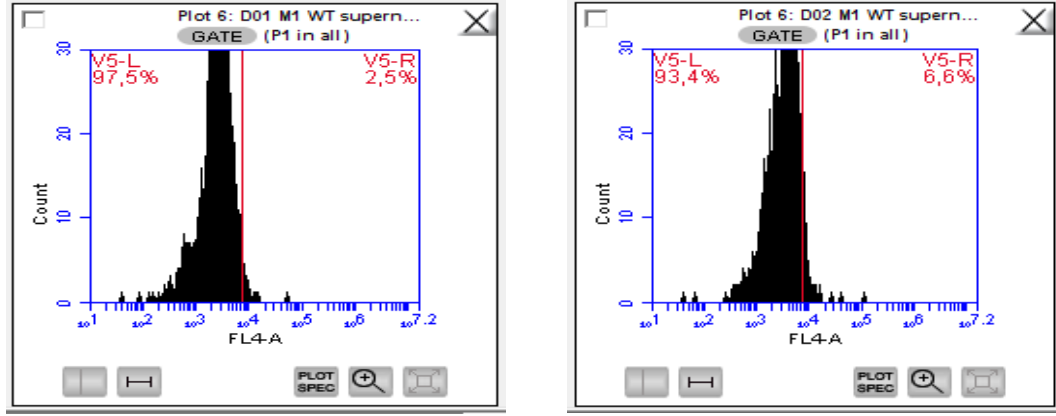
Şekil 3.15. M0 Makrofaj hücreleri ile U87WT süpernatantlarının akış sitometride CD206 ifadesi



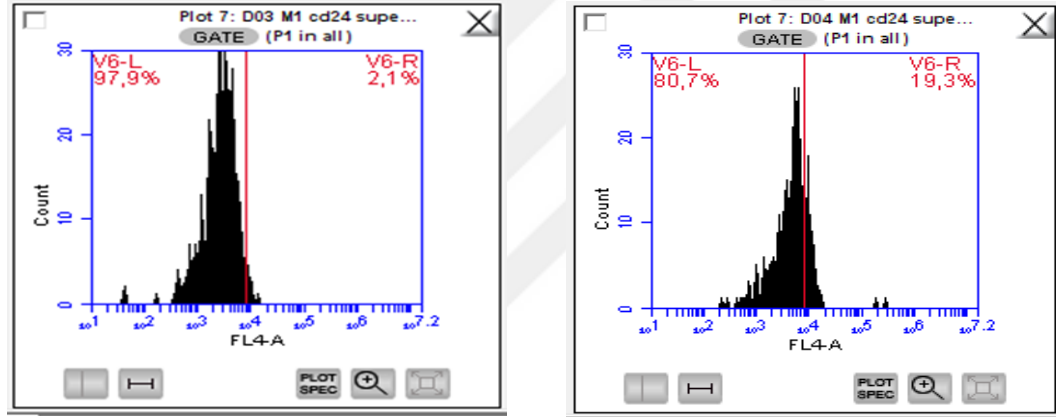
Şekil 3.16. M0 Makrofaj hücreleri ile U87CD24 süpernatantlarının akış sitometride CD206 ifadesi



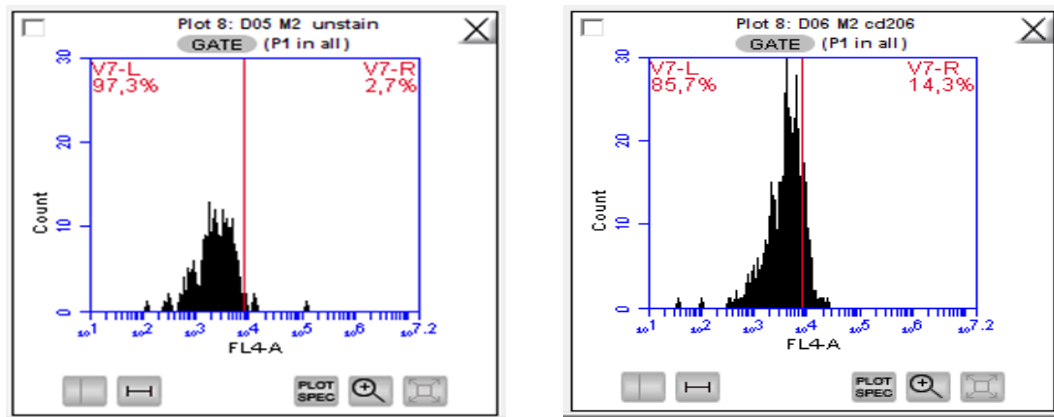
Şekil 3.17. M1 Makrofaj hücrelerinin akış sitometride CD206 ifadesi



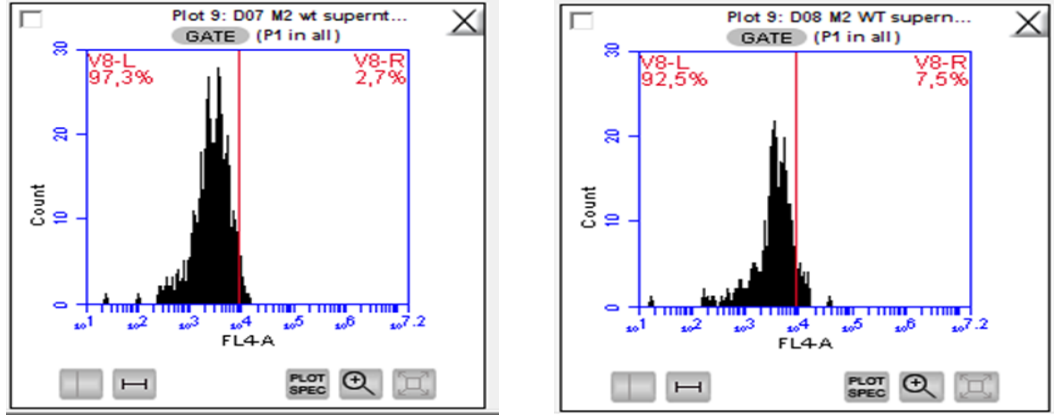
Şekil 3.18.. M1 Makrofaj hücreleri ile U87WT hücre süpernatantının akış sitometride CD206 ifadesi



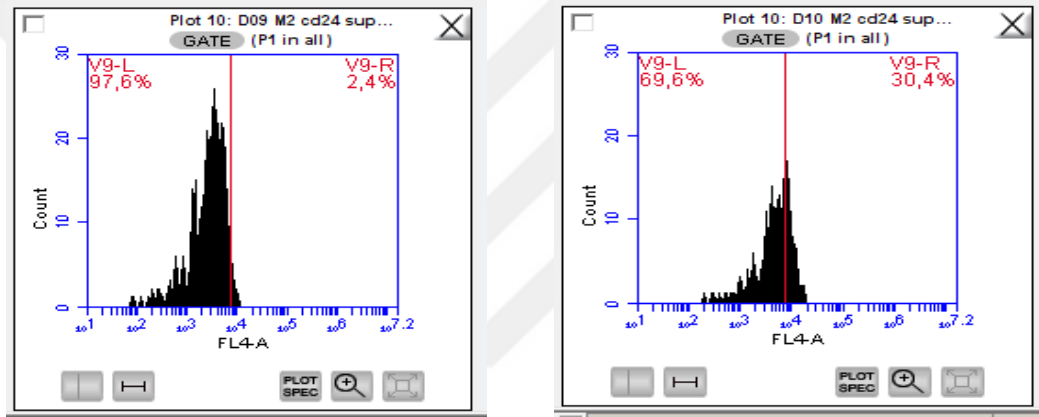
Şekil 3.19. M1 Makrofaj hücreleri ile U87CD24 hücre süpernatantının akış sitometride CD206 ifadesi



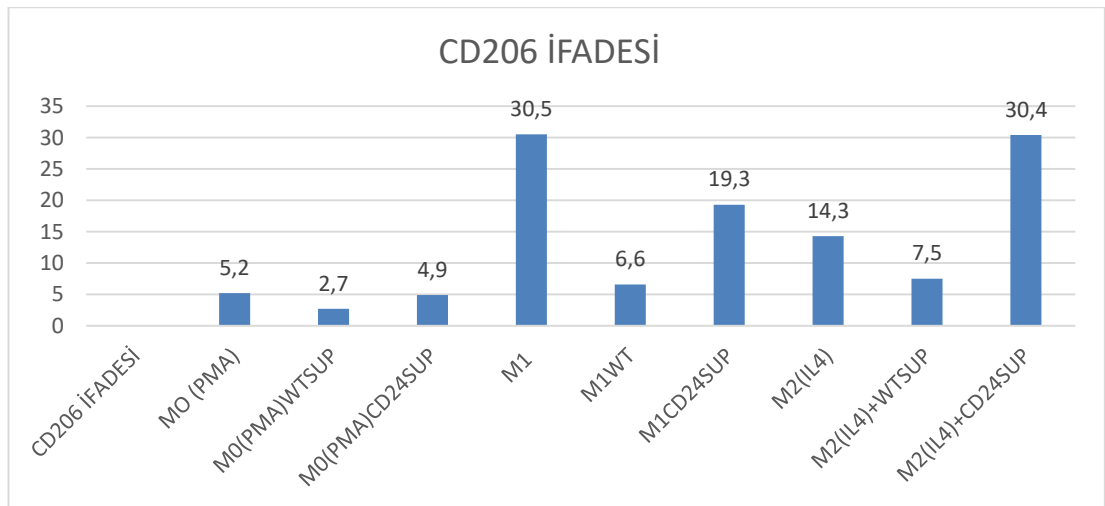
Şekil 3.20. M2(IL4) Makrofaj hücrelerinin akış sitometride CD206 ifadesi



Şekil 3.21. M2(IL4) Makrofaj hücreleri ile U87WT hücre süpernatantının akış sitometride CD206 ifadesi



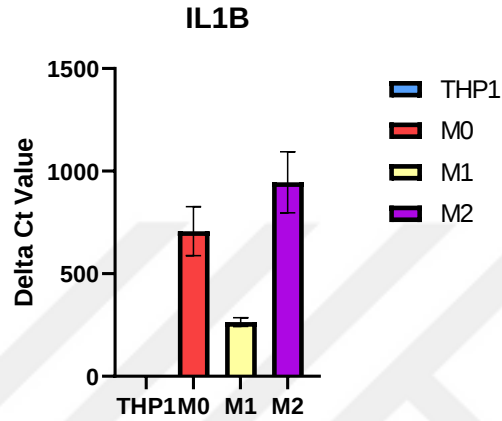
Şekil 3.22. M2(IL4) Makrofaj hücreleri ile U87CD24 hücre süpernatantının akış sitometride CD206 ifadesi



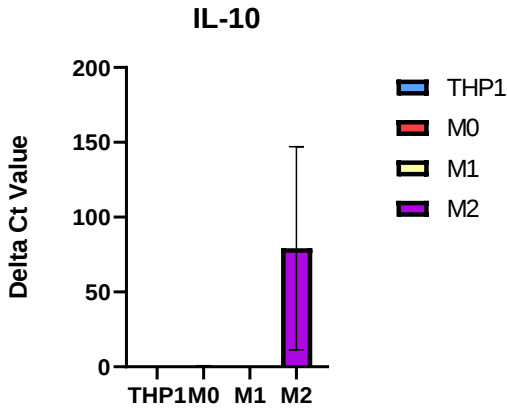
Şekil 3.23. M0, M0+U87WTsup, M0+U87CD24sup, M1, M1+U87WTsup, M1+U87CD24sup, M2(IL4), M2(IL4) +U87WTsup, M2(IL4) +U87CD24sup uygulanan hücrelerde CD206 ifadesinin Akış Sitometri Grafiği

3.4.2. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR)

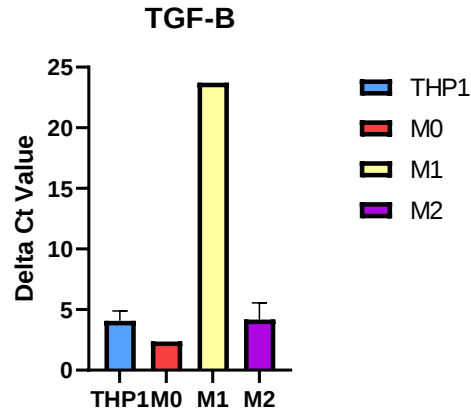
M0, M1 ve M2(U266sup) makrofajlara özgü yüzey belirteci olan genlerin (IL1B, IL6, IL10, TGFB, TNFA, CD80, CD86, Siglec10) ifadelerinin görselleri Şekil 3.25, 3.26, 3.27, 3.28, 3.29, 3.30, 3.31’de gösterilmiştir.



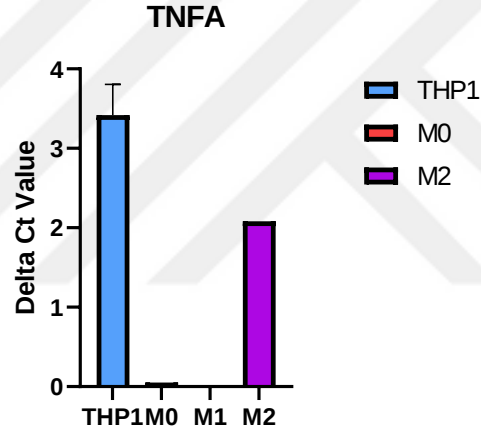
Şekil 3.24. M0, M1 makrofajlarda IL1B ekspresyon analizi



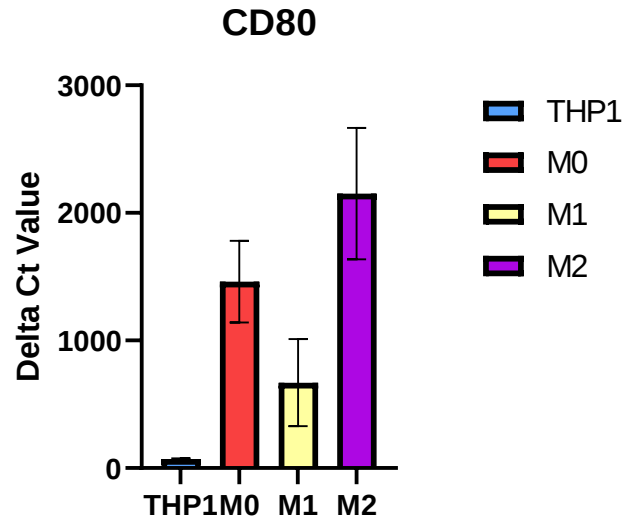
Şekil 3.25. M2 makrofajlarda (U266 sup) IL10 ekspresyon analizi



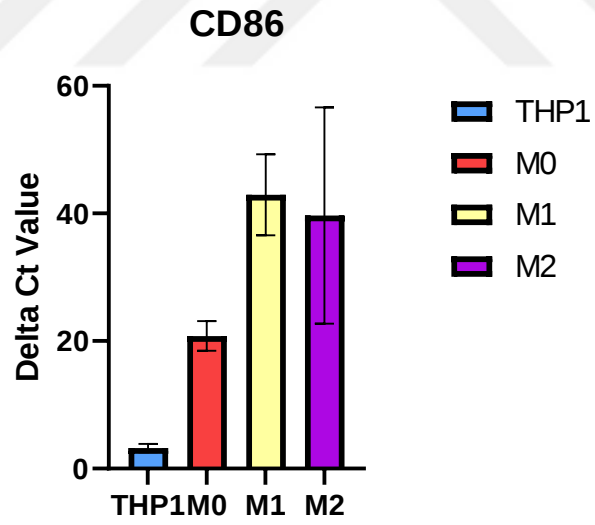
Şekil 3.26. M1, M2 (U266 sup) makrofajlarda ve THP-1 monosit hücrelerinde TGFB ekspresyon analizi



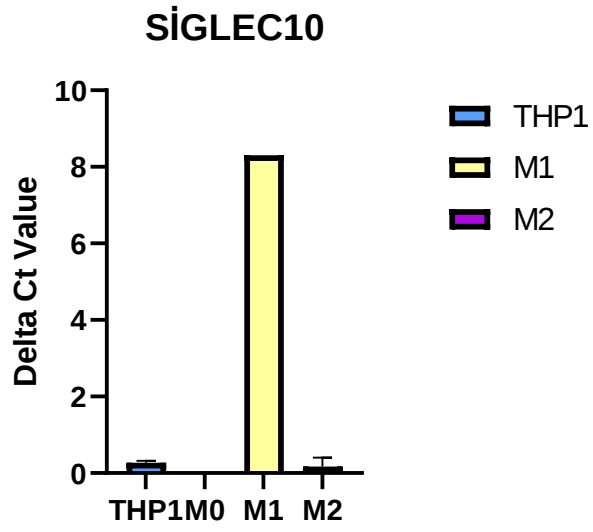
Şekil 3.27. M2 (U266 sup) makrofajlarda ve THP-1 monosit hücrelerinde TNFA ekspresyon analizi



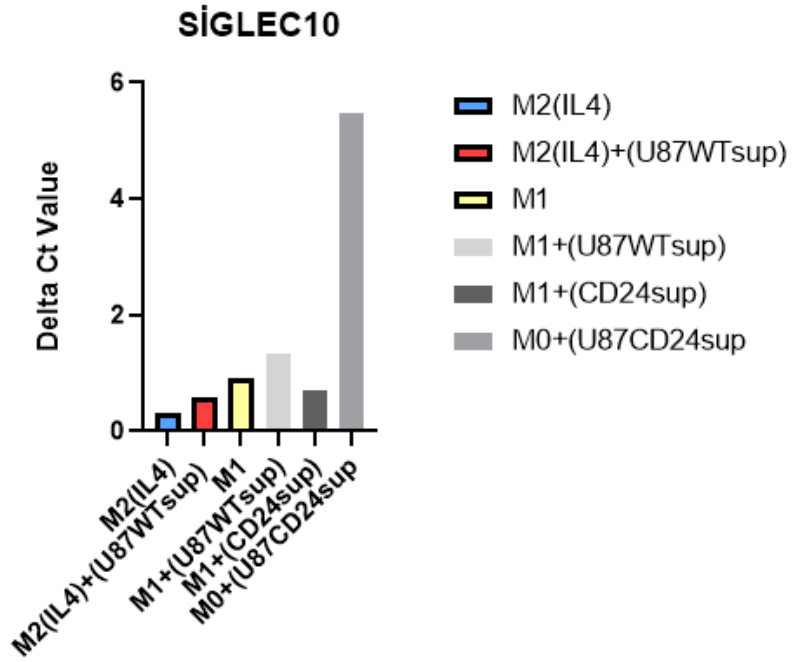
Şekil 3.28. M0, M1 Makrofaj Hücreleri ile THP-1 monosit hücrelerinin CD80 ekspresyon analizi



Şekil 3.29. M0, M1 Makrofaj Hücreleri ile THP-1 monosit hücrelerinin CD86 ekspresyon analizi



Şekil 3.30. M1, M2 (U266 sup) ile THP-1 monosit hücrelerinin Siglec10 ekspresyon analizi



Şekil 3.31. M0+(U87CD24sup), M1, M1+(U87WTsup), M1+(U87CD24sup), M2(IL4), M2(IL4) +(U87WTsup) hücrelerinin Siglec10 ekspresyon analizi

Hypothesis Test Summary

NULL HYPOTHESIS	TEST	SİG.	DECİSİON
	Indepented Samples Kruskal-Wallis Test	,010	Reject the null hypothesis

Çizelge 3.1. CD80 gen ifadesinin istatistik sonuç tablosu

CD80 geninin THP-1, M0, M1 ve M2(U266sup) hücrelerinde mRNA ifadesine rastlanmıştır. M2 makrofaj hücrelerinde THP-1, M0, M1 hücrelerine göre daha fazla mRNA ifadesine rastlanmıştır. Bu kat artışı ‘Independent-Samples Kruskal-Wallis Testi’ yapılarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p \leq 0,010$)*

Hypothesis Test Summary

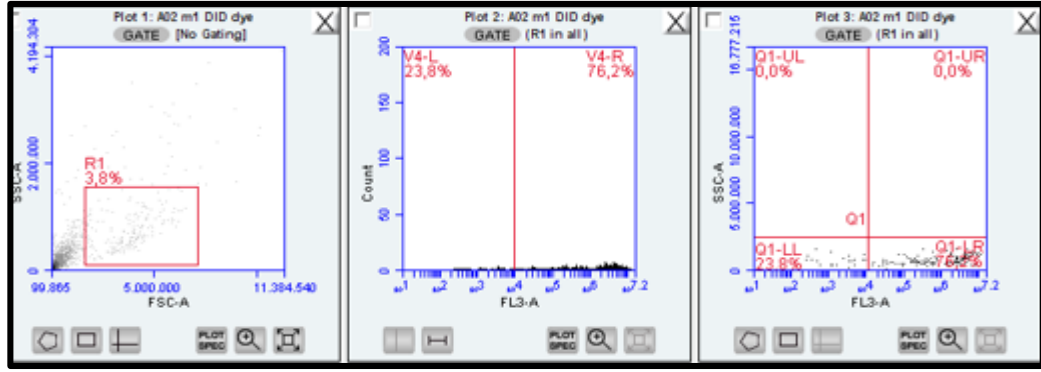
NULL HYPOTHESIS	TEST	SİG.	DECİSİON
	Indepented Samples Kruskal-Wallis Test	,002	Reject the null hypothesis

Çizelge 3.2. CD86 gen ifadesinin istatistik sonuç tablosu

CD86 geninin THP-1, M0, M1 ve M2(U266sup) hücrelerinde mRNA ifadesine rastlanmıştır. M1 makrofaj hücrelerinde THP-1, M0, M1 hücrelerine göre daha fazla mRNA ifadesine rastlanmıştır. Bu kat artışı ‘Independent-Samples Kruskal-Wallis Testi’ yapılarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p \leq 0,002$)*

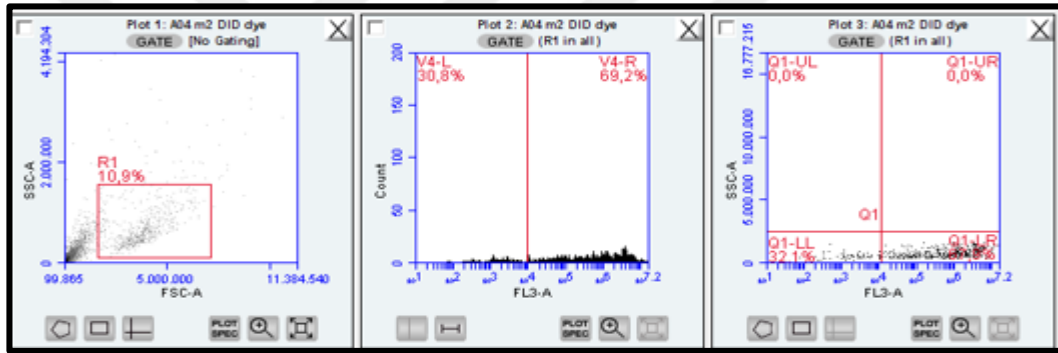
3.4.3. M1, M2(U266 sup) Makrofaj Hücrelerinin DiD-Boyaması Sonucu Akış Sitometri Analizi

M1 ve M2(U266) makrofaj hücrelerinin DiD boyanma sonucunda elde edilen akış sitometri görselleri aşağıdaki gibidir.



