



T.C

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİKRORNA VE DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRE (NATURAL
KILLER CELL) TEMELLİ KOMBİNE İMMÜNOTERAPİ
YAKLAŞIMININ ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN: SELDA KARAMİL

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ AD.

DANIŞMAN

**DOÇ. DR. NURAY ALTINTAŞ
DOÇ. DR. BÜLENT ÖZPOLAT**

MANİSA-2020



T.C

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİKRORNA VE DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRE (NATURAL
KILLER CELL) TEMELLİ KOMBİNE İMMÜNOTERAPİ
YAKLAŞIMININ ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN: SELDA KARAMİL

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ AD.

DANIŞMAN

DOÇ. DR. NURAY ALTINTAŞ

(Danışman)

PROF. DR. M. BAHATTİN TANYOLAÇ

(Üye)

PROF. DR. CUMHUR GÜNDÜZ

(Üye)

DOÇ. DR. AHMET DİRİCAN

(Üye)

DR. ÖĞRETİM ÜYESİ AYSUN TORAMAN

(Üye)

MANİSA-2020

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Selda Karamil

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana her zaman yol gösteren, göstermiş olduğu özveri ve katkıların ötesinde, bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen Danışman Hocalarım Sayın Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ ve Sayın Doç. Dr. Bülent ÖZPOLAT'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca bana bilgi ve deneyimlerini aktaran ve her konuda yardımcı olan hocalarım Sayın Prof. Dr. Nazmiye ALTINTAŞ, Sayın Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ, Sayın Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ, Sayın Prof. Dr. Gabriel LOPEZ-BERESTEİN ile tüm çalışma arkadaşlarıma,

Yaşamım boyunca maddi manevi her koşulda beni destekleyen, bu uzun ve yorucu süreçte daima yanımda olan Canım Annem ve Canım Babam Necla ve Sedat KARAMİL'e, Canım Ablam Seda KARAMİL'e, Canım Kardeşim Alican KARAMİL'e ve Sevgili Nişanlım İlyas IŞIK'a tüm desteklerinden ve fedakârlıklarından dolayı çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı (2017 II. Dönem) ile desteklenerek 2. Tez Danışmanı Sayın Doç. Dr. Bülent Özpolat ile Texas Üniversitesi, MD Anderson Kanseri Merkezi, Deneysel Tedaviler Departmanı'nda (Houston, Texas, ABD) gerçekleştirilmiştir.

KISALTMA VE SEMBOLLER

3'-UTR:	mRNA'nın 3'-tercüme edilmemiş bölgesi
4-1BB:	Sindekan-1
5'-UTR:	mRNA'nın 5'-tercüme edilmemiş bölgesi
ACT:	Kabul ve kararlılık terapisi
AIDS:	İnsan immün yetmezlik virüsü
AKT:	RAC-alfa serin / treonin-protein kinaz
Alb:	Albumin
AMPK:	5 'AMP ile aktive edilen protein kinaz
Atg8:	Otofajiye bağlı protein 8
Bcl-XL:	B hücreli lenfoma-ekstra büyük
BT-20:	Üçlü negatif meme kanseri hattı
CBNK:	Kordon bağından geliştirilen doğal öldürücü hücreleri
CD:	Farklılaşma kümesi
Cdk:	Sikline bağımlı kinaz
c-FLIP_L:	FLICE benzeri inhibitör protein
c-Myc:	BHLH transkripsiyon faktörü
Cr⁵¹:	Kromiyum 51
EF2:	Uzama faktörü 2
eEF2K:	Uzama faktörü 2 Kinaz
ER:	Östrojen reseptör
FAK:	Fokal yapışma kinaz
FITC:	Floresin
FOXO1:	Forkhead box proteini M1
HANK-1:	Ankyrin
Her2:	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HSTC:	Hematopoetik kök hücre nakli
IDO1:	İndoleamin 2,3-dioksijenaz
IL:	İnterlökin
INF- γ:	İnterferon gama
JNK:	c-Jun N-terminal kinazları
KHYG-1:	Doğal öldürücü hücre hattı

Let-2:	Öldürücü-2
MCF-7:	İnsan meme kanseri hücre hattı
MDA-MB-231:	Üçlü negatif meme kanseri hattı
MDA-MB-436:	Üçlü negatif meme kanseri hattı
MAPK:	Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz
MEK:	MAP2K
MHC:	Başlıca histouyumluluk kompleksi
miRNA:	Mikro ribonükleik asit
m-RNA:	Mesajcı ribonükleik asit
mTOR:	Rapamisinin memeli hedefi
mTORC1:	Rapamisin kompleksinin memeli hedefi 1
NH125:	1-Benzil-3-setil-2-metilimidazolium İyodür
NK:	Doğal öldürücü hücre
NK-92:	Doğal öldürücü hücre hattı
NKG2:	C-tipi lektin benzeri reseptörler
NKL:	Doğal öldürücü hücre hattı
NK-YS:	Doğal öldürücü hücre hattı
NPs:	Nanopartiküller
OX40:	Tümör nekroz faktörü reseptörü süper aile üyesi 4
p53:	Protein 53
p70S6K:	Ribozomal protein S6 kinaz beta-1
PD-1:	Programlanmış hücre ölümü proteini 1
PD-L1:	Programlanmış hücre ölüm protein ligandı 1
p-EF2	Fosfo-uzama faktörü 2
p-FAK:	Fosfo-fokal yapışma kinaz
PI3K:	Fosfoinositid-3 Kinaz
PKB:	Protein kinaz B
PLL:	Poli-L-lizin
PR:	Progesteron reseptörü
p-Src:	Fosfo-sarcoma
PTEN:	Protein tirozin fosfataz ve tensin homologu
Rb:	Retinoblastoma
RNA:	Ribonükleik asit

RT-qPCR:	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
S6K1:	Ribozomal protein S6 kinaz 1
Ser:	Serisin
siRNA:	Susturucu RNA
SHP:	Küçük heterodimer ortağı
Src:	Sarcoma
T47D:	İnsan meme kanseri hücre hattı
T98G:	Glioblastoma hücre hattı
TGF-β1:	Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1
Thr:	Threonine
TNBC:	Üçlü negatif meme kanseri
TNF-α:	Tümör nekroz faktörü alfa
TRAIL:	TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand
TX-1918:	hücre geçirgen triptostin türevi
XIAP:	X'e bağlı apoptoz proteini inhibitörü
YT:	Doğal öldürücü hücre hattı

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
Tablo 5.6.1	İmmunoblotlamada kullanılan birincil ve ikincil antikorların listesi.	45
Tablo 6.1.1	Üçlü negatif meme kanseri hastalarında miR-3977 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi.	50
Tablo 6.2.1	Üçlü negatif ve üçlü negatif olmayan meme kanseri hücre hatları ile normal meme epitel hücre hatlarında miR-3977 bazal ekspresyon seviyesi.	51
Tablo 6.3.1	hsa-miR-3977'nin eEF2K, PD-L1 ve FOXM1 mRNA'ların 3'-UTR bölgelerine bağlanma dizileri.	52
Tablo 6.4.1	50, 100, 150 ve 200 nmol/L miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu miR-3977 seviye artışı.	53
Tablo 6.4.2	miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 mRNA seviyeleri değişimi.	54
Tablo 6.4.3	siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 oligonükleotit uygulaması sonucu MDA-MB-231 hücrelerinde eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 mRNA seviyeleri değişimi.	55
Tablo 6.6.1	Meme kanseri hastalarında eEF2K protein ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi.	58
Tablo 6.6.2	Meme kanseri hastalarında FOXM1 protein ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi.	58
Tablo 6.6.3	Meme kanseri hastalarında PD-L1 protein ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi.	59
Tablo 6.7.1	Üçlü negatif meme kanseri hücre hatları ile normal meme epitel hücre hattında eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 genleri bazal ekspresyon seviyesi.	60

Tablo 6.7.2	Üçlü negatif meme kanseri hastalarında ve üçlü negatif olmayan meme kanseri hastalarında eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 genleri bazal ekspresyon seviyesi.	60
Tablo 6.8.1	miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında koloni oluşum yüzdeleri.	62
Tablo 6.9.1	siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında koloni oluşum yüzdeleri.	63
Tablo 6.10.1	miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında değişen apoptotik hücre yüzdeleri.	65
Tablo 6.11.1	miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında G1/S fazında tutulan hücre sayıları.	66
Tablo 6.12.1	miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında açık kalan yara mesafesi.	67
Tablo 6.13.1	siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında açık kalan yara mesafesi.	69
Tablo 6.14.1	miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında istilacı hücre yüzdesi.	71
Tablo 6.15.1	siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında istilacı hücre yüzdesi.	72
Tablo 6.16.1	PLL/Alb-Ser NPs-miR-3977 ve kontrol miRNA uygulamaları sonucu oluşan tümör hacimleri.	74
Tablo 6.18.1	miR-3977 ve kontrol miRNA uygulamalarından sonra farklı konsantrasyonlarda ko-kültür çalışmalarında oluşan kordon kanı doğal öldürücü hücrelerinin sitotoksosite değişimleri.	76

Tablo 6.18.2	miR-3977 ve kontrol miRNA uygulamalarından sonra farklı konsantrasyonlarda ko-kültür çalışmalarında oluşan NK-92 doğal öldürücü hücre hatlarının sitotoksosite değişimleri.	77
Tablo 6.19.1	siR-EF2K, siR-FOXM1, siR-PDL1 ve kontrol siRNA uygulamalarından sonra farklı konsantrasyonlarda ko-kültür çalışmalarında oluşan kordon kanı doğal öldürücü hücrelerinin sitotoksosite değişimleri.	77
Tablo 6.19.2	siR-EF2K, siR-FOXM1, siR-PDL1 ve kontrol siRNA uygulamalarından sonra farklı konsantrasyonlarda ko-kültür çalışmalarında oluşan NK-92 doğal öldürücü hücrelerinin sitotoksosite değişimleri.	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 4.1.1.1	Meme kanseri moleküler alt tiplerinin patojenezi ve histolojisi.	10
Şekil 4.1.2.1	Üçlü negatif meme kanserinde rol oynayan sinyal yolları.	12
Şekil 4.1.2.2	Otolog ve Allojenik NK hücre transferi.	13
Şekil 4.2.1.1	NK hücre gelişimi.	15
Şekil 4.2.1.2	NK hücrelerinin aktivasyon mekanizmaları.	16
Şekil 4.3.1.1	eEF2K'in fosforilasyon bölgeleri.	24
Şekil 4.3.1.2	Çoklu fosforilasyonlar ile eEF2 inaktivasyonu.	24
Şekil 4.3.2.1	Üçlü negatif meme kanserinde miR-603 ve eEF2K içeren düzenleyici yolların şematik modeli.	25
Şekil 4.4.2.1	PD-1'in T hücrelerinde majör sinyal yollarına ve sinyalin ardından oluşan yeniden metabolik programlamaya etkisi.	29
Şekil 4.4.2.2	Tümör mikro çevresinde CD38 kaynaklı adenosine bağlı anti-PD-1 / PD-L1 direnci.	30
Şekil 4.5.1.1	FOXM1 genindeki genomik yapı ve kodlama izoformları ve FOXM1 promotör bölgesindeki transkripsiyon faktörü bağlanma sahaları.	32
Şekil 4.5.1.2	Kanser biyolojisinde FOXM1'in rolleri.	33
Şekil 4.5.2.1	Kanserde FOXM1 etkileşimlerinin farklı örnekleri.	34
Şekil 4.5.2.2	Farklı Cdk/siklin kompleksleri, Rb/E2F ve FOXM1 aracılı transkripsiyon ve hücre döngüsü ilerleyişi	35
Şekil 4.6.1.1	miRNA biyogenezi ve efektör yollarına genel bakış.	37
Şekil 4.6.2.1	miRNA'ların kanserdeki rolü ve kanserde miRNA tabanlı tedaviler	39
Şekil 4.6.3.1	Prekürsör ve olgun hsa-miR-3977'nin genom konumu	40
Şekil 5.12.1	Uygulanan Ortotopik Ksenograft Tümör Modeli	49

RESİMLER DİZİNİ

<u>Resim</u>		<u>Sayfa</u>
Resim 6.5.1	miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 protein seviyeleri değişimi.	56
Resim 6.5.2	siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 protein seviyeleri değişimi.	57
Resim 6.8.1	miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında koloni oluşum kabiliyetindeki değişim.	62
Resim 6.9.1	siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında koloni oluşum kabiliyetindeki değişim.	63
Resim 6.10.1	miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında değişen apoptoz miktarları.	65
Resim 6.12.1	miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında yara mesafesi.	67
Resim 6.13.1	siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında yara mesafesi.	69
Resim 6.14.1	miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında istila eden hücre sayısı.	71
Resim 6.15.1	siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında istila eden hücre sayısı.	72

Resim 6.17.1	PLL/Alb-Ser NPs-miR-3977 ve kontrol miRNA uygulamaları sonucu oluşan tümörlerde protein ekspresyon seviyeleri.	75
---------------------	--	----

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
4. GENEL BİLGİLER	10
4.1. MEME DOKUSUNDA KARSİNOGENEZ	10
4.1.1 Tanım ve İnsidans	10
4.1.2. Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC) ve Mevcut Tedavi Yöntemleri	11
4.2. DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRELER (NK CELLS)	14
4.2.1. Tanım ve Genel Bilgi	14
4.2.2. NK Temelli İmmünoterapik Yaklaşımlar	19
4.3. eEF2K SİNYAL YOLAĞI	23
4.3.1. Tanım ve Genel Bilgi	23
4.3.2. Karsinogenezde eEF2K'in Rolü ve Güncel Çalışmalar	24
4.4. PD-1 / PD-L1 KONTROL NOKTASI	27
4.4.1. Tanım ve Genel Bilgi	27
4.4.2. Karsinogenezde PD-L1'in Rolü ve Güncel Çalışmalar	28
4.5. FOXM1 SİNYAL YOLAĞI	31
4.5.1. Tanım ve Genel Bilgi	31
4.5.2. Karsinogenezde FOXM1'in Rolü ve Güncel Çalışmalar	33
4.5. MİKRORNA'LAR	35
4.5.1. MikroRNA'ların Oluşumu ve İşlevleri	35
4.5.2. Kanser Tedavisinde MikroRNA'ların Kullanımı	38
4.5.3. hsa-miR-3977 Ailesi	40
5. GEREÇ VE YÖNTEM	41
5.1. Hücre Hatları ve Hücre Kültürü	41
5.2 miRNA ve siRNA Transfeksiyon Deneyi	42
5.3 Migrasyon Analizi	43
5.4 İnvazyon Analizi	43
5.5 Tümör Oluşturma Kabiliyeti Analizi	44
5.6 Protein Ekstraksiyonu ve İmmunoblotlama (Western Blotting) Analizi	44
5.7 RNA İzolasyonu ve RT-qPCR Analizi	45
5.8 Flow Sitometri Analizi	47
5.9 Tümör Hücreleri ile NK Hücrelerinin Ko-Kültürü	47
5.10 Cr ⁵¹ (Kromiyum ⁵¹) Hücre Canlılığı Analizi	47
5.11 miRNA Nanopartiküllerinin Hazırlanma Çalışmaları	48
5.12 Ortotopik Ksenograft Tümör Modeli Çalışmaları	49
5.13 Tümör Boyutlarının Ölçülmesi Analizi	49

5.14 İstatistiksel Analiz	50
6. BULGULAR	50
6.1. hsa-miR-3977 ekspresyon seviyesi üçlü negatif meme kanserinde anlamlı derecede daha uzun hasta sağkalımı ile ilişkilidir	50
6.2 hsa-miR-3977 ekspresyon seviyesi üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde normal meme dokusuna kıyasla anlamlı derecede daha düşüktür	51
6.3 hsa-miR-3977, eEF2K, PD-L1 ve FOXM1 mRNA'larının 3'-tercüme edilmemiş (3'-UTR) bölgelerine doğrudan bağlanmaktadır	52
6.4 hsa-miR-3977 seviyesinin üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde arttırılması eEF2K, PD-L1 ve FOXM1 mRNA seviyelerini düşürmektedir	53
6.5. miR-3977 uygulaması, eEF2K, PD-L1 ve FOXM1 protein seviyelerini anlamlı derecede düşürmektedir	56
6.6 hsa-miR-3977'nin hedeflediği eEF2K, PD-L1 ve FOXM1 genlerinin protein seviyeleri meme kanserinde daha uzun hasta sağkalımı ile ters orantılıdır	57
6.7 eEF2K, PD-L1 ve FOXM1 mRNA ekspresyon seviyeleri TNBC'de normal meme dokusuna kıyasla anlamlı derecede daha yüksektir	59
6.8 hsa-miR-3977 üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde koloni oluşumunu baskılamaktadır	61
6.9. eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 susturulması üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde koloni oluşumunu baskılamaktadır	62
6.10 hsa-miR-3977 üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklemektedir ----	63
6.11 hsa-miR-3977 üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde G1/S hücre döngüsü geçişini baskılamaktadır	65
6.12 hsa-miR-3977 üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde migrasyonu baskılamaktadır	66
6.13. eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 susturulması üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde hücre göçünü azaltmaktadır	68
6.14 hsa-miR-3977 üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde invazyonu baskılamaktadır -	70
6.15 eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 susturulması üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde invazyonu azaltmaktadır	71
6.16 miR-3977 nanoparçacıkların in vivo terapötik olarak uygulanması, insan meme kanseri ksenogreftleri ile ortotopik üçlü negatif meme kanseri fare modellerinde tümör büyümesini engeller	73
6.17 miR-3977 nanoparçacıklarının in vivo terapötik olarak uygulanmasında, tümörlerdeki eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 protein seviyeleri azaldı	74

6.18 hsa-miR-3977 üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin NK aracılıklı immünyanıt ile yıkımını arttırmıştır -----	75
6.19 eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 susturulması üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin NK aracılıklı immünyanıt ile yıkımını arttırmıştır -----	77
7. <i>TARTIŞMA</i> -----	78
8. <i>SONUÇ</i> -----	86
9. <i>KAYNAKLAR</i> -----	88
10. <i>EKLER</i> -----	106
11. <i>ÖZGEÇMİŞ</i> -----	108

MikroRNA ve Doğal Öldürücü Hücre (Natural Killer Cell) Temelli Kombine İmmünoterapi Yaklaşımının Üçlü Negatif Meme Kanseri Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Öğrencinin Adı: Selda KARAMİL

Danışmanı: Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

1. ÖZET

Amaç: Çalışmamızda üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücrelerinde miR-3977 ile eEF2K, PD-L1 ve FOXM1 üçlü baskılanmasının tümörigenez üzerindeki etkisinin yanısıra, bu hücrelerdeki doğal öldürücü hücre (NK) aracılıklı immün yanıt etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Üçlü negatif meme kanseri hücreleri olarak MDA-MB-436, MDA-MB-231, BT-20 hücre hatları ve doğal öldürücü hücreler olarak kordon kanı doğal öldürücü hücreleri ve NK-92 hücre hattı grubu olarak kullanılacaktır. Tümörigenez çalışmaları için koloni oluşum analizleri, miRNA ve siRNA mimik transfeksiyonu, RNA ekstraksiyonu, miRNA ve mRNA ters transkripsiyonu, RT-qPCR analizi, protein ekstraksiyonu ve immünoablota analizi, hücre hareketliliği, migrasyon ve invazyon testleri, akım sitometri testi, miRNA nanoparçacıklarının hazırlanması, ortotopik ksenograft tümör modeli ve istatistiksel analiz metotları kullanılacaktır. NK ayrıcalıklı immünoyanıtın belirlenmesi çalışmaları için ise Ko-kültür yöntemi uygulanarak Kromiyum (Cr⁵¹) analiz metotları kullanılacaktır.

Bulgular: Çalışmamızda miR-3977'nin rolü araştırılmış ve miR-3977'nin TNBC'de anlamlı derecede daha uzun hasta sağkalımı ile ilişkili olduğu ve anlamlı derecede daha kısa genel hasta sağkalımı ile ilişkili olan proto-onkojenik eEF2K seviyeleri ile ters korelasyonlu olduğu bulunmuştur. Sonuçlarımız miR-3977'nin eEF2K, PD-L1 ve FOXM1 mRNA'ların 3'-tercüme edilmemiş bölgesine (3'-UTR) doğrudan bağlandığını ve bu genlerin ekspresyonlarını baskılayarak TNBC'de hücre proliferasyonunu, motilitesini ve invazyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca, miR-3977 nanopartiküllerinin sistemik intraperitoneal uygulama ile in vivo terapötik

olarak verilmesi, eEF2K, PD-L1 and FOXM1 sinyal yolaklarını, intratümöral proliferasyonu ve anjiyogenezi inhibe ederek ve apoptozu indükleyerek ortotopik TNBC tümör ksenograft modelinde tümör büyümesini geciktirmiştir. Önemli bir şekilde, çalışmamızda ilk kez, eEF2K, PD-L1 veya FOXM1 inhibisyonunun NK-92 ve CBNK hücrelerinin sitotoksitesini indüklediği, miR-3977 veya siRNA tedavilerinin NK aracılıklı immün sistem yanını arttırmada etkili olabileceği gösterilmiştir.

Sonuçlar: Çalışmamız, üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde miR-3977 gen terapisi ile hem EF2K hem FOXM1 hem de programlanmış hücre ölüm (PD-L1) mekanizmalarının yeniden aktivasyonunu hem de bu hücrelere karşı aktive olmuş NK aracılıklı immün yanıt ile karsinogenez sürecinin durdurulmasını ve tümör hücrelerinin yıkımını birlikte yürüten ilk çalışma olması nedeniyle yüksek bir özgün değere sahiptir. Dahası, miR-3977'nin eEF2K ve FOXM1 sinyal yolaklarının çift hedeflenmesiyle TNBC'de tümör baskılayıcı rolü olduğu ve miR-3977 tabanlı gen terapisinin TNBC'de potansiyel bir terapötik strateji olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Üçlü Negatif Meme Kanseri, MikroRNA, miR-3977, Doğal Öldürücü Hücreler, İmmünoterapi

Title: Studying of the Effect of MicroRNA and Natural Killer Cell Based Combined Immunotherapy Approach on Triple Negative Breast Cancer

Student Name: Selda KARAMİL

Supervisor: Assoc. Prof. Nuray ALTINTAŞ

Department: Medical Biology

2. ABSTRACT

Aim: In our study, we aimed to determine the effect of triple suppression on eEF2K, PD-L1 and FOXM1 with miR-3977 in triple negative breast cancer (TNBC) cells, as well as identified the natural killer cell (NK) mediated immune response effect in these cells.

Materials and Method: As triple negative breast cancer cells MDA-MB-436, MDA-MB-231, BT-20 cell lines; as natural killer cells cord blood natural killer cells and NK-92 cell line will be used. To identified tumorigenesis studies colony formation assay, miRNA and siRNA mimic transfection, RNA extraction, miRNA and mRNA reverse transcription, RT-qPCR assay, protein extraction and immunoblotting assay, cell mobility, migration and invasion assays, flow cytometry, preparation of miRNA nanoparticles, orthotopic xenograft tumor model and statistical analysis methods will be used. To determination of NK mediated immunoassay studies Chromium (Cr51) analysis methods will be used.

Results: In our study, we investigated the role of miR-3977 and found that miR-3977 is associated with significantly longer patient survival in TNBC and inversely correlated with levels of proto-oncogenic eEF2K, which was associated with significantly shorter overall patient survival. We showed that miR-3977 directly binds to the 3'-untranslated region (3'-UTR) of eEF2K, PD-L1 and FOXM1 mRNAs and suppresses their expression, leading to inhibition of TNBC cell proliferation, motility, and invasion. Moreover, in vivo therapeutic delivery of miR-3977 nanoparticles by systemic intraperitoneal administration delayed tumor growth of orthotopic TNBC tumor xenograft models by inhibiting eEF2K, PD-L1 and FOXM1, intratumoral proliferation and angiogenesis, and inducing apoptosis. Importantly in our study it has

been shown at the first time, with either miR-3977 or siRNA treatments of each eEF2K, CD274 or FOXM1 inhibition NK-92 and CBNK cells cytotoxicity were induced.

Conclusion: Our study has a high specific value due to miR-3977 gene therapy in triple negative breast cancer cells as it is the first study to both re-activate the programmed cell death (PD-L1) mechanisms and to stop the carcinogenesis process and the destruction of tumor cells with the activation of NK-mediated immune response against these cells. Furthermore, our findings provide new insights into the tumor suppressor role of miR-3977 by dual-targeting of eEF2K and FOXM1 signaling axis and suggest that miR-3977-based gene therapy may be a potential therapeutic strategy in TNBC.

Key Words: Triple Negative Breast Cancer, MicroRNA, miR-3977, Natural Killer Cells, Immunotherapy

3. GİRİŞ

Meme kanseri (Breast Cancer, BC), kadınlarda en yaygın görülen malignite ve dünyadaki kansere bağlı ölümlerin ikinci en önemli nedenidir. Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 232.000 invaziv meme kanseri vakası teşhisi konmakta, bunlardan sadece 65.000 tanesi invaziv olmayan veya pre-invaziv meme kanseri olarak kabul edilmekte ve 40.000'den fazla kadın meme kanserinde ölmektedir (DeSantis ve ark. 2014). BC, farklı biyolojik ve klinik davranışlara sahip oldukça kompleks ve heterojen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Bayraktar ve ark. 2017).

Bir meme kanseri alt türü olan üçlü negatif meme kanseri (Triple Negative Breast Cancer, TNBC), tüm meme kanseri olgularının yaklaşık %10 ile %20'sini oluşturmakta ve östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) de dahil olmak üzere henüz tanımlanmış moleküler hedeflerin yokluğu ile karakterize edilmektedir (Bayraktar ve ark. 2017). Amerikan Kanser Derneği'ne göre, TNBC için 5 yıllık sağkalım oranı %77 iken diğer meme kanseri türleri için bu oran %91'tür (American Cancer Society 2019).

Hormon bağımsız gelişim ve ilerlemeden kaynaklı olarak oldukça agresif klinik davranış, ER ve HER2'ı (eERB2 olarak da bilinir) hedef alan terapiler (sırasıyla ticari adı ile tamoksifen ve trastuzumab) TNBC'ye karşı etkisiz kalmaktadır (Foulkes ve ark. 2010). Ayrıca TNBC'nin diğer önemli özellikleri arasında erken nüksler ve metastaz ve konvansiyonel tedavilere duyarlılığın azalması yer almaktadır. Zayıf klinik sonuç ve kısa genel hasta sağ kalımı ağırlıklı olarak intratümöral heterojenite ve TNBC olgularının %84'ünde saptanan mutasyona uğramış TP53'e atfedilmekle birlikte, yeni terapötik hedefleri belirlemek ve iyileşen hasta sonuçları için oldukça etkin hedefli tedaviler geliştirmek için TNBC biyolojisinin ve altta yatan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması gerekmektedir (Bayraktar ve ark. 2017; Chin ve ark. 2013; Dua ve Tan 2017; Wang ve ark. 2012).

