

# Foliküler Lenfomalarda Mikroçevrenin Organizasyonunda TGF $\beta$ /Smad Yolağının Rolü ve Prognozla İlişkisi

## The Role of Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF $\beta$ )/Smad Pathway in Microenvironment Organization of Follicular Lymphoma and its Relevance to Prognosis

Şenay KÖM<sup>1</sup>, Sinem CİVRİZ BOZDAĞ<sup>2</sup>, Muhit ÖZCAN<sup>2</sup>, Işın KUZU<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>3</sup> Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

### ÖZ

**Amaç:** En sık görülen ikinci lenfoma alt tipi olan foliküler lenfoma (FL), germinal merkez B hücrelerinden kaynaklanır. Bu çalışmada, FL örneklerinde TGF $\beta$ /Smad yolağına ait genlerin ifade değişikliklerinin, klinik ve patolojik prognostik parametrelerle ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, bu genlerin FL tümör mikroçevresi ve prognozu üzerindeki olası etkileri ve rollerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

**Hastalar ve Yöntem:** Çalışmaya 21 FL olgusu ve beş reaktif foliküler hiperplazi olgusu dahil edilmiştir. FOXP3 antikorı ile regülatör T hücreleri (Treg), CD163 antikorı ile tümör ilişkili makrofajlar (TİM) immünohistokimyasal olarak incelenmiş ve mikroçevre özelliklerine göre ayrılmıştır. Foliküler lenfoma örneklerinde neoplastik folliküller, kontrol grubunda reaktif folliküller lazer mikrodiseksiyon (LMD) yöntemiyle izole edilmiştir. Bu örneklerde qRT-PZR yöntemiyle TGF $\beta$ /Smad yolağına ait TGF $\beta$ 1, Smad2, Smad3, Smad4, Smad7, SARA, ve CDKN2B genlerinin ifade düzeyleri araştırılmıştır. Moleküler analizlerin histopatolojik ve klinikopatolojik prognostik verilerle ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** İmmünohistokimyasal analizler, FL örneklerinde FOXP3<sup>+</sup> Tregler ve CD163<sup>+</sup> TİM'lerin yoğunluğunun, kontrol grubuna göre artmış olduğunu göstermektedir. Moleküler analizlerde ise, TGF $\beta$ /Smad yolağına ait genlerin tümünde, FL örneklerinde kontrol grubuna göre genel bir ifade artışı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, çalışmada sınırlı örneklem büyüklüğü nedeniyle bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlılığı gösterilememiştir.

**Sonuç:** Foliküler lenfomalarda hastalık prognozunu etkileyen mikroçevre özellikleri, TGF $\beta$ /Smad yolağına ait genlerin ifade düzeylerindeki değişiklikler ile ilişkili olabilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Foliküler lenfoma; TGF $\beta$ /Smad yolağı; prognoz, mikroçevre

### ABSTRACT

**Objective:** Follicular lymphoma (FL) is the second most common subtype of lymphoma and originates from germinal center B cells. The aim of this study was to investigate the relationship between gene expression changes of TGF $\beta$ /Smad signaling pathway genes and clinical and pathological prognostic parameters in FL samples. Furthermore, the study sought to investigate the influence of these genes on the tumor microenvironment and to gain a deeper understanding of their contribution to the prognosis of FL.

**Makale atfı:** Köm Ş, Civriz Bozdağ S, Özcan M, Kuzu I. Foliküler lenfomalarda mikroçevrenin organizasyonunda TGF $\beta$ /Smad yolağının rolü ve prognozla ilişkisi. LLM Dergi 2025;9(2):41-52.

### Yazışma Adresi

Şenay KÖM

Ankara Üniversitesi,  
Biyoteknoloji Enstitüsü,  
Ankara, Türkiye

Geliş: 25.07.2025 - Kabul: 21.08.2025

E-posta: senayboyacigil@gmail.com

**Patients and Methods:** The study included 21 FL cases and five reactive follicular hyperplasia cases as controls. Regulatory T cells (Treg) were examined using FOXP3 antibody, and tumor-associated macrophages (TAM) were analyzed using CD163 antibody through immunohistochemistry. Neoplastic follicles from FL samples and reactive follicles from the control group were isolated by laser microdissection. The expression levels of *TGFβR1*, *Smad2*, *Smad3*, *Smad4*, *Smad7*, *SARA*, and *CDKN2B* genes, which are involved in the TGFβ/Smad signaling pathway, were assessed by qRT-PCR. The relationship between molecular findings and histopathological and clinicopathological prognostic data was statistically analyzed.

**Results:** Immunohistochemical analysis showed an increased density of FOXP3<sup>+</sup> Tregs and CD163<sup>+</sup> TAMs in FL samples compared to the control group. Molecular analysis revealed a general increase in the expression of genes related to the TGFβ/Smad pathway in FL samples compared to the control group. However, the observed alterations did not reach statistical significance, likely due to the limited sample size.

**Conclusion:** The microenvironmental characteristics that impact disease prognosis in FL may be associated to alterations in the expression of genes involved in the TGFβ/Smad signaling pathway.

**Key Words:** Follicular lymphoma; TGFβ/Smad pathway; prognosis; microenvironment

## GİRİŞ

Germinal merkez B hücrelerinden kaynaklanan foliküler lenfoma (FL), dünya genelinde en sık görülen ikinci non-Hodgkin lenfoma alt tipidir (1). Foliküler lenfoma patogenezi, B lenfositlerdeki genetik ve epigenetik değişiklikler, süregelen antijenik uyarı, germinal merkez mikroçevresi ve neoplastik hücrelerin mikroçevreyle ilişkisiyle meydana gelen karmaşık bir süreçtir (2-3).

Foliküler lenfomaların karakteristik genetik anomalisi olan t(14;18)(q32;q21) translokasyonu olguların yaklaşık olarak %85'inde görülür (4). 'BCL2 proteininin aşırı ekspresyonunu tetiklemekte olan bu translokasyon, hücrenin fizyolojik apoptotik süreçten kaçışına ve klonal proliferasyonuna neden olmaktadır (5).

Genellikle yavaş seyirli olmasına rağmen klinik davranış ve tedaviye yanıt açılarından FL heterojen bir hastalıktır (6). Güncel Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasında bir öncekinden farklı olarak evre I-II ve 3A FL'ler "klasik FL" olarak tek bir şemsiye altına alınmıştır. Tanımlanan evre I-II ve IIIA FL formları genellikle daha yavaş seyirli bir tablo çizerken, "foliküler büyük B hücreli lenfoma" olarak adlandırılan evre IIIB FL, daha kötü prognozla karakterizedir. Ayrıca evre IIIB FL olguları tedavide daha agresif bir yaklaşım gerektirir (7). Her yıl hastaların %2-3'ünde, daha agresif bir lenfoma türü olan diffüz büyük B hücreli lenfomaya (DLBCL) dönüşüm gerçekleşmektedir (8).

Foliküler lenfoma hastalarının prognostik risk değerlendirmesi, histolojik dereceden bağımsız olarak kullanılan Foliküler Lenfoma Uluslararası Prognostik İndeksi (FLIPI) algoritmasına dayanmaktadır (9).

Prognozün öngörülmesindeki temel faktörler klinik ve laboratuvar verileridir. Bu sistemde dikkate alınan prognostik faktörler; lenf nodu bölge sayısı, serum laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyi, hasta yaşı, hastalığın evresi ve hemoglobin düzeyidir. Rituksimab'ın klinik kullanıma girmesiyle birlikte, bu algoritma FLIPI-2 olarak güncellenmiştir

ve kemik iliği tutulumu ile β2-mikroglobulin düzeyleri de risk faktörleri arasına dahil edilmiştir (10).

B hücrelerinin aşırı proliferasyonu ile karakterize olan FL'nin lenfomagenез sürecinin diğer aktörlerinin, tümör mikroçevresindeki hücresel bileşenler olduğu anlaşılmıştır (11).

Foliküler lenfomanın tümör mikroçevresi; T hücreleri, makrofajlar, stromal hücreler ve daha az oranda nötrofiller ile doğal öldürücü (NK) hücreleri içermektedir (12,13). Ayrıca, klinik seyri değişkenlik gösteren FL'nin prognozu üzerinde, mikroçevrenin kritik etkileri olduğu da anlaşılmaya başlanmıştır (14).