Şekil 3.32. M1 makrofaj hücrelerinin (DİD) boyanması sonucu akış sitometri ile yüzdesinin tespit edilmesi

M1 makrofaj hücrelerinin (DİD) boyanma yüzdesi akış sitometride %76.2 oranında tespit edilmiştir.



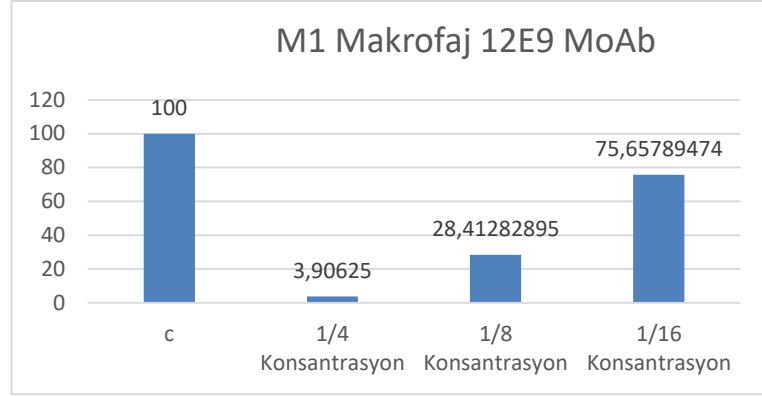
Şekil 3.33. M2 (U266 sup) makrofaj hücrelerinin (DİD) boyanması sonucu akış sitometri ile yüzdesinin tespit edilmesi

M2 (U266 sup) makrofaj hücrelerinin (DİD) boyanma yüzdesi akış sitometride %69.2 oranında tespit edilmiştir.

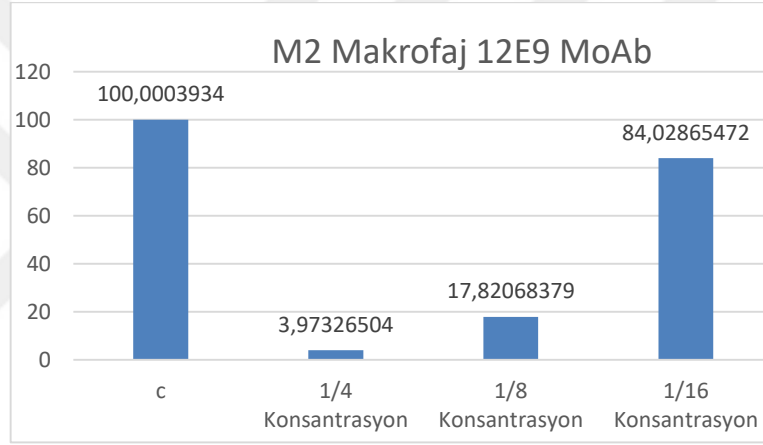
3.5. Antikor Etkinliğinin Araştırılması

3.5.1. MTT 3-(4,5-Dimetil tiyazol-2) 2,5-Difeniltetrazolyum Bromür Testi

12E9 Monoklonal Antikorumun M1 ve M2(U266sup) makrofaj hücreleri üzerine toksik olmayan dozunun belirlenmesi için canlılık testi yapılmıştır.



Şekil 3.34. M1 Makrofaj Hücrelerine Farklı Konsantrasyonlarda Uygulanan 12E9 Monoklonal Antikoronun MTT Testi ile İfade Edilen % Canlılık Grafiği

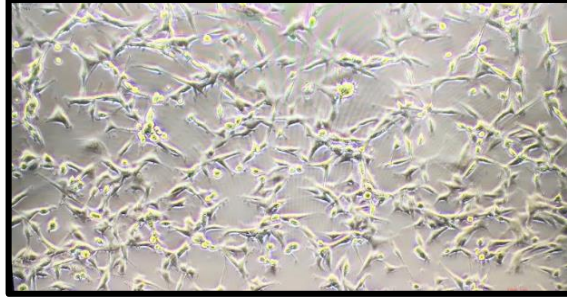


Şekil 3.35. M2(U266sup) Makrofaj Hücrelerine Farklı Konsantrasyonlarda Uygulanan 12E9 Monoklonal Antikoronun MTT Testi ile İfade edilen % Canlılık Grafiği

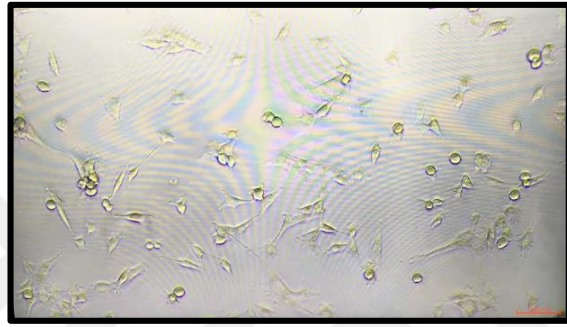
3.6. M1, M2(U266sup) Makrofaj Hücreleri ile U87CD24 Hücrelerinin Ko kültür Analizi

M1 makrofaj (DİD) hücreleri ve U87CD24 (GFP) hücrelerin ko kültürü ile elde edilen inverted mikroskop görüntüsü Şekil 3.37.'de gösterilmiştir.

M2 makrofaj (DİD) hücreleri ve U87CD24 (GFP) hücrelerin ko kültürü ile elde edilen inverted mikroskop görüntüsü Şekil 3.38.'de gösterilmiştir.



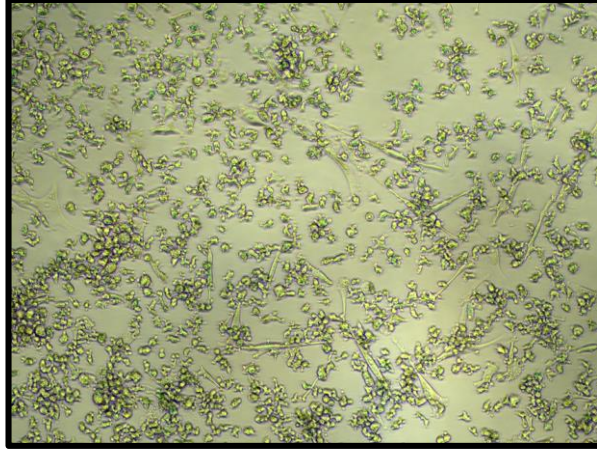
Şekil 3.36. M1 makrofaj (D1D) hücreler ve U87CD24 (GFP) işaretli hücrelerin ko kültürü ile elde edilen 10X inverted mikroskop görüntüsü



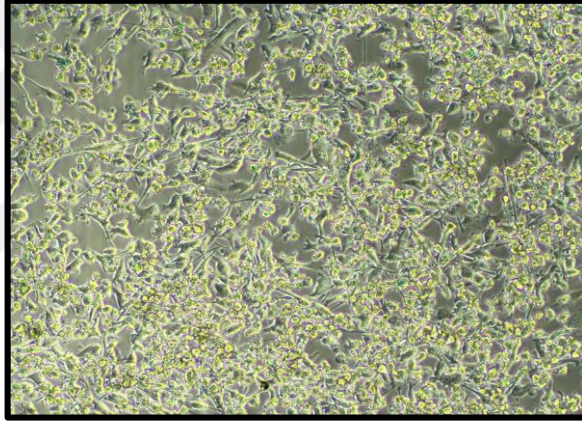
Şekil 3.37. M2 makrofaj (D1D) hücreler ve U87CD24 (GFP) işaretli hücrelerin ko kültürü ile elde edilen 10X inverted mikroskop görüntüsü

3.6.1. M1, M2(U266 sup) Makrofaj Hücreleri ile U87CD24 Hücrelerinin 12E9 Monoklonal Antikoru ile Ko-kültür Analizi

M1, M2(IL4) (D1D) makrofaj hücrelerinin U87-CD24(GFP) hücreleri ile 12E9 monoklonal antikoru muamelesi sonucunda elde edilen inverted mikroskop görüntüsü Şekil 3.39’de ve 3.40.’da gösterilmiştir.



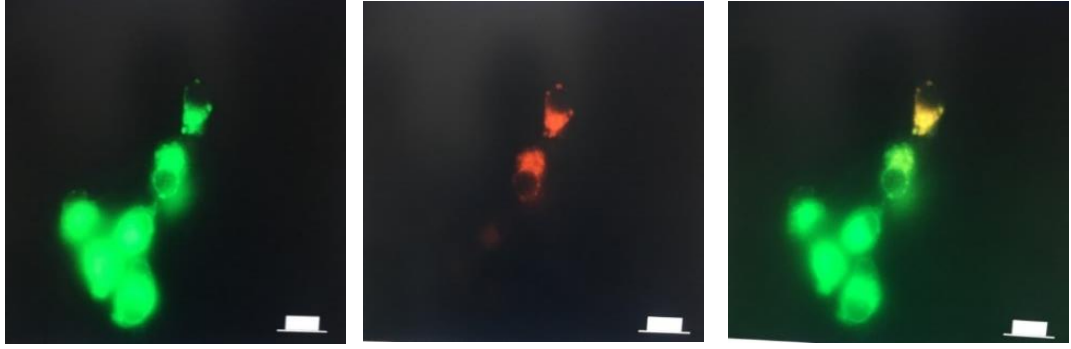
Şekil 3.38. M1 makrofaj hücreler ve U87CD24 GFP hücrelerin 12E9 Monoklonal Antikoru ile 24 saat ko kültürü sonucu elde edilen 10x inverted mikroskop görüntüsü



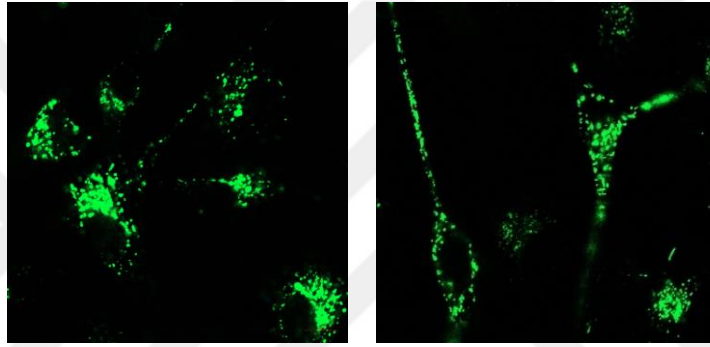
Şekil 3.39. M2(U266 sup) (DİD) makrofaj hücreler ve U87CD24 (GFP) hücrelerin 12E9 Monoklonal Antikoru ile 24 saat ko kültürü sonucu elde edilen 10X inverted mikroskop görüntüsü

3.7. Floresan Mikroskopi ile Fagositoz Yüzdesinin Belirlenmesi ve Konfokal Mikroskopi ile Fagositoz Yüzdesi Belirlenen Hücrelerin Görüntülerinin Alınması

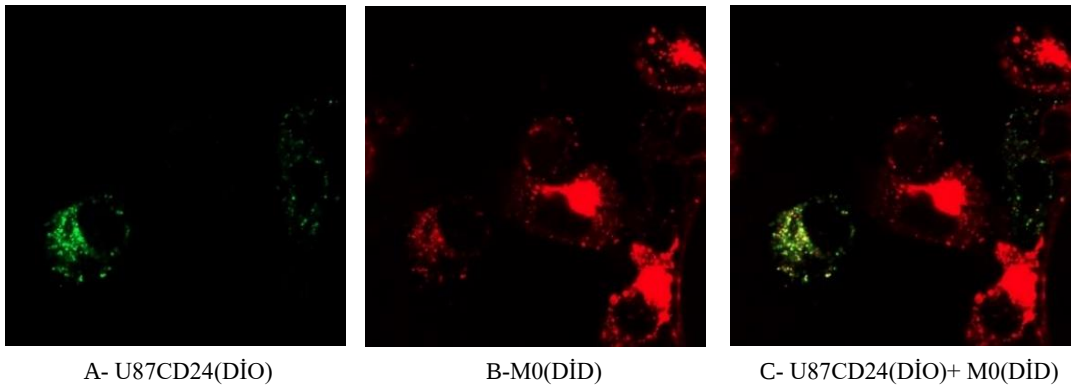
1200.000 hedef kanser hücresi/ 600.000 makrofaj oranında olacak şekilde fagositoz yüzdesinin oranları floresan mikroskopunda DİD işaretli makrofaj hücrelerinin içine DİO işaretli kanser hücrelerinin alınması sonucu floresan mikroskopta 100 hücre sayılarak tespit edilen görüntüler Şekil 3.36’da gösterilmiştir.



Şekil 3.40. M2 (U266sup) (DİD) makrofaj hücrelerinin U87CD24 (GFP) ifade eden hücrelerle ko kültürü ile elde edilen (100X) floresan mikroskop görüntüleri



Şekil 3.41. U87WT (DİO) işaretli hücrelerin 63X konfokal mikroskop görüntüleri A-63X B-63X

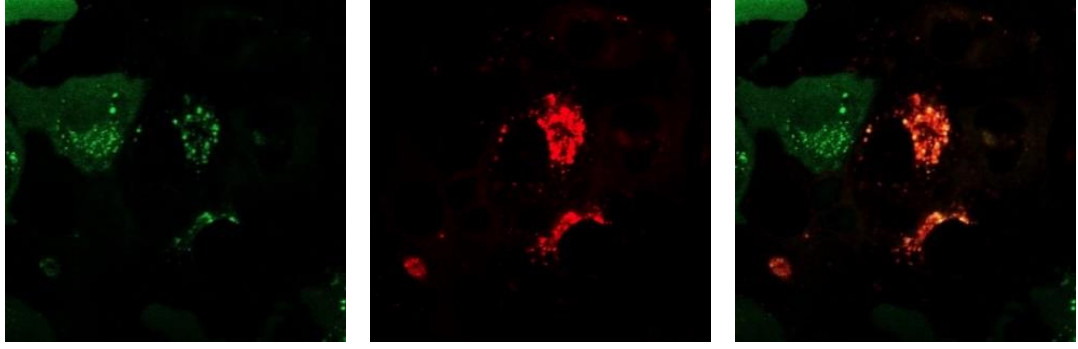


A- U87CD24(DİO)

B-M0(DİD)

C- U87CD24(DİO)+ M0(DİD)

Şekil 3.42. M1 (DİD) makrofaj hücreleri ve U8WT (DIO) hücrelerinin 12E9 Monoklonal Antikoru ile 24 saat ko kültürü sonucu elde edilen 63X konfokal mikroskop görüntüleri

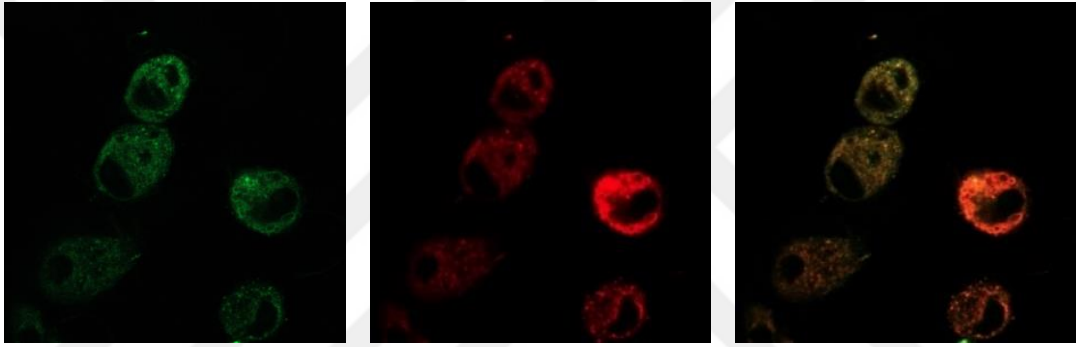


A- U87CD24(DİO)

B-M1(DİD)

C- U87CD24(DİO)+ M1(DİD)

Şekil 3.43. M1 makrofaj (DİD) ve U87CD24 (GFP) hücrelerin 12E9 Monoklonal Antikoru ile 24 saat ko kültürü sonucu elde edilen (63X) konfokal mikroskop görüntüleri

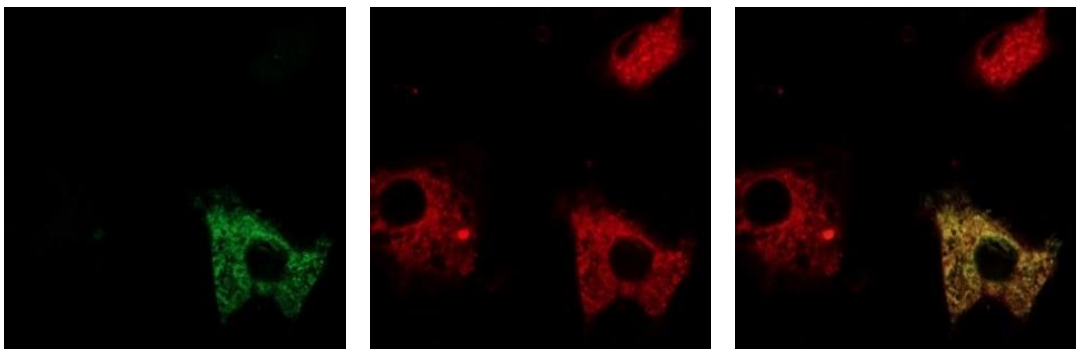


A-U87CD24 (DİO)

B-M2(U266sup) (DİD)

U87CD24 (DİO)+ M2(U266sup)

Şekil 3.44. M2(U266sup) (DİD) ve U87CD24(GFP) hücrelerinin 12E9 Monoklonal Antikoru ile ko kültür sonucu elde edilen (63X) konfokal mikroskop görüntüleri

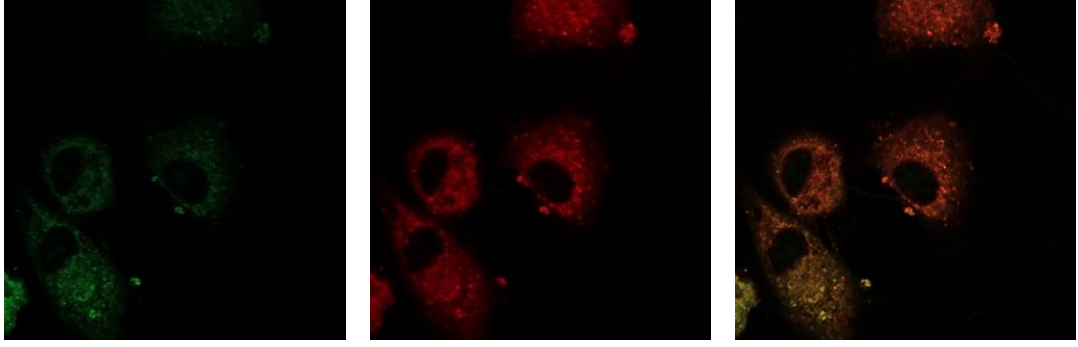


A- U87CD24(DİO)

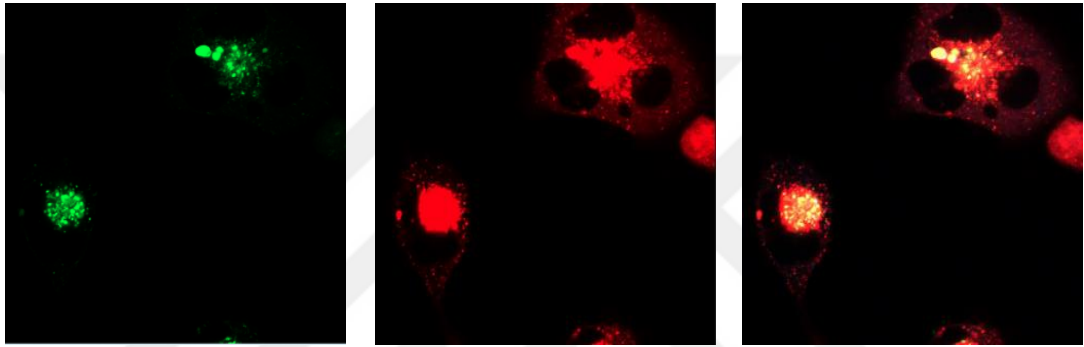
B-M2(IL4) (DİD)