Son yıllarda ortaya çıkan kanıtlar, ökaryotik uzatma faktörü 2 kinaz (eEF2K)'ın pankreas, beyin ve göğüs kanseri gibi birçok kanserde potansiyel bir moleküler indükleyici ajan olduğunu ortaya koymaktadır. eEF2K, α -kinaz ailesinin tek

kalsiyum/kalmodulin ile aktive edilmiş üyesidir ve katalitik alanı geleneksel protein kinazların yapısal olarak benzer olmadığı için atipik bir kinaz olarak adlandırılmaktadır (Ashour ve ark. 2014; Bayraktar ve ark. 2017; Cheng ve ark. 2013). eEF2K aktivitesi, transfer RNA (tRNA) üzerindeki ribozomun A sitesinden P bölgesine hareket etmesine aracılık eden eEF2'yi treonin 56'da fosforilasyon ile inaktive ederek protein zincirinin uzamasını kontrol etmek için çoklu mekanizmalarla düzenlenmektedir (Bayraktar ve ark. 2017; Gismondi ve ark. 2014). Ayrıca eEF2K'nin hücredeki translasyon oranını düzenleyerek besin yoksunluğu ve hipoksi gibi metabolik stres koşullarında hücrenin sağ kalımı ile siklin D1, c-myc, PI3K/Akt, Src/Fak ve insülin benzeri büyüme faktör reseptörü (IGFR) sinyallerini düzenlenerek hücre döngüsünü modüle ettiği, dolayısıyla hücrenin G1/S geçişini desteklediğini gösteren, hücre çoğalması, hücre göçü, invazyon, epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) ve TNBC tümörogenezi gibi olaylara aracılık ettiğini bildiren birçok çalışma yapılmıştır (Ashour ve ark. 2014; Fu ve ark. 2014; Tekedereli ve ark. 2012). Bu bilgiler ışığında, eEF2K'nın meme kanseri progresyonu için kritik bir faktör olduğu ve eEF2K aktivitesini baskılamayı amaçlayan stratejilerin TNBC için yeni tedavi rejimlerinin geliştirilmesine yardımcı olabileceği düşünülebilmektedir (Bayraktar ve ark. 2017; Fu ve ark. 2014).

Programlanmış hücre ölüm proteini-1 (PD-1)'in bir ligandı ve immün yanıt önleyici molekül olan PD-L1, kanser hücreleri, tümör sızdıran inflamatuvar hücreler ve bağışıklık hücreleri üzerinde eksprese edilmektedir (Dua ve Tan 2017; Sun ve ark. 2016). Tümör ve viral enfekte olmuş hücrelerin, T ve NK hücrelerinin immün gözetiminden kaçmalarında etkili önemli bir bağışıklık önleme mekanizması PD-1/PD-L1 eşleşmesi yoluyla gerçekleşmektedir (McArthur 2016). PD-1'in hücre içindeki kısmı, protein tirozin fosfatazları olan SHP-1 ve SHP-2'yi düzenleyen bağışıklık koruyucu tirozin esaslı önleyici motifler (ITIM) içerdiği için PD-1/PD-L1 etkileşimi inhibitör sinyal iletimini dönüştürmektedir. Böylece PI3K/AKT ile Ras sinyalizasyonunun aktivasyonu engellenmekte, dolayısıyla NK hücrelerinin etkinlikleri bozulmaktadır. PD-1/PD-L1'in anti-PD-1/anti-PD-L1 monoklonal antikoları ile etkileşiminin engellenmesi, negatif sinyalin bloklanmasına, dolayısıyla aktif NK hücreleri tarafından sitokin üretimine ve sitotoksitenin arttırılmasına neden olmaktadır (James ve ark. 2013).

PD-L1'i eksprese eden kanserlerde PD-L1 blokajı, anti-tümör immün yanıtları indüklemeye ve kişiye özel terapi planlamasında önemli bir rol oynayan, aktif bir araştırma alanıdır (Drake ve ark. 2014; Sun ve ark. 2016; Dua ve Tan 2017; Mittendorf ve ark. 2014; James ve ark. 2013).

Forkman Box M1 (FOX M1), p53 ile düzenlenmiş (bastırılmış), çeşitli insan kanserlerinde aşırı eksprese edilen ve iyi tanımlanmış önemli bir onkojenik transkripsiyon faktörlerinden biridir (Narandes ve ark. 2018; Lu ve ark. 2018; Kanser Genom Atlas Ağı 2018). FOX M1'in aşırı ekspresyonu, tümör hücrelerinin hücre çoğalmasında, yayılmasında ve çeşitli insan kanserlerinde anjiyogeneze önemli bir rol oynar (Song ve ark.2017; Yang ve ark.2018; Yang ve ark.2018; Fei ve ark.2017; Ahmad ve ark. 2016). Ayrıca TNBC'de tümör oluşumuna, ilerlemesine ve ilaç direncine de katkıda bulunur. Meme kanseri hastalarından alınan gen ekspresyon verilerinin meta-analizi, FOX M1 ve hedef geni eEF2K'nın hastaların hayatta kalmalarını etkileyen kritik genler olduğunu göstermektedir (Abba ve ark.2010; Lu ve ark.2018; Hamurcu ve ark.2016). Önceki çalışmalar ayrıca TNBC tümör modellerinde hücre proliferasyonu, motilite, invazyon ve tümör büyümesini indüklemeye FOX M1'in onkojenik rolünü göstermiştir (Hamurcu ve ark. 2016). Ayrıca, son çalışmalar TNBC hücrelerinde, FOX M1'in otofaji indüksiyonu sırasında yukarı regüle edildiğini ve FOX M1'in LC3 ve Beclin-1'i transkripsiyon seviyesinde düzenlediğini göstermiştir (Hamurcu ve ark.2019). FOX M1 onkojenik transkripsiyon faktörünü hedeflemenin ve bunu immünoterapi çalışmaları ile birleştirmenin, TNBC için yeni bir tedavi sürecinin geliştirilmesine yardımcı olacağına inanılmaktadır (Tan ve ark. 2019).

mikroRNA'lar (miRNA) gibi kodlamayan RNA'lar, hücre döngüsü düzenlemesi, farklılaşma, metabolizma ve yaşlanma da dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde gen ifadesinin yeni düzenleyicileri olarak ortaya çıkmıştır (Ames ve ark. 2009). Çeşitli kanserlerde anormal şekilde eksprese edildiğinde onkojenik ve tümör baskılayıcı olarak işlev yapan çeşitli miRNA'lar tanımlanmıştır (Esquela-Kerscher ve Slack 2006). Ayrıca, bir miRNA farklı kanser türleri için farklı onkojenik özellik gösterebilmektedir. Günümüzde miRNA'lar, çok çeşitli insan kanserlerini belirli işaretlerle sınıflandırmak ve insan kanserlerinin moleküler yapısını tanımlamak için kullanılmalarının yanı sıra, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalıkta ve aynı zamanda insan kanserlerinin patogenezinde ve klinik uygulamalarda

terapötik olarak da hayati bir role sahiptir (Chen ve ark. 2013; Ferlay ve ark. 2013; Zhang ve ark. 2007; Calin ve Croce 2006; Volinia ve ark. 2006).

miRNA'ların meme kanseri progresyonu, invazyonu, anjiyogenez ve metastazında önemli bir rol oynadığını da gösterilmiştir (Ames ve ark. 2009). Bazı miRNA'lar fonksiyonel olarak Src ve MAPK gibi birkaç önemli hücre çoğalma yolunda yer alırlar ve bu miRNA'ların anormal ekspresyonu, meme kanseri hücrelerinde inhibörlerden kaçınmada ve proliferatif sinyal vermeyi sürdürmede etkili olmaktadır (Hwang ve ark. 2013; Tanic ve ark. 2017).

Diğer yandan modern çağda kanser immünoterapisi, bağışıklık kontrol noktası blokörleri, kanser aşıları ve adoptif hücresel terapiler olarak üç ana başlık altında toplanmaktadır (Bodduluru ve ark. 2015). Yalnız doğal öldürücü hücreler ile ya da moleküler antikorlarla kombine edilen adoptif hücre tedavisinin, nöroblastoma da dahil olmak üzere çok çeşitli insan maligniteleri için terapötik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Liu ve ark. 2013).

Doğal öldürücü hücreler (NK), doğal bağışıklık sisteminin bir parçası olarak tüm bağışıklık sistemi elemanlarından en agresif olanlardır, enfeksiyondan yaklaşık 3 gün sonra tümör oluşumuna tepki verdikleri bilinmektedir. NK hücreleri toksinlerini salgılamadan, viral enfekte ve kanser hücrelerini yok etmeden önce belirli bir antijeni tanımaya ihtiyaç duymazlar (Thorntwaite 2001; Vivier ve ark. 2011). Tümör hücreleri iltihaplanmaya yol açmamaları durumunda T hücre yanıtını indüklemeyizler, bunun yerine NK tarafından interferon gama ($IFN\gamma$), interlökin (IL-10) ve tümör nekroz faktörü ($TNF\alpha$) gibi bir dizi sitokin üreterek makrofajların, dendritik hücrelerin, nötrofillerin ve antijen spesifik T ve B hücrelerin tepkileri sağlanır (Castriconi ve ark. 2003).

Meme tümörlerinin immünojenisitesine bakıldığında ise birçok tümörde sık rastlanılan şekilde, NK hücre ligandlarının protein ve mRNA profillerinin sağlıklı meme dokularında görülen profillerden farklı olduğu bulunmuştur. Bu profillerin heterojenliği, tanıdaki tümör hücrelerinin fenotipinin, az çok başarılı bir immüno-düzenlemenin sonucu olduğunu düşündürmektedir (Mamassier ve ark. 2011). Üçlü negatif meme kanseri hastalarında yapılmış bir çalışmada, meme kanserine karşı yüksek risk grubunda yer alan bireylerde NK aktiviteleri, kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Hamilton ve ark. 1988). Ayrıca NK hücresi sitotoksik aktivitesini modüle eden veya tümör hücrelerini NK hücresi aracılı

sitotoksositeye duyarlı hale getiren çeşitli siRNA, miRNA gibi kodlanmayan küçük RNA molekülleri ile farmakolojik ajanların bulunması, kombinasyonel hücre aktarım çalışmaları, immünostimülatör ve tümör hücresi ölüm hassaslaştırıcı tedavi çalışmalarına imkan sağlamaktadır (Bodduluru ve ark. 2015). Sonuç olarak, invaziv meme tümörlerinin kontrolünde NK hücrelerinin rolünü vurgulamanın ve ameliyattan sonra NK hücrelerinin antitümör verimliliğinin preaktif veya aktif NK hücreleri ile birlikte restore etmenin, diğer malignitelerde gösterildiği gibi artık tümör hücrelerinin temizlemesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle invaziv meme tümörü rekürrensini önlemek için etkili bir şekilde NK hücre sitotoksitesini geliştirecek çalışmaların yapılması oldukça önemlidir (Mamassier ve ark. 2011).

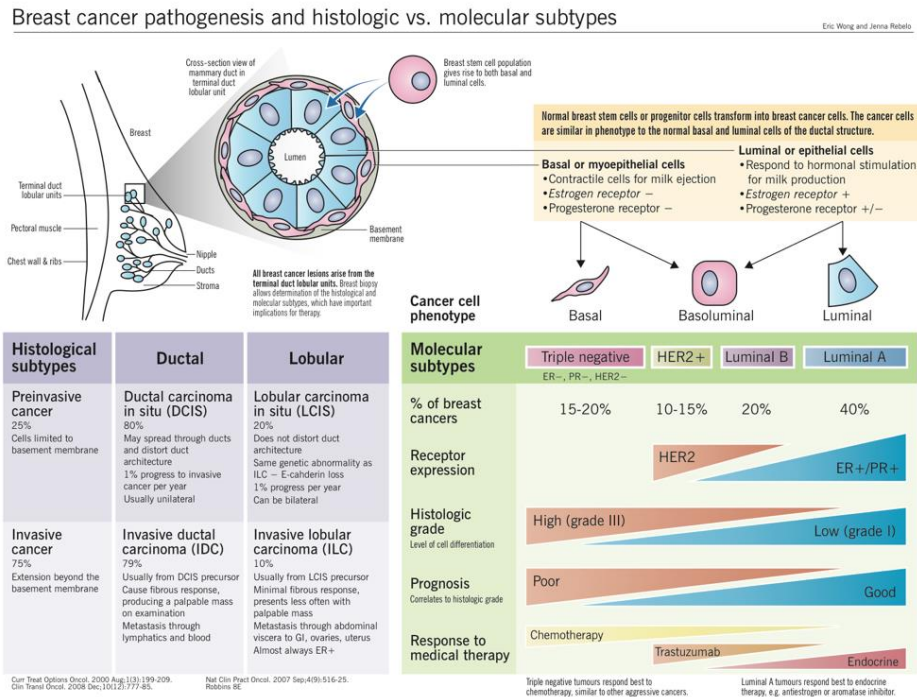
Bu sebepler ile çalışmamızda üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde ökaryotik uzama faktörü-2 kinaz (eEF2K), programlanmış ölüm ligandı-1 (PD-L1) ve FOXM1'in miR-3977 aracılıklı susturulması ile tümörojeniz'in baskılanması ve kanser hücrelerinde programlanmış hücre ölüm yollarının aktivasyonunun sağlanması çalışılmıştır. Ek olarak doğal öldürücü hücre (NK) aracılıklı immünoterapinin kombine etkisine dikkat çekilmek istenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. MEME DOKUSUNDA KARSİNOGENEZ

4.1.1 Tanım ve İnsidans

Karsinogenez, normal hücrelerin büyümesini ve hayatta kalmasını regüle eden genetik ve epigenetik mekanizmalarda meydana gelen değişiklikler sonucu oluşan çok aşamalı bir süreçtir. Karsinogenez sonucu dönüşüme uğramış hücreler apoptoza dirençli, büyümeden bağımsız doku oluşturma yeteneği gibi bazı özellikler kazanabilirler (Yang, Lee ve Ben-David 2011). Meme kanseri farklı biyolojik ve klinik davranışlara sahip, oldukça kompleks ve heterojen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Bayraktar ve ark. 2017; Hamilton ve ark. 1988; Mamassier ve ark. 2011; Mittendorf ve ark. 2014). Meme kanserinin moleküler alt tiplerine özgü patojenezi ve histolojisi **Şekil 4.1.1.1**'de gösterilmektedir (<http://www.pathophys.org/breast-cancer/breastcancer-copy/>, Erişim: 01.01.2020).



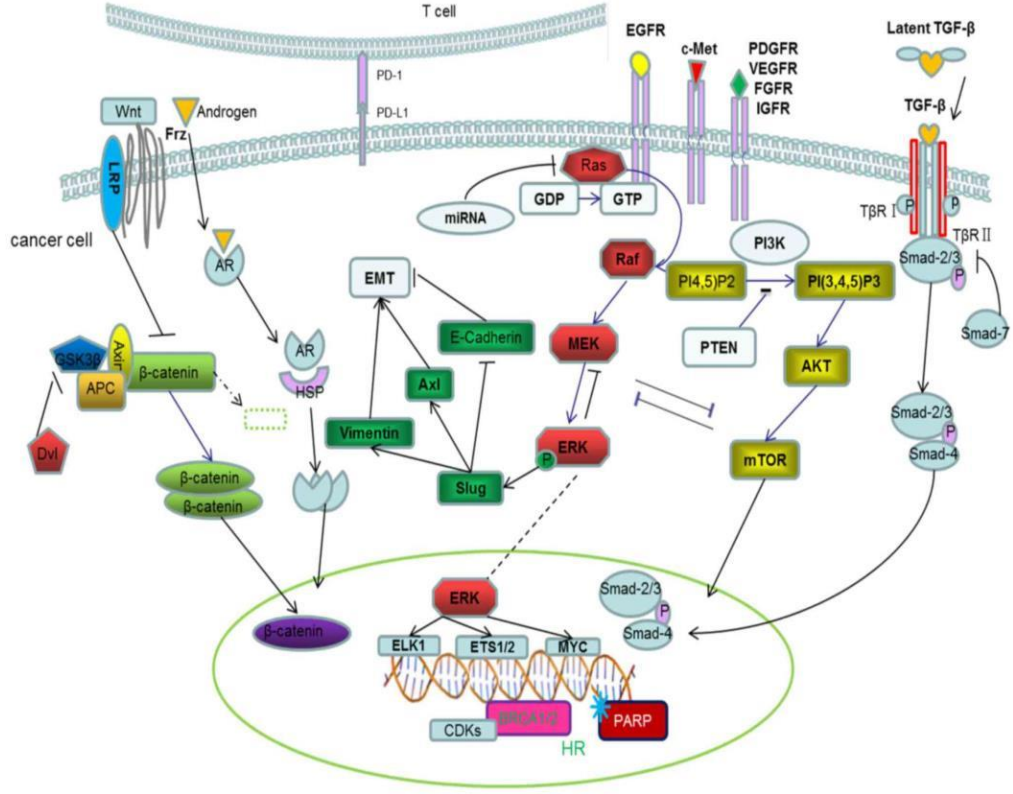
Şekil 4.1.1.1: Meme kanseri moleküler alt tiplerinin patojenezi ve histolojisi (<http://www.pathophys.org/breast-cancer/breastcancer-copy/>, Erişim: 01.01.2020).

Meme kanseri kadınlar arasında en sık rastlanılan kanser türüdür (Chin ve ark. 2013; Mamassier ve ark. 2011). Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 232.000 invaziv meme kanseri teşhisi konulmakta ve 40.000'den fazla kadın meme kanserinden ölmektedir (DeSantis ve ark. 2014). Meme kanserindeki genetik değişiklikler ile tedaviye yanıtı arasındaki bağlantıyı anlamak, hastalığa yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde oldukça önemlidir (Liu ve ark. 2014).

4.1.2 Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC) ve Mevcut Tedavi Yöntemleri

Üçlü negatif meme kanseri (TNBC), tüm meme kanseri olgularının yaklaşık %10 ila %20'sini oluşturan, yüksek cerrahi ve adjuvan kemoterapiye rağmen yüksek relaps ve uzak metastaz oranlarına sahip agresif bir meme kanseri alt tipidir (Bayraktar ve ark. 2017; Ferlay ve ark. 2013). Bu hastalığın klinik tanısı, normal insan epidermal büyüme faktörü reseptör tip 2 (HER2) gen kopya sayısı ve ifadesi ile östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) ekspresyonu bulunmayan göğüs tümörleri şeklinde yapılmaktadır (Bayraktar ve ark. 2017; Dua ve Tan 2017; Finn ve ark. 2007). Çok heterojen ve birkaç moleküler alt türe sahip olduğu bilinen TNBC, kemoterapi haricinde östrojen reseptörünü hedef alan tamoksifen ve HER2'yi hedef alan trastuzumab gibi hormonal tedavilere cevap vermediğinden şu anda etkin bir tedavisi olmayan tek büyük meme tümörü alt tipi olarak ifade edilmektedir (Bayraktar ve ark. 2017; Chin ve ark. 2013; Liu ve ark. 2014; Sun ve ark. 2016). Genelde kötü bir sonuca sahip olan TNBC için etkili tedavi stratejileri geliştirmek üzere, kanser hücrelerinin biyolojik davranışının incelenmesinde çok çaba harcanmıştır (Wang ve ark. 2012). Buna rağmen günümüzde kemoterapi, erken evre ve metastatik TNBC'nin standart tedavisini oluşturmaktadır (Bayraktar ve ark. 2017; Dua ve Tan 2017; Sun ve ark. 2016). Ancak standart kemoterapi rejimlerinin bu tümörlere karşı aktivitesi olmasına rağmen zayıf sonuçlar ortaya koyduğu bilinmektedir. Neoadjuvan ortamda kemoterapiyi değerlendiren çalışmalar, TNBC'nin diğer tümör tiplerine göre göreceli olarak daha yüksek patolojik değerlere sahip olduğunu bildirmekle birlikte, progresyon ve genel sağ kalım oranlarında paradoksal bir düşüş göstermektedir (Mittendorf ve ark. 2014). Bu nedenle, TNBC hastalarını tedavisi için yeni terapötik hedefleri tanımlamak acil bir klinik gereksinimdir (Chin ve ark. 2013; Liu ve ark. 2014; Mittendorf ve ark. 2014).

Yeni terapötik hedefleri belirlemek ve iyileşen hasta sonuçları ile ilişkili etkin tedaviler geliştirmek üzere TNBC biyolojisinin ve altta yatan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması gerekmektedir (Brenton ve ark. 2005; Zardavas ve ark. 2013). Üçlü negatif meme kanserinde rol oynayan sinyal yolları **Şekil 4.1.2.1**'de görülmektedir (Wu ve ark. 2018).

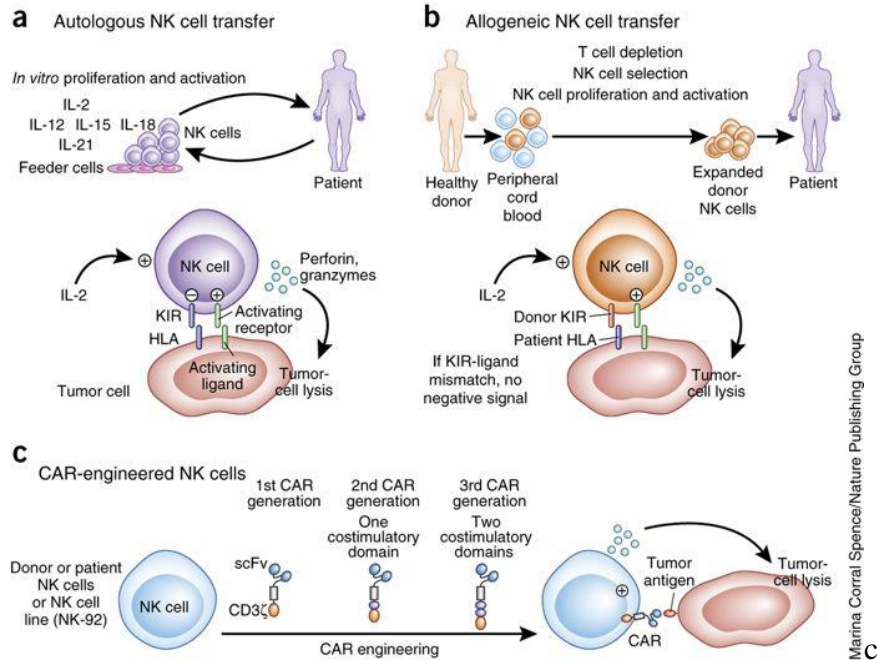


Şekil 4.1.2.1: Üçlü negatif meme kanserinde rol oynayan sinyal yolları (Wu ve ark. 2018).

TNBC'de yeni terapötik hedefleri belirlemek için, yaygın olarak meme kanserinde çoğaltılan ve aşırı eksprese olan protein kinazlar için kısa kodlamayan RNA (shRNA) bloklaması kullanılmaktadır (Chin ve ark. 2013). Gelecekte, üçlü negatif meme tümörlerinin (bazal benzeri veya bazal olmayanlar gibi) genetik yapısı hakkında ayrıntılı bilgilerin kişiye özgü tedavi seçeneklerine izin verebileceği öngörülmektedir (Bayraktar ve ark. 2017). Diğer yandan bağışıklık kontrol noktalarının aktivasyonu ile immünoterapi stratejilerinin antitümör bağışıklığın arttırılmasında etkili olacağı ve TNBC için yeni terapötik seçenekler sağlayacağı umut edilmektedir. Bu amaçla şu anda çok sayıda immünoterapötik ajan test edilmektedir (Mittendorf ve ark. 2014; McArthur 2016). TNBC'de bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri ile yapılan erken faz I çalışmaları, dayanıklı klinik yanıtlar ve tolere edilebilir bir güvenlik profili ile

%19'a kadar genel bir yanıt oranı bildirmektedir (Dua ve Tan 2017). CTLA-4 ve PD-1/PD-L1 gibi bağışıklık baskılayıcı hedefleri inhibe eden antikorların yanı sıra, OX40'ı ve 4-1BB'yi hedef alan antikorlar da dahil olmak üzere T hücre aktivasyonunu arttırarak çalışan T hücre agonistleri üzerine de çalışmalar yapılmaktadır (McArthur 2016). Bu bakış açısı ile meme kanserinde araştırılan mühendislik T hücreleri veya kimerik antijen reseptörü (KAR)-T hücreleri ile adoptif T hücre tedavisinde, bir kişinin T hücreleri lökaferez yoluyla izole edilmekte ve yeniden enfüzyon öncesinde spesifik bir tümör antijenini tanımak üzere tasarlanmaktadır. TNBC'nin yaklaşık üçte birinde aşırı eksprese edilen mezotelyal antijenleri hedefleyen KAR-T hücrelerinin üretildiği duyurulmuştur (McArthur 2016). Benzer yaklaşım ile KAR-NK hücrelerinin üretilmesi de çalışılmıştır. Günümüzde TNBC üzerine T hücreleri ile yürütülen yaklaşık 7 ve NK'lar ile yürütülen yaklaşık 5 farklı klinik çalışma bulunmaktadır.

(<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Triple+Negative+Breast+Cancer&term=T+cells&cntry=&state=&city=&dist=> Erişim: 25.01.2020). Klinik çalışmalarda kullanılan otolog ve allojenik doğal öldürücü hücre transferi şematik olarak **Şekil 4.1.2.2**'de gösterilmektedir (Guillerey ve ark. 2016).



Şekil 4.1.2.2: Otolog ve Allojenik NK hücre transferi (Guillerey ve ark. 2016).

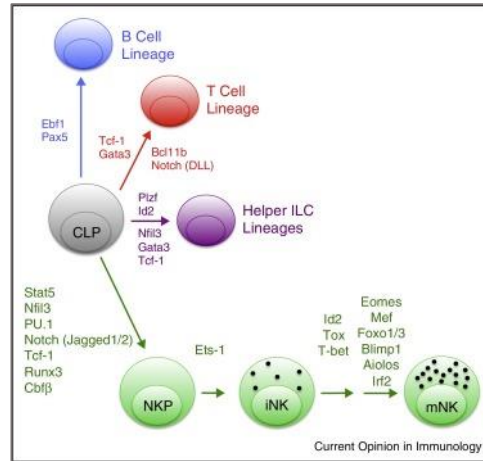
Son birkaç yılda yapılan çalışmalar, meme kanserinde tümör veya tümör stromasında bağışıklık unsurlarının varlığının prognostik ve prediktif değere sahip olduğunu düşündürmektedir. Birçok çalışma, tümör sızdıran lenfositler (TIL) olarak adlandırılan özel beyaz kan hücrelerinin varlığının meme kanserinde daha olumlu bir doğal geçmişi işaret ettiğini göstermiştir. Örneğin, yoğun tümör sızdıran lenfosit popülasyonları meme kanserlerinde üçlü negatif veya insan epidermal büyüme reseptörü 2 (HER2) için pozitif olanlarda daha sık gözlenmiş ve iyileştirilmiş sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (McArthur 2016). Loi ve meslektaşları CD8⁺ intratümöral lenfositlere özel olarak bakan büyük prospektif bir klinik araştırmada TNBC'de tümör sızdıran lenfositlerin prognostik rolünü bildirmiş, TNBC'nin CD8⁺ T hücre infiltrasyonu, TIL'leri bağımsız şekilde olumlu prognostik faktör olarak tanımlanmıştır. Ayrıca gen ekspresyon profillerini analiz eden bir çalışmada, bağışıklık hücresi sinyalleri, sitokin sinyalleri, antijen işleme ve sunumu ve bağışıklık sinyali transdüksiyon yolları yoluyla sinyallemeye dahil olmak üzere bağışıklık sistemi süreçlerinde rol alan genler için zenginleştirilmiş immünomodülatör alt tipi olan altı TNBC alt türü tanımlanmıştır (Lehmann ve ark. 2011). Birlikte ele alındığında, bu veriler immünoterapinin TNBC hastalarının yönetiminde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Mittendorf ve ark. 2014). Yaşam kalitesi açısından sitotoksik kemoterapiyle karşılaştırıldığında nispeten az sayıda önemli yan etkiye sahip olan ve daha iyi şekilde cevap veren kontrol noktası inhibitörlerinin meme kanserinde son derece umut verici olduğunu, bu nedenle TNBC tedavisinde bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri üzerine daha fazla çalışma yapmanın gerekliliği ortaya çıkmaktadır (Dua ve Tan 2017; McArthur 2016).