Foliküler lenfoma mikroçevresinde yer alan T hücreleri ve makrofajlar tarafından ifade edilen proteinler, prognozün en önemli belirleyicilerindendir. Özellikle regülatör T hücrelerin (Treg) ve tümör ilişkili makrofajların (TİM) FL'nin prognozunu ve tedaviye yanıtını etkilediği gösterilmiştir (15). Bu alanda çığır açan çalışmalardan birinde Dave ve arkadaşları, mikroçevredeki neoplastik olmayan hücrelere ait gen ifadesi imzalarının FL prognozu ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (16).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, FL germinal merkez B hücreleri (GC-benzeri) ve normal hafıza B hücrelerine benzer (MEM-benzeri) olmak üzere iki farklı moleküler alt tip tanımlanmıştır. Bu sınıflama, normal germinal merkez B hücreleri ve hafıza B hücreleriyle ilişkili iki ayrı gen ekspresyon imzasına dayanmaktadır. MEM-benzeri tümörler, rituksimab-kemoterapi tedavisi gören hastalarda anlamlı şekilde daha kötü progresyonsuz sağkalımla ilişkilendirilmiş, bu da FL'nin biyolojik çeşitliliğinin klinik sonuçlar üzerindeki etkisini vurgulamıştır (17).

Literatürde, T hücrelerinde ifade edilen genlerin imzaları daha iyi klinik seyirle ilişkilendirilirken, makrofajlar ve foliküler dendritik hücrelerdeki gen ifadelerinin hastalığın seyrini olumsuz yönde etkilediğine dair veriler mevcuttur. Ancak farklı çalışmalarda elde edilen çelişkili bulgular

nedeniyle bu konu halen aktif bir araştırma alanı olma özelliğini korumaktadır (18).

Foliküler lenfoma patogeneğinde, tümör mikroçevresindeki immün hücre popülasyonları ve hücreler arası sinyal yolları da hastalığın prognozu ve transformasyon potansiyeli üzerinde belirleyici rol oynamaktadır.

Foliküler lenfoma patogeneğinde, B hücre reseptörü, Toll-benzeri reseptör, Notch, NF- $\kappa$ B ve MAPK gibi çeşitli sinyal iletim yollarındaki bozukluklar rol oynamaktadır (19). Bu yolların yanı sıra Transforming Growth Factor Beta (TGF $\beta$ ) sinyal yolları da hücre proliferasyonu, farklılaşma, ölüm, iskelet organizasyonu, adezyon ve migrasyon gibi temel hücresel süreçleri düzenleyen mekanizmalarıyla tümör mikroçevresindeki çeşitli hücrelerin işlevlerinin kontrolünde rol oynamaktadır. TGF $\beta$ , klasik (Smad aracılı) ve alternatif (Smad dışı) olmak üzere iki yol üzerinden sinyal iletimini gerçekleştirir (20). Klasik yolda sinyal Smad proteinleri üzerinden iletilirken, alternatif yolda bu iletim MAP kinaz, Rho-benzeri GTPaz ve PI3K/AKT yolları üzerinden sağlanır.

TGF $\beta$ , tümör mikroçevresindeki NK, CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücreleri, makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler, mast hücreleri ve B hücrelerinin işlevlerini etkilemektedir (21,22). Yüksek düzeyde TGF $\beta$  varlığı, B hücrelerinde apoptoza neden olurken dendritik hücrelerle NK hücrelerinin olgunlaşmasını baskılamaktadır (23,24). Ayrıca TGF $\beta$ , granzim A, granzim B, perforin, FAS ligandı ve interferon gibi T hücre aracılı tümör hücreleri sitotoksitesine ait faktörlerin ifadesini de baskılar (25). TGF $\beta$ , monositlerin makrofajlara farklılaşmasında da rol oynamaktadır. Aynı zamanda, makrofajların M1 formundan M2 formuna polarizasyonunu teşvik ederek monosit aracılı hücre ölümünü baskılamaktadır. Bu bağlamda, TGF $\beta$ /Smad sinyal yolağının immün yanıtı düzenleyici etkileri ve tümör mikroçevresiyle olan etkileşimleri nedeniyle FL patogeneindeki rolü dikkat çekmektedir (26,27).

TGF $\beta$ , hücre tipi ve hücresel koşullara bağlı olarak çok yönlü bir etki mekanizmasına sahip bir sitokindir. Normal hücresel koşullarda, hücre proliferasyonunu baskılayarak ve farklılaşmayı uyarak tümör baskılayıcı rol oynarken, kanserin ileri evrelerinde bu durum tersine dönmekte ve tümör büyümesi ile metastazı tetikleyen onkogenik bir işlev kazanmaktadır (28).

Literatürdeki çelişkili veriler göz önüne alınarak, bu çalışmada tümör mikroçevresinin FL prognozu üzerindeki etkisini ve TGF $\beta$ /Smad sinyal iletim yolağının bu süreçteki potansiyel rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, düşük dereceli FL'lerde TGF $\beta$ /Smad yolağının mikroçevre üzerindeki düzenleyici etkisinin, klinik prognostik özelliklerle olan ilişkisi araştırılmıştır.

## HASTALAR ve YÖNTEM

Çalışmaya 21 FL ve kontrol grubu olarak seçilen beş reaktif foliküler hiperplazi olgusuna ait formalinle fikse edilmiş parafine gömülü dokular (FFPE) dahil edilmiştir. Foliküler lenfoma olgularının ikisi evre III, geri kalan 19'u ise evre I-II olarak sınıflandırılmıştır.

Seçim aşamasında tanı amacıyla kullanılan belirteçler arasında özellikle BCL2, BCL6, dendritik hücre belirteçleri CD21 ve CD23, T hücresi belirteci CD3, makrofaj belirteci CD68 ve proliferasyon belirteci Ki-67 yeniden değerlendirilmiş ve puanlandırılmıştır.

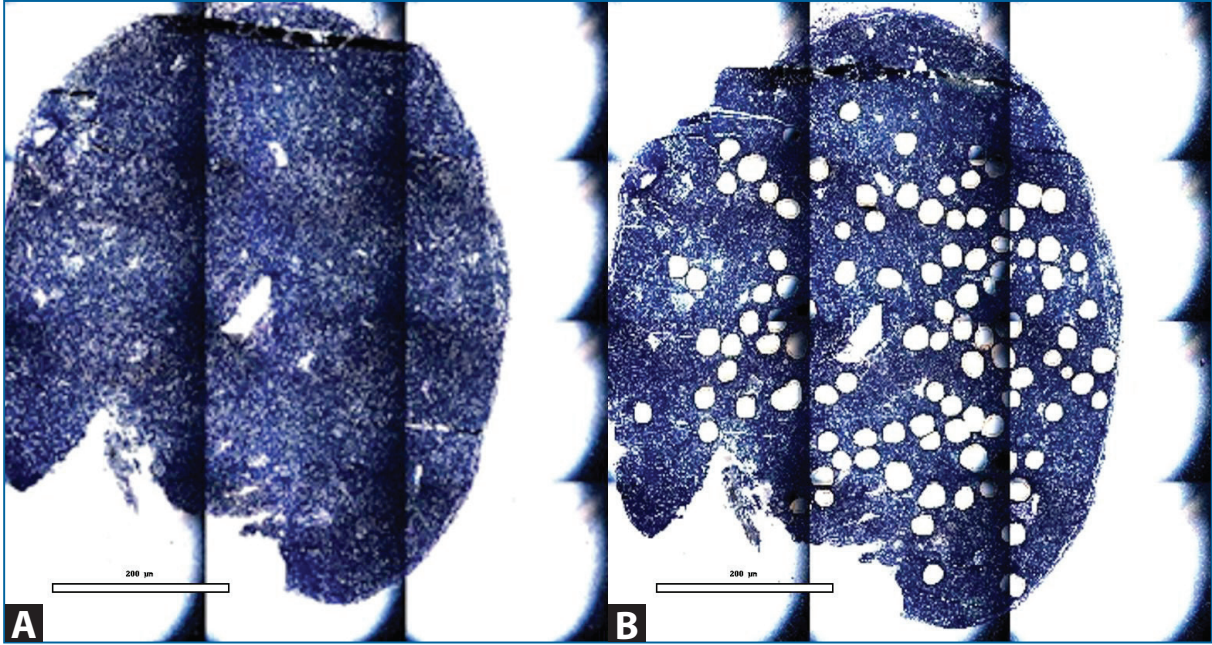
Foliküler lenfoma prognozunu etkileyen mikroçevresel elemanlar olan Treglerin belirteci olarak FOXP3 ve TİM'lerin belirteci olarak ise CD163 ifadeleri immünohistokimya yöntemiyle analiz edilmiştir.