C- U87CD24(GFP)+
M2(IL4)(DİD)

Şekil 3.45. M2(IL4) (DİD) hücreleri ile U87CD24(GFP) hücrelerinin 12E9 Monoklonal Antikoru ile ko kültürü sonucu elde edilen (63X) konfokal mikroskop görüntüleri



Şekil 3.46. M2(IL4) (DİD) hücreleri ve U87WT(DİO) hücrelerinin 12E9 Monoklonal Antikoru ile ko kültürü sonucu elde edilen (63X) konfokal mikroskop görüntüleri

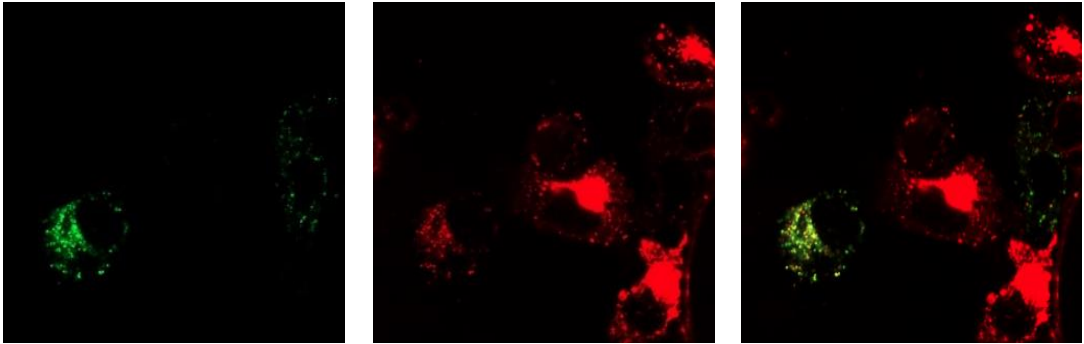


A- U87WT(DİO)

B- M0(DİD)

C-U87WT(DİO)+M0(DİD)

Şekil 3.47. M0 (DİD) hücreleri ve U87WT(DİO) hücrelerinin 12E9 Monoklonal Antikoru ile ko kültürü sonucu elde edilen (63X) konfokal mikroskop görüntüleri

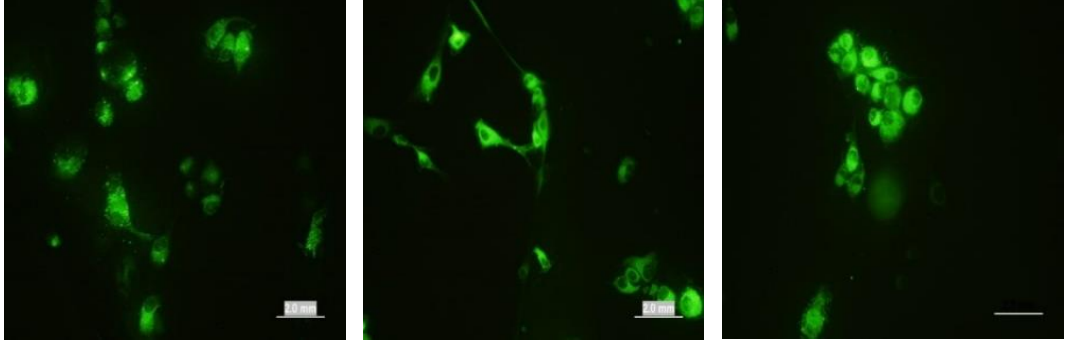


A- U87CD24(DİO)

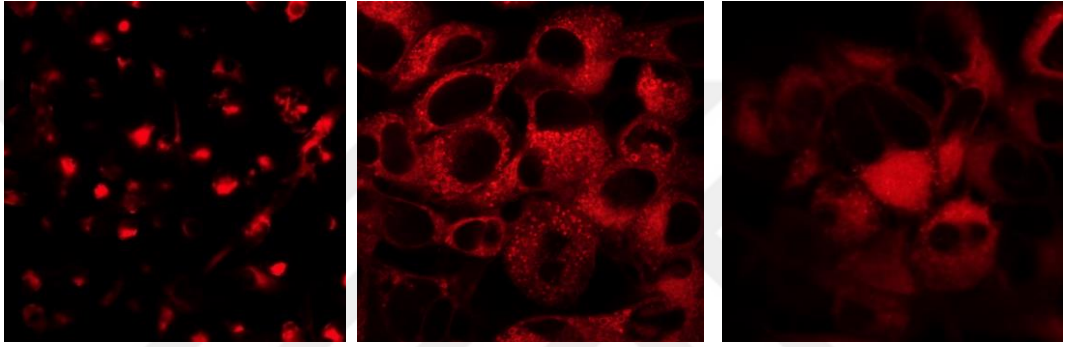
B-M0(DİD)

C- U87CD24(GFP)+ M0(DİD)

Şekil 3.48. M0 (DİD) makrofaj hücreleri ile U87CD24 (DİO) hücrelerin 12E9 Monoklonal Antikoru ile ko kültürü sonucu elde edilen (63X) konfokal mikroskop görüntüleri



Şekil 3.49. U87WT (DIO) işaretli hücrelerin 10X floresan mikroskop görüntüleri

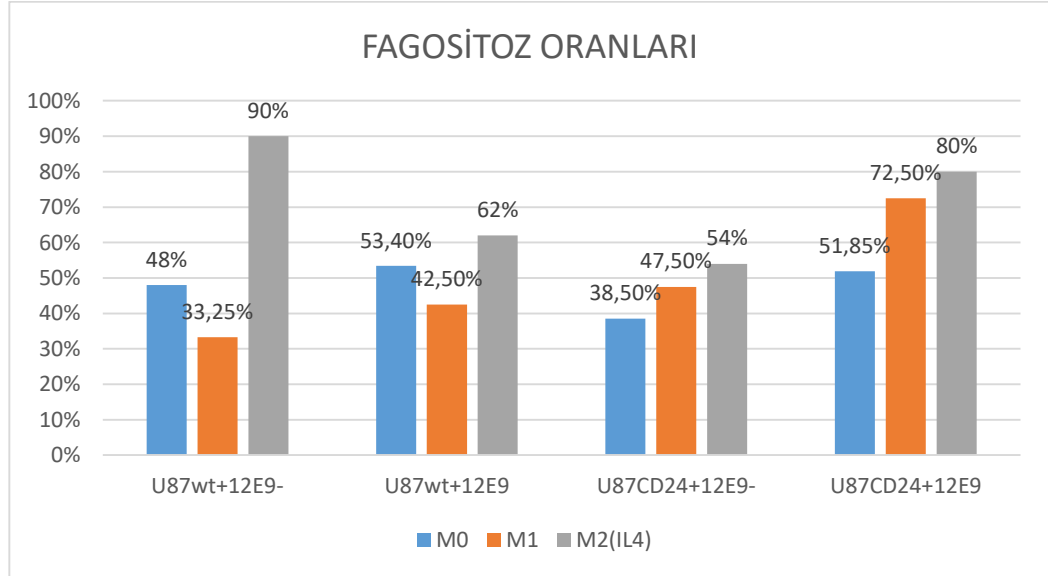


A- 20x

B -63x

C-63x

Şekil 3.50. M1 makrofaj (DID) hücrelerin konfokal mikroskop görüntüleri A-20X B-63X C-63X



Şekil 3.51. Floresan Mikroskop ile Fagositoz Oranlarının Belirlenmesi

durum* hücre crosstabulation

U87WT+12E9-	M0 (PMA)	M1(LPS+IFN)	M2(IL4)
Var Count	48a	33a	90b
% within durum	28,1%	19,3%	52,6%
% within hücre	48%	33%	90%%

Çizelge 3.3. U87WT+12E9- hücrelerinde fagositoz oranının durum* hücre Crosstabulation tablosu

Chi-Square Tests

U87WT+12E9-	Value	df	Asymp. Sig (2-sided)
Pearson Chi-Square	71,236 ^a	2	,000
Likelihood Ratio	79,667	2	,000
	35,865	1	,000

Çizelge 3.4. U87WT+12E9- hücrelerinde fagositoz oranının istatistik sonuç tablosu

U87+12E9- M0, M1, M2(IL4) hücreleri arasında M1 ve M2(IL4) makrofajlar arasındaki fark anlamlıdır. Bu anlamlılık Pearson Chi-Square analizi yapılarak anlamlı bulunmuştur. $P < 0,000$ 'dır. M0 ve M1 makrofaj arasındaki fark anlamlı değildir.

durum* hücre crosstabulation

U87WT+12E9	M0 (PMA)	M1(LPS+IFN)	M2(IL4)
Var Count	53a,b	43b	62a
% within durum	33,5%	27,2%	39,2%
% within hücre	53%	42,6%	62,0%

Çizelge 3.5. U87WT+12E9 hücrelerinde fagositoz oranının durum* hücre Crosstabulation tablosu

Chi-Square Tests

U87WT+12E9	Value	df	Asymp. Sig (2-sided)
Pearson Chi-Square	7,619 ^a	2	,022
Likelihood Ratio	7,665	2	,022
	1,619	1	,203

Çizelge 3.6. U87WT+12E9 hücrelerinde fagositoz oranının istatistik sonuç tablosu

U87WT+12E9 M0, M1 ve M2(IL4) grubundaki tüm makrofaj hücre grupları arasında anlamlı fark vardır. Bu anlamlılık Pearson Chi-Square analizi yapılarak anlamlı bulunmuştur. $P < 0,022^*$.

durum* hücre crosstabulation

U87CD24+12E9-	M0 (PMA)	M1(LPS+IFN)	M2(IL4)
Var Count	48a	54a	102
% within durum	47,1%	52,9%	100%
% within hücre	47,5%	54%	50,7%

Çizelge 3.7. U87CD24+12E9 hücrelerinde fagositoz oranının durum* hücre Crosstabulation tablosu

Chi-Square Tests

U87CD24+12E9-	Value	df	Asymp. Sig (2-sided)
Pearson Chi-Square	,843 ^a	1	,359
Continuity Correction	,604	1	,437
Likelihood Ratio	,844	1	,358
Linear-by-Linear Association	,839		,360

Çizelge 3.8. U87C24+12E9- hücrelerinde fagositoz oranının istatistik sonuç tablosu

U87CD24+12E9- uygulanmayan M0, M1, M2(IL4) makrofaj hücre grupları arasında anlamlılık yoktur. Bu anlamsızlık Pearson Chi-Square analizi yapılarak bulunmuştur. $P > 0,359$

durum* hücre crosstabulation

U87CD24+12E9	M0 (PMA)	M1(LPS+IFN)	M2(IL4)
Var Count	52a	73b	80b
% within durum	25,4%	35,6%	39,0%
% within hücre	52%	72,3%	80%

Çizelge 3.9. U87CD24+12E9 hücrelerinde fagositoz oranının durum* hücre Crosstabulation tablosu

Chi-Square Tests

U87CD24+12E9	Value	df	Asymp. Sig (2-sided)
Pearson Chi-Square	19,264 ^a	2	,000
Continuity Correction	19,098	2	,000
Likelihood Ratio	17,987	1	,000
Linear-by-Linear Association	301		

Çizelge 3.10. U87C24+12E9 hücrelerinde fagositoz oranının istatistik sonuç tablosu

U87CD24+12E9 uygulanan hücrelerin M0, M1, M2(IL4) grubundaki makrofaj hücreleri arasından M0 ve M1 makrofaj hücreleri arasında anlamlı bir fark vardır. Aynı zamanda M0 ve M2 (IL4) makrofaj hücreleri arasında da anlamlı bir fark vardır. Bu anlamlılık Pearson Chi-Square analizi yapılarak anlamlı bulunmuştur. $P < 0,001^*$

4. TARTIŞMA

Glioblastom (GBM), merkezi sinir sisteminin en yaygın ve agresif tümörlerinden biridir ve uygulanan tedavilere rağmen GBM hastalarının ortalama hayatta kalım süresi 12-14 aydır. Günümüzde, GBM hastalarında cerrahi rezeksiyonu takiben radyoterapi ve Temozolomid (TMZ) uygulamasını içeren kemoterapi uygulanmaktadır. TMZ, GBM ve astrositomları tedavi etmek için kullanılan oral bir alkilleyici ajandır. Bununla birlikte, TMZ ile tedavi edilen hastaların en az %50'si O6-metilguanin metiltransferazın (MGMT) aşırı ekspresyonundan ve/veya farklı kemo-dirençle ilişkili moleküler yolların aktivasyonu nedeni ile TMZ'e yanıt vermemektedir. Bu nedenle, GBM'de maligniteyi yönlendiren moleküler yolların daha iyi anlaşılmasına ve spesifik olarak tümör hücrelerini ve tümör mikroçevresini hedefleyen çeşitli ajanların geliştirilmesine acil ihtiyaç bulunmaktadır.

Normalde, myeloid progenitör hücre hattından köken alan makrofajlar, doğal immün sistemin hücreleri olup mikropları ve / veya ölü / hasarlı hücreleri fagosit ederek veya antijen sunan hücre olarak görev yaparlar. Makrofajlar, aldıkları uyarı tipine bağlı olarak, pro-inflamatuvar veya anti-inflamatuvar cevap gösterebilirler. Yapılan çalışmalar, makrofajların temelde M1 ve M2 makrofajlar olmak üzere iki alt gruba ayrıldığını göstermiştir. Ayrıca, M1 ve M2 makrofajları, yüzey reseptör ifadesi, doku dağılımı, metabolizma, sitokin ve kemokin üretimi, işlev ve hücre içi sinyal iletimi açısından önemli farklılıklara sahiptir. M1 makrofajları veya klasik olarak aktive olan makrofajlar, fagositoz yeteneğine sahip aşırı miktarda reaktif oksijen ve azot türevlerini üretebilen hücreler olup, yardımcı T hücresi 1 (Th1) tipi cevabını etkinleştirmektedir. M1 makrofajlar, iki önemli inflamatuvar sitokin olan IL-12 ve IL-23 salgırlar. IL-12, yüksek miktarda IL-17 salgılayan Th17 hücrelerinin aktivasyonunu ve klonal çoğalmasını arttırarak inflamasyona katkıda bulunmaktadır. Toll-benzeri reseptör 4 (TLR4) ile etkileşen IFN- γ ve LPS gibi sinyallerin, in vitro olarak makrofajları M1 tipi makrofajlara polarize ettikleri gösterilmiştir.¹⁴ Kanser oluşumuna karşı verilen makrofaj cevabında, M1 tipi makrofajlar tümöre karşı

bağışıklık yanıtında etkin rol oynarlar. M2 makrofajları IL-4 ve IL-13 gibi sitokinler tarafından polarize edilmektedir. M2 makrofajları ayrıca TGF-beta ve IL-10 da dahil olmak üzere anti-enflamatuvar sitokinlerin salınmasına neden olarak doku onarımını teşvik etmek için hücre zarının yeniden şekillenmesi ve anjiyogenez gibi süreçleri uyarmaktadır. Kanser oluşumuna karşı verilen makrofaj cevabında M2 makrofajları tümör gelişimini ve metastazını uyarıcı ve ayrıca tümöre karşı bağışıklık yanıtını baskılayıcı etki gösterirler.

Makrofajların tümör hücrelerini fagosit etmesi süreci tümör hücreleri üzerinde ifade edilen pro-fagositoz ("BeniYe") sinyalleri ve anti-fagositoz ("Beni-Yeme") sinyalleri de dâhil olmak üzere bir dizi uyarım tarafından düzenlenmektedir. Tümör hücresine ait "Beni-Yeme" sinyalleri sinyal düzenleyici protein a (SIRP a), programlanmış hücre ölümü 1 (PD-1), lökosit immünoglobulin benzeri reseptör 1 (LILRB1) ve Siglec'lerin de dâhil olduğu fagosit yüzeyi reseptörleri ile etkileşime girmektedir. Fagosit yüzeyindeki reseptörler ile tümör hücresi yüzeyindeki ligantlar arasında gerçekleşen fagositozu baskılayıcı bu etkileşim tümör hücrelerinin bağışıklık savunmasından kaçmasını sağlamaktadır. Son araştırmalar CD24'ün tümörlerde baskın çeşitteki bağışıklık denetim noktalarından biri olduğunu göstermiştir. CD24'ün sialik asit bağlayıcı Ig benzeri lektin 10 (SIGLEC10) ile etkileşimi tümör immün kaçışını etkinleştirmektedir. CD24 küçük, fazla glikosillenmiş, musin benzeri bir hücre yüzey proteini olup hücre zarına GPI (glikosilfosfatidilinositol) çapası ile bağlanan yeni tanımlanmış bir "BeniYeme" sinyalidir. CD24'ün yüksek ifadesi ve invazyona katkısı insan GBM hücrelerinde gösterilmiştir.

Tümör mikroçevresinde bulunan makrofajlar tümöre karşı pro-enflamatuvar M1 veya tümör gelişimine yardımcı olan anti- enflamatuvar M2 makrofajlardır. Tümör ilişkili makrofajlar (TAM) M2 makrofajlarla benzer birçok özellik taşırlar. TAM'lar birçok tümörde yoğun olarak bulunurlar. Tümöre infiltre olan TAM'ların sayısı ile hastalığın kötü prognozu arasında pozitif bir korelasyon olduğu raporlanmıştır. TAM'ların ayrıca

standart tedavilere karşı direnç geliştirmede rol oynadıkları da bilinmektedir. TAM'ların GBM'de tümöre en fazla sızan bağıışıklık hücreleri oldukları rapor edilmiştir. Katı tümörlerde tümör kitlesinin %5-40'ını TAM'lar oluşturmaktadır.

Tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) salgıladıkları faktörler aracılığıyla tümör hücrelerinin invaziv bir fenotip kazanmasına neden olurlar. Genel olarak Tümörle ilişkili makrofajlar (TAM), M2 makrofajlara fenotipik ve fonksiyonel özellikler açısından benzerlik gösterirler.

İnsan GBM hücrelerinde CD24'ün yüksek ifade edildiği ve CD24 sinyalinin GBM hücrelerinin invaziv özelliğinde önemli rol oynadığı ve kötü prognozla ilişkili olduğu bilinmektedir. Tümör hücresinin immün sistemden kaçış mekanizmalarından olan "Beni Yeme" sinyallerinden biri de tümör hücreleri tarafından ifade edilen CD24 ile makrofajlar tarafından ifade edilen Siglec10'un birbirine bağlanmasıdır. Yapılan bu tez çalışmasında anti-CD24 MoAb kullanılarak CD24-Siglec-10 etkileşiminin engellenmesi ve TAM özelliği gösteren makrofajlara yeniden fagositik özellik kazandırılması hedeflenmektedir.

Barkal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CD24'ün yeni bir "Beni Yeme" sinyali olduğunu bu durumun ise meme ve over kanseri hastaları için umut vadeci bir tedavinin önünü açacağı ifade edilmiştir.

Siglec'ler immünoglobulin süper ailesinin üyeleri olup hücre dışında siyalik asit bağlanma bölgesini de içeren 2-17 Ig (immunoglobulin) alanından oluşan hücre yüzeyi transmembran reseptörleridir. Makrofaj, dendritik hücre ve nötrofil gibi hücrelerde belirgin şekilde ifade edilirler. SIGLEC ailesi proteinleri siyalillenmiş oligosakkaritlere bağlanmaktadır. Örneğin, hücre dışı bölgesi yüksek derecede

siyalillenmiş olan CD24 transmembran proteini makrofajlarda özgül olarak ifade edilen SIGLEC10 reseptörüne bağlanarak makrofajların fagositoz işlevini baskılamaktadır. Birçok SIGLEC ailesi proteininin sitoplazmik alanı immün reseptör tirozin temelli baskılayıcı motiflere (ITIM) sahiptir. Bu protein motifleri SHP-1 ve SHP-2 gibi tirozin fosfatazlarının da katılımını sağlayarak makrofajlar tarafından yönetilen fagositoz sürecinin baskılanmasında görev almaktadır. CD24- SIGLEC10 etkileşimi sonrasında SRC ailesi tirozin kinazları SIGLEC10'un sitoplazmik bölgesinde bulunan tirozin temelli sinyal iletim motifini fosforlar. SIGLEC10 fosforilasyonunun sonucunda SH2 alanını içeren proteinlerin ("özellikle SHP-1, SHP-2 veya sitokin sinyalizasyon baskılayıcısı 3 (SOCS3)'ün) katılımı da sağlanmakta ve bu proteinler etkinleştirilmektedir. Makrofaj hücresi yüzeyindeki SIGLEC10 reseptörü ile tümör hücrelerinin yüzeyindeki CD24 arasındaki etkileşim makrofajlarda SIGLEC10'un hücre içi bölgesinde SHP-1 ve SHP-2 fosfatazlarının aracılık ettiği anti-enflamatuvar ve anti-fagositik sinyal iletim yollarının etkinleşmesine yol açmaktadır. CD24 ve SIGLEC10 arasındaki etkileşim makrofajların fagositoz yapabilirliğini baskıladığı için CD24'ü yüksek ifade eden tümörlerin immün kaçıışı desteklenmekte ve bu tümörler fagositozla yok edilememektedir. Sağlıklı doku ve hücreler anti-fagositoz molekülleri ifade ederek makrofajların kendilerini fagosit etmesini önleme konusunda doğal bir yeteneğe sahipken, kanser hücreleri immün kaçış mekanizmalarını kullanmaktadır. Yapılan çalışmalar makrofajların GBM'de en yüksek derecede tümöre sızıcı özellik gösteren bağışıklık hücreleri olduklarını vurgulamaktadır. Yakın zamanda elde edilen bulgular CD24 ve SIGLEC10 gen ifadelerinin GBM'de yüksek olduğunu ve bu durumun kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

Chanput ve arkadaşları THP-1 hücre hattındaki hücrelerin hem aktif hem de dinlenme koşullarında immün modüle edici etkilerini araştırmak/tahmin etmek için önemli bir model olarak benzersiz özelliklere sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

M0 makrofajların M1 polarize makrofajlara farklılaşması için kullanılan IFN- γ ve LPS konsantrasyonları yapılan bazı çalışmalarla belirlenmiştir. (20 ng/ml IFN- γ ve 10 pg/ml LPS 24 saat inkübasyon süresiyle (Genin ve ark., 2015) ve 20 ng/ml IFN- γ + 1 mg/ml LPS ile 24 saatlik inkübasyon süresiyle (Chanput ve ark., 2013) M1 makrofaja farklılaştığı belirlenmiştir. Çalışmamızda M1 makrofajların farklılaşma sürecinde 20 ng/ml IFN- γ ve 10 pg/ml LPS ile birlikte 24 saatlik inkübasyon süresi uygulanmıştır.