4.2. DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRELER (NK CELLS)

4.2.1 Tanım ve Genel Bilgi

Doğal öldürücü hücreler (NK) temel olarak, tümör hücrelerine ve viral olarak enfekte olmuş hücrelere karşı sitotoksikiteye aracılık edebilen ve doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir bileşenini oluşturan lenfositlerin bir alt kümesidir (Ames ve ark. 2009; Ames ve Murphy 2014; Cheng ve ark. 2013; Malmberg ve ark. 2008).

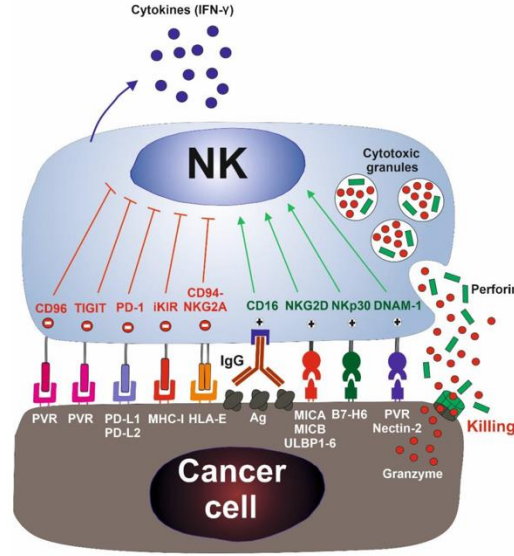
Doğal immün hücreleri, doğal olarak normal hücreleri değişen kanser hücrelerinden ayırt etme yeteneğine sahiptirler (Mamassier ve ark. 2011; Vivier ve ark. 2011). Doğal öldürücü hücrelere ‘katil hücreler’ denmesinin nedeni, toksinlerini salgılamadan, viral enfekte ve kanser hücrelerini yok etmeden önce belirli bir antijeni tanımaya ihtiyaç duymamalarıdır (Vivier ve ark. 2011; Thornthwaite 2001). Tüm bağışıklık sistemi elemanlarından doğal öldürücü hücreler en agresif olanlardır ve enfeksiyondan yaklaşık 3 gün sonra tümör oluşumuna tepki verdikleri bilinmektedir. Doğal öldürücü hücreler toplam dolaşımdaki lenfositlerin yaklaşık %5 ila %15’ini oluştururlar. NK hücrelerinin kemik iliği, lenf düğümleri, dalak, bademcikler ve timusta ayrıştığı ve olgunlaştığı ve dolaşıma katıldığı bilinmektedir (Vivier ve ark. 2011). Doğal öldürücü hücrelerin gelişimi süreci ve etkili olan transkripsiyon faktörleri **Şekil 4.2.1.1**’de görülmektedir (Geiger and Sun 2016).



Şekil 4.2.1.1: NK hücre gelişimi (Geiger and Sun 2016).

Hem farelerde hem de insanlarda, doğal öldürücü hücrelerin, yüzey adhezyon molekülleri ve antijenik peptidlerin yokluğunda bile, sitolitik efektör lenfositleri gibi davranarak tümör hücrelerinin ölümünü doğrudan indüklediği, böylece tümör immünoşüpervizyonunda rol oynadığı görülmüştür (Vivier ve ark. 2011). Ancak NK hücreleri doğal bağışıklığın yanı sıra adaptif immün yanıtta da rol oynamaktadır (Arina ve ark. 2007). Aynı antijenle sekonder enfeksiyonlara cevap vermek için temel olan antijen spesifik immünolojik belleği formüle ederek, çevresine hızlı ve kolay uyum sağlama yeteneklerini gösteren çok sayıda deney yapılmıştır. Tipik olarak, immün hücreler enfekte hücre yüzeylerinde sunulan majör histokompatibilite kompleksini (MHC) tespit ederek aktive edildiğinde, NK hücreleri hedefini diğer

efektörleri baskılayarak/veya etkinleştiren sitotoksik enzimlerin (perforin 1, granzimler, granülizin) ve/veya çözünebilir faktörlerin (kemokinler ve inflamatuvar sitokinler) salınması yoluyla ortadan kaldırır (Ames ve ark. 2009; Mamassier ve ark. 2011; Vivier ve ark. 2011). Doğal öldürücü hücrelerin genel aktivasyon mekanizmaları ve öldürme yolları **Şekil 4.2.1.2**'de görülmektedir (Gonzalez-Rodriguez ve ark. 2019).



Şekil 4.2.1.2: NK hücrelerinin aktivasyon mekanizmaları ve öldürme yolları (Gonzalez-Rodriguez ve ark. 2019).

Bir başka deyişle doğal öldürücü hücreler, hedef hücreleri öldürmek için çeşitli öldürme yolları repertuarına sahiptirler; sitotoksik granüllerin salınmasını, bağışıklık tepkisini indükleyebilen sitokinlerin üretimini ve hedef hücrelerin yüzeyinde ölüm reseptörlerini etkileme kabiliyetlerini içerirler (Ames ve ark. 2009). Ayrıca bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlarda, bağışıklık sisteminin genel sağlığını etkileyen olguların düzenlenmesinde de NK'nın rolü oldukça önemlidir (Thorntonwaite 2001). Bu nedenle kanser için kemoterapi gören bağışıklığı baskılanmış hastalarda, AIDS veya kuş gribi gibi herhangi bir viral hastalıkta, doğal öldürücü hücre aktivitesini uyarmak için doğal ürünlerin geliştirmesinin ve özellikle NK hücresi aracılıklı tedavinin arttırılmasının sağlanması immünoterapi çalışmaları için cazip bir strateji olarak dikkat çekmektedir (Malmberg ve ark. 2008; Mamassier ve ark. 2011; Shenouda ve ark. 2017; Thorntonwaite 2001).

NK hücrelerine atfedilen baskın öldürme yolunun, perforin ve granzimler (sitotoksik granüller) yoluyla granüle aracılıklı öldürme olduğu bilinmektedir (Cheng ve ark. 2013). Kısa vadeli öldürme analizlerinde, ölüm ligandlarının apoptotik etkilere aracılık etmek için yeterli zamana sahip olmadığı, bu yüzden granül ekzositoz ile NK hücrelerinin öldürme görevini yaptığı sonucuna ulaşılmıştır (Ames ve ark. 2009). Yapılan bu kısa vadeli analizler, ölüm ligandlarının tümör hedeflerine etkisini tam olarak yansıtmamaktadır. Bu nedenle, NK hücrelerinin öldürme yollarını tam anlamıyla çalışılabilecek uzun vadeli analizler yapmak daha bilgilendirici olacaktır. Böylece NK hücrelerinin in vivo işlevde ne kadar etkili olduğuna dair daha net bilgiler elde edilebilecektir (Shenouda ve ark. 2017).

Moleküler yapısına bakılacak olursa, enfekte hücrelerin bağışıklık hücreleri tarafından tespit edilmesinde rutin olarak enfekte hücrelerin antikorlarla opsonize edilmesi söz konusudur. NK hücreleri, makrofajlar ve birkaç başka hücre tipi ile birlikte, antikorların Fc kısmına bağlanan, aktive edici bir biyokimyasal reseptör olan Fc reseptör (FcR) molekülünü (Fc γ RIII(CD16)) ifade eder. Antijenleri bağlayan antikorlar, NK hücrelerinde eksprese edilen Fc γ RIII (CD16) reseptörleri tarafından tanınabilir, bu da NK aktivasyonu ile oluşan humoral yanıt (sıvısal bağışıklık yanıtının) sonucu sitolitik granüllerin salınmasına, dolayısıyla antikora bağımlı hücresel toksisite ile enfekte hücrelerin parçalanmasına izin verir. Bu, rituximab ve ofatumumab gibi bazı monoklonal antikorların önemli bir öldürme mekanizmasıdır. Bu tepkinin seviyesi, antikoru veya IgG'nin Fc kısmı için yüksek, orta ve düşük afinite gösterebilen NK hücreleri üzerinde eksprese edilen Fc reseptörünün yapısına bağlıdır. Bu afinite, fenilalanin (F alel) veya valine (V alel) kodlayabilen genin 158 pozisyonundaki nükleotid durumu tarafından belirlenir. Yüksek afiniteli Fc γ RIII (158 V/V alel) sahip bireyler, antikor tedavisine daha iyi cevap verirler. Antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksitenin tümör hücresi öldürmesine katkısı, yüksek afiniteli bir FcR ile transfekte edilmiş NK-92'yi kullanan spesifik bir test ile ölçülebilmektedir (Smyth ve ark. 2002). Bu afinite oranı rituximab moleküler antikoru olan Rituxan tedavisi gören lenfoma hastaları için gösterilmiştir. Diğer yandan tümör hücreleri, aktive edici reseptörlerin aşağı yönlü regülasyonunu ve lenfosit inhibe edici reseptörlerin yukarı yönlü regülasyonunu indükleyerek antitümör bağışıklık için görünmez hale gelebilir (Mamassier ve ark. 2011). Bu sorunu aydınlatmaya yönelik yapılmış araştırmalar, hem oto-kontrolü hem de NK hücre

aktivitesini sürdürmek gibi önemli fonksiyonları bulunan hem aktive edici hem de inhibitör NK hücre reseptörleri hakkında bilgiler sunmuştur (Bodduluru ve ark. 2015; Malmberg ve ark. 2008; Vivier ve ark. 2011). Bunlar; sitokinler, immünomodülatörler, kemoterapötik ilaçlar, proteazom inhibitörleri, histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri, HSP-90 inhibitörleri, glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3) inhibitörleri, metalloproteinaz inhibitörleri ve öldürücü hücre benzeri immünoglobulin reseptörler (KIRs), programlanmış ölüm 1 (PD-1), programlanmış ölüm ligandı 1 (PD-L1), CD137 ve glukokortikoid kaynaklı tümör nekroz faktör reseptörü (GITR) karşı monoklonal antikorlardır (Bodduluru ve ark. 2015). NK hücrelerinde bulunan aktive edici ve inhibe edici reseptörler hedef hücre tanıma sırasında tetiklenir ve pozitif veya negatif hücre sinyal yolağını oluştururlar. Bu zıt sinyallerin integrasyonu NK hücrelerinin aktivasyonunu belirler (Malmberg ve ark. 2008; Mamassier ve ark. 2011; Sutlu ve Alici 2009). IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 ve tip I interferonlar gibi sitokinler, NK hücrelerinin olgunlaşmasında, aktivasyonunda ve sağkalımında rol oynayan önemli faktörlerdir (Nahta 2013). Diğer taraftan NK hücreleri, her ikisi de hedef hücrelerde apoptozu tetikleyebilen TRAIL ve Fas ligandına (FasL) sahiptir. Tümörlerin bortezomib proteozom inhibitörü gibi yardımcı moleküler ajanlar ile ön tedavisinin, TRAIL aracılıklı NK hücre aktivitesine karşı duyarlılığı arttırdığı, fakat FasL aracılıklı sitotoksitede herhangi bir artışa neden olmadığı bildirilmiştir (Lundqvist ve ark. 2006).

Ames E. ve arkadaşları, insan meme kanseri hücrelerine bortezomib uygulamasının, insan NK hücre hattı olan NK-92 tarafından öldürülmesine duyarlılaştırıp duyarlılaştırmadığını araştırmak için bir çalışma planı yürütmüşlerdir (Ames ve ark. 2009). MDA-231 meme kanseri hücrelerine bortezomib uygulamasının in vitro NK-92 hücrelerine karşı oldukça sitotoksik iken, ksenojenik bir fare modeli olan CB-17 SCID farelerine insan meme kanseri hücreleri enjekte edilerek yapılan in vivo çalışmalarda bortezomib tedavisinin NK-92 fonksiyonunu azaltmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Ancak bortezomib eklenmesi tümör taşıyan farelerde akciğer metastazı sayısını azaltmamıştır. Bununla birlikte bortezomib, bu hücrelerin hücre yüzeyindeki apoptozla ilişkili mRNA'ların yanı sıra ölüm reseptörlerinin de yukarı yönlü regüle edilmesine neden olarak apoptozu tetiklemiştir. Bunun da alternatif dozajlama veya zamanlama ile tek başına herhangi bir tedaviden daha fazla anti-tümör etkisine neden olabileceği beyan edilmektedir (Ames ve ark. 2009). Bununla birlikte, Shi ve

arkadaşları MHC-I'deki azalmanın, kısa vadeli kromiyum⁵¹ salınım analizlerinde NK hücresi aracılı sitolizde bir artış ile korelasyona sahip olduğunu gözlemlemiştir (Shi ve ark. 2008). Dolayısıyla, NK hücreleri ile yapılacak çalışmaların in vitro ortamların yanı sıra in vivo koşullarda da gerçekleştirilmesinin oldukça gerekli olduğu görülmektedir. Bu bilgiler ışığında NK hücrelerinin ya tek başına ya da diğer tedavilerle kombinasyon halinde kullanılmasının birçok kanser türü üzerinde tedavi rolünün olabileceği düşünülmektedir (Malmberg ve ark. 2008).

Günümüzdeki NK hücre kullanan tedavileri, ya NK uyarıcı/hedefleyici ajanları kullanarak endojen, ya da HSTC (Hematopoetik kök hücreler) veya ACT (Adoptif hücre tedavisi) modelleri vasıtasıyla eksojen NK yanıtlar oluşturan şekilde sınıflandırılabilir. ACT tedavisi, bağışıklık sisteminin biyolojik fonksiyonunun otolog veya allojenik hücreler vasıtasıyla değiştirilmesi, onarılması veya arttırılmasını amaçlayan bir strateji olarak düşünülebilir. ACT tedavisi, çeşitli hücre popülasyonlarının çıkarılması veya zenginleştirilmesi, hematopoietik hücre alt gruplarının genişlemesi, immünoterapi için NK hücrelerinin aktivasyonu ve bu hücrelerin genetik modifikasyonunu içermektedir (DeSantis ve ark. 2014).

NK hücrelerinin diğer kaynağı, NK-92, YT, NKL, HANK-1, KHYG-1, NK-YS ve NKG gibi malign NK hücre dizilerinin kullanılmasıdır (Bodduluru ve ark. 2015). NK hücrelerinin elde edilmesine yönelik ilk yaklaşım, insan donörlerinden elde edilen çok sayıda periferik kan lemfositesinin lökoferez ile hasat edilmesi, allojenik T hücrelerinin tükenmesi ve kalan NK hücrelerinin yeniden ilaveden önce IL-2 ile etkinleştirilmesidir (Liu ve ark. 2013). Ancak bu yöntemin stabilizasyonu ile ilgili oldukça fazla çalışma yapılmasına rağmen işlemin zorluğu ve uzunluğu nedeniyle istenilen sonuçlara ulaşılamamıştır. Protokollerin standardizasyonu, farklı denemeler arasındaki karşılaştırmalara olanak sağlamak için gereklidir (Malmberg ve ark. 2008). Bu yöntemlerin oturtulmasının ardından sadece birkaç mililitre periferik kandan milyarlarca aktive edilmiş NK hücresine genişletmek mümkün hale gelmiştir (Shenouda ve ark. 2017). Şu anda ikinci bir yöntem olan ex vivo NK hücrelerinin büyütülmesi işlemi yaygın olarak ön klinik testleri için kullanılmaktadır (Liu ve ark. 2013; Malmberg ve ark. 2008). Bunu destekler şekilde, ex-vivo olarak üretilmiş NK hücreleri, meme kanseri hücre çizgilerine ve hem otolog hem de allojenik hastadan türeyen tümör hücrelerine karşı yüksek düzeyde in vitro sitotoksiste göstermektedir. Bununla birlikte, genişletilmiş NK hücrelerinin hasta kaynaklı tümör hücrelerini in

vivo tedavi etme kabiliyeti hakkında veri sağlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Shenouda ve ark. 2017). Bu amaçla, yüksek sitotoksik aktivitesi ve uzun vadeli büyüme potansiyeline sahip NK-92 hücre hattı, insan NK hücrelerinin fonksiyonunu incelemek için cazip bir model olmaktadır (Ames ve ark. 2009). Klinik araştırmalara giren ve NK hücresine dayalı tümör immünoterapisini incelemek için bir platform görevi görebilen tek NK hücre dizisidir (Aria ve ark. 2008). NK-92, ilk kez 1994 yılında saldırgan bir NK hücreli lenfomalı 50 yaşındaki bir erkek hastadan elde edilen bir insan NK hücre dizisidir. NK-92 hücreleri CD3, CD4 ve CD8 T hücre yüzey markörleri için negatiftir ve lenf düğümlerinde ortaya çıkan insan NK hücrelerinde en bol bulunan CD56^{bright} fenotipini (yapışma/adhezyon molekülü) ifade ederler. NK-92 hücreleri primer NK hücreleriyle karşılaştırıldığında, genel olarak öldürücü hücre inhibe edici immünoglobulin benzeri reseptörleri (KIR) ifade etmemektedir, bu hücrelerdeki yüksek sitotoksik aktiviteyi açıklamaktadır (Finn ve ark. 2007). NK-92 hücre hattı, sitokin IL-2'ye oldukça bağımlıdır ve bu hücrelerin in vivo'da dahil edildiği terapilerde süper fizyolojik miktarlarda IL-2'yi gerektirir. Bununla birlikte, NK92 ile hemen hemen aynı hücre dizisine sahip olduğu gösterilen, IL-2 bağımsız hücre dizisi NK-92MI'nin klinik terapiler için daha uygun bir seçenek olabileceği tartışılmaktadır (Mamassier ve ark. 2011). Ancak IL-2'nin kullanılan düşük dozlarında toksisite gözlemlenmemesi nedeniyle, sıçan in vivo çalışmalarında NK-92 hücre hattı kullanımı yaygınlığını korumaktadır (Ames ve ark. 2009; Aria ve ark. 2008).

4.2.2 NK Temelli İmmünoterapik Yaklaşımlar

Bağışıklık sistemi tarafından takibi yapılmasına rağmen, malignant hücreler bağışıklık sisteminden kaçma ve çoğalma yolları bulabilirler (Sutlu ve Alici 2009). AIDS de dahil olmak üzere çeşitli bağışıklık yetmezliği hastalıklarında NK hücre fonksiyonu anormal olduğundan virüslerin insan hücreleri içinde çoğalması da mümkün hale gelmektedir. Yakın tarihli araştırmalarda, kanserlerin moleküler hedeflerinin, kanserleri başka immünoterapi yöntemlere yakınlaştırma kapasitesi çalışılmıştır (Ames ve ark. 2009; Shenouda ve ark. 2017). Tümör hücrelerinin bağışıklık sistemi hücrelerinden saklanmasıdaki genel mekanizmalar, tümörün hızlı büyümesiyle bağışıklık sisteminin geride kalması, bozuk vaskülarizasyona bağlı olarak tümöre erişilememesi kaynaklı Fas veya perforin aracılı apoptoza karşı direnç

geliştirmesidir (Sutlu ve Alici 2009). Son yapılan çalışmalarda kanserli hastalarda hastalık progresyonu ile korele olduğu bildirilen, T hücreleri ve NK hücreleri tarafından defektif ifade aktivasyon reseptörleri ve çeşitli hücre içi sinyal molekülleri bulunmuştur. Ayrıca malign hücrelerin, T ve NK hücre çoğalmasını inhibe eden immün baskılayıcı faktörleri salgıladığı da gösterilmiştir (Sutlu ve Alici 2009). Özellikle yeni tümör hücreleri NK sitotoksitesine karşı nispeten dirençlidir. Bunun yanında spontan ve normal hücre popülasyonlarının NK duyarlılığı, normal hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde NK hücrelerinin de rol oynadığını ortaya koymaktadır (Hamilton ve ark. 1988). Mamassier ve arkadaşlarının çalışmalarında daha önce IFN- γ sinyali veren veya antitümör immün hücrelerdeki kusurlu farelerin primer tümörler geliştirme olasılığının daha yüksek olduğu, özellikle hastalık evresi ilerledikçe NK hücre aktivitesinin, özellikle de IFN- γ üretiminin invaziv meme tümörlerinde güçlü bir şekilde bozulduğu gözlenmiştir (Mamasier ve ark. 2011).

Yakın tarihli çalışmalar, IDO1 ve TGF- β 1 gibi tümör mikro ortamında sıklıkla bulunan inhibe edici faktörler ile NKG2D çözünür ligandları gibi birkaç molekülün NK hücrelerinin fenotipini ve fonksiyonlarını keskin bir şekilde bozabileceğini göstermiştir (Catriconi ve ark. 2003; Della Chiesa ve ark. 2006; Vivier ve ark. 2011). Çözünür NKG2D ligandları NK hücresi NKG2D reseptörlerine bağlanmakta, sahte bir NK tepkisini aktive ederek sonuçta reseptör bölgesi için rekabet yaratmaktadır (Vivier ve ark. 2011). Buna ek olarak, MHC-I sınıf moleküllerinin ekspresyonunu indirgeme yeteneğine sahip olan kanser hücreleri CD8⁺ hücre tanınmasından da kaçabilmektedir (Bodduluru ve ark. 2015). Bu bilgileri destekler şekilde invaziv meme tümörlerinin, diğer toksik tümör mikro ortamlarına benzer olarak, NK hücrelerinde oto-toleransı indükleyen, zayıflatılmış hücre immünojenitesinin ortaya çıkmasına, NK hücrelerinin sitotoksitesini körelten ve nihai olgunlaşma sürecinin engellenmesine neden olan çok yönlü bir immünoşüpresif mikro çevre yarattığı bilinmektedir (Barsoum ve ark. 2011; Mamassier ve ark. 2011; Pasero ve ark. 2015; Shenouda ve ark. 2017). Yine yapılan çalışmalarda, periferik kandaki sağlıklı vericilerle karşılaştırıldığında kanserli hastaların daha az sayıda NK hücreleri içerdiklerini saptamışlardır (Mamassier ve ark. 2011). Bununla birlikte kanser hastalarındaki NK hücrelerinin, öldürücü hücre immüoglobulin benzeri reseptörler (KIR'ler) ve NKG2A gibi inhibe edici belirteçlerin artmış bir ifadesi ve esasen NKG2D ve doğal sitotoksite reseptörleri (NCR'ler) gibi aktive edici belirteçlerin

azaltılmış ifadesi ile karakterize bir inhibitör fenotip sergiledikleri keşfedilmiştir (Gillgrass ve Ashkar 2011; Shenouda ve ark. 2017). Bu da düşük immün yanıt ile ilişkilidir. Bu bilgileri destekler şekilde bir başka çalışmada meme tümörlerinin immünojenisitesine bakıldığında birçok tümörde sık rastlanılan şekilde, NK hücre ligandlarının protein ve mRNA profillerinin sağlıklı meme dokularında görülen profillerden farklı olduğu görülmüştür. Tanıdaki tümör hücre profillerin heterojenliğinin, yine başarılı olarak çalışmayan immün sisteminin bir sonucu olduğu düşünülebilir (Mamassier ve ark. 2011). Yapılan bir başka çalışmada, meme kanserine karşı yüksek risk grubunda yer alan bireylerde NK aktiviteleri kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Hamilton ve ark. 1988). Diğer taraftan Shenouda ve arkadaşlarının çalışmalarında, meme kanseri hastalarından gelen NK hücreleri, sağlıklı donörlerden benzer şekilde üretilebileceği belirtilmektedir. Meme kanseri hastalarıyla yapılan çalışmalarda, hastadan türetilen NK hücrelerinin tümör hücrelerine karşı yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir. Bu veriler kanserli hastalarda NK hücre fonksiyonunu düzeltmek için mevcut kanser tedavileri ile uyumlu olduğundan oldukça önemlidir (Shenouda ve ark. 2017). NK ayrıcalıklı immünoterapiyi destekler şekilde, kanser hastalarına büyük dozlarda NK hücrelerinin infüzyonunun, hastalarda herhangi bir ciddi yan etki oluşturmadığı, bu sebeple güvenli olduğu, dahası kanser hastalarında üretilmiş bu NK hücrelerinin in vivo olarak haftalarca ve aylarca hayatta kaldıkları gösterilmiştir (Parkhurst ve ark. 2011). Sakamoto ve arkadaşları, stabil bir hastalık durumu gösteren hastalara NK hücre infüzyonundan 14 gün sonra NK hücre sitotoksitesinde yaklaşık üç kat artış gözlemlemiştir (Sakamoto ve ark. 2015). Bu bağlamda invaziv meme tümörlerinin kontrolünde NK hücrelerinin rolünü vurgulamanın ve ameliyattan sonra NK hücrelerinin antitümör verimliliğinin preaktif veya aktif NK hücreleri ile birlikte restore etmenin, diğer malignitelerde gösterildiği gibi artık tümör hücrelerinin temizlemesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle invaziv meme tümörü rekürrensini önlemek için etkili bir şekilde NK hücre sitotoksitesini geliştirecek çalışmaların yapılması oldukça önemlidir (Mamassier ve ark. 2011). NK hücresinin sitotoksik aktivitesini modüle eden veya tümör hücrelerini NK hücresi aracılı sitotoksitesiteye duyarlı hale getiren çeşitli farmakolojik maddeler mevcut olduğundan, kombinasyonel hücre aktarım çalışmalarının, immünostimülatör ve

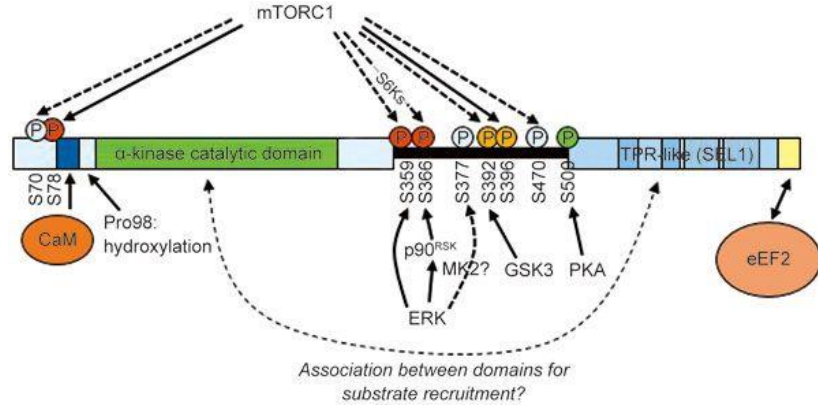
tümör hücresi ölüm hassaslaştırıcı tedavilerin tasarımlarının uygulanabilirliğine özel bir vurgu yapılmalıdır (Bodduluru ve ark. 2015).