FOXP3 için Epitomics (Tavşan Monoklonal) Anti-FOXP3 (Klon EP340) ve CD163 için Cell Marque CD163 (MRQ-26) (Fare Monoklonal) antikoları kullanılmıştır. İmmünohistokimyasal boyamalar, Ventana Benchmark ULTRA tam otomatik boyama cihazında gerçekleştirilmiştir.

TGF $\beta$  yolağındaki genlerin özellikle FL hücrelerinin bulunduğu alanlarda incelenebilmesi için neoplastik folliküller lazer mikrodiseksiyon yöntemiyle Leica LMD6 sistemi kullanılarak 10  $\mu$ m kalınlığında parafin doku kesitlerinden disseke edilmiştir. Formalinle fikse edilmiş parafine gömülü dokular doku kesitleri, 2  $\mu$ m kalınlığında PEN membranlı cam lamalar (Leica, Almanya) üzerine alınmıştır. Kesit alma işlemi sırasında mikrotom olarak Shandon Finesse 325 (ThermoFisher Scientific) cihazı kullanılmış, DEPC ile muamele edilmiş su tercih edilmiş ve mikrotom bıçakları RNase away™ (Ambion) ile temizlenmiştir.

Bu membran üzerindeki doku kesitleri Toluidin Blue boyası ile boyanarak neoplastik follikül yapıları görünür hale getirilmiştir. Lazer mikrodiseksiyon cihazında yalnızca neoplastik follikül yapıları kesilerek çalışma için toplanmıştır. Toluidin Blue ile boyanmış kesitlerde bulanık alanların bulunabilme ihtimaline karşı, her örnek için FOXP3 ve CD163 gibi diğer ilgili belirteçlere ait boyanmış lamardaki alanlarla karşılaştırılarak doğru folliküller seçilmiştir (Şekil 1).

Toplam RNA, lazer mikrodiseksiyon ile toplanan foliküler alanlardan, üretici firmanın talimatlarına uygun olarak RNeasy FFPE Kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak izole edilmiştir. RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı, Implen NanoPhotometer® P 300 (Implen GmbH, Münih, Almanya) cihazıyla ölçülmüş ve örnekler kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.



**Şekil 1.** Lazer mikrodiseksiyon öncesi (A) ve sonrası (B) doku kesitlerinin görünümü (ölçek çubuğu= 200 μm).

cDNA sentezi için reverse transkripsiyon işlemi, üretici firmanın talimatlarına uygun olarak RT2 First Strand Kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak ve 400 ng ekstrakte edilmiş RNA ile gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı polimeraz reaksiyon testi (qRT-PZR), Roche LightCycler480 sisteminde *TGFBR1*, *Smad2*, *Smad3*, *Smad4*, *Smad7*, *SARA*, *CDKN2B* genlerine özgü RT2 qPZR Primer Assay (Qiagen, Hilden, Almanya) primerleri ve RT2 SYBR Green Mastermix (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. qPZR döngü koşulları; 95'-de 10 dakika, 95'-de 15 saniye, 60'-de 60 saniye ve 72'-de 30 saniyelik 40 döngü; 95'-de 30 saniye, 60'-de 30 saniye ve 95'-de 30 saniyelik bir erime eğrisi oluşturulmuştur.

Polimeraz zincir reaksiyonu verilerinin analizi için 2-ΔΔCt yöntemi kullanılmıştır ve normalizasyon amacıyla ACTB (β-actin) geni kullanılmıştır. Beş kontrol bireyinden elde edilen Ct değerleri her bir gen için normalize edildikten sonra ortalama değer saptanmış ve karşılaştırmalı gen ifadesi analizlerinde kontrol verisi olarak kullanılmıştır.

Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis, Fisher'in kesinlik testi ve Spearman korelasyon katsayısı yöntemleri kullanılarak parametreler karşılaştırılmıştır. Çalışma kapsamında değerlendirilen nicel veriler medyan (minimum-maksimum) değerlerle, kategorik veriler ise frekans ve yüzde değerleriyle özetlenmiştir. Cinsiyet oranları açısından FL ve kontrol grupları, Fisher'in kesinlik testiyle karşılaştırılmıştır. Gen ekspresyonlarının karşılaştırılmasında, FL grubuyla kontrol grubu arasındaki farkların yanı sıra, FL grubundaki alt gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde

uygun istatistiksel test olarak Mann-Whitney U testi veya Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Tip-I hata oranını kontrol etmek amacıyla elde edilen p değerlerine Benjamini-Hochberg düzeltmesi uygulanmıştır.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 21 hastanın medyan yaşı 64 (minimum: 33, maksimum: 79)'tür. Cinsiyet dağılımı incelendiğinde hastaların %47.6 (n= 10)'sı kadın ve %52.4 (n= 11)'ü erkek olarak belirlenmiştir (Tablo 1).

Evre I-II olarak sınıflandırılan düşük dereceli FL hastaları, tüm grubun %73.1 (n= 19)'ini oluşturmaktadır. İki hasta ise evre III FL tanısı almış olup bu oran %7.7 (n= 2)'dir (Şekil 2-4). Hastaların tanı sırasındaki evreleri değerlendirildiğinde, %9.5 (n= 2)'i evre I, %23.8 (n= 5)'i evre III, %61.9 (n= 13)'ü evre IV olduğu saptanmıştır. Lenf nodu sayıları değerlendirildiğinde, dörtten az sayıda lenf nodu tutulumu olan 1 (%4.8) hasta mevcutken, diğer hastaların (%95.2, n= 20) dört ve üzeri sayıda lenf nodu tutulumu gösterdiği saptanmaktadır. Kemik iliği tutulumu 12 (%57.1) hastada saptanmış, 9 (%42.9) hastada kemik iliği tutulumu bulunmadığı görülmüştür (Tablo 1).

Hemoglobin değerleri altı hastada normalin (12g/dL) altında gözlenirken 15 hastada normal saptanmıştır. Serum LDH değeri de altı hastada normal seviyeden (200U/L) yüksek, 15 hastada normal sınırlarda gözlenmiştir. Çalışmaya dahil olan FL vakalarının FLIPI skorları değerlendirildiğinde, iki vakada düşük risk (0-1) saptanırken, iki vakada orta risk (2), 17 vakanın ise yüksek risk grubunda