Literatürde 20ng/ml IL4'ün (24-48-72) saat muamelelerinde en yüksek CD206 ifadesine 72 saatte ulaşıldığı bildirilmiştir. Buradan çıkan sonuçlara göre M2(IL4) makrofaj hücrelerine farklılaştırma çalışmalarında IL4 uygulama süresinde optimizasyon yapılmalıdır.

Literatürde, CD47 SIRPα arasındaki immün blokajın kaldırılmasına yönelik klinikte faz 1 çalışmaları mevcutken, CD24- Siglec10 arasındaki immün blokajın kaldırılmasına yönelik henüz kliniğe geçmiş bir çalışma bulunmamaktadır. Bu durum CD24- Siglec10 arasındaki blokajın kaldırılması için klinik açıdan değer taşımaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

M0 makrofaj hücrelerinin M2 makrofajlara farklılaşması için ayrı ayrı U266 hücre süpernatantı 1:1 oranında RPMI besiyeri ile hem de 20 ng/ml IL4 ile 48 saat inkübasyonu gerçekleştirilmiştir.

M2(IL4) makrofaj hücrelerini elde edebilmek için tek başına 48 saat 20ng/ml IL4 muamelesinin yeterli olmadığı tespit edilmiştir. 20ng/ml IL4 uygulanmasına ek olarak U87CD24 hücre süpernatantları ile birlikte muamelenin CD206 ifadesinde %30,4 oranında daha anlamlı bir değere sahip olduğu gösterilmiştir

M0 makrofaj hücrelerinin IL1B ekspresyon seviyesinde M1 makrofajlara göre artış gözlenmiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

M2 (U266 sup) IL10 ekspresyon seviyesi artış göstermiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

M2 (U266 sup) makrofajlarda M1 makrofajlara ve THP-1 monosit hücrelerine göre TGFB ekspresyon seviyesinde bir artış gözlenmiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

M2(U266 sup) makrofaj hücrelerinde THP-1 monosit hücrelerine ve M1 makrofaj hücrelerine göre TNFA ekspresyon seviyesinde bir artış gözlenmiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

M1 makrofaj hücreleri ve THP-1 hücreleri ile M2(U266sup) makrofaj hücreleri CD86 ifadesi analiz edildiğinde anlamlı farklılık bulunmuştur $P < ,001^*$.

M0 makrofaj hücrelerinde THP-1 monosit hücrelerine ve M2(U266sup) makrofaj hücrelerine göre CD80 ekspresyon seviyesi artış gözlenmiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur $P < ,003^*$.

LPS ve IFN- γ ile indüklenen THP-1 orijinli makrofaj hücrelerinde (M1 makrofaj hücresi) LPS ve IFN- γ ile indüklenmeyenlere kıyasla CD80 ve CD86 ifadesinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir.

M2(IL4) makrofaj (DİD) ve U87CD24 (GFP) yüksek ifade eden hücrelerin 24 saat ko kültürü sonucu tümör hücrelerinin M2 makrofaj hücreleri tarafından fagositozu M2 (IL4) (DİD) hücrelerin içine U87CD24 GFP işaretli hücrelerin alınması ile floresan mikroskopunda sayılarak tespit edilmiştir.

M0+(U87CD24sup) uygulanan hücrelerdeki Siglec 10 ekspresyon seviyesi yaklaşık 6 kat artış göstermiştir ve M0+(U87CD24sup) hücrelerine 12E9 Monoklonal antikoru uygulandığında fagositoz oranı %51,85 iken uygulanmayan grupta bu oran %38,50'dir. 12E9 Monoklonal antikoru, M0+(U87CD24sup) hücrelerinde Siglec 10 blokajını ortadan kaldırmıştır.

M2(IL4)+U87WT-12E9 Monoklonal antikoru uygulanmayan hücreler için fagositoz oranı 90 % iken M2(IL4) +U87WT+12E9 Monoklonal antikoru uygulanan gruplarda bu oran % 62dir. 12E9 Monoklonal antikoru olmadan U87WT hücreleri daha fazla fagositoza uğramaktadır

M2(IL4) +U87CD24-12E9 Monoklonal antikoru uygulanmayan hücreler için fagositoz oranı 50,7% iken M2(IL4)+ U87CD24+12E9 Monoklonal antikoru uygulanan gruplarda bu oran %80'dir. 12E9 Monoklonal antikorunun uygulanması M2(IL4) U87CD24 hücrelerinin daha fazla fagositoz yapmasına neden olmuştur.

M1+U87WT-12E9 Monoklonal antikoru uygulanmayan hücreler için fagositoz oranı %33 iken M1+U87WT+12E9 Monoklonal antikoru uygulanan gruplarda bu oran %42,6'dır. 12E9 Monoklonal antikoru varlığında M1 makrofajı U87WT hücrelerini daha fazla fagositoza uğratmıştır.

U87CD24 (GFP) hücreler ile kokültürü yapılan M1 makrofaj (DİD) hücrelerinin 12E9 Monoklonal antikoru muamelesi sonucunda M1 makrofaj hücrelerinin U87CD24 yüksek ifade eden tümör hücrelerini floresan mikroskoptaki fagositoza uğratma oranı % 47.5'dan %72,5'a yükseldiği belirlenmiştir.

M2(IL-4)+U87CD24-12E9 Monoklonal antikoru uygulanmayan hücreler için fagositoz oranı % 54 iken M2(IL-4)+U87CD24+12E9 Monoklonal antikoru uygulanan gruplarda bu oran % 80 olarak belirlenmiştir. 12E9 Monoklonal antikoru varlığında M2 makrofajı Siglec10'un baskılayıcı etkisinden kurtularak U87CD24 hücrelerini daha fazla fagositoza uğratmıştır.

M0+U87CD24, 12E9 Monoklonal antikor uygulanan grupta fagositoz oranı % 51,85 iken uygulanmayan grupta bu oran %38,5 olarak tespit edilmiştir. U87CD24sup hücrelerinde fagositoz 12E9 Monoklonal antikoruna bağlı olarak gerçekleşmektedir. 12E9 uygulaması M0+U87CD24 hücrelerinde fagositozun artmasına neden olmuştur.

CD24'e özgü üretilen 12E9 Monoklonal antikoru GBM kanser hücreleri ve TAM'lar arasındaki –sırasıyla- CD24- SIGLEC10 etkileşimlerini ortadan kaldırmak ve dolayısıyla makrofajların yeniden etkinleşmesini ve fagositoz yeteneklerini yeniden kazanmalarını sağlamak için kullanılmıştır. Böylece makrofajların üzerindeki bağışıklık baskılamasının kaldırılabilirliği ve fagositoz aracılı tümör temizliğinin yapılabilirliği araştırılmıştır. CD24'e özgü kendi sentezlediğimiz özgün 12E9 MoAb'ın GBM Glioblastoma tümör hücreleri/kök hücrelerinin temizlenmesinde

önemli rol oynayan makrofajların yeniden etkinleşmesine olan etkilerinin ilk kez araştırılması bu tez çalışmasının özgün değerini oluşturmaktadır.



ÖZET

Makrofaj Siglec-10 – CD24 Tümör “beni yeme” Sinyalinin 12E9 Monoklonal Antikoru ile İmmünoterapötik Hedeflenmesi

Tümör mikroçevresinde bulunan makrofajlar tümöre karşı pro-inflamatuar M1 veya tümör gelişimine yardımcı olan M2 makrofajlardır. Tümör ilişkili makrofajlar (TAM) M2 makrofajlarla ilişkilendirilmektedir. TAM'ların birçok tümörde yoğun olarak bulunduğu ve tümör ortamına sızan TAM'ların sayısı ile hastalığın kötü prognozunu ilişkili olduğu ve ayrıca standart tedavilere karşı direnç geliştirmede rol oynadıkları da bilinmektedir. GBM'de TAM'ların tümör ortamına en fazla sızıntı yapan bağışıklık hücreleri oldukları rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalar yüksek dereceli gliomalarda M2 makrofajların varlığı ile hastalığın kötü prognozu arasında bir korelasyon saptandığını belirtmektedir. Ayrıca, yeniden programlanmış M1 makrofajların GBM hücrelerinin büyümesini baskıladığı, M2 makrofajların ise tümör büyümesini ve tedaviye direnci desteklediği gösterilmiştir. TAM'ların çeşitli sitokinler veya kemokinler tarafından düzenlenebilmesi; tümör gelişimi ve ilerlemesini destekleyen ortam oluşturması ve tedaviye dirençle ilişkisi TAM temelli yeni immünoterapilerin geliştirilmesini ve böylece tümör ilerlemesinin bloke edilerek hasta sağ kalımının uzatılmasıyla klinik sonuçların iyileştirebileceği öngörülmektedir.

Tümör hücreleri bağışıklık sisteminin etkinleşmesinden kaçmak için bağışıklık denetim noktalarını içeren anti-fagositik yolları kullanmaktadır. Tümör hücresinin bağışıklık sisteminden kaçış mekanizmalarından olan "Beni Yeme" sinyallerinden biri de tümör hücreleri tarafından ifade edilen CD24'ün makrofajlar tarafından ifade edilen Siglec10'a bağlanmasıdır. CD24'ün özellikle over ve meme kanserinde dominant immün kontrol noktası olabileceği ve kanser immünoterapisi için yeni ve umut verici bir hedef olduğu vurgulanmaktadır. CD24'ün sialik asit bağlayıcı Ig benzeri lektin 10 (SIGLEC10) ile etkileşimi tümör immün kaçışını etkinleştirmektedir. CD24'ün yüksek ifadesi kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir.

Proje yürütücüsünün daha önce ifade ettirdiği CD24'e özgü 12E9 MoAb'ın GBM tümör/kök hücrelerinin temizlenmesindeki rolü araştırılmıştır.

12E9 Monoklonal antikorunun uygulanması M2(IL4) +U87CD24, M1 makrofajı + U87WT, M1+ U87CD24, M0+ U87CD24 hücrelerinin daha fazla fagositoz yapmasına neden olmuştur.

12E9 Monoklonal antikoru Siglec10'u en yüksek ifade eden M2 makrofaj hücrelerinde Siglec10-CD24 “Beni yeme etkisi” ni baskılayarak U87CD24 hücrelerini daha fazla fagositoza uğrattığı ilk kez belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: CD24, Glioblastoma Multiforme, M0/M1/M2 Makrofaj, Temozolomid, Siglec10

SUMMARY

Immunotherapeutic targeting of macrophage Siglec10- Tumor CD24 “don’t eat me” signalling by 12E9 monoclonal antibody

Macrophages found in the tumor microenvironment are pro-inflammatory M1 or M2 macrophages that help tumor development against the tumor. Tumor-associated macrophages (TAM) are associated with M2 macrophages. It is also known that TAMs are intensively found in many tumors and that the number of TAMs infiltrating the tumor environment is associated with a poor prognosis of the disease, and they also play a role in developing resistance to standard treatments. It has been reported that in GBM, TAMs are the immune cells that leak the most into the tumor environment. The conducted studies indicate that a correlation has been Deciphered between the presence of M2 macrophages in high-grade gliomas and the poor prognosis of the disease. It has also been shown that reprogrammed M1 macrophages suppress the growth of GBM cells, while M2 macrophages promote tumor growth and resistance to treatment. The ability of TAMs to be regulated by various cytokines or chemokines; it is anticipated that the development of new immunotherapies based on the creation of an environment that supports tumor development and progression and its relationship with resistance to treatment can improve clinical outcomes by blocking tumor progression and thus extending patient survival.

Tumor cells use anti-phagocytic pathways containing immune control points to escape the activation of the immune system. One of the "Don't Eat Me" signals, which is one of the escape mechanisms of the tumor cell from the immune system, is the binding of CD24, expressed by tumor cells, to Siglec10, expressed by macrophages. It is emphasized that CD24 may be the dominant immune checkpoint, especially in ovarian and breast cancer, and is a new and promising target for cancer immunotherapy. The interaction of CD24 with sialic acid binding Ig-like lectin 10 (SIGLEC10) activates tumor immune escape. High expression of CD24 has been associated with poor prognosis. The original value of the project is that it will be investigated for the first time the effects of CD24-specific MoAb, which the project coordinator has previously expressed, on the reactivation of macrophages, which play an important role in clearing GBM tumor cells.

The role of CD24-specific 12E9 MOAB, which the project manager had previously expressed, in the clearance of GBM tumor/stem cells was investigated.

The application of 12E9 monoclonal antibody caused M2(IL4) +U87CD24, M1 macrophage + U87WT, M1+ U87CD24, M0+ U87CD24 cells to perform more phagocytosis.

It has been determined for the first time that the 12E9 monoclonal antibody suppresses the Siglec10-CD24 “eat me effect” in M2 macrophage cells expressing Siglec87cd24 cells to further phagocytose Siglec10-CD24 cells.

Keywords: CD24, Glioblastoma Multiforme, M0/M1/M2 Macrophage, Temozolomide, Siglec10.

KAYNAKLAR

- AFFRONTI ML, HEERY CR, HERNDON JE, 2ND, RICH JN, REARDON DA, DESJARDINS A, FRIEDMAN HS. (2009). Overall survival of newly diagnosed glioblastoma patients receiving carmustine wafers followed by radiation and concurrent temozolomide plus rotational multiagent chemotherapy. *Cancer*, **115**(15): 3501-3511.
- AHMED MA, AL-ATTAR A, KIM J, WATSON NF, SCHOLEFIELD JH, DURRANT LG, ILYAS M. (2009). CD24 shows early upregulation and nuclear expression but is not a prognostic marker in colorectal cancer. *J Clin Pathol*, **62**(12): 1117-1122.
- AJAMI B, BENNETT JL, KRIEGER C, MCNAGNY KM,ROSSI FM. (2011). Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci*, **14**(9): 1142-1149.
- AKKARI L, BOWMAN RL, TESSIER J, KLEMM F, HANDGRAAF SM, DE GROOT M, JOYCE JA. (2020). Dynamic changes in glioma macrophage populations after radiotherapy reveal CSF-1R inhibition as a strategy to overcome resistance. *Sci Transl Med*, **12**(552).
- AL-HAJJ M, WICHA MS, BENITO-HERNANDEZ A, MORRISON SJ,CLARKE MF (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(7): 3983-3988.
- ALBERTS DS,HESS LM. (2005). *Fundamentals of cancer prevention*. Berlin ; New York: Springer.
- ALLIOT F, GODIN I, PESSAC B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res*, **117**(2): 145-152.
- ALTERMAN LA, CRISPE IN,KINNON C. (1990). Characterization of the murine heat-stable antigen: an hematolymphoid differentiation antigen defined by the J11d, M1/69 and B2A2 antibodies. *Eur J Immunol*, **20**(7): 1597-1602.
- ALTMANN C, KELLER S, SCHMIDT MHH. (2019). The Role of SVZ Stem Cells in Glioblastoma. *Cancers (Basel)*, **11**(4).
- ALVARADO AG, THIAGARAJAN PS, MULKEARNS-HUBERT EE, SILVER DJ, HALE JS, ALBAN TJ,LATHIA JD. (2017). Glioblastoma Cancer Stem Cells Evade Innate Immune Suppression of Self-Renewal through Reduced TLR4 Expression. *Cell Stem Cell*, **20**(4): 450-461 e454.

- ANDERSSON U, TRACEY KJ, YANG H. (2021). Post-Translational Modification of HMGB1 Disulfide Bonds in Stimulating and Inhibiting Inflammation. *Cells*, **10**(12).
- ANGATA T,VARKI A. (2002). Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev*, **102**(2): 439-469.
- AYOB AZ, RAMASAMY TS. (2018). Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci*, **25**(1): 20.
- AURER MA, MEYER L, BIANCHI M, TURNER HL, LE NPL, STECK M, HANGARTNER L. (2018). Glycosylation of Human IgA Directly Inhibits Influenza A and Other Sialic-Acid-Binding Viruses. *Cell Rep*, **23**(1): 90-99.
- AZIZI E, CARR AJ, PLITAS G, CORNISH AE, KONOPACKI C, PRABHAKARAN S,PE'ER D. (2018). Single-Cell Map of Diverse Immune Phenotypes in the Breast Tumor Microenvironment. *Cell*, **174**(5): 1293-1308 e1236.
- BAJETTO A, BARBIERI F, DORCARATTO A, BARBERO S, DAGA A, PORCILE C, FLORIO T. (2006). Expression of CXC chemokine receptors 1-5 and their ligands in human glioma tissues: role of CXCR4 and SDF1 in glioma cell proliferation and migration. *Neurochem Int*, **49**(5): 423-432.
- BAKEMA JE, VAN EGMOND M. (2011). The human immunoglobulin A Fc receptor Fc α RI: a multifaceted regulator of mucosal immunity. *Mucosal Immunol*, **4**(6): 612-624.
- BAKER BJ, AKHTAR LN, BENVENISTE EN. (2009). SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity. *Trends Immunol*, **30**(8): 392-400.
- BALANA C, VAZ MA, MANUEL SEPULVEDA J, MESIA C, DEL BARCO S, PINEDA E, CARRATO C. (2020). A phase II randomized, multicenter, open-label trial of continuing adjuvant temozolomide beyond 6 cycles in patients with glioblastoma (GEINO 14-01). *Neuro Oncol*, **22**(12): 1851-1861.
- BALDUCCI-SILANO PL, SUZUKI K, OHTA M, SAITO J, OHMORI M, MONTANI V, KOHN LD. (1998). Regulation of major histocompatibility (MHC) class II human leukocyte antigen-DR alpha gene expression in thyrocytes by single strand binding protein-1, a transcription factor that also regulates thyrotropin receptor and MHC class I gene expression. *Endocrinology*, **139**(5): 2300-2313.
- BAO S,WU Q, MCLENDON RE,HAO Y, SHI Q, HJELMELAND AB,RICH JN. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, **444**(7120): 756-760.

- BAR EE, LIN A,MAHAIRAKI V, MATSUI W,EBERHART CG. (2010). Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am J Pathol*, **177**(3): 1491-1502.
- BARBER TM,MCCARTHY MI,WASS JA,FRANKS S. (2006). Obesity and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **65**(2): 137-145.
- BARKAL AA, BREWER RE,MARKOVICM,KOWARSKY M,BARKAL SA,ZARO BW,WEISSMAN IL. (2019). CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy. *Nature*, **572**(7769): 392-396.
- BAUMANN M, KRAUSE M,HILL R. (2008). Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer*, **8**(7): 545-554.
- BELOUSOV A,TITOV S,SHVED N, GARBUZ M,MALYKIN G,GULAIA V,KUMEIKO V. (2019). The Extracellular Matrix and Biocompatible Materials in Glioblastoma Treatment. *Front Bioeng Biotechnol*, **7**: 341.
- BELTER A, BARCISZEWSKI J,BARCISZEWSKA AM. (2020). Revealing the epigenetic effect of temozolomide on glioblastoma cell lines in therapeutic conditions. *PLoS One*, **15**(2), e0229534.
- BHOWMIK A,KHAN R,GHOSH MK. (2015). Blood brain barrier: a challenge for effectual therapy of brain tumors. *Biomed Res Int*, **2015**, 320941.
- BIASOLI D,SOBRINHO MF, DA FONSECA, AC,DE MATOS, DG,ROMAO L, DE MORAES MACIEL R,LIMA F. R. (2014). Glioblastoma cells inhibit astrocytic p53-expression favoring cancer malignancy. *Oncogenesis*, **3**, e123.
- BISWAS SK,SICA A, LEWIS CE. (2008). Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol*, **180**(4): 2011-2017.
- BOCHNER BS. (2016). "Siglec"ting the allergic response for therapeutic targeting. *Glycobiology*, **26**(6): 546-552.
- BOMAN BM, WICHA MS. (2008). Cancer stem cells: a step toward the cure. *J Clin Oncol*, **26**(17): 2795-2799.
- BONNET D, Dick JE, (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, **3**(7): 730-737.
- BOSO D, RAMPAZZO E, ZANON C, BRESOLIN S, MAUL F, PORCU E, PERSANO L. (2019). HIF-1alpha/Wnt signaling-dependent control of gene transcription regulates neuronal differentiation of glioblastoma stem cells. *Theranostics*, **9**(17): 4860-4877.