4.3. eEF2K SİNYAL YOLAĞI

4.3.1 Tanım ve Genel Bilgi

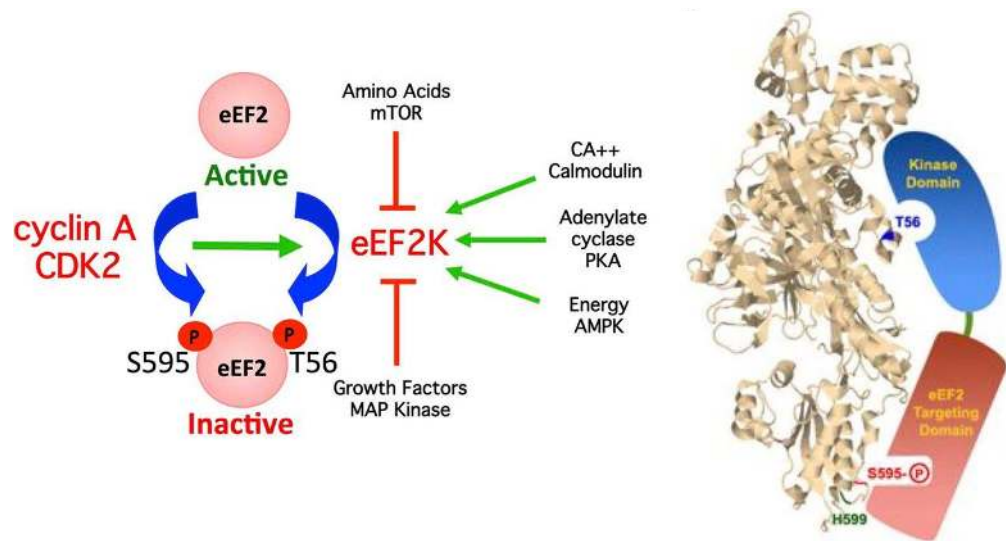
Ökaryotik uzama faktörü 2 kinaz (eEF2K), bir kalsiyum/kalmodulin-bağımlı serin/treonin kinazdır. eEF2K, katalitik alanı geleneksel protein kinazlara yapısal olarak benzemediği için atipik bir kinaz olarak ifade edilir. Bilinen tek substratı peptid zincirinin uzama hızını azaltan ökaryotik uzama faktörü 2 (eEF2)'dir (Bayraktar ve ark. 2017; Tavares ve ark. 2012). eEF2K geni, memeliler arasında oldukça korunmuştur. Dolayısıyla, eEF2'nin eEF2K tarafından düzenlenme mekanizması da evrimsel olarak korunmuş olmaktadır (Fu ve ark. 2014). eEF2K aktivitesi, transfer RNA (tRNA) üzerindeki ribozomun A sitesinden P bölgesine hareketine aracılık eden eEF2'yi (treonin 56'da) fosforile/defosforile ederek protein zincirinin uzamasını kontrol etmek için çoklu mekanizmalarla düzenlenir (Bayraktar ve ark. 2017; Brenton ve ark. 2005; Finn ve ark. 2007; Fu ve ark. 2014; Liu ve ark. 2014).

Yapılan yeni çalışmalar ışığında 1-Benzil-3-setil-2-metilimidazolyum iyodid (NH125), mTOR ve AMPK gibi regülatörlerde yer alan çoklu yolları modüle ederek eEF2 fosforilasyonunun indüklenmesi, farklı kanser hücrelerine karşı etkin bir anti-proliferasyon ajan olabileceğini düşündürmektedir (Chen ve ark. 2011). Ayrıca eEF2'nin eEF2K tarafından fosforilasyonu küresel protein sentezini engellediğinden, TNBC tümörigenezinin ilerlemesini ve ilaç direncini teşvik eden potansiyel yeni bir moleküler hedef olarak nitelendirilmesine olanak sağlamaktadır (Bayraktar ve ark. 2017; Liu ve ark. 2014; Tavares ve ark. 2012). Ancak bugüne kadar, eEF2K'nın fizyolojik işlevlerini anlama ve bunu uygun bir terapötik hedef olarak değerlendirmede kaydedilen ilerleme, eEF2K'yi hedef alan güçlü spesifik moleküllerin olmaması nedeniyle engellenmiş, bu yüzden eEF2K otofosforilasyon mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Ashour ve ark. 2014; Bayraktar ve ark. 2017; Tavares ve ark. 2012). Tavares ve arkadaşları, çalışmalarında eEF2K için beş büyük otofosforilasyon bölgesi (Thr-348, Thr-353, Ser-445, Ser-474 ve Ser-500) belirlemişlerdir (Tavares ve ark. 2012). eEF2K'in fosforilasyon bölgeleri **Şekil 4.3.1.1**'de görülmektedir (Liu ve ark. 2016).



Şekil 4.3.1.1: eEF2K'in fosforilasyon bölgeleri (Liu ve ark. 2016).

Ca_2^+ /calmodilin (CaM) varlığında, Thr-348'in sağlam fosforilasyonunun birkaç saniye içinde MgATP ilavesiyle oluştuğu, mutajenez çalışmaları ile de eEF2 fosforilasyonu için Thr-348'in fosforilasyonunun gerekli olduğu önerilmektedir. Ser-500'ün fosforilasyonunun Thr-348'in fosforilasyonunun gerisinde kaldığı ve eEF2K'nin Ca_2^+ bağımsız aktivitesi ile ilişkilendirildiği belirtilmektedir. Ser-500'ün Ala yerine Asp aminoasitine dönüşmesi, eEF2K'yi Ca_2^+ bağımsız hale getirmektedir. Ancak Ca_2^+ 'a bağlı olmayan bu aktivite, calmodilin (CaM)'nin varlığını gerektirmektedir (Tavares ve ark. 2012). Bunun yanında Ser-595 ve Thr-56 bölgelerinin çoklu fosforilasyonları ile de eEF2 inaktive hale gelmektedir (Şekil 4.3.1.2) (Hizli ve ark. 2012).

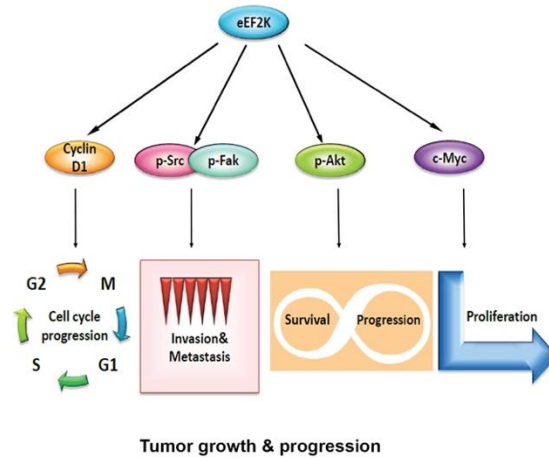


Şekil 4.3.1.2: Çoklu fosforilasyonlar ile eEF2 inaktivasyonu (Hizli ve ark. 2012).

4.3.2 Karsinogenezde eEF2K'in Rolü ve Güncel Çalışmalar

Literatüre göre mRNA translasyon uzamasının aktivasyonuna yol açan eEF2K ve eEF2, mTORC1'in aşağı akış yönünde yer alan S6K1 tarafından fosforile edilip aktive edilmektedir. eEF2K ayrıca ERK ve AMPK da dahil olmak üzere diğer sinyal yolları tarafından da gözlemlenebilmektedir. eEF2K ve JNK inhibitörleri, Pten/p53'ten yoksun TNBC'nin ksenograft fare çalışmalarında tümör büyümesini baskılamaktadır. Ayrıca eEF2K inhibitörlerine altı adet insan TNBC hücre hattının (BT-549, HCC-38, HCC-1937, MDA-MB-157, MDA-MB-436, MDA-MB-468) duyarlılığının, Gatza ve arkadaşları tarafından tanımlanan 18 yol işaretinin herhangi biriyle orantılı olup olmadığı da çalışılmış, dikkat çekici şekilde TNBC hücrelerinin TX-1918 ve NH125'e duyarlılığının yalnızca AKT sinyal yolağı ile korelasyonu olduğu bildirilmiştir (Gatza ve ark. 2010; Liu ve ark. 2014).

Son zamanlarda, eEF2K'nin hücre çoğalmasını, hücre göçünü, invazyonu, epitelyal mezenkimal geçişini (EMT) ve TNBC tümöregenleşmesini, siklin D1, c-myc, PI3K/Akt, Src/Fak ve insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü (IGFR) sinyallerini düzenlenerek hücre döngüsünü kontrol ettiği, böylece G1/S geçişini desteklediği gösterilen birçok çalışma yapılmıştır (Bayraktar ve ark. 2017). Bu çalışmalardan bir tanesinde miR-603 küçük molekülü eEF2K inhibitörü olarak kullanılmış ve eEF2K ile ilişkili düzenleyici yollar şematize edilmiştir (Şekil 4.3.2.1) (Bayraktar ve ark. 2016).



Şekil 4.3.2.1: Üçlü negatif meme kanserinde eEF2K içeren düzenleyici yolların şematik modeli (Bayraktar ve ark. 2016).

Dahası eEF2K, kanser hücrelerinin apoptozis ve otofaji arasındaki çapraz geçişinde önemli bir rol oynamaktadır. Tümörögenizde EF2K apoptozu inhibe etmek için XIAP, c-FLIPL, Bcl-XL, PI3KCI ve p70S6K gibi bazı apoptotik proteinlerin ekspresyonunu modüle edebilmektedir. Apoptozun tetiklendiği durumlarda, çevredeki dokulara zarar vermeden tümörlerin dağılması sağlanır. eEF2K'nın TNF'e bağlı apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) ayrıcalıklı indüklenen apoptoz üzerindeki etkisi, modüle edici Bcl-XL ekspresyonu vasıtasıyla sağlanabilir. Bcl-XL'in aşırı ekspresyonu, eEF2K hedefli siRNA'nın TRAIL aracılıklı indüklenen apoptoz üzerindeki duyarlılaştırıcı etkisini ortadan kaldırabilir (Zhang ve ark. 2011).

eEF2K ayrıca, endoplazmik retikulum (ER) stresine ve ribozomal strese yanıt olarak aktive edildiği için ER ve ribozomal stres indükleyici ajanlar, anti kanser ajanlar olarak test edilmekte ve geliştirilmektedir (Cheng ve ark. 2013; Gismond ve ark. 2014). Ribozomal stres, eEF2K/eEF2 yolağını aktive ederek protein translasyonunu yavaşlatır. Ribozomal stres koşullarında ribozomal proteinleri ve çeviri faktörlerini kodlayan terminal oligopirimidin (TOP) mRNA'larının diğer proteinlere kıyasla polisomlar üzerinde tekrar dolaşarak TOP mRNA'sı ile kodlanmış, yapısal haberciler olarak tanınan proteinlerin sentezinde de nispi bir artış meydana gelir. Dolayısıyla ribozomal strese tepki olarak, hücrede yeterli seviyede ribozomun geri kazanılmasına yardımcı olacak bir değişiklik olurken, hücre aynı zamanda protein sentezini yavaşlatarak sağ kalım şansını arttırmaktadır (Gismond ve ark. 2014). eEF2K ekspresyonunun ER stres kaynaklı otofaji üzerindeki etkisi ise, insan meme kanseri hücre serileri MCF-7 ve T47D'de gösterilmiştir. Bu deneyler, ER stresine otofajik yanıtta eEF2K'nın düzenleyici rol oynadığını vurgulamaktadır (Cheng ve ark. 2013). eEF2K, mTORC1, AMPK ve Atg8 molekülleri aracılıklı otofaji mekanizmasının düzenlenmesinde etkili olmaktadır (Fu ve ark. 2014; Liu ve ark. 2014). Ancak Liu ve arkadaşları eEF2K'nın inhibisyonunun açlık çekmeyen koşullar altında otofajiyi etkilemediğini belirtmişlerdir. Diğer yandan besin yoksunluğu gibi tümör hücrelerinin sıklıkla maruz kaldığı koşullarda eEF2K'nın inhibisyonunun, proteinin translasyonunu sürdürülemez oranda arttırarak hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir (Liu ve ark. 2014). Ancak akut besin yokluğu durumunda eEF2K aktivitesi, tümör hücresinin metabolik strese adaptasyonunu sağlayabilir. Bu yaklaşım çeşitli malignitelerde yüksek seviyede bulunan eEF2K ifadesi ile desteklemektedir (Fu ve ark. 2014). MCF-7 meme kanseri ve T98G glioma hücreleri ile yapılan besin

yoksunluğu çalışmalarında, eEF2K'nin hızla aktivite olarak eEF2 fosforilasyonunu gerçekleştirdiği görülmüştür. eEF2K, translasyon oranını düzenleyerek besin yoksunluğu, hipoksi ve metabolik stres koşullarında hücre sağkalımı desteklemektedir (Bayraktar ve ark. 2017). Dahası, farklı kanser türlerinde bazı küçük moleküllu bileşiklerin spesifik substrat eEF2'yi hedef aldığı rapor edilmiştir (Fu ve ark. 2014). Tüm bu bilgiler ışığında eEF2K'nın yapısı, modifikasyonları ve biyolojik fonksiyonu hakkında daha fazla araştırma yapmak, eEF2K'nin kanser hücreleri üzerindeki apoptoz ve/veya otofaji etkisindeki sağkalım rolünü ve potansiyel anti-kanser hedefi olarak kullanımının önemini anlamamıza yardımcı olacaktır (Fu ve ark. 2014; Liu ve ark. 2014).

4.4 PD-1 / PD-L1 KONTROL NOKTASI

4.4.1 Tanım ve Genel Bilgi

Programlanmış hücre ölüm proteini-1 (PD-1), aktifleştirilmiş T hücreleri, NK hücreleri, B hücreleri, Dentrit hücreleri ve monositlerde yukarı regüle edilen ortak sinyal iletim reseptörü olan B7 ailesine dahil, dokulardaki T ve doğal öldürücü hücreler gibi çeşitli immün hücrelerin efektör fonksiyonunu sınırlayan bağışıklık kontrol noktası reseptörüdür (Bodduluru ve ark. 2015; Zardavas ve ark. 2013). PD-1, çeşitli tümör tiplerinde eksprese edildiği bilinen, farklı tanımlama profillerine sahip, iki liganda (PD-L1 ve PD-L2) sahiptir (Bayraktar ve ark. 2017; Mittendorf ve ark. 2014). PD-1'in bir ligandı ve immün yanıt önleyici molekül olan PD-L1, kanser hücreleri, tümör sızdıran inflamatuvar hücreler ve bağışıklık hücreleri üzerinde eksprese edilir (Dua ve Tan 2017; Sun ve ark. 2016).

PD-L1 ve PD-L2 ligandlarının ekspresyonlarının baskılanması birçok tümör tipinin immünoterapi tabanlı tedavisine olanak sağlamaktadır. Kontrol noktası abluka antikorları, sitotoksik T lenfosit ve doğal öldürücü hücrelerle ilişkilendirilen antijen 4 (CTLA-4) veya programlanmış ölüm-1/programlanmış ölüm ligandı-1 (PD-1/PD-L1) yolunu hedefleyerek engelleyici sinyalleri kaldırarak sağlam bağışıklık yanıtlarına izin verebilirler (McArthur 2016). PD-L1 düzenlemesinin bir mekanizması, IFN-gama (IFN γ)'ya yanıt olarak PD-L1'in tümör hücre yüzey ekspresyonunun indüksiyonudur. Bunun muhtemelen tümör hücrelerinin anti-tümör immün tepkisini terk ettiği bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. İkinci bir mekanizma, kanserojen sinyal ile

yapılmaktadır (Mittendorf ve ark. 2014). Onkogen kaynaklı PD-L1 ifadesi ile inflamasyona dayalı PD-L1 ifadesi arasında farklar vardır. Onkogen kaynaklı PD-L1 ekspresyonu yapısal ve değişken olsa da inflamasyona dayalı PD-L1 ekspresyonu, IFN γ aracılıklı immünolojik saldırı alanları ile sınırlıdır. Buna ek olarak, inflamasyona dayalı PD-L1 ekspresyonu bağışıklık sızıntılarıyla ilişkili iken, onkogen kaynaklı PD-L1 ekspresyonu değildir (Sun ve ark. 2016). Ek olarak fosfataz ve tensin homolog (PTEN) protein kaybı, PD-L1 ekspresyonunu düzenleyen bir başka mekanizma olduğundan, PI3K yolağını hedefleyen ajanlar anti-tümör adaptif immün yanıtları artırabilir (Mittendorf ve ark. 2014).

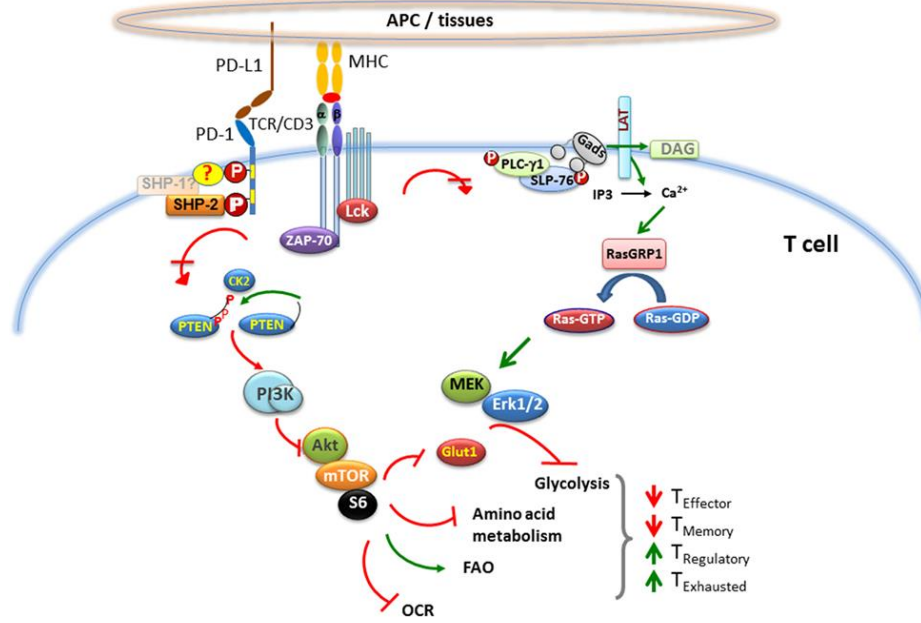
4.4.2 Karsinogeneizde PD-L1'in Rolü ve Güncel Çalışmalar

Tümör ve viral olarak enfekte olmuş hücrelerin bağışıklık önleme mekanizmalarından bir tanesi PD-L1 (gene known as CD274) ve PD-L2 ligandlarının ekspresyonu yoluyla gerçekleşmektedir (McArthur 2016). Akciğer kanseri, mesane kanseri, malign melanom ve yumurtalık kanseri çalışmalarında PD-L1 ekspresyonunun %20 ila %70 oranında olduğu gösterilmiştir (Sun ve ark. 2016).

NK hücrelerinde PD-1'in hücre içindeki kısmı protein tirozin fosfatazları olan SHP-1 ve SHP-2'yi düzenleyen bağışıklık koruyucu tirozin esaslı önleyici motifler (ITIM) içerdiği için PD-1/PD-L1 etkileşimi inhibitör sinyal iletimini dönüştürür ve böylece PI3K/AKT ve Ras sinyalizasyonunun aktivasyonunu ortadan kaldırır. Bu durum immün hücrelerinin bozulmuş aktivasyonuna neden olur. Bu nedenle, PD-1/PD-L1'in anti-PD-1 (nivolumab (BMS-936558 veya MDX1106), pembrolizumab (MK-3475), pidilizumab (CT-011)) veya anti-PD-L1 (BMS-936559, MSB0010718C, MPDL3280A, MEDI-4736) monoklonal antikorları ile etkileşiminin engellenmesi, negatif sinyali inhibe eder ve immün hücrelerinden NK hücreleri sitokin üretimini ve sitotoksiteyi artırarak anti-tümör efektör yanıtlarının artmasına ve tümör regresyonuna (baskılanmasına) neden olur (James ve ark. 2013).

Mittendorf ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada çoğunlukla TNBC olan bazal benzeri tümörlerin PI3K yol aktivasyonu ile korelasyon gösterdikleri, yapılan diğer bir çalışmada tümörlerin %35'inde PTEN kaybı görüldüğü ve ER/PR negatif tümörlerde PTEN korelasyonunun desteklendiği bulgularına ulaşılmıştır. İlave olarak PTEN geninin susturulmasının, transkripsiyonel regülasyonu modüle ederek, hücre yüzeyinde PD-L1 transkriptlerinin ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı

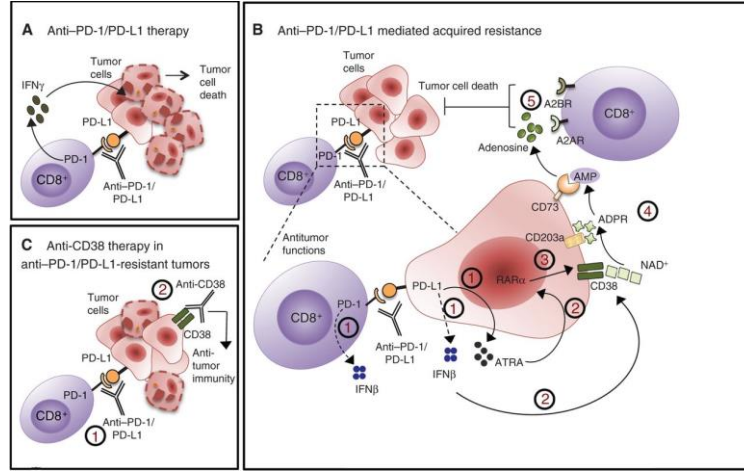
gösterilmiştir. Bulgular PTEN kaybıyla indüklenen tümör hücreleri tarafından artmış PD-L1 hücre yüzeyi ekspresyonunun azalmış T hücre proliferasyonuna yol açtığı yönündedir (Mittendorf ve ark. 2014). **Şekil 4.4.2.1**'de PD-1'in T hücrelerinin majör sinyal yollarına ve sinyalin oluşmasının ardından aktive olan yeniden metabolik programlamaya etkisi gösterilmektedir (Bardhan ve ark. 2016).



Şekil 4.4.2.1: PD-1'in T hücrelerinde majör sinyal yollarına ve sinyalin ardından oluşan yeniden metabolik programlamaya etkisi. (Bardhan ve ark. 2016).

Sonuç olarak tümör hücrelerinde eksprese edilen PD-L1'in T hücre yüzeyinde bulunan PD-1 ile etkileşiminin, tümörün bağışıklık sistemi elemanlarından kaçmasında önemli bir mekanizması olduğu görülmektedir (Dua ve Tan 2017).

Literatürde aşırı PD-L1 ekspresyonu gösteren ve PD-L1 gen ifadesi içermeyen bazı hastaların, PD-L1 baskılanmasına yanıt vermediğini belirten yayınlar da mevcuttur (O'Donnell et al. 2016; Nowicki et al. 2018; Ren et al. 2020). Mittal ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada tümör mikro çevresinde CD38 kaynaklı adenosine bağlı anti-PD-1 / PD-L1 direncinin geliştiği belirtilmiştir (**Şekil 4.4.2.2**) (Mittal ve ark. 2018).



Şekil 4.4.2.2: Tümör mikro çevresinde CD38 kaynaklı adenosine bağlı anti-PD-1 / PD-L1 direnci (Mittal ve ark. 2018).

Dahası, ER veya HER2'den farklı olarak, tümör PD-L1 ifadesi dinamiktir ve ekspresyon seviyeleri spesifik maruz kalmalara yanıt olarak değişmektedir. Örneğin, T hücresi infiltrasyonu PD-L1'in tümör ekspresyonunu yukarı yönde regüle eden IFN γ 'nın salınmasına neden olur. Başka bir deyişle, test edilen doku, dokunun toplanma koşulları ve etkili diğer parametrelerin hepsi de PD-L1 ekspresyon sonuçlarını etkileyebilmektedir. Dolayısıyla, PD-L1 ekspresyonunun varlığı koşullara bağlı olarak zenginleşebilir ancak bu durum yanlış pozitif olarak ifade edilen, hikâyenin tamamını anlatmayan bir olgudur (McArthur 2016). Bununla birlikte bu verilerin, PD-L1 ekspresyonunu tanımlamak için farklı kriterlere ve PD-L1 ekspresyonunu ölçmek için farklı deney uygulamalarına sahip küçük çalışmalardan elde edildiğini unutmamak önemlidir. Tüm tümör alt türleri üzerinde daha büyük çalışmalar sürdürerek bu alanı daha da bilgilendirmek olasıdır (McArthur 2016). Ayrıca, PD-L1 değerlendirmesi hem kanser hücresi hem de immün hücrelerde yapılmalıdır (Sun ve ark. 2016). Formalin ile fikse edilmiş ve parafine gömülmüş (FFPE) örneklerde monoklonal bir PD-L1 antikoru ile immünohistokimya (IHC) kullanılarak kolayca değerlendirilebilmektedir (Bayraktar ve ark. 2017; Sun ve ark. 2016). Young Sun ve arkadaşlarının raporlarında TNBC'deki PD-L1'in immünohistokimyasal ifadesini değerlendirmek için aynı şartlar altında üç farklı antikor klonları kullanıldığı ve hem tümör hücrelerinde hem de bağışıklık hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunda farklılıklar bulunduğunu ve antikor klonuna bağlı olarak kanser hücrelerinin ve bağışıklık hücrelerinin %19.3 ile %37.6'sında PD-L1 ifadesi görüldüğünü bildirmişlerdir (Sun ve ark. 2016). Mittendorf ve arkadaşlarının elde

ettiği sonuçlar da, TNBC'deki PD-L1'in hormon reseptörüne (HR) sahip meme kanserlerine kıyasla daha yüksek ekspresyonu olduğu yönündedir (Mittendorf ve ark. 2014). Doku mikro dizileri üzerine yapılan analiz, 105 primer TNBC örneğinin %19'unun PD-L1 pozitif olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, Tung ve arkadaşları, biyolojik belirteç olarak PD-L1'in rolünün belirsiz olmasına rağmen, primer TNBC hücrelerinin %26'sının (193'te 51 tanesinin) yüzeylerinde PD-L1 ifade ettiklerini keşfetmiştir (Dua ve Tan 2017).