Tablo 1. Demografik, klinik ve immünohistokimyasal bulgular

|          | Yaş | Cinsiyet | Evre | FOXP3 | CD163 | Hemogloblin | Serum LDH | Evre | Lenf Nodu Sayısı | Ki Tutulumu | FLIPI-1 Skor | Ki-67 | BCL2 |
|----------|-----|----------|------|-------|-------|-------------|-----------|------|------------------|-------------|--------------|-------|------|
| Hasta 1  | 47  | Erkek    | 1    | 2     | 1     | 16.6        | 225       | 1    | <4               | Yok         | 1            | 1     | 1    |
| Hasta 2  | 55  | Erkek    | 1    | 1     | 0     | 14.4        | 241       | 4    | ≥4               | Yok         | 3            | 1     | 1    |
| Hasta 3  | 66  | Erkek    | 2    | 2     | 0     | 15.7        | 219       | 4B   | ≥4               | Var         | 4            | 0     | 1    |
| Hasta 4  | 56  | Kadın    | 2    | 2     | 0     | 11.5        | 162       | 4    | ≥4               | Var         | 3            | 0     | 1    |
| Hasta 5  | 37  | Erkek    | 2    | 1     | 0     | 15.5        | 154       | 4    | ≥4               | Var         | 3            | 1     | 0    |
| Hasta 6  | 74  | Kadın    | 2    | 2     | 0     | 12.9        | 146       | 4    | ≥4               | Var         | 3            | 2     | 1    |
| Hasta 7  | 64  | Kadın    | 2    | 1     | 1     | 12.8        | 380       | 4    | ≥4               | Var         | 4            | 1     | 1    |
| Hasta 8  | 59  | Kadın    | 2    | 1     | 2     | 13.3        | 132       | 4    | ≥4               | Yok         | 2            | 0     | 2    |
| Hasta 9  | 73  | Erkek    | 2    | 1     | 0     | 11.5        | 166       | 4    | ≥4               | Var         | 4            | 2     | 1    |
| Hasta 10 | 60  | Kadın    | 2    | 1     | 0     | 14.0        | 0         | 4    | ≥4               | Var         | 3            | 0     | 2    |
| Hasta 11 | 66  | Kadın    | 2    | 1     | 0     | 12.7        | 170       | 4    | ≥4               | Var         | 3            | 2     | 1    |
| Hasta 12 | 73  | Kadın    | 2    | 2     | 0     | 14.6        | 230       | 3    | ≥4               | Yok         | 4            | 2     | 1    |
| Hasta 13 | 79  | Erkek    | 2    | 2     | 0     | 12.4        | 256       | 3    | ≥4               | Yok         | 4            | 1     | 0    |
| Hasta 14 | 43  | Kadın    | 2    | 2     | 0     | 12.5        | 150       | 3A   | ≥4               | Yok         | 2            | 2     | 2    |
| Hasta 15 | 33  | Erkek    | 2    | 2     | 0     | 17.0        | 158       | 1    | ≥4               | Yok         | 2            | 2     | 1    |
| Hasta 16 | 51  | Kadın    | 2    | 2     | 1     | 11.0        | 189       | 1    | ≥4               | Var         | 3            | 1     | 1    |
| Hasta 17 | 69  | Erkek    | 2    | 2     | 0     | 16.5        | 210       | 4    | ≥4               | Var         | 3            | 3     | 1    |
| Hasta 18 | 75  | Kadın    | 2    | 2     | 1     | 10.2        | 218       | 4    | ≥4               | Var         | 5            | 1     | 2    |
| Hasta 19 | 67  | Erkek    | 2    | 1     | 2     | 15.9        | 146       | 3    | ≥4               | Yok         | 3            | 3     | 1    |
| Hasta 20 | 70  | Erkek    | 3B   | 3     | 2     | 8.9         | 387       | 4    | ≥4               | Var         | 5            | 3     | 2    |
| Hasta 21 | 61  | Erkek    | 3A   | 3     | 0     | 11.3        | 369       | 3    | ≥4               | Yok         | 4            | 3     | 1    |

LDH: Laktat dehidrogenaz.

(3-5) olduğu saptanmıştır. Çalışmadaki iki vaka haricinde, bütün vakaların %90.5'inde BCL2 pozitifliği gözlenmiştir. Hastaların proliferasyon belirteci Ki-67 durumlarına bakıldığında, 4 (%19) hastada proliferasyon oranının çok düşük (skor 0), 7 (%33.3) hastada düşük (skor 1), 6 (%28.6) hastada orta (skor 2) ve 4 (%19) hastada (skor 3) yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 1).

Foliküler lenfoma olguları, immünohistokimyasal olarak FOXP3 ve CD163 antikorlarıyla boyanarak, ışık mikroskobu altında değerlendirilmiş ve sinyal yoğunluğundaki artışa göre 0-3 arasında puanlandırılmıştır.

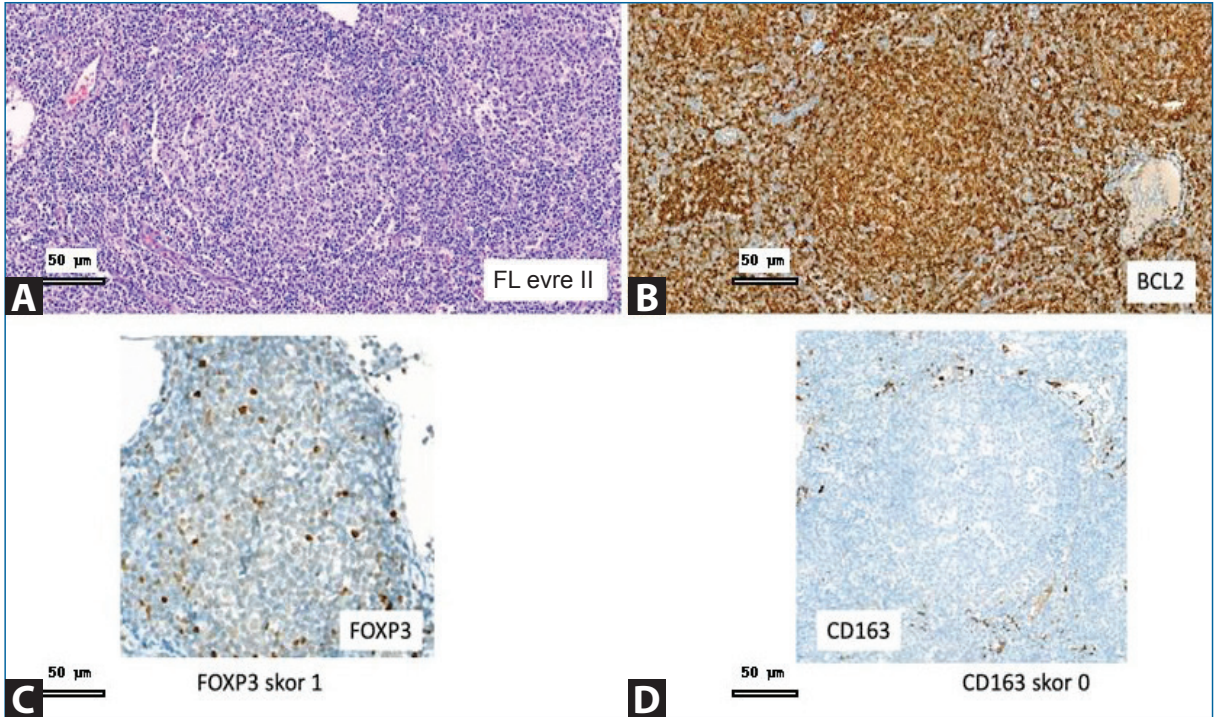
FOXP3 pozitif Treg hücre skorlamasında; skor 1, 2 ve 3 grubundaki hastalar sırasıyla %38.1 (n= 8), %52.4 (n= 11) ve %9.5 (n= 2) oranında tüm hasta grubunu temsil etmektedir. CD163 ekspresyonu gösteren TİM'lerin değerlendirilmesinde ise skor 0, 1 ve 2 grubundaki hastalar sırasıyla %66.7 (n= 14), %19 (n= 4) ve %14.3 (n= 3) olarak bulunmuştur (Şekil 2-4).

Foliküler lenfoma olguları Tablo 2'de görülen FLIPI-1 skorlaması temel alınarak, Tablo 1'de sunulan klinik bulguları ışığında gerçekleştirilmiştir (29). Çalışmaya dahil edilen

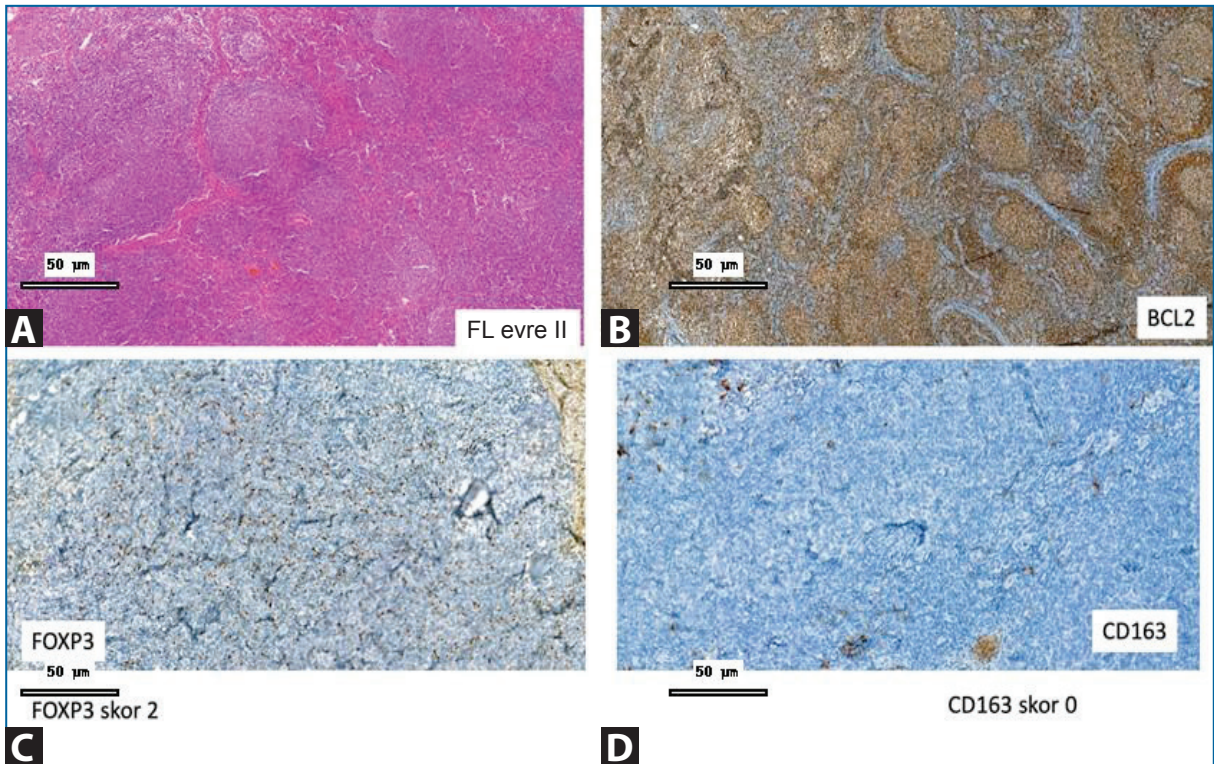
FL vakalarının FLIPI skorları değerlendirildiğinde; iki olgu düşük risk (0-1), iki olgu orta risk (2) ve 17 olgu yüksek risk (3-5) grubunda yer almıştır.