- BOUGNAUD S, GOLEBIEWSKA A, OUDIN A, KEUNEN O, HARTER PN, MADER L, NICLOUS P. (2016). Molecular crosstalk between tumour and brain parenchyma instructs histopathological features in glioblastoma. *Oncotarget*, **7**(22): 31955-31971.
- BOWMAN R, KLEMM F, AKKARI L, PYONTECK, SEVENICH L, QUAIL DF, JOYCE JA. (2016). Macrophage Ontogeny Underlies Differences in Tumor-Specific Education in Brain Malignancies. *Cell Rep*, **17**(9): 2445-2459.
- BOYD NH, TRAN AN, BERNSTOCK JD, ETMINAN T, JONES AB, GILLESPIE GY, HJELMELAND AB. (2021). Glioma stem cells and their roles within the hypoxic tumor microenvironment. *Theranostics*, **11**(2): 665-683.
- BRANDENBURG S, MULLER A, TURKOWSKI K, RADEV YT, ROT S, SCHMIDT C, VAJKOCZY P. (2016). Resident microglia rather than peripheral macrophages promote vascularization in brain tumors and are source of alternative pro-angiogenic factors. *Acta Neuropathol*, **131**(3): 365-378.
- BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, SIEGEL RL, TORRE LA, JEMAL A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, **68**(6): 394-424.
- BRENNAN CW, VERHAAK RG, MCKENNA A, CAMPOS B, NOUSHMEHR H, SALAMA SR, NETWORK TR. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*, **155**(2): 462-477.
- BRIGLIADORI G, FOCA F, DALL'AGATA M, RENGUCCI C, MELEGARI E, CERASOLI S, FAEDI M. (2016). Defining the cutoff value of MGMT gene promoter methylation and its predictive capacity in glioblastoma. *J Neurooncol*, **128**(2): 333-339.
- BROEKMAN ML, MAAS SLN, ABELS ER, MEMPEL TR, KRICHEVSKY AM, BREAKEFIELD XO. (2018). Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nat Rev Neurol*, **14**(8): 482-495.
- BROWN MB, VON CHAMIER M, ALLAM AB, REYES L. (2014). M1/M2 macrophage polarity in normal and complicated pregnancy. *Front Immunol*, **5**: 606.
- BULL C, DEN BROK, MH, ADEMA GJ. (2014). Sweet escape: sialic acids in tumor immune evasion. *Biochim Biophys Acta*, **1846**(1): 238-246.
- BULL C, HEISE T, ADEMA GJ, BOLTJE TJ. (2016). Sialic Acid Mimetics to Target the Sialic Acid-Siglec Axis. *Trends Biochem Sci*, **41**(6): 519-531.

- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH N. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, **455**(7216): 1061-1068.
- CANTON J. (2014). Phagosome maturation in polarized macrophages. *J Leukoc Biol*, **96**(5): 729-738.
- CANTON J, NECULAI D, GRINSTEIN S. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol*, **13**(9): 621-634.
- CARDOSO AP, PINTO ML, PINTO AT, OLIVEIRA MI, PINTO MT, GONCALVES R, OLIVEIRA MJ. (2014). Macrophages stimulate gastric and colorectal cancer invasion through EGFR Y(1086), c-Src, Erk1/2 and Akt phosphorylation and smallGTPase activity. *Oncogene*, **33**(16): 2123-2133.
- CARTRON PF, HERVOUET E, DEBIEN E, OLIVIER C, POULIQUEN D, MENANTEAU J, VALLETTE FM (2012). Folate supplementation limits the tumourigenesis in rodent models of gliomagenesis. *Eur J Cancer*, **48**(15): 2431-2441.
- CASSETTA L, NOY R, SWIERCZAK A, SUGANO G, SMITH H, WIECHMANN L, POLLARD JW. (2016). Isolation of Mouse and Human Tumor-Associated Macrophages. *Adv Exp Med Biol*, **899**: 211-229.
- CASSETTA L, POLLARD JW. (2020). Tumor-associated macrophages. *Curr Biol*, **30**(6): 246-248.
- CASTRICONI R, DAGA A, DONDERO A, ZONA G, POLIANI PL, MELOTTI A, BOTTINO C. (2009). NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties. *J Immunol*, **182**(6): 3530-3539.
- CATALANO V, GAGGIANESI M, SPINA V, IOVINO F, DIELI F, STASSI G, TODARO M. (2011). Colorectal cancer stem cells and cell death. *Cancers (Basel)*, **3**(2): 1929-1946.
- CAVAILLON JM. (2011). The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *J Leukoc Biol*, **90**(3): 413-424.
- CHAKRAVARTI A, ZHAI G, SUZUKI Y, SARKESH S, BLACK PM, MUZIKANSKY A, LOEFFLER JS (2004). The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J Clin Oncol*, **22**(10): 1926-1933.
- CHANMEE T, ONTONG P, KONNO K, ITANO N. (2014). Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*, **6**(3): 1670-1690.

- CHARLES, NA, HOLLAND EC, GILBERTSON R, GLASS R, KETTENMANN H. (2011). The brain tumor microenvironment. *Glia*, **59**(8): 1169-1180.
- CHAVEZ-GALAN L, OLLEROS ML, VESIN D, GARCIA I. (2015). Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Front Immunol*, **6**: 263.
- CHEN GY, TANG J, ZHENG P, LIU Y. (2009). CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science*, **323**(5922): 1722-1725.
- CHEN H, SHI R, LUO B, YANG X, QIU L, XIONG J, WU Y. (2015). Macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma deficiency delays skin wound healing through impairing apoptotic cell clearance in mice. *Cell Death Dis*, **6**, e1597.
- CHEN X, VARKI A. (2010). Advances in the biology and chemistry of sialic acids. *ACS Chem Biol*, **5**(2): 163-176.
- CHEN X, ZHANG L, ZHANG IY, LIANG J, WANG H, OUYANG M, BADIE B. (2014). RAGE expression in tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in glioma. *Cancer Res*, **74**(24): 7285-7297.
- CHEN Z, FENG X, HERTING C J, GARCIA VA, NIE K, PONG WW, HAMBARDZUMYAN D. (2017). Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma. *Cancer Res*, **77**(9): 2266-2278.
- CHENG L, HUANG Z, ZHOU W, WU Q, DONNOLA S, LIU JK, BAO S. (2013). Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell*, **153**(1): 139-152.
- CHINTALA SK, SAWAYA R, GOKASLAN ZL, FULLER G, RAO JS. (1996). Immunohistochemical localization of extracellular matrix proteins in human glioma, both in vivo and in vitro. *Cancer Lett*, **101**(1): 107-114.
- CHIOREAN R, BERINDAN-NEAGOE I, BRAICU C, FLORIAN IS, LEUCUTA D, CRISAN D, CERNEA V. (2014). Quantitative expression of serum biomarkers involved in angiogenesis and inflammation, in patients with glioblastoma multiforme: correlations with clinical data. *Cancer Biomark*, **14**(2-3): 185-194.
- CHOI YL, KIM SH, SHIN YK, HONG YC, LEE SJ, KANG SY, AHN G. (2005). Cytoplasmic CD24 expression in advanced ovarian serous borderline tumors. *Gynecol Oncol*, **97**(2): 379-386.
- CHOW A, BROWN BD, MERAD M. (2011). Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat Rev Immunol*, **11**(11): 788-798.

- CHRISTENSEN JE, ANDREASEN SO, CHRISTENSEN JP, THOMSEN AR. (2001). CD11b expression as a marker to distinguish between recently activated effector CD8(+) T cells and memory cells. *Int Immunol*, **13**(4): 593-600.
- CHRISTENSEN K, SCHRODER HD, KRISTENSEN BW. (2008). CD133 identifies perivascular niches in grade II-IV astrocytomas. *J Neurooncol*, **90**(2): 157-170.
- CHRISTMANN M, NAGEL G, HORN S, KRAHN U, WIEWRODT D, SOMMER C, KAINA B. (2010). MGMT activity, promoter methylation and immunohistochemistry of pretreatment and recurrent malignant gliomas: a comparative study on astrocytoma and glioblastoma. *Int J Cancer*, **127**(9): 2106-2118.
- CLEVERS H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med*, **17**(3): 313-319.
- COLE AJ, FAYOMI A P, ANYAECHE VI, BAI S, BUCKANOVICH RJ. (2020). An evolving paradigm of cancer stem cell hierarchies: therapeutic implications. *Theranostics*, **10**(7): 3083-3098.
- CONDEELIS J, POLLARD JW. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*, **124**(2): 263-266.
- COUSSENS LM, ZITVOGEL L, PALUCKA AK. (2013). Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science*, **339**(6117): 286-291.
- CROCKER PR, PAULSON JC, VARKI A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol*, **7**(4): 255-266.
- CUDDAPAH VA, ROBEL S, WATKINS S, SONTHEIMER H. (2014). A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci*, **15**(7): 455-465.
- DA FONSECA AC, BADIE B. (2013). Microglia and macrophages in malignant gliomas: recent discoveries and implications for promising therapies. *Clin Dev Immunol*, 264124.
- DALY J, CARLSTEN M, O'DWYER M. (2019). Sugar Free: Novel Immunotherapeutic Approaches Targeting Siglecs and Sialic Acids to Enhance Natural Killer Cell Cytotoxicity Against Cancer. *Front Immunol*, **10**: 1047.
- DAMBUZA IM, BROWN GD. (2015). C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr Opin Immunol*, **32**: 21-27.
- DANSON SJ, MIDDLETON MR. (2001). Temozolomide: a novel oral alkylating agent. *Expert Rev Anticancer Ther*, **1**(1): 13-19.

- DAVIS ME. (2016). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs*, **20**(5): 2-8.
- DE GOOIJER MC, GUILLEN NAVARRO M, BERNARDS R, WURDINGER T, VAN TELLINGEN O. (2018). An Experimenter's Guide to Glioblastoma Invasion Pathways. *Trends Mol Med*, **24**(9): 763-780.
- DECORDOVA S, SHASTRI A, TSOLAKI AG, YASMIN H, KLEIN L, SINGH SK, KISHORE U. (2020). Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma. *Front Immunol*, **11**: 1402.
- DEMUTH T, BERENS ME. (2004). Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol*, **70**(2): 217-228.
- DEORAH S, LYNCH CF, SIBENALLER ZA, RYKEN TC. (2006). Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001. *Neurosurg Focus*, **20**(4): E1.
- DESJARDINS M. (1995). Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol*, **5**(5): 183-186.
- DI TOMASO T, MAZZOLENI S, WANG E, SOVENA G, CLAVENNA D, FRANZIN A, MACCALLI C. (2010). Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clin Cancer Res*, **16**(3): 800-813.
- DIETERICH LC, MELLBERG S, LANGENKAMP E, ZHANG L, ZIEBA A, SALOMAKI H, DIMBERG A. (2012). Transcriptional profiling of human glioblastoma vessels indicates a key role of VEGF-A and TGFbeta2 in vascular abnormalization. *J Pathol*, **228**(3): 378-390.
- DINCA EB, LU KV, SARKARIA JN, PIEPER RO, PRADOS MD, HAAS-KOGAN DA, JAMES CD. (2008). p53 Small-molecule inhibitor enhances temozolomide cytotoxic activity against intracranial glioblastoma xenografts. *Cancer Res*, **68**(24): 10034-10039.
- DIOGO MM, DA SILVA CL, CABRAL JM. (2012). Separation technologies for stem cell bioprocessing. *Biotechnol Bioeng*, **109**(11): 2699-2709.
- DONG Z, ZHANG G, QU M, GIMPLE RC, WU Q, QIU Z, RICH, J. N. (2019). Targeting Glioblastoma Stem Cells through Disruption of the Circadian Clock. *Cancer Discov*, **9**(11): 1556-1573.
- DOUGAN M, DRANOFF G. (2009). Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol*, **27**: 83-117.

- DRIESSENS G, KLINE J, GAJEWSKI TF. (2009). Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol Rev*, **229**(1): 126-144.
- DROPCHO EJ, SOONG SJ. (1996). The prognostic impact of prior low grade histology in patients with anaplastic gliomas: a case-control study. *Neurology*, **47**(3): 684-690.
- DU R, LU KV, PETRITSCH C, LIU P, GANSS R, PASSEGUE E, BERGERS G. (2008). HIF1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell*, **13**(3): 206-220.
- DUAN S, PAULSON JC. (2020). Siglecs as Immune Cell Checkpoints in Disease. *Annu Rev Immunol*, **38**: 365-395.
- DUBOIS LG, CAMPANATI L, RIGHY C, D'ANDREA-MEIRA I, SPOHR TC, PORTO-CARREIRO I, MOURA-NETO V. (2014). Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. *Front Cell Neurosci*, **8**: 418.
- ELLERT-MIKLASZEWSKA A, DABROWSKI M, LIPKO M, SLIWA M, MALESZEWSKA M, KAMINSKA B. (2013). Molecular definition of the pro-tumorigenic phenotype of glioma-activated microglia. *Glia*, **61**(7): 1178-1190.
- ELLERT-MIKLASZEWSKA A, WISNIEWSKI P, KIJEWSKA M, GAJDANOWICZ P, PSZCZOLKOWSKA D, PRZANOWSKI P, KAMINSKA B. (2016). Tumour-processed osteopontin and lactadherin drive the protumorigenic reprogramming of microglia and glioma progression. *Oncogene*, **35**(50): 6366-6377.
- ESCAMILLA-RAMIREZ A, CASTILLO-RODRIGUEZ RA, ZAVALA-VEGA S, JIMENEZ-FARFAN D, ANAYA-RUBIO I, BRISENO E, TREJO-SOLIS C. (2020). Autophagy as a Potential Therapy for Malignant Glioma. *Pharmaceuticals (Basel)*, **13**(7).
- ESTELLER M, GARCIA-FONCILLAS J, ANDION E, GOODMAN SN, HIDALGO OF, VANACLOCHA V, HERMAN JG. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*, **343**(19): 1350-1354.
- ESTELLER M, HAMILTON SR, BURGER PC, BAYLIN SB, HERMAN JG. (1999). Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*, **59**(4): 793-797.
- ETZERODT A, TSALKITZI K, MANIECKI M, DAMSKY W, DELFINI M, BAUDOIN E, LAWRENCE T. (2019). Specific targeting of CD163(+) TAMs mobilizes inflammatory monocytes and promotes T cell-mediated tumor regression. *J Exp Med*, **216**(10): 2394-2411.

- EYVAZI S,KAZEMI B, DASTMALCHI S, BANDEHPOUR M. (2018). Involvement of CD24 in Multiple Cancer Related Pathways Makes It an Interesting New Target for Cancer Therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, **18**(4): 328-336.
- FACOETTI A,NANO R, ZELINI P, MORBINI P, BENERICETTI E, CERONI M,FERRONE S. (2005). Human leukocyte antigen and antigen processing machinery component defects in astrocytic tumors. *Clin Cancer Res*, **11**(23): 8304-8311.
- FAN QM, JING YY, YU GF,KOU,XR, YE F, GAO L, WEI LX. (2014). Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, **352**(2): 160-168.
- FAN X, XIONG Y,WANG Y. (2019). A reignited debate over the cell(s) of origin for glioblastoma and its clinical implications. *Front Med*, **13**(5): 531-539.
- FANG X, ZHENG P, TANG J,LIU Y .(2010). CD24: from A to Z. *Cell Mol Immunol*, **7**(2): 100-103.
- FANTINI MC, BECKER C, MONTELEONE G, PALLONE F, GALLE PR,NEURATH MF. (2004). Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol*, **172**(9): 5149-5153.
- FARKONA S,DIAMANDIS EP, BLASUTIG IM. (2016). Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med*, **14**: 73.
- FEARON ER,HAMILTON SR,VOGELSTEIN B. (1987). Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science*, **238**(4824): 193-197.
- FERREYRA SOLARI NE,BELFORTE FS, CANEDO L, VIDELA-RICHARDSON GA,ESPINOSA JM, ROSSI M, PEREZ-CASTRO C. (2016). The NSL Chromatin-Modifying Complex Subunit KANSL2 Regulates Cancer Stem-like Properties in Glioblastoma That Contribute to Tumorigenesis. *Cancer Res*, **76**(18): 5383-5394.
- FIDLER IJ,HART IR. (1982). Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science*, **217**(4564): 998-1003.
- FIDLER IJ,KRIPKE ML. (1977). Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*, **197**(4306): 893-895.
- FISHER R, PUSZTAI L,SWANTON C. (2013). Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer*, **108**(3): 479-485.

- FLANNAGAN RS, JAUMOUILLE V,GRINSTEIN S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol*, **7**: 61-98.
- FLORES R,ZHANG P, WU W,WANG X, YE P,ZHENG P,LIU Y. (2019). Siglec genes confer resistance to systemic lupus erythematosus in humans and mice. *Cell Mol Immunol*, **16**(2): 154-164.
- FORGIONE RE, DI CARLUCCIO C, GUZMAN-CALDENTY J, GAGLIONE R, BATTISTA F, CHIODO F, SILIPO A. (2020). Unveiling Molecular Recognition of Sialoglycans by Human Siglec-10. *iScience*, **23**(8): 101401.
- FRANK NY, SCHATTON T,FRANK MH. (2010). The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest*, **120**(1): 41-50.
- FRANKLIN RA,LIAO W,SARKAR A, KIM MV,BIVONA MR,LIU K, LI MO. (2014). The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science*, **344**(6186): 921-925.
- FRASCHILLA I,PILLAI S. (2017). Viewing Siglecs through the lens of tumor immunology. *Immunol Rev*, **276**(1): 178-191.
- FREEMAN SA,GOYETTE J,FURUYA W, WOODS EC, BERTOZZI CR,BERGMEIER W,GRINSTEIN S. (2016). Integrins Form an Expanding Diffusional Barrier that Coordinates Phagocytosis. *Cell*, **164**(1-2): 128-140.
- FREEMAN SA,GRINSTEIN S. (2014). Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol Rev*, **262**(1): 193-215. doi:10.1111/imr.12212
- FRIEDMANN-MORVINSKI D,BUSHONG EA, KE E, SODA Y, MARUMOTO T, SINGER O,VERMA IM. (2012). Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science*, **338**(6110): 1080-1084.
- FRIESE MA,PLATTEN M, LUTZ SZ, NAUMANN U, AULWURM S, BISCHOF F,WELLER M. (2003). MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. *Cancer Res*, **63**(24): 8996-9006.
- FU B, TIAN Z,WEI H. (2014). Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology*, **141**(4): 483-489.
- FU D, CALVO JA,SAMSON LD. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer*, **12**(2): 104-120.
- GAGLIANO N,COSTA F,COSSETTI C, PETTINARI L, BASSI R, CHIRIVA-INTERNATI M, PLUCHINO S. (2009). Glioma-astrocyte interaction modifies the astrocyte phenotype in a co-culture experimental model. *Oncol Rep*, **22**(6): 1349-1356.

- GANZ T. (2012). Macrophages and systemic iron homeostasis. *J Innate Immun*, **4**(5-6): 446-453.
- GERLINGER M, SWANTON C. (2010). How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *Br J Cancer*, **103**(8): 1139-1143.
- GERMIC N, FRANGEZ Z, YOUSEFI S, SIMON HU. (2019). Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation. *Cell Death Differ*, **26**(4): 715-727.
- GERSON SL. (2004). MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*, **4**(4): 296-307.
- GILBERT CA, ROSS AH. (2009). Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies. *J Cell Biochem*, **108**(5): 1031-1038.
- GILBERT MR, WANG M, ALDAPE KD, STUPP R, HEGI ME, JAECKLE KA, MEHTA MP. (2013). Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. *J Clin Oncol*, **31**(32): 4085-4091.
- GIMPLE RC, BHARGAVA S, DIXIT D, RICH JN. (2019). Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. *Genes Dev*, **33**(11-12): 591-609.
- GIUSTI I, DELLE MONACHE S, DI FRANCESCO M, SANITA P, D'ASCENZO S, GRAVINA GL, DOLO V. (2016). From glioblastoma to endothelial cells through extracellular vesicles: messages for angiogenesis. *Tumour Biol*, **37**(9): 12743-12753.
- GJORGJEVSKI M, HANNEN R, CARL B, LI Y, LANDMANN E, BUCHHOLZ M, NIMSKY C. (2019). Molecular profiling of the tumor microenvironment in glioblastoma patients: correlation of microglia/macrophage polarization state with metalloprotease expression profiles and survival. *Biosci Rep*, **39**(6).
- GLADSON CL. (1999). The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function. *J Neuropathol Exp Neurol*, **58**(10): 1029-1040.
- GOLDAR S, KHANIANI MS, DERAKHSHAN SM, BARADARAN B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, **16**(6): 2129-2144.
- GOODENBERGER ML, JENKINS RB. (2012). Genetics of adult glioma. *Cancer Genet*, **205**(12): 613-621.
- GORDON S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, **3**(1): 23-35.

- GORDON S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*, **44**(3): 463-475.
- GORDON S, MARTINEZ FO. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, **32**(5): 593-604.
- GORDON S, TAYLOR PR. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, **5**(12): 953-964.
- GOSWAMI S, WALLE T, CORNISH A. E, BASU S, ANANDHAN S, FERNANDEZ I, SHARMA P. (2020). Immune profiling of human tumors identifies CD73 as a combinatorial target in glioblastoma. *Nat Med*, **26**(1): 39-46.
- GRIVENNIKOV SI, GRETEN FR, KARIN M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, **140**(6): 883-899.
- GUO X, XUE H, SHAO Q, WANG J, GUO X, CHEN X, LI G. (2016). Hypoxia promotes glioma-associated macrophage infiltration via periostin and subsequent M2 polarization by upregulating TGF-beta and M-CSFR. *Oncotarget*, **7**(49): 80521-80542.
- HALEY EM, KIM Y. (2014). The role of basic fibroblast growth factor in glioblastoma multiforme and glioblastoma stem cells and in their in vitro culture. *Cancer Lett*, **346**(1): 1-5.
- HAM SW, JEON HY, JIN X, KIM EJ, KIM JK, SHIN YJ, KIM H. (2019). TP53 gain-of-function mutation promotes inflammation in glioblastoma. *Cell Death Differ*, **26**(3): 409-425.
- HAMBARDZUMYAN D, GUTMANN DH, KETTENMANN H. (2016). The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci*, **19**(1): 20-27.
- HANAHAN D, WEINBERG RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**(1): 57-70.
- HANAHAN D, WEINBERG RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**(5): 646-674.
- HANSEN RJ, NAGASUBRAMANIAN R, DELANEY SM, SAMSON LD, DOLAN ME. (2007). Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in protecting from alkylating agent-induced toxicity and mutations in mice. *Carcinogenesis*, **28**(5): 1111-1116.
- HAQUE A, MORIYAMA M, KUBOTA K, ISHIGURO N, SAKAMOTO M, CHINJU A, NAKAMURA S. (2019). CD206(+) tumor-associated

macrophages promote proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma via EGF production. *Sci Rep*, **9**(1): 14611.