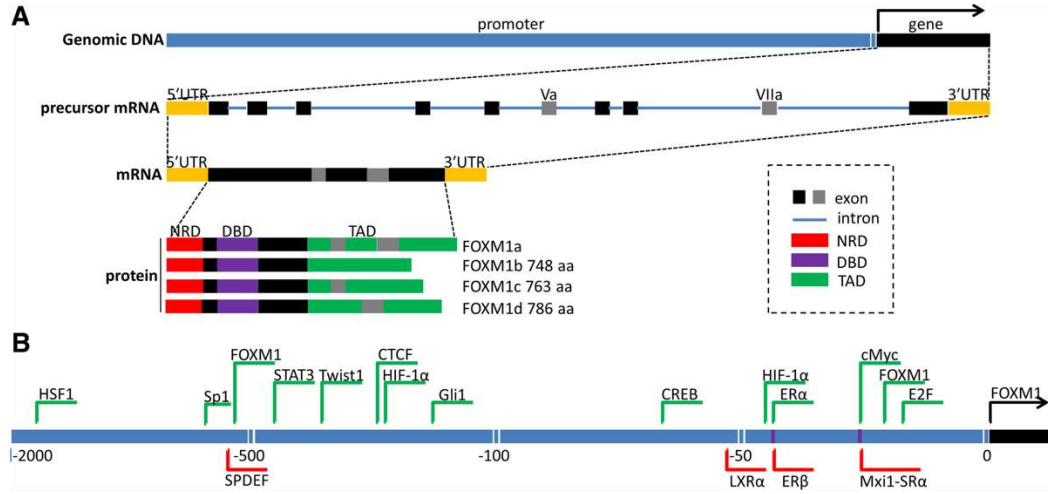
Dahası PD-1 ile ligandı PD-L1 arasındaki etkileşimin aracılık ettiği bu önemli kontrol noktası birçok klinik çalışmanın merkezinde yer almaktadır (James ve ark. 2013). PD-L1'i eksprese eden kanserlerde PD-L1 blokajı, anti-tümör immün yanıtları indüklemeye ve kişiye özel terapi planlamasında önemli bir rol oynamakta, böylece birçok katı tümörün tedavi şeklini değiştirmektedir (Drake ve ark. 2014; Sun ve ark. 2016). Tümör hücrelerinde PD-L1 pozitifliği prognozla ilişkili olduğundan PD-L1, TNBC için etkin immünoterapötik ajanların işaretleyicisi olarak potansiyel sunmaktadır (Dua ve Tan 2017; Mittendorf ve ark. 2014; Sun ve ark. 2016). Bu doğrultuda birçok tümörde pre-klinik ve klinik çalışmalarda BMS-936559 ve MPDL3280A gibi anti-PD-L1 antikorumları ile PD-L1 hedefli tedaviler araştırılmış, elde edilen sonuçlar doğrultusunda 28-8 klonu, 22C3 klonu, klon SP142 ve klon E1L3N gibi çoklu monoklonal PD-L1 antikorumları ticari olarak geliştirilmiştir (Sun ve ark. 2016).

4.5 FOXM1 SİNYAL YOLAĞI

4.5.1 Tanım ve Genel Bilgi

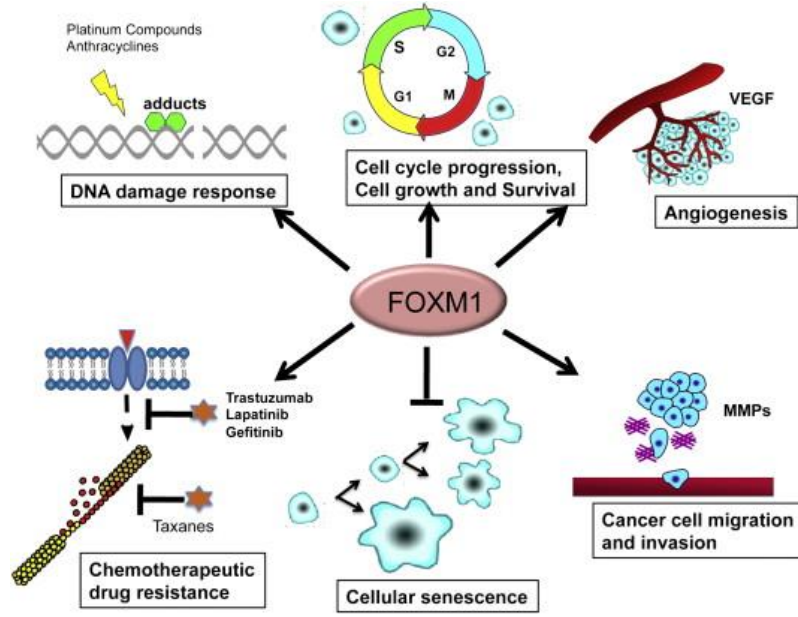
Memeli transkripsiyon faktörü Forkhead Box M1 (FOXM1), 100 amino asit uzunluğunda kanatlı sarmal DNA bağlanma alanını paylaşan Forkhead ailesi proteinlerinin üyelerinden biridir (Laoukili ve ark. 2007). FOXM1 transkripsiyon faktörü, esasen hücre proliferasyonu, farklılaşması ve transformasyonunda rol oynayan hücre döngüsü genlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Halasi ve Gartel 2013). Dört FOXM1 izoformu vardır: alternatif birleştirme ile üretilen FOXM1A, B, C ve D proteinleri mevcuttur. FOXM1 geninin ifadesi sırasında genin promotör bölgesine çeşitli moleküller bağlanarak FOXM1 geninin ifadesini

değiştirebilmektedir. (Yeşil: aktivatör, kırmızı: baskılayıcı elemanlar) (Şekil 4.5.1.1) (Liao ve ark. 2018).



Şekil 4.5.1.1: FOXM1 genindeki genomik yapı ve kodlama izoformları ve FOXM1 promotör bölgesindeki transkripsiyon faktörü bağlanma sahaları (Liao ve ark. 2018).

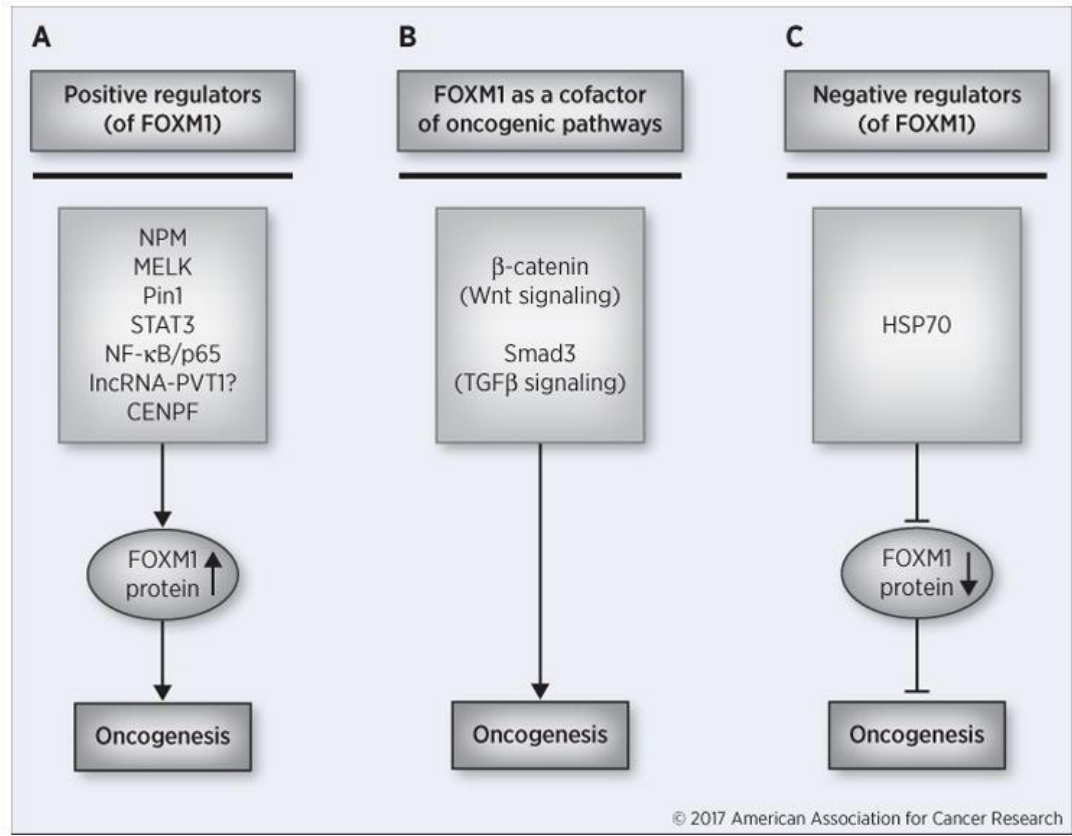
Çoğu insan kanserinde, FOXM1 aşırı eksprese edilir ve bu, kanser hastaları için kötü bir prognoza işaret eder (Liao ve ark. 2018). FOXM1 ayrıca Hanahan ve Weinberg tarafından tanımlanan tüm kanser belirtilerinde rol oynar (Gartel 2017). 2010 yılında Yılın Molekülü olarak adlandırılmıştır (Liao ve ark. 2018). FOXM1A sitoplazmada yerleşen transkripsiyonel bir baskılayıcıdır. FOXM1B'nin insan kanserlerinde diğer izoformların baskın olarak fazla ifade edilmediği durumlarda antikanser ilaçları için çekici bir hedefi olduğuna inanılmaktadır. FOXM1C, bazı tümörlerde aşırı eksprese edilen transkripsiyon aktivatörüdür. FOXM1D ise ağırlıklı olarak sitoplazmada bulunur ve metastazı teşvik edebilir. FOXM1'in onkojenik potansiyelinin, kanser gelişiminin farklı aşamalarında yer alan hedef genleri trans-aktive etme kapasitesi ile belirlendiği varsayılmıştır (Gartel 2017). Kanser biyolojisinde FOXM1'in etkilediği mekanizmalar Şekil 4.5.1.2'de gösterilmektedir (Koo ve ark. 2012).



Şekil 4.5.1.2: Kanser Biyolojisinde FOXM1'in rolleri (Koo ve ark. 2012).

4.5.2 Karsinogenezde FOXM1'in Rolü ve Güncel Çalışmalar

FOXM1'in aşırı ekspresyonu, çok çeşitli kanser türlerinde tespit edilmiştir (Laoukili ve ark. 2007; Halasi ve Gardel 2013; Gartel 2017). Son zamanlarda, FOXM1'in kanserdeki önemli rolünü doğrulayan 18.000 kanser vakası incelenmiş ve sadece 39 insan tümöründe negatif sonuçlar elde edilmiştir (Gentles ve ark. 2015). FOXM1'in onkogenik aktivitesini insan hücrelerinde nasıl uyguladığı ile ilgili birkaç mekanizma üzerinde durulmaktadır. Bir mekanizma, gelişmiş hücre proliferasyonu da dahil olmak üzere birçok öncül tümörjenik etkiye yol açan FOXM1 hedeflerinin transkripsiyonel aktivasyonu ile bağlantılıdır (Halasi ve Gardel 2013). Alternatif olarak ikinci mekanizmada, FOXM1'in diğer proteinlerle etkileşime girerek onkogen olarak işlev gösterdiği ve farklı onkogenik yolları destekleyebildiğidir. Buna örnek olarak, FOXM1 onkogenik WNT ve TGF- β sinyal yollarını indüklemek için beta-katenin veya SMAD3 gibi diğer proteinlerle etkileşime girerek onkogenik bir rol oynayabilmektedir (Şekil 4.5.2.1) (Gartel 2017).

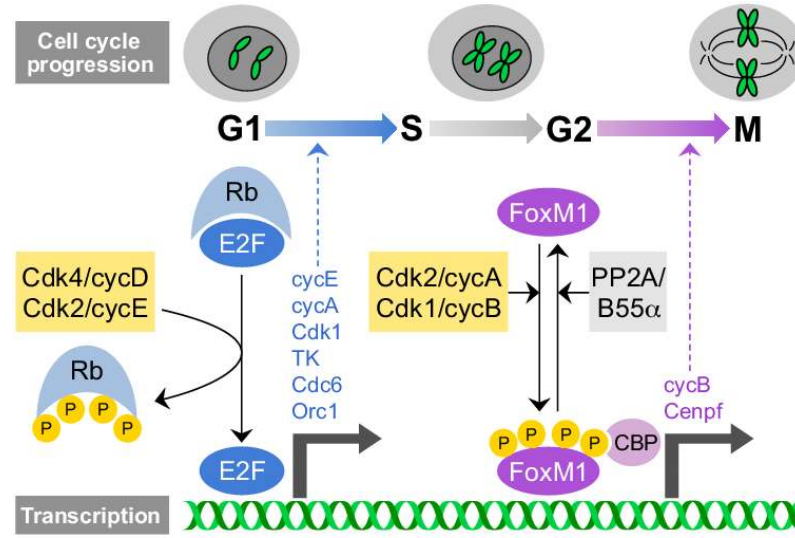


Şekil 4.5.2.1: Kanserde FOXM1 etkileşimlerinin farklı örnekleri (Gartel 2017).

Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda p53 mutasyonu sonrası p53 seviyesinin azalması ile FOXM1 ekspresyonunun ters orantılı olarak arttığını gösterilmiştir (Pandit ve ark. 2009; Barsotti ve Prives 2009). Bu da insan tümörlerinde p53 inaktivasyonunun yaygınlığı dolayısıyla FOXM1'in aşırı ekspresyonunu destekler niteliktedir. Dolayısıyla FOXM1, kanser hücrelerinin genomik instabilitesini ve apoptoza karşı direncini de arttırmaktadır (Halasi ve Gardel 2013). Fonksiyonel olarak FOXM1 eksik serviks kanser hücrelerinde (C33A) yapılan bir çalışmada, FOXM1c'nin zorunlu ekspresyonunun hücre proliferasyonunu ve başlangıç bölgesinden bağımsız büyüme kabiliyetini önemli ölçüde arttırdığı bulunmuştur. Bunun tersine, FOXM1 eksprese eden rahim ağzı kanseri hücreleri (SiHa) üzerinde RNA ile FOXM1'in baskılanmasının ise siklin B1, siklinD1 ve cdc25B'nin azalmasına ve p27Kipl ve p21Cipl'in artmasına sebep olduğu, böylece hücre çoğalmasında ve migrasyonda önemli ölçüde inhibisyona yol açtığı görülmüştür (Chan 2008).

Yapılan başka bir çalışmada ise, Kanser Genom Atlasından alınan meme karsinomu gen ekspresyon verileri kullanılarak, bazal benzeri meme kanseri alt tipinde FOXM1 ekspresyonunun diğer meme kanseri alt tiplerine kıyasla arttığı tespit

edilmiştir. Thiostrepton kullanılarak FOXM1'in baskılanmasının, MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve siklin A2, siklin B2, kontrol noktası kinaz 1, sentrozomal protein 55 ve polo benzeri kinaz 1 dahil olmak üzere hücre döngüsü ile ilişkili genlerin ekspresyonunu inhibe ettiğini belirlenmiştir (Tan ve ark. 2019). Farklı Cdk/siklin komplekslerinin Rb/E2F ve FOXM1 aracılı transkripsiyon ve hücre döngüsü ilerleyişi üzerine etkileri **Şekil 4.5.2.2**'de gösterilmektedir (Lim ve Kaldis 2013).



Şekil 4.5.2.2: Farklı Cdk/siklin kompleksleri, Rb/E2F ve FOXM1 aracılı transkripsiyon ve hücre döngüsü ilerleyişi (Lim ve Kaldis 2013).

Tüm bu veriler ışığında, RNA etkileşimi ile tümör hücrelerinde FOXM1'in baskılanması ile tümör hücrelerinde hücre proliferasyonunun, metastazın, invazyonun ve anjiyogenezin önüne geçilebileceğine inanılmaktadır (Gartel 2017).

4.6 MİKRORNA'LAR

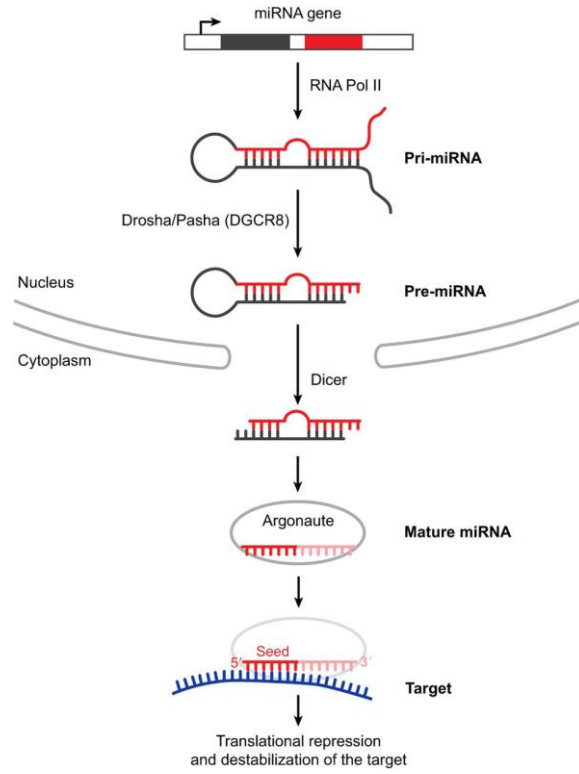
4.6.1. Mikrorna'ların Oluşumu ve İşlevleri

İlk mikroRNA olarak kabul edilen lin-4, 1993 yılında Ambros ve Ruvkun ve arkadaşları tarafından *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilmiştir. (Lee ve Ambros 2001; Wightman ve ark. 1993) Devam eden çalışmalarda miRNA'ların tüm hayvan modeli sistemlerinde tespiti yapılmış, bazı miRNA'ların türler arasında yüksek oranda

korunduğu bulunmuştur (Davis-Dusenbery ve Hata 2010; Friedländer ve ark. 2014; Li ve ark. 2010; Pasquinelli ve ark. 2000).

miRNA'lar, mRNA'ların stabilitesini ve translasyonunu etkileyerek çok hücreli organizmalarda gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel seviyede regüle eden 18-25 nükleotid uzunluğunda, güçlü sekonder yapı motifleri içeren tek iplikli kodlanmayan RNA transkriptleridir (Uwatoko ve ark. 2019).

Genel miRNA biyogenezi ve efektör yolları **Şekil 4.6.1.1**'de gösterilmektedir (Alberti ve Cochella 2017). miRNA biyogenezi, RNA polimeraz II/III transkriptlerinin post-transkripsiyonel veya ko-transkripsiyonel olarak işlenmesiyle başlamaktadır (Ha ve Kim 2014). Genel olarak protein kodlayan veya kodlamayan uç bölgesi poliadenilatlanmış birincil transkriptlerin (pri-miRNA'lar) parçası olarak RNA polimeraz II tarafından kopyalanır. Birincil transkript, yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda stem loop öncüsü miRNA (pre-miRNA) üretmek için Drosha ribonükleaz III enzimi tarafından parçalanır ve bu da sonra olgun miRNA ve antisens miRNA ürünlerini üretmek için sitoplazmik Dicer ribonükleaz tarafından daha da kesilir. Daha sonra oluşan bu olgun miRNA, miRNA ile baz eşleştirmesi yoluyla hedef mRNA'ları tanıyan ve en yaygın olarak hedef mRNA'nın translasyonel inhibisyona veya yıkımına sebep olan, RNA ile indüklenen bir susturma kompleksine (RISC) dahil edilir (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR3977>, Erişim; 26.01.2020)



Şekil 4.6.1.1: miRNA biyogenezi ve efektör yollarına genel bakış (Alberti ve Cochella 2017).

Hali hazırda tanımlanmış tüm miRNA'ların yaklaşık yarısı intrageniktir (aynı gen üzerinde) ve çoğunlukla intronlardan ve nispeten az sayıda protein kodlayan gen ekzonundan işlenirken, diğerleri intergeniktir (kromozom üzerinde başka gende), bir host geninden bağımsız olarak kopyalanır ve kendi promotörleri tarafından düzenlenirler (De Rie ve ark. 2017; Kim ve Kim 2007).

Hücre proliferasyonu, hücre ölümü, yağ metabolizması, nöronal modelleme, hematopoetik farklılaşma ve bağışıklık sistemi gelişiminin kontrolü gibi çeşitli işlemlerde işlevleri olan bir dizi miRNA bilinmektedir (He ve Hannon 2004). miRNA'lar tarafından düzenlenen genleri bulmak için hesaplama teknikleri ve biyoinformatik algoritmalar toplam miRNA sisteminin çok azını temsil etmektedir. miRNA'ların, memelilerdeki belirli süreçlerin düzenlenmesinde kilit rolleri bulunmaktadır (Vasudevan 2012, Makarova ve ark. 2017).

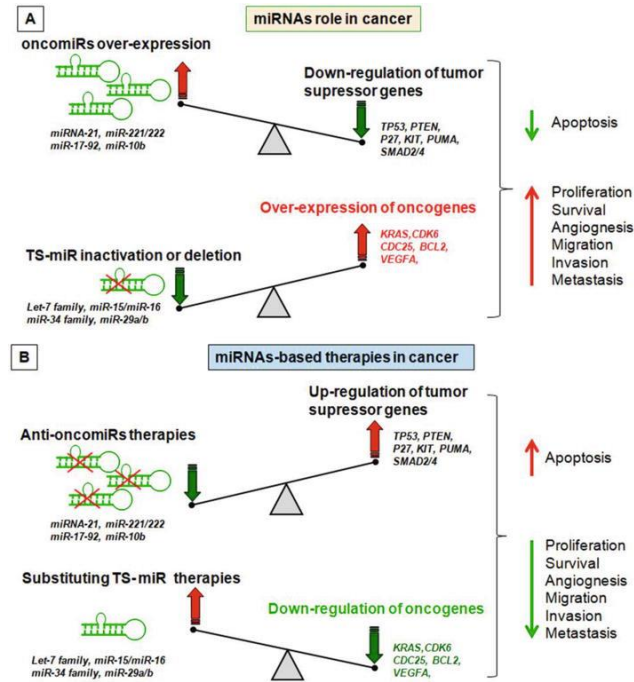
miRNA'lar, hedef genlerin sentezlenmesini, hedef mRNA'ların genellikle 3'-UTR bölgelerinde bulunan ve çevirinin inhibisyonu ve/veya mRNA parçalanması ile sonuçlanan tamamlayıcı sekanslarla etkileşim kurarak post-transkripsiyonel seviyede düzenlerler (Bartel 2004; Chen ve ark. 2013). Çoğu durumda, miRNA'lar ekspresyonu

baskılamak için hedef mRNA'ların 3'-UTR'si ile etkileşime girerler (Ha ve Kim 2014; Zhou ve ark. 2017). Bununla birlikte, miRNA'ların 5'-UTR, kodlama dizisi ve gen promotörleri dahil diğer bölgelerle etkileşimi de rapor edilmiştir (Broughton ve ark. 2016). Ayrıca, miRNA'ların belirli koşullar altında gen ekspresyonunu aktive ettiği gösterilmiştir (Vasudevan 2012). Son dönemlerde yapılan çalışmalar, miRNA'ların, transkripsiyon oranını ve hatta transkripsiyonu kontrol etmek için farklı alt hücre kompartmanları arasında gidip-geldiğini göstermiştir (Makarova ve ark. 2017).

4.6.2. Kanser Tedavisinde Mikrorna'ların Kullanımı

miRNA'lar, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalıkta ve aynı zamanda insan kanserlerinin patogenezinde ve klinik uygulamalarda terapötik olarak hayati bir rol oynarlar (Chen ve ark. 2013; Ferlay ve ark. 2013; Zhang ve ark. 2007). miRNA'lar, çok çeşitli insan kanserlerini belirli işaretlerle sınıflandırmak ve insan kanserlerinin moleküler yapısını tanımlamak için kullanılabilir (Calin ve Croce 2006; Volinia ve ark. 2006; Zhang ve ark. 2007).

Çeşitli kanserlerde anormal şekilde eksprese edildiğinde çeşitli onkojenik veya tümör baskılayıcı miRNA'lar tümör oluşumunun ve büyümesinin düzenleyici olarak görev alabilirler. miRNA'ların kanserdeki rolü ve kanserde miRNA tabanlı tedaviler ile ilgili genel bir şema Şekil 4.6.2.1'de gösterilmektedir (Balacescu ve ark. 2018).



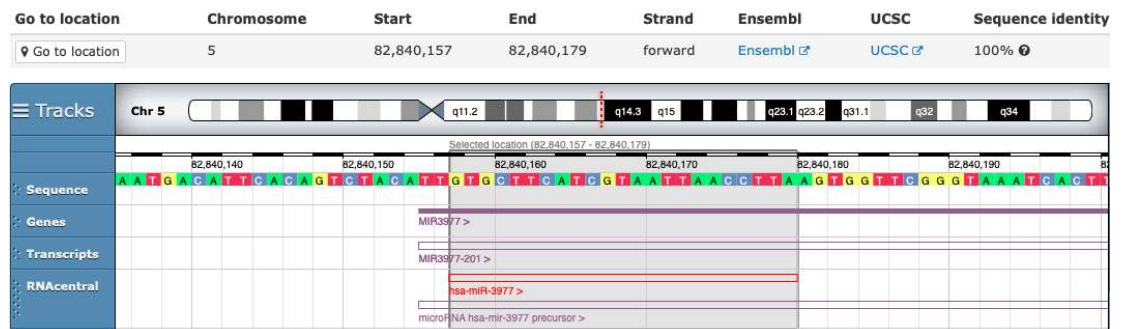
Şekil 4.6.2.1: miRNA'ların kanserdeki rolü ve kanserde miRNA tabanlı tedaviler (Balacescu ve ark. 2018).

miRNA-21, miRNA-17-92, miRNA-155 ve miRNA-372 dahil olmak üzere onkojenik miRNA'lar kanser dokularında aşırı eksprese edilirken, miRNA-34 ve miRNA-15a ve miRNA-16 gibi Let-7 aile üyeleri tümör baskılayıcı olarak düşünülür ve kanser dokularında ekspresyonları genellikle azdır (Esquela-Kerscher ve Slack 2006).

Yıllar süren çalışmalar sonucunda artan kanıtlar, miRNA'ların meme kanseri progresyonu, invazyonu, anjiyogenezi ve metastazında önemli roller oynadığını göstermiştir (Ames ve ark. 2009). Görünüşe göre, bazı miRNA'lar fonksiyonel olarak Src ve MAPK gibi birkaç önemli hücre çoğalma yolunda yer almaktadırlar ve meme kanseri hücrelerinde bu miRNA'ların anormal ekspresyonu, tümör inhibörlerinden saklanmada ve proliferatif sinyali sürdürmede etkili olmaktadır (Hwang ve ark. 2013; Tanic ve ark. 2012). Bu veriler sonucunda TNBC'nin genetik yapısının incelenmesinde kullanılabilecek mikroRNA'lar gibi kodlamayan RNA'ların, hücre döngüsü düzenlemesi, farklılaşma, metabolizma ve yaşlanma da dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde gen ifadesinin yeni düzenleyicileri olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Ames ve ark. 2009).

4.6.3 hsa-miR-3977 Ailesi

5q14.2 kromozomu üzerinde yer alan (Şekil 4.6.3.1) ve post-translasyonel seviyede düzenlenmeyen hsa-miR-3977 (MIMAT0019362) tek iplikli RNA transkripti insana özgü bir dizilime sahiptir (<https://rnacentral.org/rna/URS000075BDA6/9606>, Erişim:01.01.2020). 23 nükleotid uzunluğundaki olgun miR-3977'nin nükleotid sekansı: “gugcuucaucguaauuaccuua” şeklindedir (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR3977>, Erişim; 26.01.2020).