qPZR analizleri "rölatif kantifikasyon ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )" yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında qPZR analiz sonuçlarına göre; 21 olgunun 14'ünde *TGFβR1* gen ifadesi artmış, yedi olguda ise azalmıştır. *Smad2* gen ifadesi 21 olgunun 17'sinde artarken, geri kalan dört olguda azalma göstermiştir. *Smad3* gen ifadesi 15 olguda artmış, altı olguda azalmıştır. *Smad4* gen ifadesi 16 olguda artarken, beş olguda azalmıştır. *Smad7* gen ifadesi 18 olguda artmış, üç olguda ise azalmıştır. *SARA* gen ifadesi 12 olguda artarken, dokuz olguda azalmıştır. *CDKN2B* gen ifadesi 17 olguda artmış, üç olguda azalmış; bir olguda ise ifade düzeyinde değişiklik gözlenmemiştir. Çalışmaya konu olan genlerde, hasta örneklerinin kontrole göre ifadelerinin kat değişimleri Şekil 5'teki heatmap grafiğinde belirtilmiştir.

Bu analizlerden elde edilen sonuçlara göre; TGFβ/Smad yolağında yer alan *TGFβR1*, *Smad2*, *Smad3*, *Smad4*, *Smad7*, *SARA* ve *CDKN2B* gen ifadelerinin FL hastalarındaki

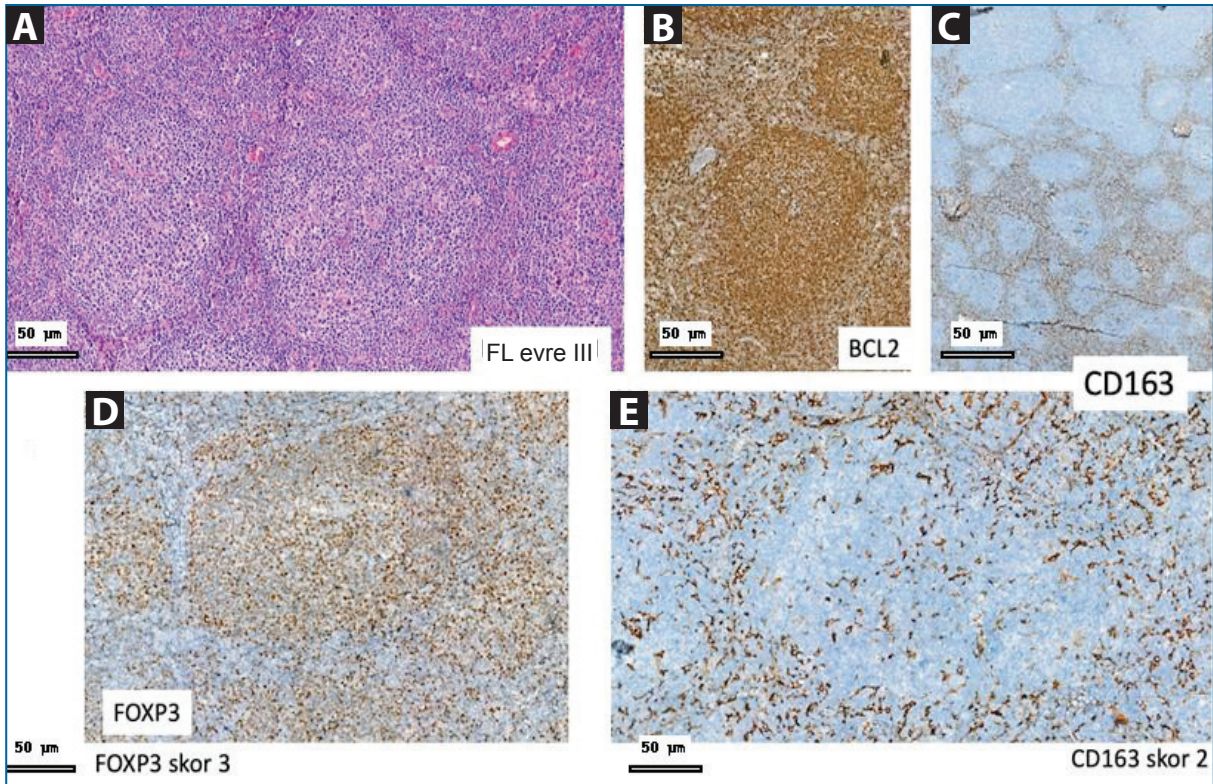


**Şekil 2.** Foliküler lenfoma (evre II) olgusundan temsili kesitler. (A) H&E boyası. (B) BCL2 immünohistokimyasal boyaması. (C) FOXP3 immünohistokimyasal boyaması. (D) CD163 immünohistokimyasal boyaması (ölçek çubuğu= 50  $\mu$ m).



**Şekil 3.** Foliküler lenfoma (evre II) olgusundan başka bir alanın temsili kesitleri. (A) H&E boyası. (B) BCL2 immünohistokimyasal boyaması. (C) FOXP3 immünohistokimyasal boyaması. (D) CD163 immünohistokimyasal boyaması (ölçek çubuğu= 50  $\mu$ m).





**Şekil 4.** Foliküler lenfoma (evre III) olgusundan immünohistokimyasal boyamalar. (A) H&E boyası. (B) BCL2 boyaması. (C) FOXP3 boyaması. (D) CD163 boyaması. (E) başka bir alandan CD163 boyaması (ölçek çubuğu= 50 µm).

değişimleri kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p \geq 0.05$ ) (Tablo 3).

FOXP3 ve CD163 immünohistokimyasal ekspresyon skorlarına göre, TGF $\beta$ /Smad yolağında yer alan *TGF $\beta$ R1*, *Smad2*, *Smad3*, *Smad4*, *Smad7*, *SARA* ve *CDKN2B* genlerinin ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır ( $p \geq 0.05$ ). Ayrıca, Ki-67 proliferasyon indeksiyle söz konusu genlerin ekspresyonları arasında da anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p \geq 0.05$ ) (Tablo 4).

Klinik prognostik belirteç olan FLIPI skorlarıyla TGF $\beta$ /Smad yolağındaki *TGF $\beta$ R1*, *Smad2*, *Smad3*, *Smad4*, *Smad7*, *SARA*, *CDKN2B* genlerinin ifadeleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır (çizelge 5.5) ( $p \geq 0.05$ ). Hastalarda tanı sırasındaki evreleriyle ilgili bilgi veren kemik iliği tutulumuyla TGF $\beta$ /Smad yolağındaki *TGF $\beta$ R1*, *Smad2*, *Smad3*, *Smad4*, *Smad7*, *SARA*, *CDKN2B* genlerinin ifadeleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır ( $p \geq 0.05$ ) (Tablo 5).