HARDER BG,BLOMQUIST MR,WANG J, KIM AJ,WOODWORTH GF, WINKLES JA, TRAN NL. (2018). Developments in Blood-Brain Barrier Penetrance and Drug Repurposing for Improved Treatment of Glioblastoma. *Front Oncol*, **8**: 462.

HATANPAA KJ, BURMA S, ZHAO D, HABIB AA. (2010). Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia*, **12**(9): 675-684.

HE F, BORCHERDS W, SONG T, WEI X, DAS M, CHEN L, CHEN J. (2019). Interaction between p53 N terminus and core domain regulates specific and nonspecific DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **116**(18): 8859-8868.

HEGI ME, DISERENS AC, GODARD S, DIETRICH PY, REGLI L, OSTERMANN S, STUPP R. (2004). Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res*, **10**(6): 1871-1874.

HEGI ME, DISERENS AC, GORLIA T, HAMOU MF, DE TRIBOLET N,WELLER M, STUPP R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, **352**(10): 997-1003.

HEGI ME, LIU L, HERMAN JG, STUPP R, WICK W, WELLER M, GILBERT MR. (2008). Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol*, **26**(25): 4189-4199.

HENRIK HEILAND D, RAVI VM, BEHRINGER SP, FRENKING JH, WURM J, JOSEPH K,SCHNELL O. (2019). Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. *Nat Commun*, **10**(1): 2541.

HEPPNER GH. (1984). Tumor heterogeneity. *Cancer Res*, **44**(6): 2259-2265.

HERRLINGER U, TZARIDIS T, MACK F, STEINBACH J P, SCHLEGEL U, SABEL M, NEUROONCOLOGY WORKING GROUP OF THE GERMAN CANCER, S. (2019). Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, **393**(10172): 678-688.

HERVOUET E, DEBIEN E, CAMPION L, CHARBORD J, MENANTEAU J, VALLETTE FM,CARTRON PF. (2009). Folate supplementation limits the aggressiveness of glioma via the remethylation of DNA repeats element and

- genes governing apoptosis and proliferation. *Clin Cancer Res*, **15**(10): 3519-3529.
- HINSHAW DC, SHEVDE LA. (2019). The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res*, **79**(18): 4557-4566.
- HIRA V V V, WORMER JR, KAKAR H, BREZNIK B, VAN DER SWAAN B, HULSBOS R, VAN NOORDEN CJF. (2018). Periarteriolar Glioblastoma Stem Cell Niches Express Bone Marrow Hematopoietic Stem Cell Niche Proteins. *J Histochem Cytochem*, **66**(3): 155-173.
- HIRAYAMA D, IIDA T, NAKASE H. (2017). The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *Int J Mol Sci*, **19**(1).
- HO IAW, SHIM WSN. (2017). Contribution of the Microenvironmental Niche to Glioblastoma Heterogeneity. *Biomed Res Int*, **2017**.
- HOEFFEL G, GINHOUX F. (2015). Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Front Immunol*, **6**:486.
- HOLLAND EC. (2001). Progenitor cells and glioma formation. *Curr Opin Neurol*, **14**(6): 683-688.
- HORING E, HARTER PN, SEZNEC J, SCHITTENHELM J, BUHRING HJ, BHATTACHARYYA S, NAUMANN U. (2012). The "go or grow" potential of gliomas is linked to the neuropeptide processing enzyme carboxypeptidase E and mediated by metabolic stress. *Acta Neuropathol*, **124**(1): 83-97.
- HUANG S, VAN ARSDALL M, TEDJARATI S, MCCARTY M, WU W, LANGLEY R, FIDLER IJ. (2002). Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice. *J Natl Cancer Inst*, **94**(15): 1134-1142.
- HUSSAIN SF, YANG D, SUKI D, ALDAPE K, GRIMM E, HEIMBERGER AB. (2006). The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro Oncol*, **8**(3): 261-279.
- HUSSELL T, BELL TJ. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol*, **14**(2): 81-93.
- HVIDBERG V, MANIECKI MB, JACOBSEN C, HOJRUP P, MOLLER HJ, MOESTRUP SK. (2005). Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood*, **106**(7): 2572-2579.
- INDA MM, FAN X, MUNOZ J, PEROT C, FAUVET D, DANGLOT G, CASTRESANA JS. (2003). Chromosomal abnormalities in human

glioblastomas: gain in chromosome 7p correlating with loss in chromosome 10q. *Mol Carcinog*, **36**(1): 6-14.

IRANZO J, MARTINCORENA I, KOONIN EV. (2018). Cancer-mutation network and the number and specificity of driver mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **115**(2): E6010-E6019.

ISLAM F, GOPALAN V, SMITH RA, LAM AK. (2015). Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in cancer recurrence and cancer treatment. *Exp Cell Res*, **335**(1): 135-147.

IWASAKI A, MEDZHITOV R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*, **16**(4): 343-353.

JACKSON S, ELALI A, VIRGINTINO D, GILBERT MR. (2017). Blood-brain barrier pericyte importance in malignant gliomas: what we can learn from stroke and Alzheimer's disease. *Neuro Oncol*, **19**(9): 1173-1182.

JANEWAY CA, JR, MEDZHITOV R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, **20**: 197-216.

JIANG G, LI LT, XIN Y, ZHANG L, LIU Y Q, ZHENG JN. (2012). Strategies to improve the killing of tumors using temozolomide: targeting the DNA repair protein MGMT. *Curr Med Chem*, **19**(23): 3886-3892.

JINUSHI M, CHIBA S, YOSHIYAMA H, MASUTOMI K, KINOSHITA I, DOSAKA-AKITA H, TAHARA H. (2011). Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**(30): 12425-12430.

JOHANSEN MD, ROCHAT P, LAW I, SCHEIE D, POULSEN HS, MUHIC A. (2016). Presentation of Two Cases with Early Extracranial Metastases from Glioblastoma and Review of the Literature. *Case Rep Oncol Med*, **2016**, 8190950.

JORDAN CT, GUZMAN ML, NOBLE M. (2006). Cancer stem cells. *N Engl J Med*, **355**(12): 1253-1261.

JOVCEVSKA I. (2019). Genetic secrets of long-term glioblastoma survivors. *Bosn J Basic Med Sci*, **19**(2): 116-124.

KAINA, B., CHRISTMANN, M., NAUMANN, S., & ROOS, W. P. (2007). MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)*, **6**(8): 1079-1099.

KANZAWA T, BEDWELL J, KONDO Y, KONDO S, GERMANO IM. (2003). Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide. *J Neurosurg*, **99**(6): 1047-1052.

- KARAYAN-TAPON L, QUILLIEN V, GUILHOT J, WAGER M, FROMONT G, SAIKALI S, GRATAS-RABBIA-RE C. (2010). Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *J Neurooncol*, **97**(3): 311-322.
- KARP CL, MURRAY PJ. (2012). Non-canonical alternatives: what a macrophage is 4. *J Exp Med*, **209**(3): 427-431.
- KASTENHUBER ER, LOWE SW. (2017). Putting p53 in Context. *Cell*, **170**(6): 1062-1078.
- KATHAGEN-BUHMANN A, SCHULTE A, WELLER J, HOLZ M, HEROLD-MENDE C, GLASS R, LAMSZUS K. (2016). Glycolysis and the pentose phosphate pathway are differentially associated with the dichotomous regulation of glioblastoma cell migration versus proliferation. *Neuro Oncol*, **18**(9): 1219-1229.
- KAWAI T, AKIRA S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, **34**(5): 637-650.
- KEPPLER OT, HINDERLICH S, LANGNER J, SCHWARTZ-ALBIEZ R, REUTTER W, PAWLITA M. (1999). UDP-GlcNAc 2-epimerase: a regulator of cell surface sialylation. *Science*, **284**(5418): 1372-1376.
- KIGERL KA, GENSEL JC, ANKENY DP, ALEXANDER JK, DONNELLY DJ, POPOVICH PG. (2009). Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci*, **29**(43): 13435-13444.
- KILLELA PJ, REITMAN ZJ, JIAO Y, BETTEGOWDA C, AGRAWAL N, DIAZ LA, YAN H. (2013). TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**(15): 6021-6026.
- KIM BYS, JIANG W, BEIKO J, PRABHU SS, DEMONTE F, GILBERT MR, MCCUTCHEON IE. (2014). Diagnostic discrepancies in malignant astrocytoma due to limited small pathological tumor sample can be overcome by IDH1 testing. *J Neurooncol*, **118**(2): 405-412.
- KIM J, BAE JS. (2016). Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediators Inflamm*, **2016**, 6058147.
- KIM SJ, LEE HJ, KIM MS, CHOI HJ, HE J, WU Q, FIDLER IJ. (2015). Macitentan, a Dual Endothelin Receptor Antagonist, in Combination with Temozolomide Leads to Glioblastoma Regression and Long-term Survival in Mice. *Clin Cancer Res*, **21**(20): 4630-4641.

- KIOI M, VOGEL H, SCHULTZ G, HOFFMAN RM, HARSH GR, BROWN JM. (2010). Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J Clin Invest*, **120**(3): 694-705.
- KLAUS C, LIAO H, ALLENDORF DH, BROWN GC, NEUMANN H. (2021). Sialylation acts as a checkpoint for innate immune responses in the central nervous system. *Glia*, **69**(7): 1619-1636.
- KLEMM F, MAAS RR, BOWMAN RL, KORNETE M, SOUKUP K, NASSIRI S, JOYCE JA. (2020). Interrogation of the Microenvironmental Landscape in Brain Tumors Reveals Disease-Specific Alterations of Immune Cells. *Cell*, **181**(7): 1643-1660.
- KRISTIANSEN G, SAMMAR M, ALTEVOGT P. (2004). Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol*, **35**(3): 255-262.
- KWON MJ, HAN J, SEO JH, SONG K, JEONG HM, CHOI JS, SHIN YK. (2015). CD24 Overexpression Is Associated with Poor Prognosis in Luminal A and Triple-Negative Breast Cancer. *PLoS One*, **10**(10), e0139112.
- LATHIA JD, MACK SC, MULKEARNS-HUBERT EE, VALENTIM CL, RICH JN. (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev*, **29**(12): 1203-1217.
- LAU LW, CUA R, KEOUGH MB, HAYLOCK-JACOBS S, YONG VW. (2013). Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination. *Nat Rev Neurosci*, **14**(10): 722-729.
- LAWRENCE T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **1**(6), a001651.
- LAWRENCE T, NATOLI G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol*, **11**(11): 750-761.
- LE DM, BESSON A, FOGG DK, CHOI KS, WAISMAN DM, GOODYER CG, YONG VW. (2003). Exploitation of astrocytes by glioma cells to facilitate invasiveness: a mechanism involving matrix metalloproteinase-2 and the urokinase-type plasminogen activator-plasmin cascade. *J Neurosci*, **23**(10): 4034-4043.
- LECHNER M, LIRK P, RIEDER J. (2005). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol*, **15**(4): 277-289.
- LEE CG, HOMER RJ, ZHU Z, LANONE S, WANG X, KOTELIANSKY V, ELIAS JA. (2001). Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med*, **194**(6): 809-821.

- LEE HJ, HANIBUCHI M, KIM SJ, YU H, KIM MS, HE J, FIDLER IJ. (2016). Treatment of experimental human breast cancer and lung cancer brain metastases in mice by macitentan, a dual antagonist of endothelin receptors, combined with paclitaxel. *Neuro Oncol*, **18**(4): 486-496.
- LEE JH, KIM SH, LEE ES, KIM YS. (2009). CD24 overexpression in cancer development and progression: a meta-analysis. *Oncol Rep*, **22**(5): 1149-1156.
- LEE S, JILANI SM, NIKOLOVA GV, CARPIZO D, IRUELA-ARISPE ML. (2005). Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol*, **169**(4): 681-691.
- LEE YR, CHEN M, PANDOLFI PP. (2018). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **19**(9): 547-562.
- LEFRANC F, BROTCHE J, KISS R. (2005). Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol*, **23**(10): 2411-2422.
- LENDECKEL U, VENZ S, WOLKE C. (2022). Macrophages: shapes and functions. *ChemTexts*, **8**(2): 12.
- LEVIN R, GRINSTEIN S, CANTON J. (2016). The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunol Rev*, **273**(1): 156-179.
- LI C, XU X, WEI S, JIANG P, XUE L, WANG J, SENIOR C. (2021). Tumor-associated macrophages: potential therapeutic strategies and future prospects in cancer. *J Immunother Cancer*, **9**(1).
- LI K, UNDERHILL DM. (2020). C-Type Lectin Receptors in Phagocytosis. *Curr Top Microbiol Immunol*, **429**: 1-18.
- LI RE, VAN VLIET SJ, VAN KOOYK Y. (2018). Using the glycan toolbox for pathogenic interventions and glycan immunotherapy. *Curr Opin Biotechnol*, **51**: 24-31.
- LI S, XU F, ZHANG J, WANG L, ZHENG Y, WU X, LAI M. (2018). Tumor-associated macrophages remodeling EMT and predicting survival in colorectal carcinoma. *Oncoimmunology*, **7**(2): e1380765.
- Li W, Graeber MB. (2012). The molecular profile of microglia under the influence of glioma. *Neuro Oncol*, **14**(8): 958-978.
- LI Y, GUESSOUS F, KWON S, KUMAR M, IBIDAPO O, FULLER L, ABOUNADER R. (2008). PTEN has tumor-promoting properties in the setting of gain-of-function p53 mutations. *Cancer Res*, **68**(6): 1723-1731.

- LIDDELOW SA, BARRES BA. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, **46**(6): 957-967.
- LIM SC. (2005). CD24 and human carcinoma: tumor biological aspects. *Biomed Pharmacother*, **59**: 351-354.
- LING EA, WONG WC. (1993). The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*, **7**(1): 9-18.
- LIU C, SAGE JC, MILLER MR, VERHAAK RG, HIPPENMEYER S, VOGEL H, ZONG H. (2011). Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell*, **146**(2): 209-221.
- LIU X, LIU Y, QI Y, HUANG Y, HU F, DONG F, LEI T. (2022). Signal Pathways Involved in the Interaction Between Tumor-Associated Macrophages/TAMs and Glioblastoma Cells. *Front Oncol*, **12**, 822085.
- LIU YC, ZOU XB, CHAI YF, YAO YM. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int J Biol Sci*, **10**(5): 520-529.
- LO CM, WANG HB, DEMBO M, WANG YL. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*, **79**(1): 144-152.
- LOEB LA. (2011). Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. *Nat Rev Cancer*, **11**(6): 450-457.
- LOTTAZ C, BEIER D, MEYER K, KUMAR P, HERMANN A, SCHWARZ J, BEIER CP. (2010). Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer Res*, **70**(5): 2030-2040.
- LOUIS DN. (2012). The next step in brain tumor classification: "Let us now praise famous men"... or molecules? *Acta Neuropathol*, **124**(6): 761-762.
- LOUIS DN, OHGAKI H, WIESTLER OD, CAVENEE WK, BURGER PC, JOUVET A, KLEIHUES P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, **114**(2): 97-109.
- LOUIS DN, PERRY A, REIFENBERGER G, VON DEIMLING A, FIGARELLA-BRANGER D, CAVENEE WK, ELLISON DW. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, **131**(6): 803-820.
- LU-EMERSON C, SNUDERL M, KIRKPATRICK ND, GOVEIA J, DAVIDSON C, HUANG Y, JAIN RK. (2013). Increase in tumor-associated macrophages after antiangiogenic therapy is associated with poor survival among patients with recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol*, **15**(8): 1079-1087.

- LU C, WARD PS, KAPOOR GS, ROHLE D, TURCAN S, ABDEL-WAHAB O, THOMPSON CB. (2012). IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*, **483**(7390): 474-478.
- LU DY, LEUNG YM, CHEUNG CW, CHEN YR, WONG KL. (2010). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces cell migration and matrix metalloproteinase-13 expression in glioma cells. *Biochem Pharmacol*, **80**(8): 1201-1209.
- LUBBERS J, RODRIGUEZ E, VAN KOOYK Y. (2018). Modulation of Immune Tolerance via Siglec-Sialic Acid Interactions. *Front Immunol*, **9**: 2807.
- LUKASHCHUK N, VOUSDEN KH. (2007). Ubiquitination and degradation of mutant p53. *Mol Cell Biol*, **27**(23): 8284-8295.
- MA J, LIU L, CHE G, YU N, DAI F, YOU Z. (2010). The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer*, **10**: 112.
- MACAULEY MS, CROCKER PR, PAULSON JC. (2014). Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat Rev Immunol*, **14**(10): 653-666.
- MAHESPARAN R, READ TA, LUND-JOHANSEN M, SKAFTNESMO KO, BJERKVIG R, ENGBRAATEN O. (2003). Expression of extracellular matrix components in a highly infiltrative in vivo glioma model. *Acta Neuropathol*, **105**(1): 49-57.
- MAJORES M, SCHINDLER A, FUCHS A, STEIN J, HEUKAMP L, ALTEVOGT P, KRISTIANSEN G. (2015). Membranous CD24 expression as detected by the monoclonal antibody SWA11 is a prognostic marker in non-small cell lung cancer patients. *BMC Clin Pathol*, **15**: 19.
- MANSOURI A, HACHEM LD, MANSOURI S, NASSIRI F, LAPERRIERE NJ, XIA D, ZADEH G. (2019). MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro Oncol*, **21**(2): 167-178.
- MANTOVANI A, SAVINO B, LOCATI M, ZAMMATARO L, ALLAVENA P, BONECCHI R. (2010). The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, **21**(1): 27-39.
- MANTOVANI A, SICA A, SOZZANI S, ALLAVENA P, VECCHI A, LOCATI M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, **25**(12): 677-686.

- MARKOVIC DS, GLASS R, SYNOWITZ M, ROOIJEN N, KETTENMANN H. (2005). Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2. *J Neuropathol Exp Neurol*, **64**(9): 754-762.
- MARTINEZ FO, GORDON S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, **6**: 13.
- MATARREDONA ER, PASTOR AM. (2019a). Extracellular Vesicle-Mediated Communication between the Glioblastoma and Its Microenvironment. *Cells*, **9**(1).
- MATARREDONA ER, PASTOR AM. (2019b). Neural Stem Cells of the Subventricular Zone as the Origin of Human Glioblastoma Stem Cells. Therapeutic Implications. *Front Oncol*, **9**, 779.
- MAYO LD, DIXON JE, DURDEN DL, TONKS NK, DONNER DB. (2002). PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *J Biol Chem*, **277**(7): 5484-5489.
- MCALEENAN A, KELLY C, SPIGA F, KERNOHAN A, CHENG HY, DAWSON S, KURIAN KM. (2021). Prognostic value of test(s) for O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation for predicting overall survival in people with glioblastoma treated with temozolomide. *Cochrane Database Syst Rev*, **3**, CD013316.
- MCFARLAND HI, NAHILL SR, MACIASZEK JW, WELSH RM. (1992). CD11b (Mac-1): a marker for CD8+ cytotoxic T cell activation and memory in virus infection. *J Immunol*, **149**(4): 1326-1333.
- MCGUIRK P, MILLS KH. (2002). Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol*, **23**(9): 450-455.
- MEACHAM CE, MORRISON SJ. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, **501**(7467): 328-337.
- MECHNIKOV II. (1988). Immunity in infective diseases. By Il'ia Il'ich Mechnikov, 1905. *Rev Infect Dis*, **10**(1): 223-227.
- MEDEMA JP. (2013). Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nat Cell Biol*, **15**(4): 338-344.
- MERAD M, MANZ MG, KARSUNKY H, WAGERS A, PETERS W, CHARO I, ENGLEMAN EG. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol*, **3**(12): 1135-1141.
- MILDNER A, HUANG H, RADKE J, STENZEL W, PRILLER J. (2017). P2Y12 receptor is expressed on human microglia under physiological conditions

- throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia*, **65**(2): 375-387.
- MILLS CD. (2012). M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol*, **32**(6): 463-488.
- MILLS CD, SHEARER J, EVANS R, CALDWELL MD. (1992). Macrophage arginine metabolism and the inhibition or stimulation of cancer. *J Immunol*, **149**(8): 2709-2714.
- MITRA S. (2007). MGMT: a personal perspective. *DNA Repair (Amst)*, **6**(8): 1064-1070.
- MOMENY M, MOGHADDASKHO F, GORTANY NK, YOUSEFI H, SABOURINEJAD Z, ZARRINRAD G, GHAFARI SH. (2017). Blockade of vascular endothelial growth factor receptors by tivozanib has potential anti-tumour effects on human glioblastoma cells. *Sci Rep*, **7**, 44075.
- MONTANA V, SONTHEIMER H. (2011). Bradykinin promotes the chemotactic invasion of primary brain tumors. *J Neurosci*, **31**(13): 4858-4867.
- MONTEIRO AR, HILL R, PILKINGTON GJ, MADUREIRA PA. (2017). The Role of Hypoxia in Glioblastoma Invasion. *Cells*, **6**(4).
- MORRISON C. (2016). Immuno-oncologists eye up macrophage targets. *Nat Rev Drug Discov*, **15**(6): 373-374.
- MORRISON SJ, SHAH NM, ANDERSON DJ. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, **88**(3): 287-298.
- MOTZ GT, COUKOS G. (2013). Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity*, **39**(1): 61-73.
- MULLER A, BRANDENBURG S, TURKOWSKI K, MULLER S, VAJKOCZY P. (2015). Resident microglia, and not peripheral macrophages, are the main source of brain tumor mononuclear cells. *Int J Cancer*, **137**(2): 278-288.
- MULLER S, KOHANBASH G, LIU SJ, ALVARADO B, CARRERA D, BHADURI A, DIAZ A. (2017). Single-cell profiling of human gliomas reveals macrophage ontogeny as a basis for regional differences in macrophage activation in the tumor microenvironment. *Genome Biol*, **18**(1): 234.
- MUNSTER-KUHNEL AK, TIRALONGO J, KRAPP S, WEINHOLD B, RITZ-SEDLACEK V, JACOB U, GERARDY-SCHAHN R. (2004). Structure and function of vertebrate CMP-sialic acid synthetases. *Glycobiology*, **14**(10): 43R-51R.