Şekil 4.6.3.1: Prekürsör ve olgun hsa-miR-3977'nin genom konumu (<https://rnacentral.org/rna/URS000075BDA6/9606>, Erişim:01.01.2020).

hsa-miR-3977, AKT/PKB ve MEK/MAPK gibi bazı önemli sinyal yollarını hedefleyerek kanser hücrelerinin invazyonunu ve metastazını önemli ölçüde etkileyen bir molekül olduğuna inanılmaktadır (http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_72/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir_sc=&mir_c=&mir_nc=&mir_vnc=&mirg=miR-3977, Erişim: 16.01.2020). Bu proteinlerin ekspresyon seviyeleri, birçok kanser türünde kötü prognosisla ilişkilidir (Steelman ve ark. 2011). Dolayısıyla bu çalışmada miR-3977 seviyesinin TNBC’de incelenmesi ve miR-3977’nin tümörojenez ile yakın ilişkisi ile potansiyel prognostik belirteç veya terapötik hedef olarak çalışılması amaçlanmıştır.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı (2017 II. Dönem) ile desteklenerek Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu'nun 16/10/2019 tarih ve 20.478.486 karar numaralı onayı ile 2. Tez Danışmanı Doç. Dr. Bülent ÖZPOLAT gözetiminde Texas Üniversitesi, MD Anderson Kanseri Merkezi, Deneysel Tedaviler Departmanı'nda (Houston, Texas, ABD) gerçekleştirilmiştir.

5.1. HÜCRE HATLARI VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

Kanser hücrelerinde moleküler çalışmaların gerçekleştirilmesini amaçlayan projemizde ilk basamak olarak, belirlenen hücre hatlarının uygun hücre kültür ortamı ve koşullarında üretilmesi gerçekleştirilmiştir. Yapılan literatür taramasına ve Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den alınan referanslara dayanarak, projemizde üçlü negatif meme kanseri hücre modeli olarak MDA-MB-436, MDA-MB-231, BT-20 insan üçlü negatif meme kanseri hücre hatları kullanılmıştır. MDA-MB-436, MDA-MB-231, BT-20 hücre hatlarının hiçbirisi ER, PR ve HER2 yüzey reseptörlerini eksprese etmemektedir. MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 hücre hatları plevral effüzyon metastatik meme bezi kaynaklı kötü diferansiye hücrelerdir ve MDA-MB-231 hücre hattı p53 ve KRAS mutasyonuna, MDA-MB-436 hücre hattı ise BRCA1 ve RB1 mutasyonuna sahiptir. BT-20 hücre hattı ise birincil meme kaynaklı kötü diferansiye hücrelerdir ve p53 ile PIK3 gen mutasyonlarına sahiptir. Bu üç hücre hattı üçlü negatif meme kanseri modelinde genellikle kullanılan, morfolojik ve genetik karakteristikleri iyi çalışılmış hücreler olmaları sebebi ile seçilmişlerdir.

Bu hücre hatlarından MDA-MB-436 ve MDA-MB-231, Texas Üniversitesi MD Anderson Kanseri Merkezi Hücre Hattı Merkezi, ABD'den, BT-20 (HTB-19) Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC), ABD'den ticari olarak temin edilmiştir. Tüm üçlü negatif meme kanseri hücre hatları %10 Fetal Bovin Serum (FBS) (35016CV, Corning, ABD) ve 100 IU/ml Penisilin/Streptomisin (30002CL, Corning,

ABD) içeren Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12) (10090CV, Corning, ABD) besi ortamı içerisinde 37°C sıcaklık, %95 nem ve %5CO₂ koşullarını sağlayan inkübatör (3010, Thermo Scientific, ABD) ile çoğaltılmışlardır.

Doğal öldürücü hücre (Natural Killer Cell) tabanlı immünoterapi çalışmaları için ise, insan NK hücrelerinin fonksiyonunu incelemek için uygun bir model olan NK-92 (CRL-2407) doğal öldürücü hücre hattı Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den ticari olarak temin edilerek kullanılmıştır. NK-92 hücreleri %12.5 FBS (35016CV, Corning, ABD), %12.5 Horse Serum (16050122, ThermoFisher, ABD), 1.5 µg/ml sodyum bikarbonat (S5761, Sigma-Aldrich, Almanya), 0.1 mM 2-merkaptoetanol (21985-023, Gibco, ABD), 0.02 mM folik asit (F-8758, Sigma-Aldrich, Almanya), 0.2 mM myo-inositol (I-7508, Sigma-Aldrich, Almanya) ve 100 IU/ml rekombinant insan (rh) IL-2 (200-02, Peprotech, ABD) içeren Alpha MEM (12000-063, ThermoFisher, ABD) besi ortamında 37°C sıcaklık, %95 nem ve %5CO₂ koşullarını sağlayan inkübatör (3010, Thermo Scientific, ABD) ile çoğaltılmışlardır. Ayrıca deneylerde kullanılan kordon kanından elde edilmiş doğal öldürücü hücreler (CBNK) Teksas Üniversitesi MD Anderson Kanser Merkezi Kök Hücre Nakli ve Hücresel Terapi Anabilim Dalı, ABD'den temin edilmiştir.

5.2. MİRNA VE SİRNA TRANSFEKSİYON DENEYİ

Hücreler, 6 kuyucuklu steril hücre kültürü plakalarına (1×10^5 hücre/kuyucuk) ekildikten 24 saat sonra, 100 uM siRNA-FOXM1 (SASI-Hs01-00243985, Sigma-Aldrich, Almanya), siRNA-eEF2K (WD07813156, Sigma-Aldrich, Almanya), siRNA-PD-L1 (SASI_Hs01_00010201, Sigma-Aldrich, Almanya) ve 100 uM negatif kontrol siRNA (WDO7813160, Sigma-Aldrich, Almanya), 100 uM miR-3977-mimik (339174, Qiagen, Hollanda, ABD) ve 100 uM negatif kontrol miRNA mimik (4464059, Ambion-ThermoFisher, ABD) , HiPerfect (301705, Qiagen, Hollanda, ABD) transfeksiyon ajanı ile (9 ul/kuyucuk) FBS ve penisilin/streptomisin içermeyen DMEM/F12 besiyeri içerisinde oda sıcaklığında 20 dakika karıştıma bırakılmış ardından hücreler transfekte edilmiştir. 6 saatlik inkübasyondan sonra, transfeksiyon besiyeri normal besi yeri ile değiştirilmiştir. Hücreler 72 veya 96 saat inkübe edilmiş ve Western Blot, RT-qPCR, RPPA analizleri için toplanmışlardır.

5.3. MİGRASYON ANALİZİ

Hücre hareketliliği ve göçü (migrasyon) kapasitesindeki değişimi ölçebilmek için *in-vitro* yara iyileşmesi deneyi kurgulanmıştır. Bunun için 6-kuyucuklu steril hücre kültürü plaklarına ekilen hücrelerin (7×10^4 hücre/kuyucuk) siRNA ve miRNA'lar ile transfeksiyonunun tamamlanmasının ardından hücrelerin kapladığı flask tabanı 200 μ l'lik steril pipet ucu ile düz bir çizgi halinde boydan boya çizilmiştir (0. saat). Ardından yüzen hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için besiyeri bir kez değiştirilmiş ve hücreler 37°C sıcaklık, %95 nem ve %5CO₂ koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol uygulamasındaki kapanma miktarı dikkate alınarak 0. ve 36. saatlerinde çizilen alanların fotoğrafı Faz-Kontrast Mikroskobu (Nikon Eclipse TE-200-U, Japonya) kullanılarak çekilmiştir. Migrasyon miktarı, belirlenen zaman sürecinde (0. ve 36. saatler) oluşan ilerlemenin, ilk yara genişliği ile farkının ImageJ yazılımı (NIH, Bethesda, ABD) ile ölçülmesiyle hesaplanmıştır. Her deney için en az 5 rastgele örtüşmeyen fotoğraf çekilmiş ve deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

5.4. İNVAZYON ANALİZİ

İnvazyon analizi matrijel (0,7 mg/mL; 356234, BD Biosciences, ABD) ile kaplanmış geçirgen membranlı transwell insert sistemi (8 μ m por boyutlu; 353097, Fisher Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 6-kuyucuklu steril hücre kültürü plaklarına ekilen hücrelerin (7×10^4 hücre/kuyucuk) siRNA ve miRNA'lar ile 72 saatlik transfeksiyonunun tamamlanmasının ardından hücreler toplanarak transwell sistemindeki üst kuyucuklara serum içermeyen besiyerinde (8×10^4 hücre/100 μ l) ekilmiş, alt bölgeye de %10 FBS içeren ortam konulmuş ve hücreler 37°C sıcaklık, %95 nem ve %5CO₂ koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatin sonunda invaze olarak alt tarafa geçen hücreler fikse edilerek Hema3 Boyama Kiti (22-122911, Fisher Scientific, ABD) ile boyanmıştır. Altta kalıp invaze olmayan hücreler pamuklu çubuk yardımıyla silinerek uzaklaştırılmışlardır. İnvaze olan hücreler ışık mikroskobu kullanılarak en az 5 farklı alanda sayım gerçekleştirilmiştir. Her bir hücre grubundaki invazyon özellikleri muamele yapılmamış kontrol hücrelerine oranlanarak belirlenmiş ve transfeksiyonlara göre değerlendirilmiştir.

Görüntüler ImageJ yazılımı (NIH, Bethesda, ABD) kullanılarak test edilmiş ve ölçülmüştür. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

5.5. TÜMÖR OLUŞTURMA KABİLİYETİ ANALİZİ

Tümör oluşumu üzerine mikroRNA ve siRNA'lerin etkisini belirlemek için klonojenik analiz yapılmıştır. Hücrelerin 6-kuyucuklu steril hücre kültürü plaklarına tek tek düşmelerini sağlamak için iyice süspansiyonu ve ardından ekimi (1×10^3 hücre/kuyucuk) yapılmıştır. Hücreler ekildikten 24 saat sonra 50 uM siRNA ve miRNA'ler ile 6 saat transfeksiyona bırakılmıştır. Ardından transfeksiyon besiyeri %10 FBS içeren ortam ile değiştirilmiş ve hücreler koloni oluşturmaları için 10-14 gün boyunca 37°C sıcaklık, %95 nem ve %5CO₂ koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan koloniler %10'luk kristal violet ile boyanıp en az 50 hücre içeren tümör küreleri ImageJ yazılımı (NIH, Bethesda, ABD) kullanarak sayılmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

5.6. PROTEİN EKSTRAKSİYONU VE İMMUNOBLOTLAMA (WESTERN BLOTTİNG) ANALİZİ

miRNA ve siRNA'ler ile transfeksiyonu gerçekleştirilmiş hücreler 6 kuyucuklu steril hücre kültürü plakalarından tripsin kullanılarak toplanmıştır. Ardından hücreler 4°C'de 5 dakika $1.100 \times g$ 'de santrifüjlenmiş ve bir kez 4°C'de PBS ile yıkaması yapılmıştır. 4°C'de tutulan pelletler üzerine %1 proteaz inhibitör kokteyli (P8340, Sigma Aldrich Biotechnology, ABD), %1 fosfataz inhibitör kokteyli (P2850, Sigma Aldrich Biotechnology, ABD) ve % 0,4 sodyum florür eklenen ripa tamponu (89900, Thermo Scientific, ABD) ilave edilmiş ve hücreler buz üzerinde 45 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre içerisinde her 5 dakikada bir vortekslenerek homojenite sağlanmıştır. İnkübasyonun sonrası örnekler 4°C'de 10 dakika $12.000 \times g$ 'de santrifüjlenmiş ve üstteki süpernatant başka bir tüpe alınarak örneklerden protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen protein lizatlarındaki toplam protein konsantrasyonu her örnek için BCA protein ölçüm kiti (23225, Thermo Scientific, ABD) kullanılarak 570nm dalga boyunda ölçülmüştür. Hesaplamaların ardından 50ug/20ul protein miktarına sahip örnekler, laemmli-SDS tamponu (BP-111NR,

BioPlus, ABD) ile karıştırılarak 100°C’de 5 dakika denatüre edilmiştir. Örnekler soğumalarının ardından %10’luk hazır poliakrilamid jelde (4561033, Bio-Rad, ABD) 50V’ta 180 dk. yürütölmüşlerdir. Ardından metanol ile 1 dakika aktive edilmiş PVDF (polivinilden florit) (IPVH00010, Merck-Millipore, Almanya) membranlar kullanarak proteinlerin jellerden membranlara transferi 4°C’de 23V’luk güçte 20 saat boyunca sağlanmıştır. Membranlar sonra 10 dakika boyunca TBS-T (% 2 Triton X-100 içeren Tris tampon salin) ile yıkanmış ve %5’lik süt tozu (1706404, Bio-Rad Laboratories, ABD) ile hazırlanan bloklama çözeltisi ile 1 saat inkübe edilmiş ve primer antikor ile gece boyunca muameleye bırakılmıştır. Daha sonra 3 kez 10’ar dakika TBS-T ile yıkaması yapılmış membranlar HRP (horseradish peroksidaz enzimi) bağılı ikincil antikorla oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiş ve protein seviyelerini oluşturan bantlar kemilüminesan belirleme kiti (NEL103001EA, Pelkin Elmer, ABD) kullanarak Alpha Innotech Imager HP System’de (ProteinSimple, ABD) görüntölenmişlerdir. Bant yoğunlukları AlphaImager yazılımı ile nicelleştirilmiştir.

Tablo 5.6.1: Immunoblotlamada kullanılan birincil ve ikincil antikorların listesi.

Antikor	Katalog Numarası / Üretici Firma	Kullanılan Konsantrasyon
EF2K	3692, Cell Signal, ABD	1:1000
p-EF2	2331S, Cell Signal, ABD	1:1000
EF2	2332S, Cell Signal, ABD	1:1000
FOXMI	Sc-271746, Santa Cruz, ABD	1:200
PD-L1	ab210931Abcam, ABD	1:1000
GAPDH	5174S, Cell Signal, ABD	1:1000
p-SRC	2101S, Cell Signal, ABD	1:1000
SRC	2108S, Cell Signal, ABD	1:1000
p-FAK	MAB4528, R&D Systems, ABD	1:1000
FAK	AF4467, R&D Systems, ABD	1:1000
Cyclin D1	2922S, Cell Signal, ABD	1:1000
Caspase 9	9502S, Cell Signal, ABD	1:1000
B-ACTIN	58169S, Cell Signal, ABD	1:10000
IgG-HRP	7074S, Cell Signal, ABD	1:2000
IgG-HRP	7076S, Cell Signal, ABD	1:2000

5.7. RNA İZOLASYONU VE RT-qPCR ANALİZİ

Örneklerde miRNA ve siRNA uygulamalarının target genler üzerindeki etkisinin mRNA seviyesinde ölçülmesi için RT-qPCR yöntemi kullanılmıştır. Buz üzerine alınan 6 kuyucuklu steril hücre kültürü plakalarında bulunan örnekler TRIzol RNA izolasyon reaktifi (1000 ul/kuyucuk) (15596026, Thermo Scientific, ABD) ile 10 dakika inkübasyonun ardından ependorf tüplerine alınmıştır. Daha sonra her örnek üzerine 200 ul kloroform eklenmiş ve 3'er dakika inkübasyonun ardından 6500×rpm'de, 15 dakika boyunca santrifüj edilmişlerdir. Elde edilen kırmızı renkli fenol-kloroform, interfaz ve renksiz üst fazlarından renksiz faz alınarak yeni bir tüplere aktarılmıştır. Yeni tüpler üzerine 500 ul 2-izopropanol ilave edilmiş ve 10 dakika inkübasyon sonrası 6500×rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek total RNA'nın tüpün dibinde beyaz çökmesi sağlanmıştır. Total RNA örnekleri 1 ml %75 etanol ile yıkanmıştır. Örneklerin hava ile kurutulmasının ardından 40 ul nükleaz içermeyen su içerisinde çözülmesi ve 55°C'de 15 dakika inkübasyon sonrası Nanodrop cihazı (Thermo Scientific, ABD) ile izolasyon kalitesi ve RNA miktarı ölçülmüştür. Örnekler kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

Örneklerdeki miRNA ekspresyon seviyelerini ölçmek için qScript mikroRNA cDNA Sentez Kiti (95107, Quanta Biosciences, ABD) kullanılarak 42°C'de 60 dakika, 70°C'de 5 dakika tutularak tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezlenmiştir. Gerçek zamanlı qPCR yöntemi ile miR-3977 primer seviyesi (Sigma-Aldrich, Almanya) BX-384 RT-PCR tespit cihazında (Bio-Rad, ABD) ölçülmüş ve endojen kontrol olarak da U6 küçük nükleer RNA (RNU6) (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. Hedef genlerin mRNA seviyelerinin tespiti için ise RNA'dan cDNA Sentez Kiti (95047, Quanta Biosciences, ABD) kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. qRT-PCR, Sso Advanced Universal SYBR-Green SuperMix (Bio-Rad, ABD) kullanılarak BX-384 RT-PCR tespit cihazında (Bio-Rad, ABD) yapılmıştır. Reaksiyonlar üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Hedef genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) internal kontrol kullanılarak normalleştirilmiştir. Sens (Forward) ve anti-sens (Reverse) primerlerinin sekansları eEF2K, PD-L1 ve FOXM1 için sırasıyla 5'-GGA GAG AGT CGA AGG TCA CG-3' / 5'-GCA ATC AGC CAA GAC CAT CT-3'; 5'-CAG GGC ATT CCA GAA AGA TGA GGA T-3' / 5'-TTA

CGT CTC CTC CAA ATG TGT ATC-3' ve 5'-GGA GGA AAT GCC ACA CTT AGC G-3' / 5'-TAG GAC TTC TTG GGT CTT GGG GTG-3' ile GAPDH primer dizileri ise sırasıyla 5'-CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG-3' / 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-3' dir. Bu sekanslar GenBank'dan teyit edilmiştir. İfadedeki göreceli farklılıklar, karşılaştırmalı eşik çevrim ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) yöntemi kullanılarak belirlenmiş, EEF-2K ve PD-L1 ve FOXM1 gen ifadeleri GAPDH transkripti ile normalize edilerek değerlendirilmiştir.

5.8. FLOW SİTOMETRİ ANALİZİ

miRNA ve siRNA'lar ile transfekte edilen hücreler apoptoz saptama kiti (BDB556547, BD Biosciences, ABD) kullanılarak üreticinin protokolüne göre FITC-AnnexinV ve PI boyaması ile MD Anderson Kanser Merkezi Akış Sitometrisi ve Hücresel Görüntüleme Analizi Merkezi'nde bulunan FACS Calibur akış sitometresi (BD Biosciences, ABD) cihazı ile analiz edilmiştir. Apoptotik hücrelerin sayısını saptamak için CellQuest Pro yazılımı (BD Biosciences, ABD) kullanılmıştır. Hücre siklusu testi Propidium Iodide boyama ile değerlendirilmiştir. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

5.9. TÜMÖR HÜCRELERİ İLE NK HÜCRELERİNİN KO-KÜLTÜRÜ

Tümör hücreleri, 96 kuyucuklu steril hücre kültürü plakalarına (1×10^4 hücre/kuyucuk) ekildikten 24 saat sonra, farklı dilüsyonlardaki Tümör Hücresi:Doğal Öldürücü Hücre oranları (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 oranları LDH sitotoksosite analizi için, 1:1, 1:5, 1:10, 1:20 oranları Cr^{51} Hücre canlılığı analiz testi için kullanılmıştır) NK hücreleri ile farklı sürelerde (6 ve 12 saat) inkübasyona bırakılarak optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ko-kültür çalışmalarında kullanılan dilüsyon miktarlarına uygun oranda besiyeri kullanılmıştır. Oluşan değişiklikler mikrosobi ve Cr^{51} yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

5.10. CR⁵¹ (KROMİYUM⁵¹) HÜCRE CANLILIĞI ANALİZİ

Cr⁵¹ analizi çalışmaları Teksas Üniversitesi MD Anderson Kanseri Merkezi Kök Hücre Nakli ve Hücre Terapi Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Toplam ekimi yapılacak tümör hücreleri 1000 ul içerisinde 100 ul Cr⁵¹ radyoaktif ajanı ile 2 saat normal inkübasyon koşullarında muamele edilmiştir. İnkübasyonun ardından 2 defa 400×g'de 5 dakika PBS ile yıkanan hücreler kuyucuk başına 50 ul içerisinde (2.5×10³ hücre/kuyucuk) 96 kuyucuklu steril hücre kültürü plakalarına ekilmiş ve üzerlerine dilusyona uygun miktarlarda hazırlanan NK hücreleri kuyucuk başına 50 ul içerisinde eklenerek 6 saat normal büyüme ortamında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 96 kuyucuklu kültür plakaları 400×g'de 5 dakika santrifüjlenerek süpernatanttan 50 ul alınmış ve yeni 96 kuyucuklu plakalara aktararak gece boyu oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Buharlaştan süpernatant sonrası kuyucuklarda kalan Cr⁵¹ miktarları plaka okuyucu ile ölçülmüştür. Elde edilen değerler ile yüzde sitotoksitesite aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmıştır. Sonuçların kantitatif değerlendirilmesi yapılırken bütün örneklerden arka plan değeri çıkartılmış, örneklerdeki ölüm oranı hücre parçalama solüsyonu (SDS) ile hücrelerin %100'ünün öldüğü kontrol grubuna göre normalleştirilerek bulunmuştur. Reaksiyonlar üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{(\text{Test Örneği} - \text{Arka Plan Değeri})}{(\text{Kontrol Grubu} - \text{Arka Plan Değeri})} \times 100$$

5.11. MİRNA NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMA ÇALIŞMALARI

Ortotopik Ksenograft Tümör Modeli Çalışmalarında Albumin-Serisin (2:1 w/w) Nanopartikülü kullanılmıştır. 0.027 gr HSA (İnsan Serum Albümini) (A-9511, Sigma-Aldrich, Almanya) ve 0.013 gr Serisin (Hacettepe Üniversitesi Biyokimya AB, Türkiye) molekülleri 1'er ml di-iyonize su içerisinde çözülmüştür. Ardından iki solüsyon 5 dakika boyunca karıştırılmış, üzerine renk bulanıklaşmaya kadar damla damla desolvasyon ajanı %100 etanol (2ml) ve çapraz bağlayıcı %8'lik Gluteraldehit solüsyonu (G5882-25ul, Sigma-Aldrich, Almanya) eklenerek ve 2 saat boyunca

rotatörde sabit bir hızda mini santrifüj tüplerinde inkübasyona bırakılmıştır. Negatif yüke sahip olan miRNA'ların, negatif yüklü protein nanopartiküllere daha yüksek verimde bağlanabilmesi için partikül yüzeylerinin modifiye edilmesi için katyonik yüklü bir polimer olan Poli-L-lisin (PLL) (P4707, Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. Bunun için ayrı bir yerde toplam hacim 500 µl olacak şekilde %0.1'lik PLL solüsyonu ile miRNA (8ug/fare) oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. 2 saatin tamamlanmasından sonra PLL ile inkübe edilen miRNA solüsyonları manyetik karıştırıcıda 250×rpm'de karışmakta olan partikül süspansiyonunun içerisine damla damla eklenmiş, üzeri delinmiş alimünyum folya ile kapatılan mini santrifüj tüpleri gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Farelere yüklemeyen önce solusyonlar ependorflara alınarak 12000×rpm'de 10 dakika santrifujlenmiş, 1 kez de RNAase free su ile yıkaması yapılmıştır. Elde edilen yüklü nanopartikül pelletleri fare başına 200ul olacak şekilde PBS içerisinde çözölmüştür.

5.12. ORTOTOPİK KSENOGREFT TÖMÖR MODELİ ÇALIŞMALARI

Dört haftalık atimik nude dişi fareler MD Anderson Kanser Merkezi Deneysel Radyasyon Onkolojisi Departmanından temin edilmiştir. Tüm çalışmalar MD Anderson Kurumsal Hayvan Bakımı ve Kullanım Komitesi tarafından onaylanmış deney protokolüne göre yürütölmüş ve bir hayvan grubu 5 dişi fareden oluşturulmuştur. TNBC modeli ve kontrol hücreleri, %20 matrigel içinde 2×10^6 hücre olacak şekilde her farenin meme yağ dokusuna enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan yaklaşık iki hafta sonra tümör boyutları 3-5 mm'ye ulaştığında Albümin-Serisin-miRNA Nanopartikül tedavisine başlanmıştır. Tedavi grubundaki her bir fareye, deri altından 4 hafta süreyle haftada bir kez haftada bir kez (0.3 mg/kg eşdeğeri) 8ug/fare oranında miRNA uygulaması (toplam dört intraperitoneal enjeksiyon [ip]) yapılmıştır (Şekil 5.12.1). Son enjeksiyondan 3 gün sonra, fareler CO₂ ile ötenazi edilmiştir. Daha sonra tümör dokuları çıkarılıp, immünblotlama analiz yönteminde çalışılmıştır. miRNA tedavi grubundan elde edilen sonuçlar, kontrol miRNA grubu ile karşılaştırılarak tedavi etkinliği değeriendirilmiştir.



Şekil 5.12.1: Uygulanan Ortotopik Ksenograft Tümör Modeli.

5.13. TÜMÖR BOYUTLARININ ÖLÇÜLMESİ ANALİZİ

Tümör oluşumu belirginleşmeye başladıktan hemen sonra tümör boyutları ölçülerek miR-3977 enjeksiyonuna başlanmıştır. Uygulamanın gerçekleştiği 4 hafta boyunca enjeksiyonlar yapılmadan hemen önce tümörlerin boyutları ölçülerek zamana bağlı olarak gruplar arası tümör büyüme farklılıkları GraphPad Prism (sürüm 8) yazılımı kullanılarak nicelleştirilmiştir.

5.14. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

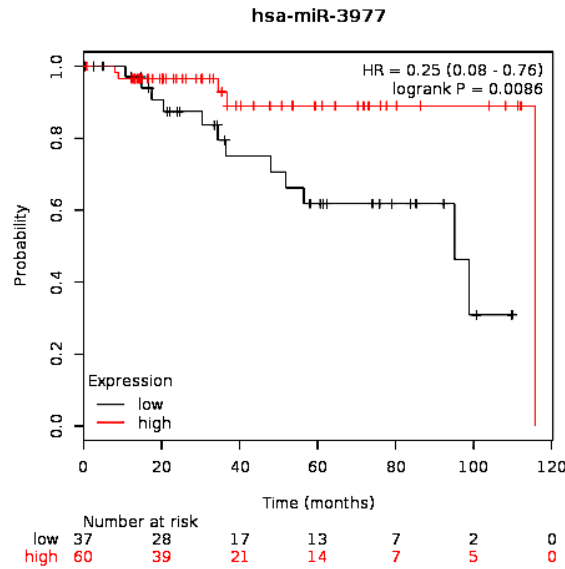
Kontrol ve tedavi gruplarını karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi ile iki grubun karşılaştırılması *Student's t* testi ile ve kategorize değerlerin karşılaştırılması t^2 testi ile analiz edilmiş, p-değerleri <0.05 olanlar anlamlı sayılmıştır. Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapmalar (SD) olarak ifade edilmiştir. Analizler, GraphPad Prism (sürüm 8) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

6.BULGULAR

6.1. hsa-miR-3977 EKSPRESYON SEVİYESİ ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİNDE ANLAMLI DERECEDE DAHA UZUN HASTA SAĞKALIMI İLE İLİŞKİLİDİR.

miR-3977 ekspresyonunun klinik önemini açıklamak için miRpower aracını (<http://kmplot.com/analysis/>) kullanarak TCGA veri tabanından alınan üçlü negatif meme kanserinde hasta kümesini analiz ettik. Toplam hayatta kalma oranı, yüksek miR-3977 ekspresyonu olan hastalarda, daha düşük miR-3977 eksprese eden hastalara göre önemli ölçüde daha yüksek bulundu ($n = 97$; $p = 0.0086$; **Tablo 6.1.1**).