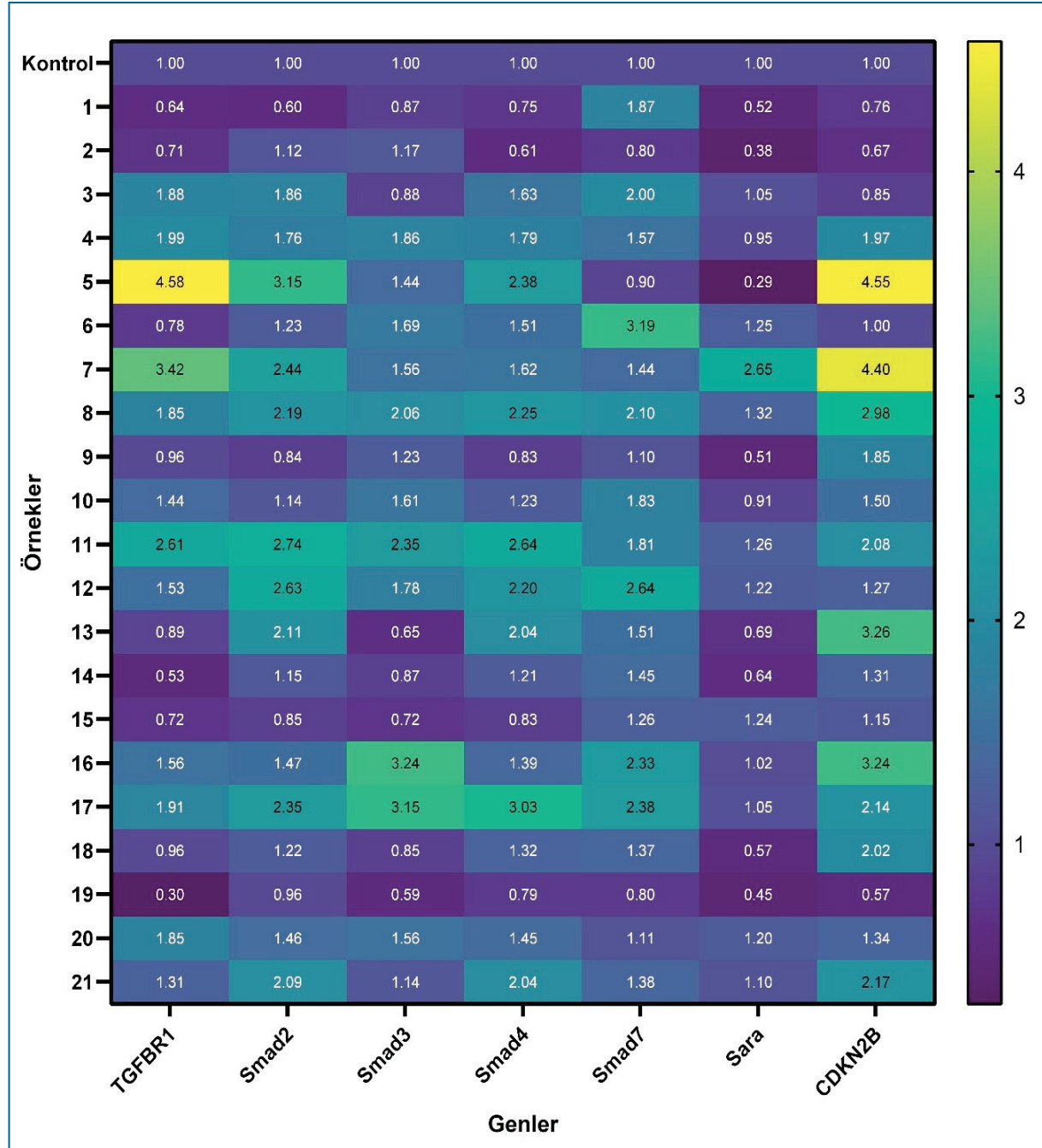
## TARTIŞMA ve SONUÇ

Foliküler lenfoma, klinik ve prognostik açıdan heterojen bir hastalıktır. Klinik faktörlerin yanı sıra literatürde yer alan çok sayıda çalışma, tümör mikroçevresinin FL prognozundaki kritik önemini ortaya koymuştur (6). Neoplastik B hücreleriyle mikroçevre arasındaki kompleks etkileşim,

hastalığın şiddetini, tedaviye yanıtı ve klinik seyri etkileyen faktörler arasında önemli bir rol oynamaktadır (30).

Tümör mikroçevresinin ayrıntılı karakterizasyonu, yeni immünoterapötik ajanlar, kontrol noktası inhibitörleri ve idelalisib gibi sinyal yolağı inhibitörleriyle tedaviye yanıt açısından farklı T hücre tiplerinin bileşiminin önemini ortaya koymuştur (31). Çok sayıda retrospektif çalışma, FOXP3<sup>+</sup> T hücrelerinin FL, germinal merkez tipi DLBCL ve Hodgkin lenfomada tedaviden bağımsız olarak iyi prognoz göstergesi olduğunu göstermiştir (32). Ancak germinal merkez tipi olmayan DLBCL'de FOXP3<sup>+</sup> T hücrelerinin kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (33). Rituksimab tedavisi öncesi dönemde, tanı anında yüksek düzeyde foliküler FOXP3<sup>+</sup> Treg varlığının, genel sağkalım süresini uzattığı sonucuna varılmıştır (31-34).

Gen ekspresyon analizlerinden elde edilen güncel bilgilere göre, malign olmayan lenfositlerin FL ve DLBCL'de önemli prognostik öneme sahip olduğu gösterilmiştir (6). Tedavi almamış B hücreli non-Hodgkin lenfoma hastalarında, sağlıklı bireylere veya tedavi almış hastalara oranla anlamlı düzeyde artmış FOXP3 mRNA transkriptleri gözlenmiştir. Serum LDH düzeyi ile periferik CD4/CD25 pozitifliği, periferik FOXP3 ekspresyonu, hastalık evresi ve performans durumu, periferik kan TGF $\beta$  mRNA ekspresyonu ve CD4/CD25 pozitifliği arasında pozitif korelasyon saptan-



Şekil 5. FLIPI skorları, kemik iliği tutulumu ile TGFβ/Smad yolağındaki genlerin ifadelerinin istatistiksel karşılaştırılması.

miştir. Ayrıca FL hastalarında LDH ve FOXP3 ekspresyon düzeylerinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (35). Laurenti ve arkadaşlarının çalışması, artmış Treg oranının yüksek LDH düzeyi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (36).

Başka bir çalışmada, R-CVP ile tedavi edilen FL hastalarında CD163<sup>+</sup> TİM'lerin kötü prognozla ilişkili olduğu, R-CHOP tedavisi alanlarda ise iyi prognoz göstergesi olduğu bulunmuştur (37). Bu bulgular, TİM miktarının FL hasta-

larında prognoz tahmininde rol oynadığını, ancak bu etkinin tedaviye bağımlı olduğunu göstermektedir. Rituksimab tedavisi öncesinde yapılan immünohistokimya çalışmaları yüksek makrofaj sayısının kötü prognozla ilişkili olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir (31-38).

Xie ve arkadaşlarının meta-analiz çalışmasına göre, yüksek CD68<sup>+</sup> TİM yoğunluğu, düşük yoğunluğa kıyasla daha kısa genel sağkalım (OS) ile ilişkili bulunmuştur (p=0.033). Ayrıca, FL prognozu ile CD68<sup>+</sup> TİM düzeyi arasındaki



**Tablo 2. FLIPI ve FLIPI-2 risk sınıflandırma tablosu**

| Parametre                    | FLIPI-1              | FLIPI-2                       |
|------------------------------|----------------------|-------------------------------|
| Lenf nodu                    | >4 lenf nodu bölgesi | >6 cm                         |
| Yaş                          | >60                  | >60                           |
| Serum belirtci               | Artmış LDH           | Artmış $\beta$ -mikroglobulin |
| Evre                         | Ann Arbor III-IV     | Kemik iliği tutulumu          |
| Hemoglobin                   | <12 g/dL             | <12 g/dL                      |
| <b>5 yıllık sağkalım (%)</b> |                      |                               |
| Düşük risk (0-1)             | 91                   | 79                            |
| Orta risk (2)                | 78                   | 51                            |
| Yüksek risk (3-5)            | 53                   | 20                            |

LDH: Laktat dehidrogenaz.