- MURAOKA D, SEO N, HAYASHI T, TAHARA Y, FUJII K, TAWARA I, SHIKU H. (2019). Antigen delivery targeted to tumor-associated macrophages overcomes tumor immune resistance. *J Clin Invest*, **129**(3): 1278-1294.
- MURRAY PJ, ALLEN JE, BISWAS SK, FISHER EA, GILROY DW, GOERDT S, WYNN TA. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, **41**(1): 14-20.
- MURRAY PJ, WYNN TA. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*, **11**(11): 723-737.
- MUSUMECI G, MAGRO G, CARDILE V, COCO M, MARZAGALLI R, CASTROGIOVANNI P, CASTORINA A. (2015). Characterization of matrix metalloproteinase-2 and -9, ADAM-10 and N-cadherin expression in human glioblastoma multiforme. *Cell Tissue Res*, **362**(1): 45-60.
- MYERS KV, AMEND SR, PIENTA KJ. (2019). Targeting Tyro3, Axl and MerTK (TAM receptors): implications for macrophages in the tumor microenvironment. *Mol Cancer*, **18**(1): 94.
- NAGPAL J, JAMOONA A, GULATI ND, MOHAN A, BRAUN A, MURALI R, JHANWAR-UNIYAL M. (2006). Revisiting the role of p53 in primary and secondary glioblastomas. *Anticancer Res*, **26**(6C): 4633-4639.
- NAKADA M, FURUTA T, HAYASHI Y, MINAMOTO T, HAMADA J. (2012). The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma. *Front Oncol*, **2**: 98.
- NAPPO G, HANDLE F, SANTER FR, MCNEILL RV, SEED RI, COLLINS AT, ERB HHH. (2017). The immunosuppressive cytokine interleukin-4 increases the clonogenic potential of prostate stem-like cells by activation of STAT6 signalling. *Oncogenesis*, **6**(5): e342.
- NAYAK D, ROTH TL, MCGAVERN DB. (2014). Microglia development and function. *Annu Rev Immunol*, **32**: 367-402.
- NDUOM EK, WELLER M, HEIMBERGER AB. (2015). Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma. *Neuro Oncol*, **17**(7): vii9-vii14.
- NGUYEN TG. (2020). Harnessing Newton's third-law paradigm to treat autoimmune diseases and chronic inflammations. *Inflamm Res*, **69**(9): 813-824.
- NOWELL PC. (1986). Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res*, **46**(5): 2203-2207.
- NOY R, POLLARD JW. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*, **41**(1): 49-61.

- O'SULLIVAN T, SADDAWI-KONEFKA R, VERMI W, KOEBEL CM, ARTHUR C, WHITE JM, BUI JD. (2012). Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *J Exp Med*, **209**(10): 1869-1882.
- OH SA, LIU M, NIXON BG, KANG D, TOURE A, BIVONA M, LI MO. (2017). Foxp3-independent mechanism by which TGF-beta controls peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **114**(36): E7536-E7544.
- OHGAKI H, DESSEN P, JOURDE B, HORSTMANN S, NISHIKAWA T, DI PATRE PL, KLEIHUES P. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*, **64**(19): 6892-6899.
- OHGAKI H, KLEIHUES P. (2005). Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, **64**(6): 479-489.
- OHGAKI H, KLEIHUES P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*, **170**(5): 1445-1453.
- OHGAKI H, KLEIHUES P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*, **19**(4): 764-772.
- OHRI CM, SHIKOTRA A, GREEN RH, WALLER DA, BRADDING P. (2009). Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *Eur Respir J*, **33**(1): 118-126.
- OHRI CM, SHIKOTRA A, GREEN RH, WALLER DA, BRADDING P. (2010). Tumour necrosis factor-alpha expression in tumour islets confers a survival advantage in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, **10**: 323.
- OHSAWA K, IMAI Y, KANAZAWA H, SASAKI Y, KOHSAKA S. (2000). Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci*, **113** (Pt 17): 3073-3084.
- OLDRINI B, VAQUERO-SIGUERO N, MU Q, KROON P, ZHANG Y, GALANGANGA M, SQUATRITO M. (2020). MGMT genomic rearrangements contribute to chemotherapy resistance in gliomas. *Nat Commun*, **11**(1): 3883.
- OLIVER L, LALIER L, SALAUD C, HEYMANN D, CARTRON PF, VALLETTE FM. (2020). Drug resistance in glioblastoma: are persisters the key to therapy? *Cancer Drug Resist*, **3**(3): 287-301.
- ORREGO E, CASTANEDA CA, CASTILLO M, BERNABE LA, CASAVILCA S, CHAKRAVARTI A, OJEDA L. (2018). Distribution of tumor-infiltrating immune cells in glioblastoma. *CNS Oncol*, **7**(4): CNS21.

- OSTROWSKI PP, GRINSTEIN S, FREEMAN SA. (2016). Diffusion Barriers, Mechanical Forces, and the Biophysics of Phagocytosis. *Dev Cell*, **38**(2): 135-146.
- OZAWA T, BRENNAN CW, WANG L, SQUATRITO M, SASAYAMA T, NAKADA M, HOLLAND EC. (2010). PDGFRA gene rearrangements are frequent genetic events in PDGFRA-amplified glioblastomas. *Genes Dev*, **24**(19): 2205-2218.
- PALUCKA AK, COUSSENS LM. (2016). The Basis of Oncoimmunology. *Cell*, **164**(6): 1233-1247.
- PAOLICELLI RC, BOLASCO G, PAGANI F, MAGGI L, SCIANNI M, PANZANELLI P, GROSS CT. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, **333**(6048): 1456-1458.
- PAPAMICHAIL M, PEREZ SA, GRITZAPIS AD, BAXEVANIS CN. (2004). Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. *Cancer Immunol Immunother*, **53**(3): 176-186.
- PARK CK, KIM JE, KIM JY, SONG SW, KIM JW, CHOI SH, PARK SH. (2012). The Changes in MGMT Promoter Methylation Status in Initial and Recurrent Glioblastomas. *Transl Oncol*, **5**(5): 393-397.
- PARK NI, GUILHAMON P, DESAI K, MCADAM RF, LANGILLE E, O'CONNOR M, DIRKS PB. (2017). ASCL1 Reorganizes Chromatin to Direct Neuronal Fate and Suppress Tumorigenicity of Glioblastoma Stem Cells. *Cell Stem Cell*, **21**(3): 411.
- PARKER LC, LUHESHI GN, ROTHWELL NJ, PINTEAUX E. (2002). IL-1 beta signalling in glial cells in wildtype and IL-1RI deficient mice. *Br J Pharmacol*, **136**(2): 312-320.
- PARNEY IF, HAO C, PETRUK KC. (2000). Glioma immunology and immunotherapy. *Neurosurgery*, **46**(4): 778-791; discussion 791-772.
- PARSA AT, WALDRON JS, PANNER A, CRANE CA, PARNEY IF, BARRY JJ, PIEPER RO. (2007). Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med*, **13**(1): 84-88.
- PATEL AP, TIROSH I, TROMBETTA JJ, SHALEK AK, GILLESPIE SM, WAKIMOTO H, BERNSTEIN BE. (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*, **344**(6190): 1396-1401.
- PATHRIA P, LOUIS TL, VARNER JA. (2019). Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. *Trends Immunol*, **40**(4): 310-327.

- PEGG AE. (2000). Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res*, **462**(2-3): 83-100.
- PEISELER M, KUBES P. (2018). Macrophages play an essential role in trauma-induced sterile inflammation and tissue repair. *Eur J Trauma Emerg Surg*, **44**(3): 335-349.
- PERRIN SL, SAMUEL MS, KOSZYCA B, BROWN MP, EBERT LM, OKSDATH M, GOMEZ GA. (2019). Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. *Biochem Soc Trans*, **47**(2): 625-638.
- PHI LTH, SARI IN, YANG YG, LEE SH, JU N, KIM KS, KWON HY. (2018). Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells Int*, **2018**, 5416923.
- PHILLIPS HS, KHARBANDA S, CHEN R, FORREST WF, SORIANO RH, WU TD, ALDAPE K. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, **9**(3): 157-173.
- PIETRAS A, KATZ AM, EKSTROM EJ, WEE B, HALLIDAY JJ, PITTER KL, HOLLAND EC. (2014). Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell Stem Cell*, **14**(3): 357-369.
- PILLAI S, NETRAVALI IA, CARIAPPA A, MATTOO H. (2012). Siglecs and immune regulation. *Annu Rev Immunol*, **30**: 357-392.
- PINTO ML, RIOS E, DURAES C, RIBEIRO R, MACHADO JC, MANTOVANI A, OLIVEIRA MJ. (2019). The Two Faces of Tumor-Associated Macrophages and Their Clinical Significance in Colorectal Cancer. *Front Immunol*, **10**: 1875.
- POLLARI M, BRUCK O, PELLINEN T, VAHAMURTO P, KARJALAINEN-LINDSBER ML, MANNISTO S, LEPPA S. (2018). PD-L1(+) tumor-associated macrophages and PD-1(+) tumor-infiltrating lymphocytes predict survival in primary testicular lymphoma. *Haematologica*, **103**(11): 1908-1914.
- PONTE KF, BERRO DH, COLLET S, CONSTANS JM, EMERY E, VALABLE S, GUILLAMO JS. (2017). In Vivo Relationship Between Hypoxia and Angiogenesis in Human Glioblastoma: A Multimodal Imaging Study. *J Nucl Med*, **58**(10): 1574-1579.
- POON CC, GORDON PMK, LIU K, YANG R, SARKAR S, MIRZAEI R, KELLY JJP. (2019). Differential microglia and macrophage profiles in human IDH-mutant and -wild type glioblastoma. *Oncotarget*, **10**(33): 3129-3143.

- POPE WB, MIRSADEAEI L, LAI A, ESKIN A, QIAO J, KIM HJ, CLOUGHESY TF. (2012). Differential gene expression in glioblastoma defined by ADC histogram analysis: relationship to extracellular matrix molecules and survival. *AJNR Am J Neuroradiol*, **33**(6): 1059-1064.
- PRASETYANTI PR, MEDEMA JP. (2017). Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol Cancer*, **16**(1): 41.
- PREUSS I, EBERHAGEN I, HAAS S, EIBL RH, KAUFMANN M, VON MINCKWITZ G, KAINA B. (1995). O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in breast and brain tumors. *Int J Cancer*, **61**(3): 321-326.
- QI Y, LI RM, KONG FM, LI H, YU JP, REN XB. (2012). How do tumor stem cells actively escape from host immunosurveillance? *Biochem Biophys Res Commun*, **420**(4): 699-703.
- QIU SQ, WAAIJER SJH, ZWAGER MC, DE VRIES EGE, VAN DER VEGT B, SCHRODER CP. (2018). Tumor-associated macrophages in breast cancer: Innocent bystander or important player? *Cancer Treat Rev*, **70**: 178-189.
- QUAIL DF, BOWMAN RL, AKKARI L, QUICK ML, SCHUHMACHER AJ, HUSE JT, JOYCE JA. (2016). The tumor microenvironment underlies acquired resistance to CSF-1R inhibition in gliomas. *Science*, **352**(6288): aad3018.
- QUAIL DF, JOYCE JA. (2017). The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell*, **31**(3): 326-341.
- R., A. E., D., B. M. L., O., B. X., & N., M. S. L. (2019). Glioma EVs Contribute to Immune Privilege in the Brain. *Trends Cancer*, **5**(7): 393-396.
- RABINOVITCH M. (1995). Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol*, **5**(3): 85-87.
- RAGHAVAN S, BASKIN DS, SHARPE MA. (2020). A "Clickable" Probe for Active MGMT in Glioblastoma Demonstrates Two Discrete Populations of MGMT. *Cancers (Basel)*, **12**(2).
- RAHAT MA, HEMMERLEIN B. (2013). Macrophage-tumor cell interactions regulate the function of nitric oxide. *Front Physiol*, **4**: 144.
- RAMNARAIN DB, PARK S, LEE DY, HATANPAA KJ, SCOGGIN SO, OTU H, HABIB AA. (2006). Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells. *Cancer Res*, **66**(2): 867-874.

- RANSOHOFF RM. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci*, **19**(8): 987-991.
- RAO CV, MOHAMMED A. (2015). New insights into pancreatic cancer stem cells. *World J Stem Cells*, **7**(3): 547-555.
- RAO JS. (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer*, **3**(7): 489-501.
- RASCHER G, FISCHMANN A, KROGER S, DUFFNER F, GROTE EH, WOLBURG H. (2002). Extracellular matrix and the blood-brain barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin. *Acta Neuropathol*, **104**(1): 85-91.
- RAZA A, FRANKLIN MJ, DUDEK AZ. (2010). Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol*, **85**(8): 593-598.
- RAZAVI SM, LEE KE, JIN BE, AUJLA PS, GHOLAMIN S, LI G. (2016). Immune Evasion Strategies of Glioblastoma. *Front Surg*, **3**: 11.
- REARDON DA, HERNDON JE, 2ND PETERS KB, DESJARDINS A, COAN A, LOU E, VREDENBURGH JJ. (2012). Bevacizumab continuation beyond initial bevacizumab progression among recurrent glioblastoma patients. *Br J Cancer*, **107**(9): 1481-1487.
- RENAUD SJ, GRAHAM CH. (2008). The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. *Immunol Invest*, **37**(5): 535-564.
- REY-GIRAUD F, HAFNER M, RIES CH. (2012). In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One*, **7**(8): e42656.
- REYA T, MORRISON SJ, CLARKE MF, WEISSMAN IL. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, **414**(6859): 105-111.
- RICCI-VITIANI L, PALLINI R, BIFFONI M, TODARO M, INVERNICI G, CENCI T, DE MARIA R. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, **468**(7325): 824-828.
- ROBERTS LM, MUNSON J. (2020). Modulating microenvironments for treating glioblastoma. *Curr Tissue Microenviron Rep*, **1**(3): 99-111.
- RODRIGUEZ PC, QUICENO DG, ZABALETA J, ORTIZ B, ZEA AH, PIAZUELO MB, OCHOA AC. (2004). Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res*, **64**(16): 5839-5849.

- ROESCH S, RAPP C, DETTLING S, HEROLD-MENDE C. (2018). When Immune Cells Turn Bad-Tumor-Associated Microglia/Macrophages in Glioma. *Int J Mol Sci*, **19**(2).
- ROSENSTOCK P, KAUFMANN T. (2021). Sialic Acids and Their Influence on Human NK Cell Function. *Cells*, **10**(2).
- ROSSI ML, HUGHES JT, ESIRI MM, COAKHAM HB, BROWNELL DB. (1987). Immunohistological study of mononuclear cell infiltrate in malignant gliomas. *Acta Neuropathol*, **74**(3): 269-277.
- ROSTOKER R, ABELSON S, GENKIN I, BEN-SHMUEL S, SACHIDANANDAM R, SCHEINMAN EJ, LEROITH D. (2015). CD24(+) cells fuel rapid tumor growth and display high metastatic capacity. *Breast Cancer Res*, **17**: 78.
- ROSZER T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm*, **2015**: 816460.
- ROY PS, SAIKIA BJ. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*, **53**(3): 441-442.
- RUFFELL B, COUSSENS LM. (2015). Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell*, **27**(4): 462-472.
- SAFA AR, SAADATZADEH MR, COHEN-GADOL AA, POLLOK KE, BIJANGI-VISHEHSARAEI K. (2015). Glioblastoma stem cells (GSCs) epigenetic plasticity and interconversion between differentiated non-GSCs and GSCs. *Genes Dis*, **2**(2): 152-163.
- SAGIV E, ARBER N. (2008). The novel oncogene CD24 and its arising role in the carcinogenesis of the GI tract: from research to therapy. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, **2**(1): 125-133.
- SAMI A, KARSY M. (2013). Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in glioblastoma: novel therapeutic agents and advances in understanding. *Tumour Biol*, **34**(4): 1991-2002.
- SAMMAR M, SIWETZ M, MEIRI H, FLEMING V, ALTEVOGT P, HUPPERTZ B. (2017). Expression of CD24 and Siglec-10 in first trimester placenta: implications for immune tolerance at the fetal-maternal interface. *Histochem Cell Biol*, **147**(5): 565-574.
- SANTARPIA M, KARACHALIOU N. (2015). Tumor immune microenvironment characterization and response to anti-PD-1 therapy. *Cancer Biol Med*, **12**(2): 74-78.

- SANTONI M, BRACARDA S, NABISSI M, MASSARI F, CONTI A, BRIA E, CASCINU S. (2014). CXC and CC chemokines as angiogenic modulators in nonhaematological tumors. *Biomed Res Int*, **2014**: 768758.
- SASAKI M, KNOBBE CB, ITSUMI M, ELIA AJ, HARRIS IS, CHIO IL, MAK TW. (2012). D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH1 perturbs collagen maturation and basement membrane function. *Genes Dev*, **26**(18): 2038-2049.
- SCHIFFER D, ANNOVAZZI L, CASALONE C, CORONA C, MELLAI M. (2018). Glioblastoma: Microenvironment and Niche Concept. *Cancers (Basel)*, **11**(1).
- SCHIFFER D, ANNOVAZZI L, MAZZUCCO M, MELLAI M. (2015). The Microenvironment in Gliomas: Phenotypic Expressions. *Cancers (Basel)*, **7**(4): 2352-2359.
- SCHIFFER D, MELLAI M, BOVIO E, BISOGNO I, CASALONE C, ANNOVAZZI L. (2018). Glioblastoma niches: from the concept to the phenotypical reality. *Neurol Sci*, **39**(7): 1161-1168.
- SCHNAAR RL, GERARDY-SCHAHN R, HILDEBRANDT H. (2014). Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol Rev*, **94**(2): 461-518.
- SCHREIBER RD, OLD LJ, SMYTH MJ. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, **331**(6024): 1565-1570.
- SCHULZ C, GOMEZ PERDIGUERO E, CHORRO L, SZABO-ROGERS H, CAGNARD N, KIERDORF K, GEISSMANN F. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*, **336**(6077): 86-90.
- SCHWARTZBAUM JA, FISHER JL, ALDAPE KD, WRENSCH M. (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol*, **2**(9): 494-503.
- SCOTT CB, NELSON JS, FARNAN NC, CURRAN WJ JR, MURRAY KJ, FISCHBACH AJ, NELSON DF. (1995). Central pathology review in clinical trials for patients with malignant glioma. A Report of Radiation Therapy Oncology Group 83-02. *Cancer*, **76**(2): 307-313.
- SEIDEL S, GARVALOV BK, WIRTA V, VON STECHOW L, SCHANZER A, MELETIS K, ACKER T. (2010). A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain*, **133**(Pt 4): 983-995.
- SHACKLETON M, QUINTANA E, FEARON ER, MORRISON SJ. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*, **138**(5): 822-829.

- SHARPE AH, ABBAS AK. (2006). T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges. *N Engl J Med*, **355**(10): 973-975.
- SHERIDAN C, KISHIMOTO H, FUCHS RK, MEHROTRA S, BHAT-NAKSHATRI P, TURNER CH, NAKSHATRI H. (2006). CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*, **8**(5): R59.
- SHIAO SL, RUFFELL B, DENARDO DG, FADDEGON BA, PARK CC, COUSSENS LM. (2015). TH2-Polarized CD4(+) T Cells and Macrophages Limit Efficacy of Radiotherapy. *Cancer Immunol Res*, **3**(5): 518-525.
- SIDDIQUI SS, MATAR R, MERHEB M, HODEIFY R, VAZHAPPILLY CG, MARTON J, AL ZOUABI H. (2019). Siglecs in Brain Function and Neurological Disorders. *Cells*, **8**(10).
- SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, **68**(1): 7-30.
- SIERRA A, ABIEGA O, SHAHRAZ A, NEUMANN H. (2013). Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front Cell Neurosci*, **7**: 6.
- SILBER JR, BLANK A, BOBOLA MS, GHATAN S, KOLSTOE DD, BERGER MS. (1999). O6-methylguanine-DNA methyltransferase-deficient phenotype in human gliomas: frequency and time to tumor progression after alkylating agent-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*, **5**(4): 807-814.
- SILVER DJ, SINYUK M, VOGELBAUM MA, AHLUWALIA MS, LATHIA JD. (2016). The intersection of cancer, cancer stem cells, and the immune system: therapeutic opportunities. *Neuro Oncol*, **18**(2): 153-159.
- SINGH SK, HAWKINS C, CLARKE ID, SQUIRE JA, BAYANI J, HIDE T, DIRKS PB. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, **432**(7015): 396-401.
- SODA Y, MARUMOTO T, FRIEDMANN-MORVINSKI D, SODA M, LIU F, MICHIEU H, VERMA IM. (2011). Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**(11): 4274-4280.
- SOEDA A, PARK M, LEE D, MINTZ A, ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS A, MCKAY RD, PARK DM. (2009). Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene*, **28**(45): 3949-3959.
- SOFRONIEW MV. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci*, **16**(5): 249-263.