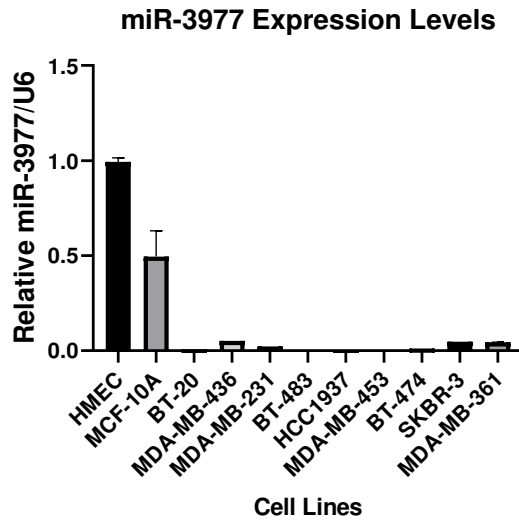
Tablo 6.1.1: Üçlü negatif meme kanseri hastalarında miR-3977 ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi.



6.2. hsa-miR-3977 EKSPRESYON SEVİYESİ ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE NORMAL MEME DOKUSUNA KIYASLA ANLAMLI DERECEDİ DAHA DÜŞÜKTÜR.

miR-3977'nin bazal ekspresyon seviyesini belirlemek için, üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında (MDA-MB-231, MDA-MB-436, BT-20, MDA-MB-453, BT-483 ve HCC1937) ve üçlü negatif meme kanseri grubuna dahil olmayan meme kanseri hücre hatlarında (MDA-MB-361, BT-474 ve SKBR-3), ayrıca kontrol grubu olarak normal insan meme epitel hücre hatlarında (MCF10A ve HMEC) RT-qPCR yapıldı. Sonuçlarımız, bazal miR-3977 ekspresyonunun tüm üçlü negatif meme kanseri ve üçlü negatif meme kanseri olmayan meme kanseri hücre hatlarında normal meme epitel hücrelerine kıyasla anlamlı derecede düşük olduğunu gösterdi (**Tablo 6.2.1**).

Tablo 6.2.1: Üçlü negatif ve üçlü negatif olmayan meme kanseri hücre hatları ile normal meme epitel hücre hatlarında miR-3977 bazal ekspresyon seviyesi.

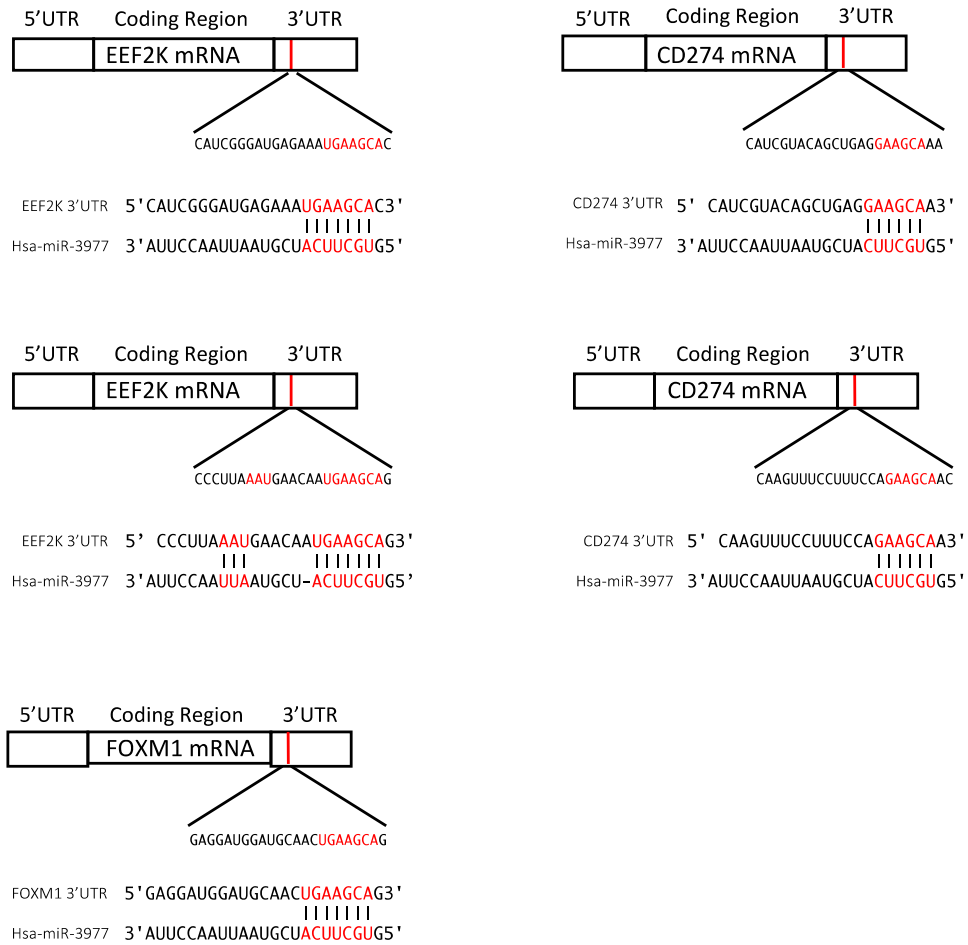


6.3. hsa-miR-3977, EEF2K, PD-L1 VE FOXM1 mRNA'LARININ 3'-TERCÜME EDİLMEMİŞ (3'-UTR) BÖLGELERİNE DOĞRUDAN BAĞLANMAKTADIR.

hsa-miR-3977 ile eEF2K, PD-L1 ve FOXM1'i hedeflendiği bilgisi TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/) ve Diana Tool (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>) biyoinformatik algoritma arama motorları ile yapılan gen taraması sonucunda bulunmuştur.

miR-3977'nin eEF2K, PD-L1 ve FOXM1 hedef genlerin her biri için mRNA'larının 3'UTR bölgelerindeki bağlanma dizileri de yine bu arama motorları ve NCBI blastn suite motoru (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) ile belirlenmiştir (Tablo 6.3.1).

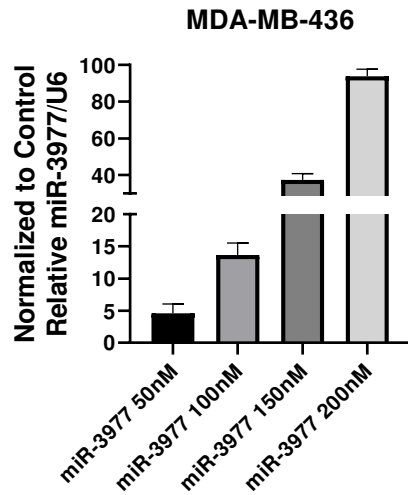
Tablo 6.3.1: hsa-miR-3977'nin eEF2K, PD-L1 ve FOXM1 mRNA'larının 3'-UTR bölgelerine bağlanma dizileri.



6.4. hsa-miR-3977 SEVİYESİNİN ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE ARTTIRILMASI EEF2K, PD-L1 VE FOXM1 mRNA SEVİYELERİNİ DÜŞÜRMEKTEDİR.

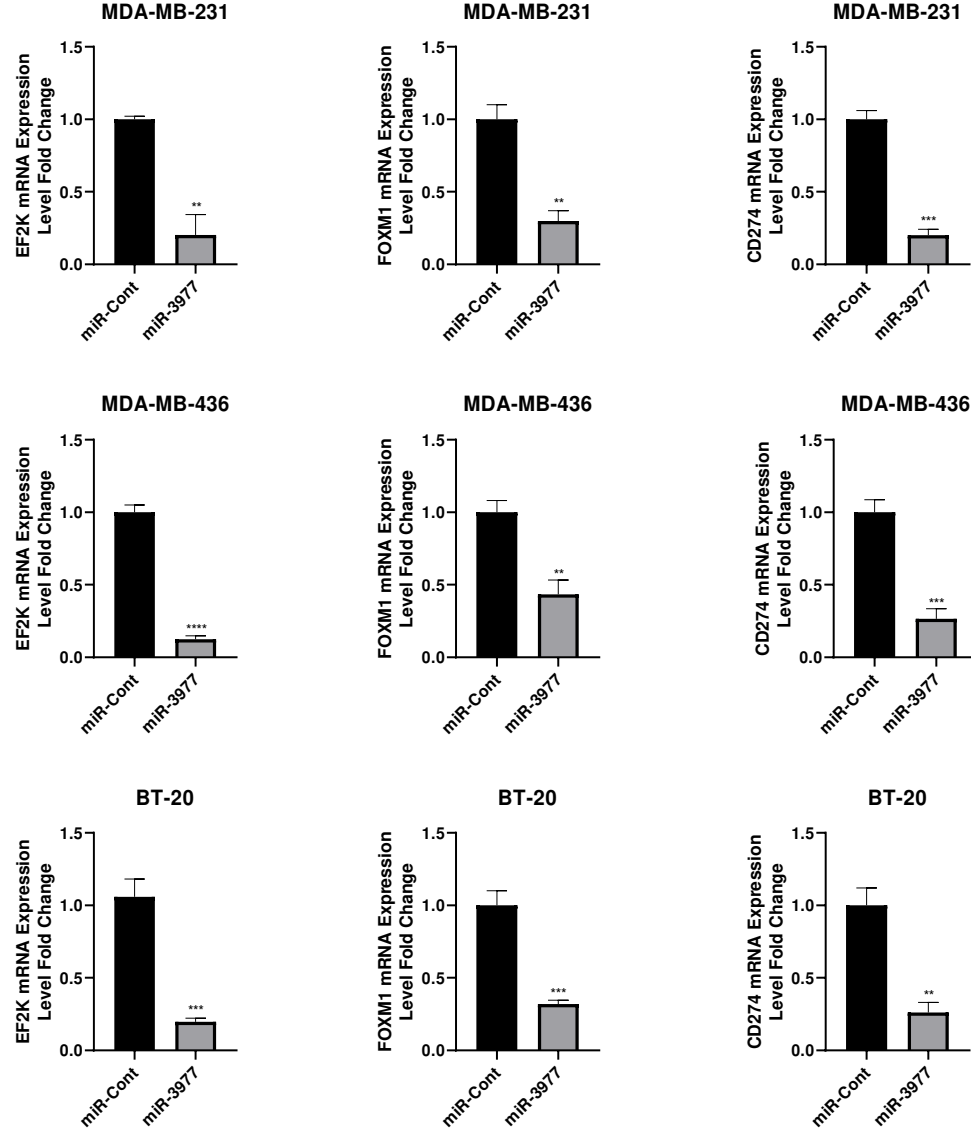
Transfeksiyon verimliliğini kontrol etmek için ilk olarak MDA-MB-436 üçlü negatif meme kanseri hücreleri 50, 100, 150, 200 nmol/L konsantrasyonlarında miR-3977 mimik veya kontrol mimik oligonükleotitleri ile 72 saat boyunca transfekte edildikten sonra RT-qPCR yöntemi ile analiz edildi. miR-3977 ekspresyon seviyesinin doza bağlı olarak uygulama gruplarında kontrol gruplarına kıyasla daha yüksek seviyede miR-3977 ekspresyonuna yol açtığı görüldü (**Tablo 6.4.1**).

Tablo 6.4.1: 50, 100, 150 ve 200 nmol/L miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu miR-3977 seviye artışı.



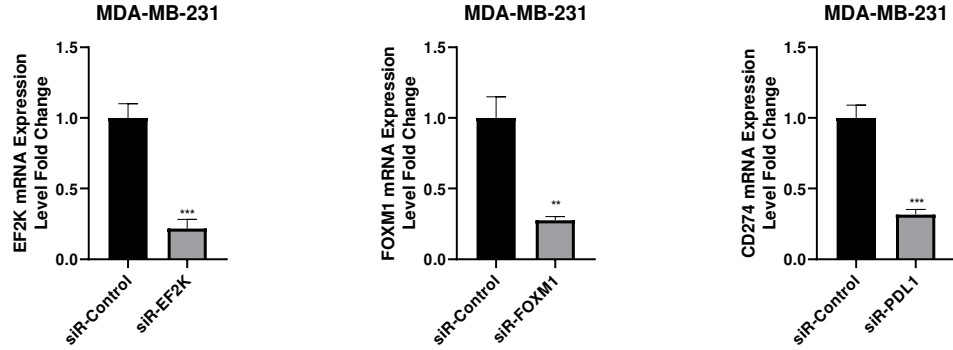
miR-3977'nin eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 mRNA düzenlemeleri üzerindeki doğrudan rolünü incelemek için MDA-MB-231, MDA-MB-436 ve BT-20 hücreleri miR-3977 mimik veya kontrol mimik oligonükleotitleri ile 72 saat boyunca transfekte edildikten sonra RT-qPCR yöntemi ile analiz edildi. miR-3977 ile transfekte edilen hücrelerde eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 mRNA seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla tüm hücre hatlarında önemli ölçüde azaldığı görüldü (**Tablo 6.4.2**).

Tablo 6.4.2: miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 mRNA seviyeleri değişimi.



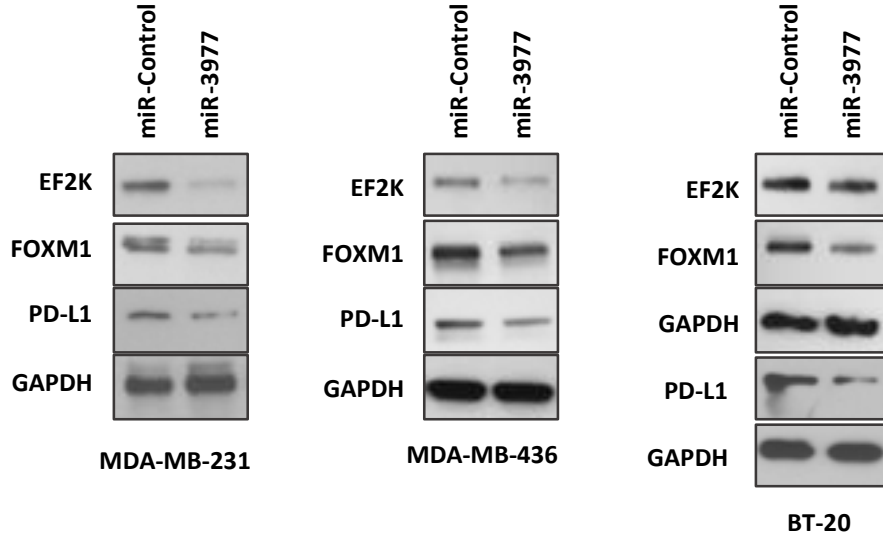
siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 ile transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücreleri de kontrol olarak kullanıldı. siRNA'ler ile transfekte edilen hücrelerde eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 mRNA seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldığı görüldü (Tablo 6.4.3).

Tablo 6.4.3: siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 oligonükleotit uygulamaları sonucu MDA-MB-231 hücrelerinde eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 mRNA seviyeleri değişimi.



6.5. hsa-miR-3977 UYGULAMASI, EEF2K, PD-L1 VE FOXM1 PROTEİN SEVİYELERİNİ ANLAMLI DERECEDİ DÜŞÜRMEKTEDİR.

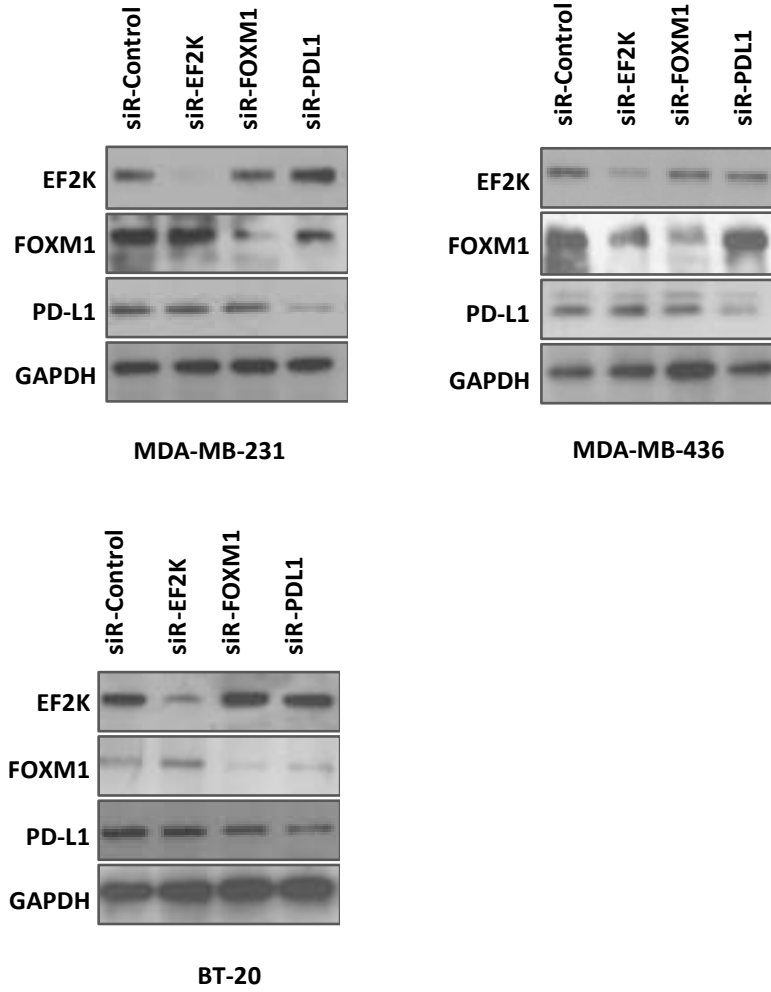
eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 hedef genlerin protein seviyeleri Immunoblotlama yöntemi ile analiz edildi. Şekil 7'de gösterildiği gibi, miR-3977 ile transfekte edilen tüm hücrelerde eEF2K, FOXM1, PD-L1 protein seviyelerinin kontrol grubu hücrelere kıyasla önemli ölçüde azaldığı görüldü (**Resim 6.5.1**).



Resim 6.5.1: miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 protein seviyeleri değişimi.

siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 ile transfekte edilmiş üçlü negatif meme kanseri hücreleri de kontrol olarak kullanıldı. siRNA'lar ile transfekte edilen

hücrelerde eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 mRNA seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldığı görüldü (**Resim 6.5.2**).



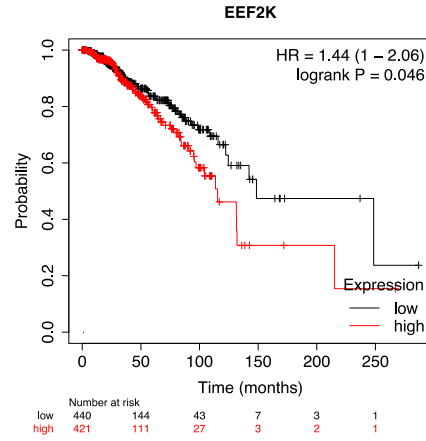
Resim 6.5.2: siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 protein seviyeleri değişimi.

6.6. hsa-miR-3977’NİN HEDEFLEDİĞİ EEF2K, PD-L1 VE FOXM1 GENLERİNİN PROTEİN SEVİYELERİ MEME KANSERİNDE DAHA UZUN HASTA SAĞKALIMI İLE TERS ORANTILIDIR.

Önceki çalışmalar, eEF2K'nın çeşitli kanser türleri üzerinde onkojenik bir gen olarak hareket ettiğini göstermiştir (Bayraktar ve ark. 2017). Meme kanserinde eEF2K'nın klinik önemini ve prognostik değerini belirlemek için miRpower aracıyla (<http://kmplot.com/analysis/>) Kanser Genom Atlas (TCGA)'dan hastaların protein

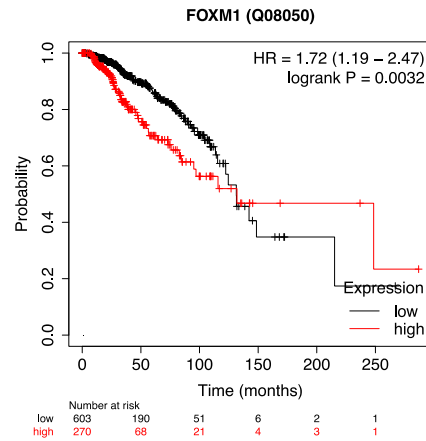
düzeylerini analiz ettik. Tümörleri düşük eEF2K ekspresyonu ifade eden hastalarda genel sağkalım oranı, tümörleri daha yüksek eEF2K ifade eden hastalara göre anlamlı olarak daha yüksekti ($n = 861$; $p = 0.046$; **Tablo 6.6.1**).

Tablo 6.6.1: Meme kanseri hastalarında eEF2K protein ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi.



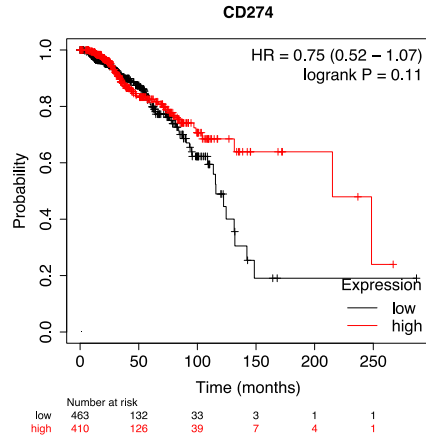
eEF2K'ya benzer şekilde, iyi çalışılmış bir onkojenik gen olan FOXM1 için de miRpower aracı (<http://kmplot.com/analysis/>) ile Kanser Genom Atlası'ndan (TCGA) meme kanseri hastalarının protein düzeylerini analiz ettik. Kaplan-Meier veri analizi ile elde edilen sonuçlara göre, genel sağkalım oranı, tümörleri düşük FOXM1 ekspresyonu ifade eden hastalarda, tümörleri daha yüksek FOXM1 eksprese eden hastalara göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($n = 873$; $p = 0.0032$; **Tablo 6.6.2**).

Tablo 6.6.2: Meme kanseri hastalarında FOXM1 protein ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi.



PD-L1'in protein seviyesinin meme kanseri hastalarındaki klinik önemini açıklamak için de benzer şekilde miRpower aracı (<http://kmplot.com/analysis/>) ile Kanser Genom Atlas (TCGA) verilerinin analizi yapılmıştır. Her ne kadar genel sağkalım oranı düşük eksprese edilmiş ve yüksek eksprese edilmiş PD-L1 arasında anlamlı olarak farklı bulunmasa da, literatür kısmında ayrıntılı belirtildiği üzere PD-L1 birçok kanser alt tipinde bir prognostik faktör ve bir bağışıklık kontrol noktası reseptörü olarak tanımlanmıştır (n = 873; p = 0.11; **Tablo 6.6.3**).

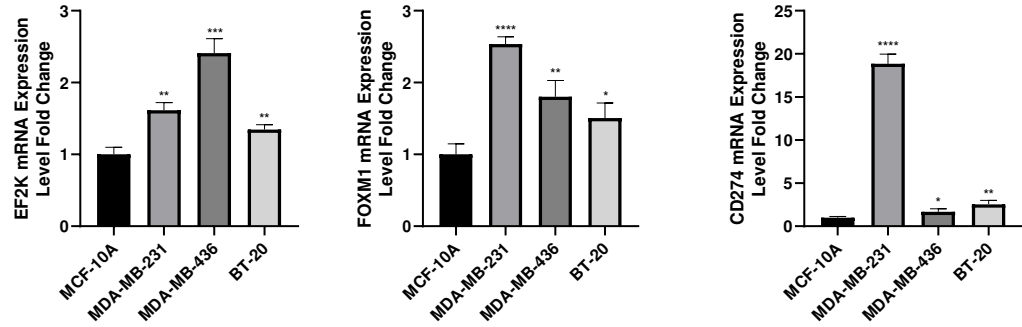
Tablo 6.6.3: Meme kanseri hastalarında PD-L1 protein ekspresyonunun sağkalım ile ilişkisi.



6.7. EEF2K, PD-L1 VE FOXM1 mRNA EKSPRESYON SEVİYELERİ TNBC'DE NORMAL MEME DOKUSUNA KIYASLA ANLAMLI DERECEDE DAHA YÜKSEKTİR.

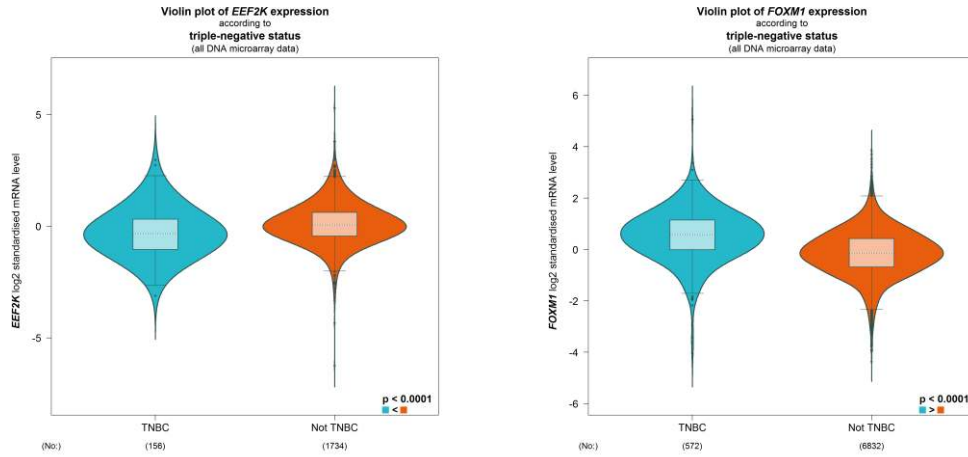
eEF2K, FOXM1 ve PD-L1'in bazal ekspresyon seviyelerini belirlemek için, MDA-MB-231, MDA-MB-436 ve BT-20 üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarındaki mRNA seviyelerini, MCF10A normal insan meme epitel hücre hattındaki seviyeleri ile karşılaştırdık. Sonuçlarımız, eEF2K, FOXM1 ve PD-L1'in bazal ekspresyonunun, MDA-MB-231, MDA-MB-436 ve BT-20 hücre hatlarında normal hücrelere kıyasla anlamlı ölçüde daha düşük olduğunu gösterdi (**Tablo 6.7.1**).

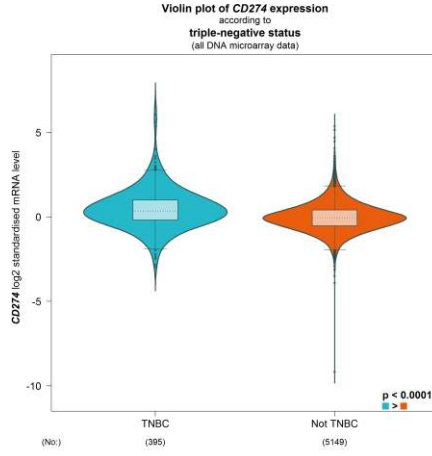
Tablo 6.7.1: Üçlü negatif meme kanseri hücre hatları ile normal meme epitel hücre hattında eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 genleri bazal ekspresyon seviyesi.