**Tablo 3. FL hastalarında TGF $\beta$ /Smad yolağına ait gen ifade değişikliklerinin kontrol grubuyla istatistiksel olarak karşılaştırılması**

|   | TGF $\beta$ 1 | SMAD2 | SMAD3 | SMAD4 | SMAD7 | SARA  | CDKN2B |
|---|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| p | 0.555         | 0.242 | 0.492 | 0.242 | 0.184 | 0.753 | 0.492  |

FL: Foliküler lenfoma.

**Tablo 4. İmmünohistokimyasal mikroçevre ilişkili belirteçler ve proliferasyon indeksiyle TGF $\beta$ /Smad yolağındaki genlerin ifadelerinin istatistiksel karşılaştırılması**

| p     | TGF $\beta$ 1 | SMAD2 | SMAD3 | SMAD4 | SMAD7 | SARA  | CDKN2B |
|-------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| FOXP3 | 0.952         | 0.952 | 0.952 | 0.952 | 1     | 0.952 | 1      |
| CD163 | 0.913         | 0.913 | 0.913 | 0.913 | 0.913 | 0.913 | 0.913  |
| Ki-67 | 0.857         | 0.717 | 0.825 | 0.822 | 0.717 | 0.717 | 0.784  |

**Tablo 5. FLIPI skorları, kemik iliği tutulumuyla TGF $\beta$ /Smad yolağındaki genlerin ifadelerinin istatistiksel karşılaştırılması**

| p                    | TGF $\beta$ 1 | SMAD2 | SMAD3 | SMAD4 | SMAD7 | SARA  | CDKN2B |
|----------------------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| FLIPI skor           | 0.292         | 0.248 | 0.248 | 0.248 | 0.406 | 0.406 | 1      |
| Kemik iliği tutulumu | 0.936         | 0.936 | 0.936 | 0.936 | 0.936 | 0.936 | 0.972  |

FLIPI: Foliküler lenfoma uluslararası prognostik indeksi.

korelasyonda yüksek TİM düzeyinin kötü OS ile ilişkili olduğu görülmüştür.

Rituksimab tedavisinin, özellikle yüksek CD68<sup>+</sup> TİM yoğunluğuna sahip hastalarda OS ve PFS üzerinde anlamlı pozitif etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu durum, FL'de CD68<sup>+</sup> ve CD163<sup>+</sup> makrofaj sayılarını immünokemoterapi duyarlılığı için potansiyel bir biyobelirteç olarak öne çıkarmaktadır (39).

Önceden, makrofajların malign B hücrelerinin sağkalım sinyallerini desteklemek amacıyla sitokin ve kemokin ürettiği düşünülmektedir. Uyarı tipine bağlı olarak makrofajlar M1 veya M2 fenotiplerine farklılaşmakta olup bu iki alt grubun bağışıklık yanıtındaki rolleri farklılık göstermektedir. Ancak, makrofaj aracılı tümör gelişimini destekleyen mekanizmalar ve M2 tipi makrofajların FL'deki rolleri tam olarak aydınlatılamamıştır ve tedaviye bağlı değişiklikler olabileceği düşünülmektedir (37-39).

Bu çalışmalardan elde edilen çelişkili sonuçlar nedeniyle, FL mikroçevresinde Treglerin ve TİM'lerin rollerinin literatürde net olarak tanımlanmadığı görülmektedir. Bu belirsizliğin giderilmesine katkıda bulunmak amacıyla çalışmamızda, immünohistokimyasal analizlerle CD163<sup>+</sup> TİM'ler ve FOXP3<sup>+</sup> Treglerin FL prognozunu etkileyen diğer faktörlerle ilişkisi araştırılmıştır. Ancak FOXP3 ve CD163 skorları ile klinik prognostik veriler arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır (p $\geq$  0.05).

Çalışmamızda, tümör mikroçevresinin prognoz üzerindeki etkisinin değerlendirilmesine odaklanıldığından, neoplastik foliküllerin doğru seçimi büyük önem taşımıştır. Bu amaçla lazer mikrodiseksiyon yönteminin kullanılması uygun bulunmuş ve literatürde benzer çalışmalarda nadiren kullanılan bu yöntem çalışmamızın güvenilirliğini artırmıştır.

Çalışmamızın doğrudan amacı olmamakla birlikte, FOXP3 ve CD163 skorlarının evre I-II ve evre III olgular ara-

sında farklılık gösterip göstermediği incelenmiş; FOXP3 skoru yüksek olan iki olgunun her ikisinin de evre III olduğu, ayrıca bu iki olgudan birinin yüksek CD163 skoruna sahip olduğu gözlenmiştir. Yalnızca 21 olgunun üçünde yüksek CD163 skoru bulunduğu dikkate alındığında, bu iki bulgudan birinin evre III olması dikkat çekicidir. Bu durum, yüksek dereceli FL olgularında düşük derecelilere göre daha fazla Treg ve TİM bulunabileceğini düşündürmektedir. Bu olasılığın doğrulanması için daha geniş örneklem gruplarında, düşük ve yüksek dereceli FL olgularında Treg ve TİM'lerin incelenmesi yararlı olacaktır.

TGFβ/Smad yolağı, çok yönlülüğüyle bilinen bir sinyal yolağıdır. Normal şartlarda hücre proliferasyonunu baskılamakta ve hücrel farklılaşmayı desteklemektedir. Ancak kanserin ileri evrelerinde, tümör büyümesini ve metastazı destekleyici etki gösterebilmektedir. Bu yolak, bağlama ve hücrel koşullara bağlı olarak zaman zaman tümör baskılayıcı, zaman zaman ise onkogenik bir işlev üstlenmektedir (40).

Son dönemde yapılan bazı çalışmalar, TGFβ yolağının FL gelişiminde aktif rol aldığını göstermektedir. Tvrdik ve arkadaşları, TGFβ'nın FL hücre hatları üzerindeki in vitro etkilerini ortaya koyarak hücre döngüsü arresti oluşturduğunu göstermiştir (41,42).

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda, düzenleyici T hücreleri veya tümörle ilişkili makrofajların zengin olduğu mikroçevrelerde TGFβ/Smad yolağının FL'deki rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda TGFβ/Smad yolağı genlerinin ekspresyon değişiklikleriyle hastaların klinik ve patolojik prognostik parametreleri arasındaki ilişki değerlendirilerek bu yolağın FL'nin klinik davranışı üzerindeki etkisine ışık tutması hedeflenmiştir.

Çalışmamızda, yavaş seyirli FL hastalarında *TGFβR1*, *Smad2*, *Smad3*, *Smad4*, *Smad7*, *SARA* ve *CDKN2B* genlerinin ekspresyon değişimleri kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir (Mann-Whitney U testi,  $p \geq 0.05$ ). Aynı şekilde bu genlerin ekspresyonları ile FOXP3 ve CD163 immünohistokimyasal skorları arasında da anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır ( $p \geq 0.05$ ). Ayrıca, bu genlerin ekspresyonları ile Ki-67 proliferasyon indeksi, FLIPI skorları arasında da anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ( $p \geq 0.05$ ). Ayrıca, bu genlerin ekspresyonları ile Ki-67 proliferasyon indeksi, FLIPI skorları arasında da anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ( $p \geq 0.05$ ).

TGFβ/Smad yolağının, özellikle ileri evre kanserlerde tümör progresyonunu hızlandırıcı etkileri göz önünde bulundurulduğunda, bu yolağı hedefleyen terapötik yaklaşımlar gelecekteki tedavi stratejileri için umut verici bir potansiyele sahiptir (43). Çalışmamızda, FL hastalarında söz konusu genlerin ekspresyon artışının kontrol grubuna

göre anlamlı olduğu ve FLIPI skorlarıyla korelasyon gösterdiği senaryoda, TGFβ/Smad yolağını hedefleyen tedavi seçeneklerinin (örneğin antisens oligonükleotidler, Belagenpneumatucel-L gibi anti-TGFβ kanser aşıları, 2G7, 1D11, Lerdelimumab, Metelimumab, Fresolimumab gibi monoklonal antikolar) FL için alternatif ya da yardımcı tedavi olarak potansiyel kullanımına dair tartışmalar yapılabildi.

TGFβ/Smad yolağının FL prognozu üzerindeki etkilerinin daha ayrıntılı ve bütünsel bir biçimde ortaya konulabilmesi için bu yolakta yer alan genlerin mutasyon durumu ve epigenetik etmenler göz önünde bulundurulurken ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir. Ayrıca çalışmamızda elde edilen verilerin desteklenmesi noktasında, örneklem büyüklüğü ve hasta-kontrol oranı açısından daha kapsamlı ve dengeli çalışmalar yapılması yararlı olacaktır.