- SOTTORIVA A, SPITERI I, PICCIRILLO SG, TOULOUMIS A, COLLINS VP, MARIONI JC, TAVARE S. (2013). Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**(10): 4009-4014.
- STAMBOLIC V, MACPHERSON D, SAS D, LIN Y, SNOW B, JANG Y, MAK TW. (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell*, **8**(2): 317-325.
- STEIN M, KESHAV S, HARRIS N, GORDON S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*, **176**(1): 287-292.
- STRATTON MR, CAMPBELL PJ, FUTREAL PA. (2009). The cancer genome. *Nature*, **458**(7239): 719-724.
- STREIT WJ. (2005). Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev*, **48**(2): 234-239.
- STRLE K, ZHOU JH, SHEN WH, BROUSSARD SR, JOHNSON RW, FREUND GG, KELLEY KW. (2001). Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol*, **21**(5): 427-449.
- STUPP R, MASON WP, VAN DEN BENT MJ, WELLER M, FISHER B, TAPHOORN MJ. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, **352**(10): 987-996.
- SUDHAKAR A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*, **1**(2): 1-4.
- SUN MZ, OH T, IVAN ME, CLARK AJ, SAFAEE M, SAYEGH ET, BLOCH O. (2015). Survival impact of time to initiation of chemoradiotherapy after resection of newly diagnosed glioblastoma. *J Neurosurg*, **122**(5): 1144-1150.
- SUVA ML, RHEINBAY E, GILLESPIE SM, PATEL AP, WAKIMOTO H, RABKIN SD, BERNSTEIN BE. (2014). Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell*, **157**(3): 580-594.
- SZULZEWSKY F, ARORA S, DE WITTE L, ULAS T, MARKOVIC D, SCHULTZE JL., KETTENMANN H. (2016). Human glioblastoma-associated microglia/monocytes express a distinct RNA profile compared to human control and murine samples. *Glia*, **64**(8): 1416-1436.
- TABATABAI G, FRANK B, MOHLE R, WELLER M, WICK W. (2006). Irradiation and hypoxia promote homing of haematopoietic progenitor cells towards gliomas by TGF-beta-dependent HIF-1alpha-mediated induction of CXCL12. *Brain*, **129**(Pt 9): 2426-2435.

- TABATABAI G, STUPP R, VAN DEN BENT MJ, HEGI ME, TONN JC, WICK W, WELLER M. (2010). Molecular diagnostics of gliomas: the clinical perspective. *Acta Neuropathol*, **120**(5): 585-592.
- TALHAOUI I, MATKARIMOV BT, TCHENIO T, ZHARKOV DO, SAPARBAEV MK. (2017). Aberrant base excision repair pathway of oxidatively damaged DNA: Implications for degenerative diseases. *Free Radic Biol Med*, **107**: 266-277.
- TAN Y, ZHAO M, XIANG B, CHANG C, LU Q. (2016). CD24: from a Hematopoietic Differentiation Antigen to a Genetic Risk Factor for Multiple Autoimmune Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*, **50**(1): 70-83.
- TAYLOR PR, MARTINEZ-POMARES L, STACEY M, LIN HH, BROWN GD, GORDON S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*, **23**: 901-944.
- TENTORI L, BALDUZZI A, PORTARENA I, LEVATI L, VERNOLE P, GOLD B, GRAZIANI G. (2001). Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor increases apoptosis and reduces necrosis induced by a DNA minor groove binding methyl sulfonate ester. *Cell Death Differ*, **8**(8): 817-828.
- THAKER AI, RAO MS, BISHNUPURI KS, KERR TA, FOSTER L, MARINSHAW JM, CIORBA MA. (2013). IDO1 metabolites activate beta-catenin signaling to promote cancer cell proliferation and colon tumorigenesis in mice. *Gastroenterology*, **145**(2): 416-425 e411-414.
- THAKKAR JP, DOLECEK TA, HORBINSKI C, OSTROM QT, LIGHTNER DD, BARNHOLTZ-SLOAN JS, VILLANO JL. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **23**(10): 1985-1996.
- THORSSON V, GIBBS DL, BROWN SD, WOLF D, BORTONE DS, OU YANG TH, SHMULEVICH I. (2018). The Immune Landscape of Cancer. *Immunity*, **48**(4): 812-830 e814.
- THURSTON G. (2002). Complementary actions of VEGF and angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage. *J Anat*, **200**(6): 575-580.
- TIAN L, LEI A, TAN T, ZHU M, ZHANG L, MOU H, ZHANG J. (2022). Macrophage-Based Combination Therapies as a New Strategy for Cancer Immunotherapy. *Kidney Dis (Basel)*, **8**(1): 26-43.
- TIRINO V, DESIDERIO V, PAINO F, DE ROSA A, PAPACCIO F, LA NOCE M, PAPACCIO G. (2013). Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J*, **27**(1): 13-24.

- TOLCHER AW, GERSON SL, DENIS L, GEYER C, HAMMOND LA, PATNAIK A, ROWINSKY EK. (2003). Marked inactivation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity with protracted temozolomide schedules. *Br J Cancer*, **88**(7): 1004-1011.
- TOMASZEWSKI W, SANCHEZ-PEREZ L, GAJEWSKI TF, SAMPSON JH. (2019). Brain Tumor Microenvironment and Host State: Implications for Immunotherapy. *Clin Cancer Res*, **25**(14): 4202-4210.
- TONG N, HE Z, MA Y, WANG Z, HUANG Z, CAO H, WANG Q. (2021). Tumor Associated Macrophages, as the Dominant Immune Cells, Are an Indispensable Target for Immunologically Cold Tumor-Glioma Therapy? *Front Cell Dev Biol*, **9**: 706286.
- TORGOVNICK A, SCHUMACHER B. (2015). DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Front Genet*, **6**: 157.
- TORRE LA, SIEGEL RL, WARD EM, JEMAL A. (2016). Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **25**(1): 16-27.
- TREPS L, PERRET R, EDMOND S, RICARD D, GAVARD J. (2017). Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*, **6**(1): 1359479.
- TUBBS JL, PEGG AE, TAINER JA. (2007). DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy. *DNA Repair (Amst)*, **6**(8): 1100-1115.
- TZARIDIS T, SCHAFFER N, WELLER J, STEINBACH JP, SCHLEGEL U, SEIDEL S, FELSBERG J. (2021). MGMT promoter methylation analysis for allocating combined CCNU/TMZ chemotherapy: Lessons learned from the CeTeG/NOA-09 trial. *Int J Cancer*, **148**(7): 1695-1707.
- ULRICH TA, DE JUAN PARDO, EM, KUMAR S. (2009). The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer Res*, **69**(10): 4167-4174.
- VALDEBENITO S, AUDIA A, BHAT KPL, OKAFO G, EUGENIN EA. (2020). Tunneling Nanotubes Mediate Adaptation of Glioblastoma Cells to Temozolomide and Ionizing Radiation Treatment. *iScience*, **23**(9): 101450.
- VAN DALEN FJ, VAN STEVENDAAL M, FENNEMANN FL., VERDOES M, ILINA O. (2018). Molecular Repolarisation of Tumour-Associated Macrophages. *Molecules*, **24**(1).

- VAN DYKEN SJ, LOCKSLEY RM. (2013). Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol*, **31**: 317-343.
- VAN HOUTUM EJH, BULL C, CORNELISSEN LAM, ADEMA GJ. (2021). Siglec Signaling in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*, **12**: 790317.
- VAN LOOKEREN CAMPAGNE M, WIESMANN C, BROWN EJ. (2007). Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol*, **9**(9): 2095-2102.
- VAN MEIR EG, HADJIPANAYIS CG, NORDEN AD, SHU HK, WEN PY, OLSON JJ. (2010). Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin*, **60**(3): 166-193.
- VAN NIFTERIK KA, VAN DEN BERG J, VAN DER MEIDE WF, AMEZIANE N, WEDEKIND LE, STEENBERGEN RD, SMINIA P. (2010). Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide. *Br J Cancer*, **103**(1): 29-35.
- VARKI A. (2017). Are humans prone to autoimmunity? Implications from evolutionary changes in hominin sialic acid biology. *J Autoimmun*, **83**: 134-142.
- VARKI A, SCHNAAR RL, CROCKER PR. (2015). I-Type Lectins. In rd, A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, & P. H. Seeberger (Eds.), *Essentials of Glycobiology* (pp. 453-467). Cold Spring Harbor (NY).
- VAROL C, MILDNER A, JUNG S. (2015). Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol*, **33**: 643-675.
- VENKATESH HS, JOHUNG TB, CARETTI V, NOLL A, TANG Y, NAGARAJA S, MONJE M. (2015). Neuronal Activity Promotes Glioma Growth through Neuroligin-3 Secretion. *Cell*, **161**(4): 803-816.
- VIGNESWARAN K, NEILL S, HADJIPANAYIS CG. (2015). Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. *Ann Transl Med*, **3**(7): 95.
- VISVADER JE, LINDEMAN GJ. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*, **8**(10): 755-768.
- VISVADER JE, LINDEMAN GJ. (2012). Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*, **10**(6): 717-728.

- VREDENBURGH JJ, DESJARDINS A, HERNDON JE, 2ND DOWELL JM, REARDON DA, QUINN JA, FRIEDMAN HS. (2007). Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res*, **13**(4): 1253-1259.
- WALCHER L, KISTENMACHER AK, SUO H, KITTE R, DLUCZEK S, STRAUSS A, KOSSATZ-BOEHLERT U. (2020). Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol*, **11**,: 1280.
- WALENTYNOWICZ KA, OCHOCKA N, PASIERBINSKA M, WOJNICKI K, STEPNIAK K, MIECZKOWSKI J, KAMINSKA B. (2018). In Search for Reliable Markers of Glioma-Induced Polarization of Microglia. *Front Immunol*, **9**: 1329.
- WALKER DG, LUE LF. (2015). Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimers Res Ther*, **7**(1): 56.
- WALTERS MJ, EBSWORTH K, BERAHOVICH RD, PENFOLD ME, LIU SC, AL OMRAN R, BROWN JM. (2014). Inhibition of CXCR7 extends survival following irradiation of brain tumours in mice and rats. *Br J Cancer*, **110**(5): 1179-1188.
- WANG D, WANG C, WANG L, CHEN Y. (2019). A comprehensive review in improving delivery of small-molecule chemotherapeutic agents overcoming the blood-brain/brain tumor barriers for glioblastoma treatment. *Drug Deliv*, **26**(1): 551-565.
- WANG G, SAI K, GONG F, YANG Q, CHEN F, LIN J. (2014). Mutation of isocitrate dehydrogenase 1 induces glioma cell proliferation via nuclear factor-kappaB activation in a hypoxia-inducible factor 1-alpha dependent manner. *Mol Med Rep*, **9**(5): 1799-1805.
- WANG J, SAKARIASSEN PO, TSINKALOVSKY O, IMMERVOLL H, BOE SO, SVENDSEN A, ENGER PO. (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer*, **122**(4): 761-768.
- WANG N, LIU W, ZHENG Y, WANG S, YANG B, LI M, WANG Z. (2018). CXCL1 derived from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via activating NF-kappaB/SOX4 signaling. *Cell Death Dis*, **9**(9): 880.
- WANG R, CHADALAVADA K, WILSHIRE J, KOWALIK U, HOVINGA KE, GEBER A, TABAR V. (2010). Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*, **468**(7325): 829-833.

- WANG Y, LIU T, YANG N, XU S, LI X, WANG D. (2016). Hypoxia and macrophages promote glioblastoma invasion by the CCL4-CCR5 axis. *Oncol Rep*, **36**(6): 3522-3528.
- WATANABE T, NOBUSAWA S, KLEIHUES P, OHGAKI H. (2009). IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol*, **174**(4): 1149-1153.
- WATKINS S, ROBEL S, KIMBROUGH IF, ROBERT SM, ELLIS-DAVIES G, SONTHEIMER H. (2014). Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells. *Nat Commun*, **5**: 4196.
- WEI J, BARR J, KONG LY, WANG Y, WU A, SHARMA AK, HEIMBERGER AB. (2010). Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression. *Clin Cancer Res*, **16**(2): 461-473.
- WEI J, CHEN P, GUPTA P, OTT M, ZAMLER D, KASSAB C, HEIMBERGER AB. (2020). Immune biology of glioma-associated macrophages and microglia: functional and therapeutic implications. *Neuro Oncol*, **22**(2): 180-194.
- WEICHERT W, DENKERT C, BURKHARDT M, GANSUKH T, BELLACH J, ALTEVOGT P, KRISTIANSEN G. (2005). Cytoplasmic CD24 expression in colorectal cancer independently correlates with shortened patient survival. *Clin Cancer Res*, **11**(18): 6574-6581.
- WEINBERG RA. (1996). How cancer arises. *Sci Am*, **275**(3): 62-70.
- WEISSMAN IL. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*, **287**(5457): 1442-1446.
- WELLER M, STUPP R, HEGI ME, VAN DEN BENT M, TONN JC, SANSON M, REIFENBERGER G. (2012). Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. *Neuro Oncol*, **14 Suppl 4**, iv100-108.
- WESSELING P, RUITER DJ, BURGER PC. (1997). Angiogenesis in brain tumors; pathobiological and clinical aspects. *J Neurooncol*, **32**(3): 253-265.
- WICK W, HARTMANN C, ENGEL C, STOFFELS M, FELSBERG J, STOCKHAMMER F, WELLER M. (2009). NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol*, **27**(35): 5874-5880.
- WICK W, WELLER M, VAN DEN BENT M, SANSON M, WEILER M, VON DEIMLING A, REIFENBERGER G. (2014). MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nat Rev Neurol*, **10**(7): 372-385.

- WILSON TA, KARAJANNIS MA, HARTER DH. (2014). Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int*, **5**: 64.
- WLODARCZYK A, HOLTMAN IR, KRUEGER M, YOGEV N, BRUTTGER J, KHOROOSHI R, OWENS T. (2017). A novel microglial subset plays a key role in myelinogenesis in developing brain. *EMBO J*, **36**(22): 3292-3308.
- WOLBURG H, NOELL S, FALLIER-BECKER P, MACK AF, WOLBURG- BUCHHOLZ K. (2012). The disturbed blood-brain barrier in human glioblastoma. *Mol Aspects Med*, **33**(5-6): 579-589.
- WOLBURG H, NOELL S, MACK A, WOLBURG-BUCHHOLZ K, FALLIER-BECKER P. (2009). Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res*, **335**(1): 75-96.
- WU A, WEI J, KONG LY, WANG Y, PRIEBE W, QIAO W, HEIMBERGER AB. (2010). Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro Oncol*, **12**(11): 1113-1125.
- WU H, LIU J, WANG Z, YUAN W, CHEN L. (2021). Prospects of antibodies targeting CD47 or CD24 in the treatment of glioblastoma. *CNS Neurosci Ther*, **27**(10): 1105-1117.
- WU Q, TIAN Y, ZHANG J, ZHANG H, GU F, LU Y, WANG D. (2017). Functions of pancreatic stellate cell-derived soluble factors in the microenvironment of pancreatic ductal carcinoma. *Oncotarget*, **8**(60): 102721-102738.
- WU SY, XING F, SHARMA S, WU K, TYAGI A, LIU Y, WATABE K. (2020). Nicotine promotes brain metastasis by polarizing microglia and suppressing innate immune function. *J Exp Med*, **217**(8).
- XING F, KOBAYASHI A, OKUDA H, WATABE M, PAI SK, PANDEY PR, WATABE K. (2013). Reactive astrocytes promote the metastatic growth of breast cancer stem-like cells by activating Notch signalling in brain. *EMBO Mol Med*, **5**(3): 384-396.
- XU J, MURPHY SL, KOCHANKE KD, ARIAS E. (2016). Mortality in the United States, 2015. *NCHS Data Brief*(267), 1-8.
- XUAN W, LESNIAK MS, JAMES CD, HEIMBERGER AB, CHEN P. (2021). Context-Dependent Glioblastoma-Macrophage/Microglia Symbiosis and Associated Mechanisms. *Trends Immunol*, **42**(4): 280-292.
- XUE J, SCHMIDT SV, SANDER J, DRAFFEHN A, KREBS W, QUESTER I, SCHULTZE JL. (2014). Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*, **40**(2): 274-288.

- YADAV VN, ZAMLER D, BAKER GJ, KADIYALA P, ERDREICH-EPSTEIN A, DECARVALHO AC, LOWENSTEIN PR. (2016). CXCR4 increases in-vivo glioma perivascular invasion, and reduces radiation induced apoptosis: A genetic knockdown study. *Oncotarget*, **7**(50): 83701-83719.
- YAMAGUCHI T, FUSHIDA S, YAMAMOTO Y, TSUKADA T, KINOSHITA J, OYAMA K, OHTA T. (2016). Tumor-associated macrophages of the M2 phenotype contribute to progression in gastric cancer with peritoneal dissemination. *Gastric Cancer*, **19**(4): 1052-1065.
- YAN H, PARSONS DW, JIN G, MCLENDON R, RASHEED BA, YUAN W, BIGNER DD. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*, **360**(8): 765-773.
- YANG C, HE L, HE P, LIU Y, WANG W, HE Y, GAO F. (2015). Increased drug resistance in breast cancer by tumor-associated macrophages through IL-10/STAT3/bcl-2 signaling pathway. *Med Oncol*, **32**(2): 352.
- YANG I, TIHAN T, HAN SJ, WRENSCH MR, WIENCKE J, SUGHRUE ME, PARSA AT. (2010). CD8+ T-cell infiltrate in newly diagnosed glioblastoma is associated with long-term survival. *J Clin Neurosci*, **17**(11): 1381-1385.
- YANG J, YAN J, LIU B. (2018). Targeting VEGF/VEGFR to Modulate Antitumor Immunity. *Front Immunol*, **9**: 978.
- YANG L, ZHANG Y. (2017). Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematol Oncol*, **10**(1): 58.
- YANG Z, MING XF. (2014). Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Front Immunol*, **5**: 533.
- YE XZ, XU SL, XIN YH, YU SC, PING YF, CHEN L, BIAN XW. (2012). Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF-beta1 signaling pathway. *J Immunol*, **189**(1): 444-453.
- YEKULA A, YEKULA A, MURALIDHARAN K, KANG K, CARTER BS, BALAJ L. (2019). Extracellular Vesicles in Glioblastoma Tumor Microenvironment. *Front Immunol*, **10**: 3137.
- YI Y, HSIEH IY, HUANG X, LI J, ZHAO W. (2016). Glioblastoma Stem-Like Cells: Characteristics, Microenvironment, and Therapy. *Front Pharmacol*, **7**: 477.
- YU Z, PESTELL TG, LISANTI MP, PESTELL RG. (2012). Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, **44**(12): 2144-2151.

- YUAN Y, QI C, MALING G, XIANG W, YANHUI L., RUOFEI L, QING M. (2016). TERT mutation in glioma: Frequency, prognosis and risk. *J Clin Neurosci*, **26**: 57-62.
- ZEINER PS, PREUSSE C, GOLEBIEWSKA A, ZINKE J, IRIONDO A, MULLER A, MITTELBRONN M. (2019). Distribution and prognostic impact of microglia/macrophage subpopulations in gliomas. *Brain Pathol*, **29**(4): 513-529.
- ZHANG J, STEVENS MF, BRADSHAW TD. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol*, **5**(1): 102-114.
- ZHANG P, LU X, TAO K, SHI L, LI W, WANG G, WU K. (2015). Siglec-10 is associated with survival and natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma. *J Surg Res*, **194**(1): 107-113.
- ZHANG QW, LIU L, GONG CY, SHI HS, ZENG YH, WANG XZ, WEI YQ. (2012). Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One*, **7**(12): e50946.
- ZHANG Y, DUBE C, GIBERT M, CRUICKSHANKS N, WANG B, COUGHLAN M, ABOUNADER R. (2018). The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers (Basel)*, **10**(9).
- ZHAO X, QU J, SUN Y, WANG J, LIU X, WANG F, ZHANG S. (2017). Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. *Oncotarget*, **8**(18): 30576-30586.
- ZHOU J, TANG Z, GAO S, LI C, FENG Y, ZHOU X. (2020). Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. *Front Oncol*, **10**: 188.
- ZHOU W, KE SQ, HUANG Z, FLAVAHAN W, FANG X, PAUL J, BAO S. (2015). Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol*, **17**(2): 170-182.
- ZHU H, LEISS L, YANG N, RYGH CB, MITRA SS, CHESHER SH, WANG J. (2017). Surgical debulking promotes recruitment of macrophages and triggers glioblastoma phagocytosis in combination with CD47 blocking immunotherapy. *Oncotarget*, **8**(7): 12145-12157.
- ZHU K, LIU Q, ZHOU Y, TAO C, ZHAO Z, SUN J, XU H. (2015). Oncogenes and tumor suppressor genes: comparative genomics and network perspectives. *BMC Genomics*, **16 Suppl 7**: S8.
- ZHU W, CARNEY KE, PIGOTT VM, FALGOUST LM, CLARK PA, KUO JS, SUN D. (2016). Glioma-mediated microglial activation promotes glioma proliferation and migration: roles of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. *Carcinogenesis*, **37**(9): 839-851.

ZLOKOVIC BV. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*, **12**(12): 723-738.

ZONG H, VERHAAK RG, CANOLL P. (2012). The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. *Expert Rev Mol Diagn*, **12**(4): 383-394.