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alınmıştır (Tarih: 25.09.2017, Karar no: 15-965-17).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## MALİ AÇIKLAMA

Çalışma için doğrudan veya dolaylı mali destek alınmadı. Çalışma ile ilgili herhangi bir firma veya kişi ile ilgili ticari bağlantı yoktur.

## YAZAR KATKISI

Literatür taranması: ŞK, IK; Vakaların takip ve tedavi aşamaları: IK; Verilerin toplanması: SCB, MÖ; Makalenin yazımı: ŞK, IK; Onaylama: IK, SCB.

## KAYNAKLAR

- Rossi D, Rasi S, Spina V, Brusca A, Monti S, Ciardullo C, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013;121(8):1403-12. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-458265>
- Carreras J. The pathobiology of follicular lymphoma. *J Clin Exp Hematop* 2023;63(3):152-63. <https://doi.org/10.3960/jcsh.23014>
- Nam AS, Chaligne R, Landau DA. Integrating genetic and non-genetic determinants of cancer evolution by single-cell multi-omics. *Nat Rev Genet* 2021;22(1):3-18. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0265-5>
- Pasqualucci L, Khiabani H, Fangazio M, Vasishta M, Messina M, Holmes AB, et al. Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Rep* 2014;6(1):130-40. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.027>
- Rosenquist R, Beà S, Du MQ, Nadel B, Pan-Hammarström Q. Genetic landscape and deregulated pathways in B-cell lymphoid malignancies. *J Intern Med* 2017;282(5):371-94. <https://doi.org/10.1111/joim.12633>

6. Sugimoto T, Watanabe T. Follicular lymphoma: The role of the tumor microenvironment in prognosis. *J Clin Exp Hematop* 2016;56(1):1-19. <https://doi.org/10.3960/jslrt.56.1>
7. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBO, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of haematolymphoid tumours: Lymphoid neoplasms. *Leukemia* 2022;36(7):1720-48. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01625-x>
8. Montoto S, Davies AJ, Matthews J, Calaminici M, Norton AJ, Amess J, et al. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25(17):2426-33. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.3260>
9. Solal-Célgny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004;104(5):1258-65. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4434>
10. Luminari S, Bellei M, Biasoli I, Federico M. Follicular lymphoma. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011;34(1):54-9.
11. Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM. Malignant B cells skew the balance of regulatory t cells and TH 17 cells in b-cell non-hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 2009;69(13):5522-30.
12. Dobaño-lópez C, Araujo-ayala F, Serrat N, Valero JG, Pérez-galán P. Follicular lymphoma microenvironment: An intricate network ready for therapeutic intervention. *Cancers (Basel)* 2021;13(4):1-22.
13. Lamaison C, Tarte K. B cell/stromal cell crosstalk in health, disease, and treatment: Follicular lymphoma as a paradigm. *Immunol Rev* 2021;302(1):273-85. <https://doi.org/10.1111/imr.12983>
14. Hiddemann W, Cheson BD. How we manage follicular lymphoma. *Leukemia* 2014;28(7):1388-95. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.91>
15. Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment. *Nature Publishing Group* 2014;14(8):517-534. <https://doi.org/10.1038/nrc3774>
16. Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 2004;351(21):2159-69. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa041869>
17. Laurent C, Trisal P, Tesson B, Seth S, Beyou A, Roulland S, et al. Follicular lymphoma comprises germinal center-like and memory-like molecular subtypes with prognostic significance. *Blood* 2024;144 (24):2503-16. <https://doi.org/10.1182/blood.2024024496>
18. Kahl BS, Yang DT. Follicular lymphoma: Evolving therapeutic strategies. *Blood* 2016; 127(17):2055-64. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-624288>
19. Rossi D, Ciardullo G, Gaidano G. Genetic aberrations of signaling pathways in lymphomagenesis: revelations from next generation sequencing studies. *Semin Cancer Biol* 2013;23(6):422-30. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.04.002>
20. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature* 2003;425(6958):577-84. <https://doi.org/10.1038/nature02006>
21. Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor- $\beta$  and the immune response: Implications for anticancer therapy. *Clinical Cancer Research* 2007;13(18):5262-70. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1157>
22. Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGF $\beta$  signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11(10):790-811. <https://doi.org/10.1038/nrd3810>
23. Yamaguchi Y, Tsumura H, Miwa M, Inaba K. Contrasting effects of TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$  on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells* 1997;15(2):144-53. <https://doi.org/10.1002/stem.150144>
24. Ramesh S, Wildey GM, Howe PH. Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )-induced apoptosis: The rise & fall of Bim. *Cell Cycle* 2009;8(1):11-7. <https://doi.org/10.4161/cc.8.1.7291>
25. Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. TGF- $\beta$ 1 Attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells. *J Immunol* 2005;174(9):5215-23. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5215>
26. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AKL, Flavell RA. Transforming growth factor-B regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006;24(1):99-146. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737>
27. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002;23(11):549-55. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02302-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02302-5)
28. Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1(3):169-78. <https://doi.org/10.1038/35043051>
29. Federico M, Bellei M, Marcheselli L, Luminari S, Lopez-Guillermo A, Vitolo U, et al. Follicular lymphoma international prognostic index 2: A new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. *J Clin Oncol* 2009;27(27):4555-62. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.21.3991>
30. Monti S, Savage KJ, Kutok JL, Feuerhake F, Kurtin P, Mihm M, et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* 2005;105(5):1851-61. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2947>
31. Blaker YN, Spetalen S, Brodtkorb M, Lingjaerde OC, Beiske K, Østenstad B, et al. The tumour microenvironment influences survival and time to transformation in follicular lymphoma in the rituximab era. *Br J Haematol* 2016;175(1):102-14. <https://doi.org/10.1111/bjh.14201>
32. Hasselblom S, Sigurdadottir M, Hansson U, Nilsson-Ehle H, Ridell B, Andersson PO. The number of tumour-infiltrating TIA-1+ cytotoxic T cells but not FOXP3+ regulatory T cells predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2007;137(4):364-73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06593.x>
33. Cheung KJ, Shah SP, Steidl C, Johnson N, Relander T, Telenius A, et al. Genome-wide profiling of follicular lymphoma by array comparative genomic hybridization reveals prognostically significant DNA copy number imbalances. *Blood* 2009;113(1):137-48. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-140616>
34. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, et al. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 2006;108(9):2957-2964.
35. El-Sayed LH, Ghoneim HM, Abdel Rahman MA, Mohamed B, Abou Rawash SN, El-Kerm YM. Prognostic value of FOXP3 and TGF- $\beta$  expression in both peripheral blood and lymph nodes in patients with B-non Hodgkin's lymphoma. *Alex J Med* 2014;50(3):253-65.



36. D'Arena G, Laurenti L, Minervini MM, Deaglio S, Bonello L, De Martino L, et al. Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. *Leuk Res* 2011;35(3):363-8. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.08.010>
37. Kridel R, Mottok A, Farinha P, Ben-Neriah S, Ennishi D, Zheng Y, et al. Cell-of-origin of transformed follicular lymphoma. *Blood* 2015;126(18):2118-27. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-06-649905>
38. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, Shumansky K, Spinelli JJ, Gill K, et al. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood* 2005;106(6):2169-74. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1565>
39. Xie M, Jiang Q, Zhao S, Zhao J, Ye X, Qian W. Prognostic value of tissue-infiltrating immune cells in tumor microenvironment of follicular lymphoma: A meta-analysis. *Int Immunopharmacol* 2020;85:106684.
40. Roberts AB, Wakefield LM. The two faces of transforming growth factor  $\beta$  in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(15):8621-3. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633291100>
41. Tvrdík D. The effect of TGF $\beta$ 1 on the expression and phosphorylation of key cell-cycle regulators in malignant B cells. *Med Sci Monit* 2004;10(12):BR447-54.
42. Husson H, Carideo EG, Neuberg D, Schultze J, Munoz O, Marks PW, et al. Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays. *Blood* 2002;99(1):282-9. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.1.282>
43. Haque S, Morris JC. Transforming growth factor- $\beta$ : A therapeutic target for cancer. *Hum Vaccin Immunother* 2017;13(8):1741-50. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1327107>