Normal meme dokusu, luminal meme kanseri, HER2 pozitif meme kanseri ve TNBC hastaları arasındaki eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 genlerinin bazal ekspresyon seviyelerini de Kanser Genom Atlası (TCGA) verileri üzerinden analiz ettik. Şekil 13’de görüldüğü üzere, üçlü negatif meme kanseri hastalarında normal bireylere ve diğer meme kanseri hastalarına göre FOXM1 ve PD-L1’in ekspresyon seviyelerinin anlamlı derecede yüksek, ancak eEF2K’nın mRNA seviyesinin daha düşük olduğu bulundu ($p < 0.0001$) (**Tablo 6.7.2**).

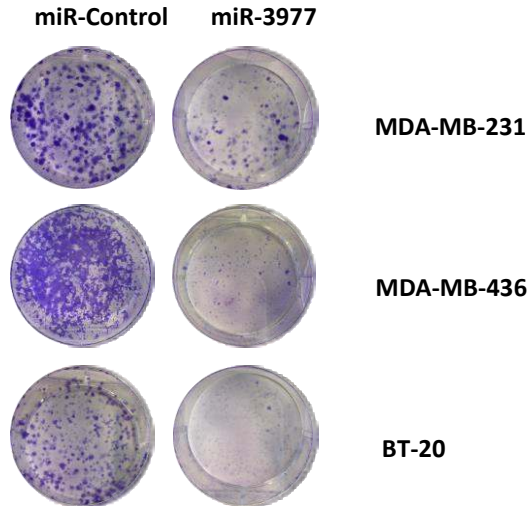
Tablo 6.7.2: Üçlü negatif meme kanseri hastalarında ve üçlü negatif olmayan meme kanseri hastalarında eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 genleri bazal ekspresyon seviyesi.





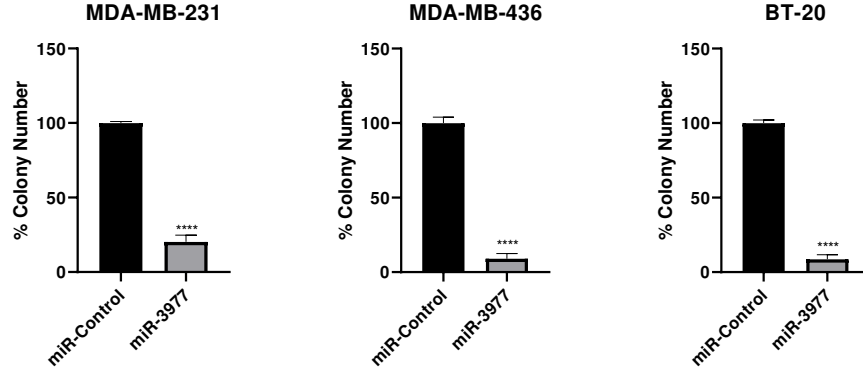
6.8. hsa-miR-3977 ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE KOLONİ OLUŞUMUNU BASKILAMAKTADIR.

miR-3977'un üçlü negatif meme kanserinde hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi incelenmek üzere, MDA-MB-231, MDA-MB-436 ve BT-20 hücreleri ile klonojenik testi yapıldı. miR-3977 ekspresyonunun artışının sağlandığı durumlarda, oluşan koloni sayısı kontrol grubu hücrelerine kıyasla önemli ölçüde azaldı ($p < 0.0001$) (**Resim 6.8.1, Tablo 6.8.1**).



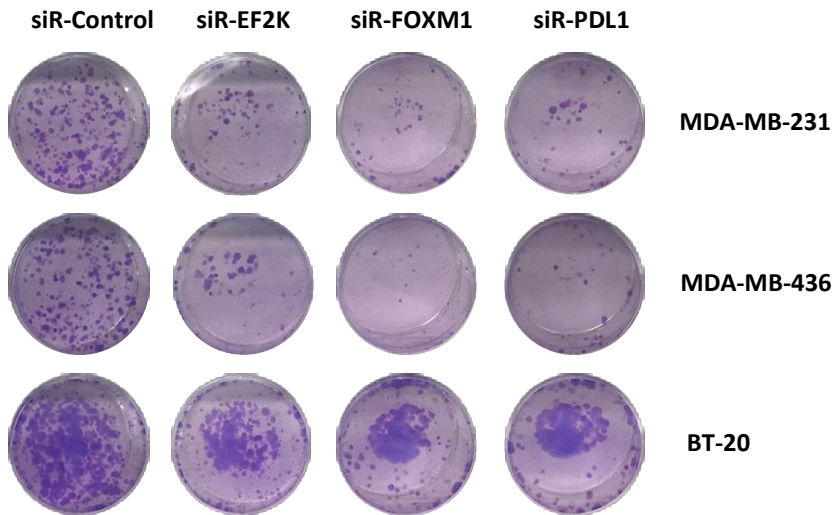
Resim 6.8.1: miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında koloni oluşum kabiliyetindeki değişim.

Tablo 6.8.1: miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında koloni oluşum yüzdeleri.



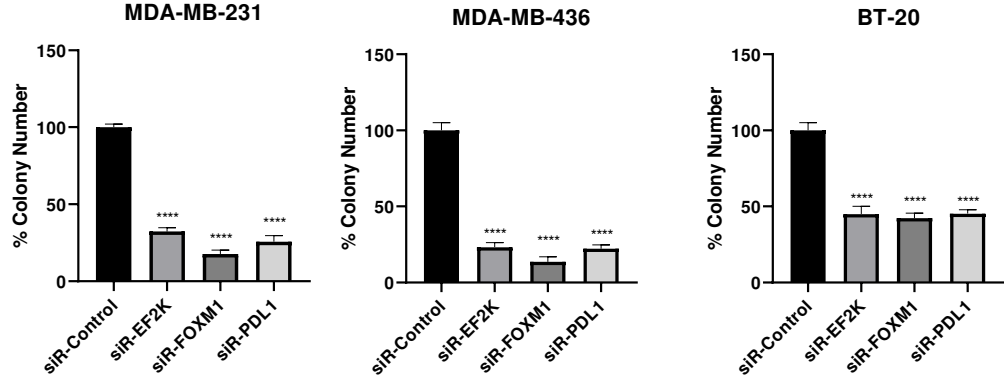
6.9. EEF2K, FOXM1 VE PD-L1 SUSTURULMASI ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE KOLONİ OLUŞUMUNU BASKILAMAKTADIR.

eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 aracılı sinyal yollarının üçlü negatif meme kanserinde hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini incelenmek için, MDA-MB-231, MDA-MB-436 ve BT-20 hücreleri ile klonojenik testi yapıldı. eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 ekspresyonlarının baskılandığı durumlarda oluşan koloni sayısı kontrol grubu hücrelerine kıyasla önemli ölçüde azaldı ($p < 0.0001$) (Resim 6.9.1, Tablo 6.9.1).



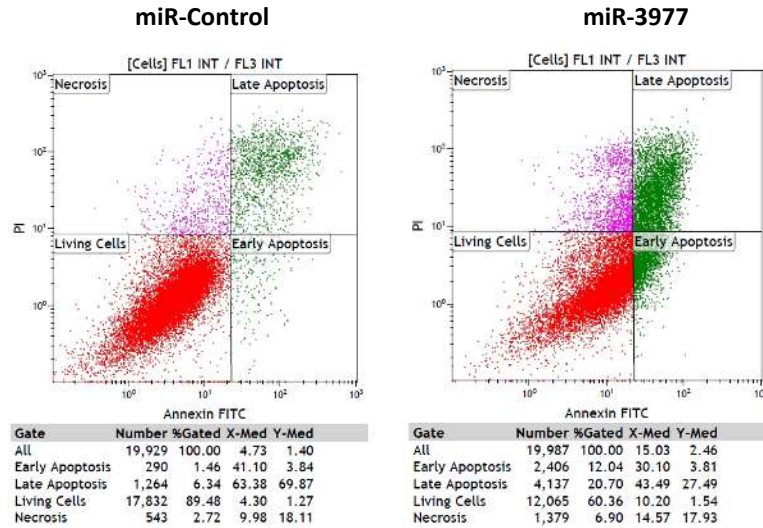
Resim 6.9.1: siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında koloni oluşum kabiliyetindeki değişim.

Tablo 6.9.1: siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında koloni oluşum yüzdeleri.

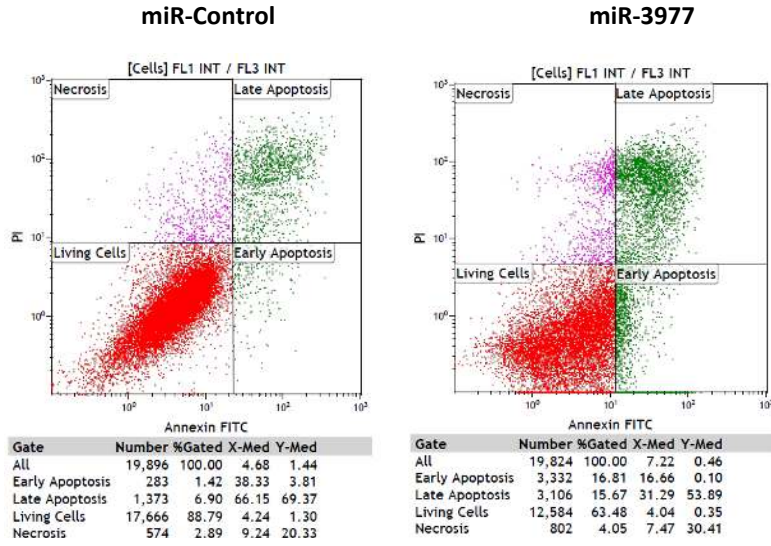


6.10. hsa-miR-3977 ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE APOPTOZU İNDÜKLEMEKTEDİR.

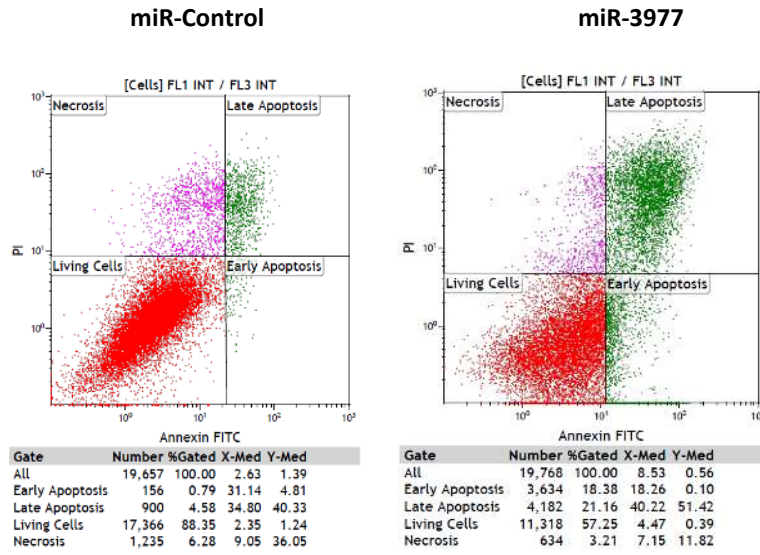
miR-3977 ekspresyonunun apoptoz aracılıklı büyüme inhibisyonuna katkısını incelemek için, Annexin V-FITC ve propidyum iyodür (PI) boyaması kullanılarak apoptoz deneyi yapıldı. miR-3977 veya kontrol mimik transfekte edilmiş hücreler, 72 saatlik transfeksiyonda akış sitometrisine tabi tutuldu. miR-3977 transfeksiyonundan 72 saat sonra hem erken hem de geç apoptotik MDA-MB-231, MDA-MB-436 ve BT-20 hücrelerinin sayısı, kontrol hücrelerine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek bulundu ($p < 0.0001$) (Resim 6.10.1, Tablo 6.10.1).



MDA-MB-231



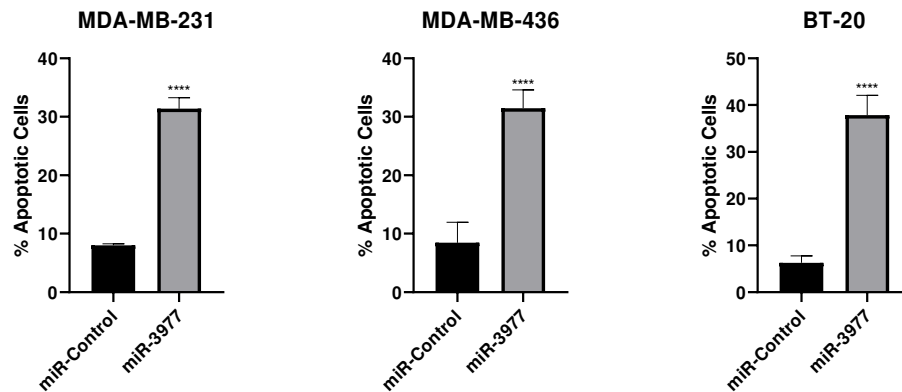
MDA-MB-436



BT-20

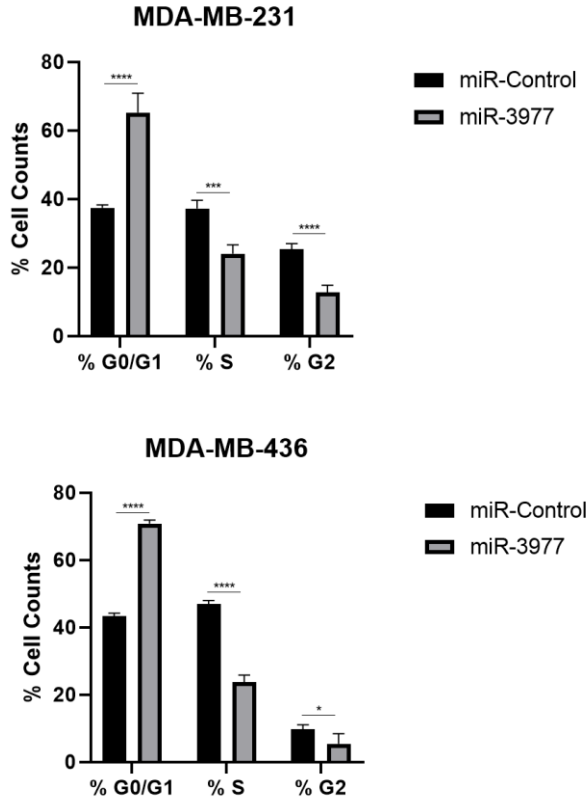
Resim 6.10.1: miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında değişen apoptoz miktarları.

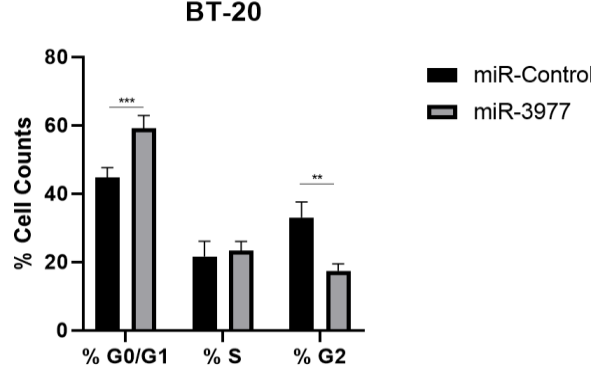
Tablo 6.10.1: miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında değişen apoptotik hücre yüzdeleri.



6.11. hsa-miR-3977 ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE G1/S HÜCRE DÖNGÜSÜ GEÇİŞİNİ BASKILAMAKTADIR.

Transfeksiyon sonrası hücrelerin hücre döngüsü ilerleme verileri de analiz edildi. Bilindiği gibi FOXM1, G1/S ve G2/M geçişi ve M fazı ilerlemesi (Li ve ark. 2019) için kritik öneme sahiptir ve ayrıca hücre içi kalsiyumdaki (Ca^{2+}) bir artışın aracılık ettiği eEF2K aktivitesi G1/S geçişini teşvik eder (Parmer et al.1997; Proud 2007). Bu verileri destekleyecek şekilde, TNBC hücre hatlarında miR-3977 transfeksiyonun kontrol grubuna göre, G1 fazında tutulan hücrelerin yüzdesini önemli ölçüde arttırdığı, S ve G2 fazlarındaki hücrelerin yüzdesinin önemli ölçüde azaldığı ($p^* < 0.05$; $p^{**} < 0.01$; $p^{***} < 0.001$; $p^{****} < 0.0001$) bulundu. (Tablo 6.11.1).

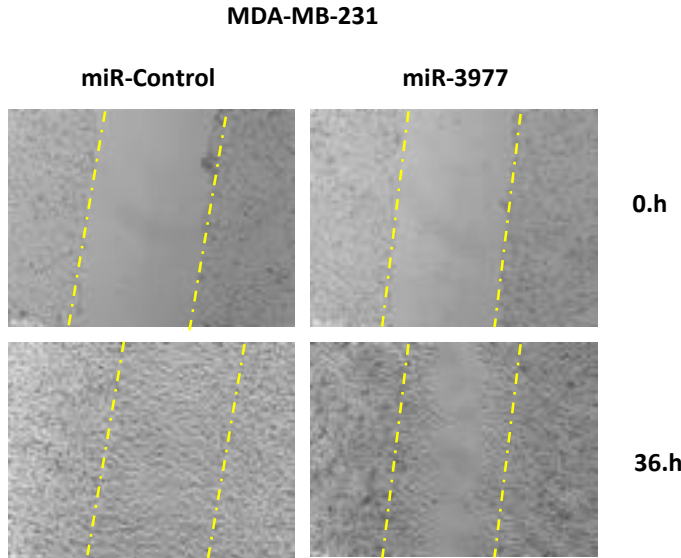


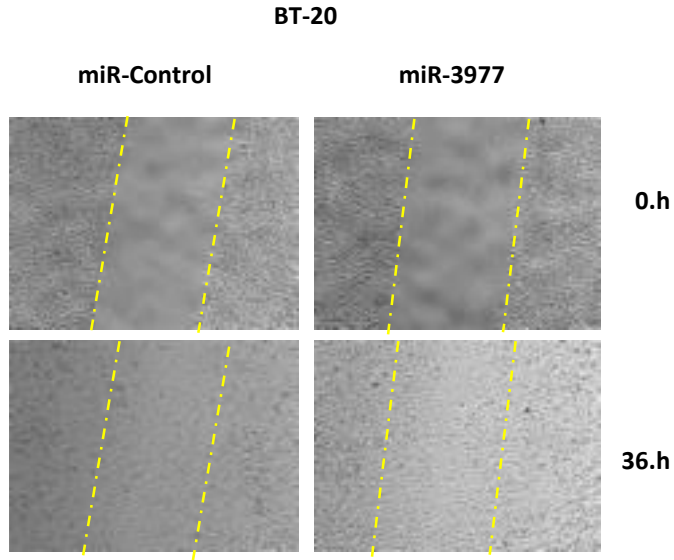
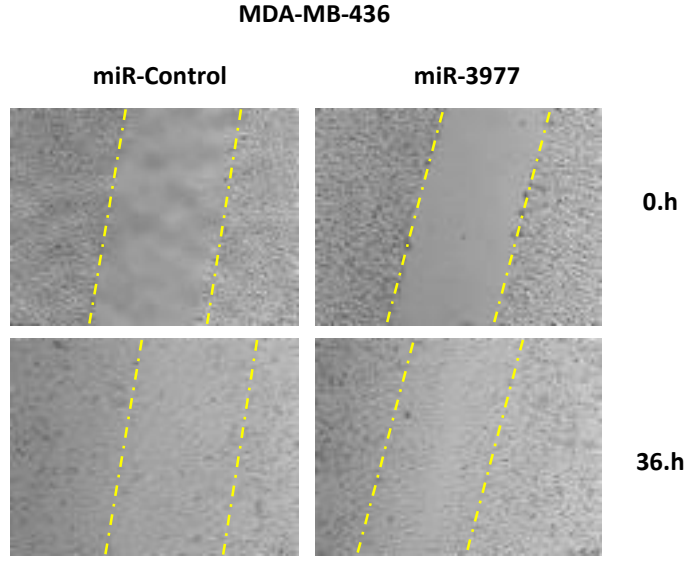


Tablo 6.11.1: miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında G1/S fazında tutulan hücre sayıları.

6.12. hsa-miR-3977 ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE MİGRASYONU BASKILAMAKTADIR.

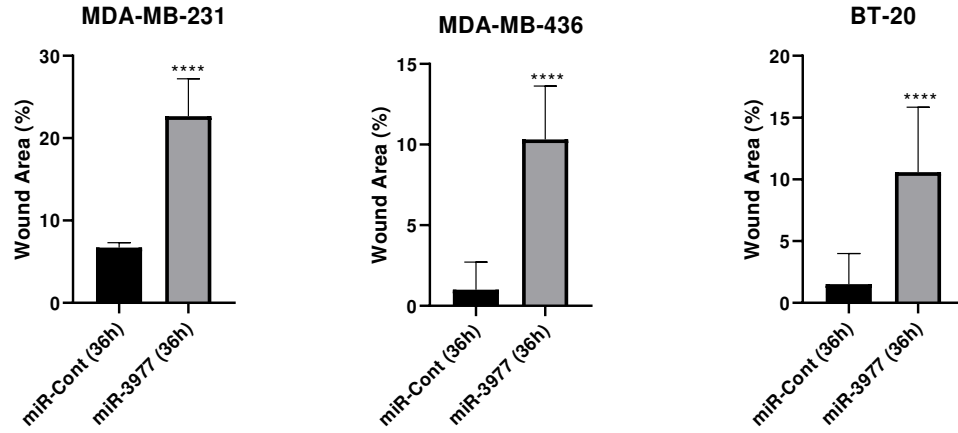
miR-3977'nin migrasyon üzerindeki etkisini araştırmak için çizik yara iyileştirme testini gerçekleştirdik. Şekil 18'de gösterildiği gibi, 72 saat miR-3977 transfeksiyonundan sonraki 36. saatte yara mesafesi (**Resim 6.12.1**), tüm hücrelerde kontrol grubundan önemli ölçüde daha geniş bulundu ($p < 0.0001$) (**Tablo 6.12.1**).





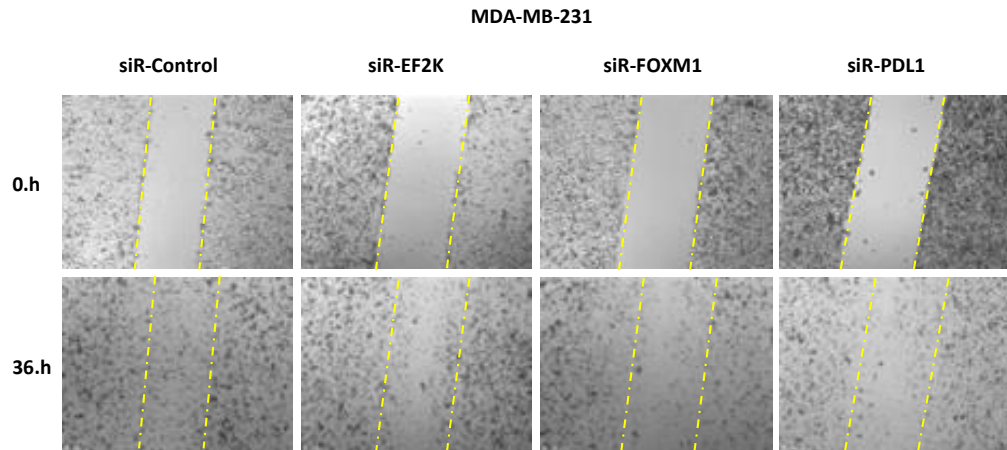
Resim 6.12.1: miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında yara mesafesi.

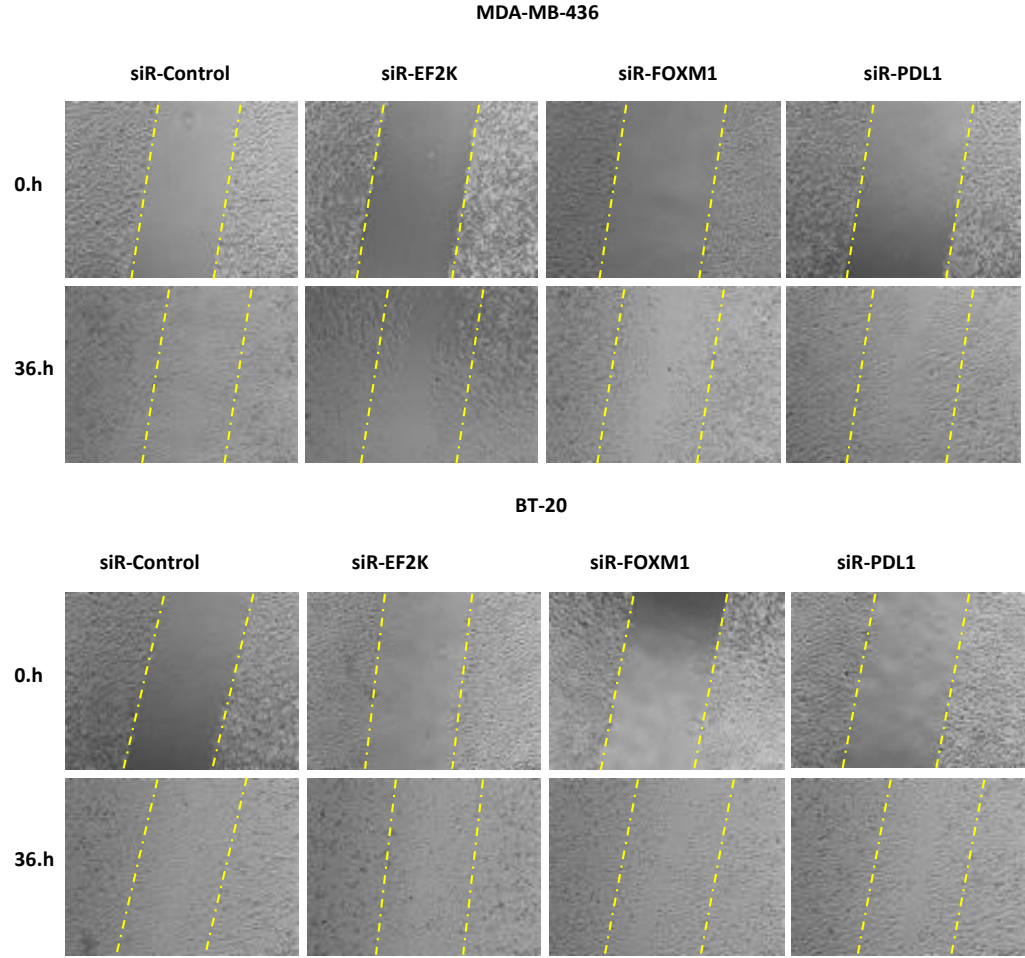
Tablo 6.12.1: miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında açık kalan yara mesafesi.



6.13. EEF2K, FOXM1 VE PD-L1 SUSTURULMASI ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE HÜCRE GÖÇÜNÜ AZALTMAKTADIR.

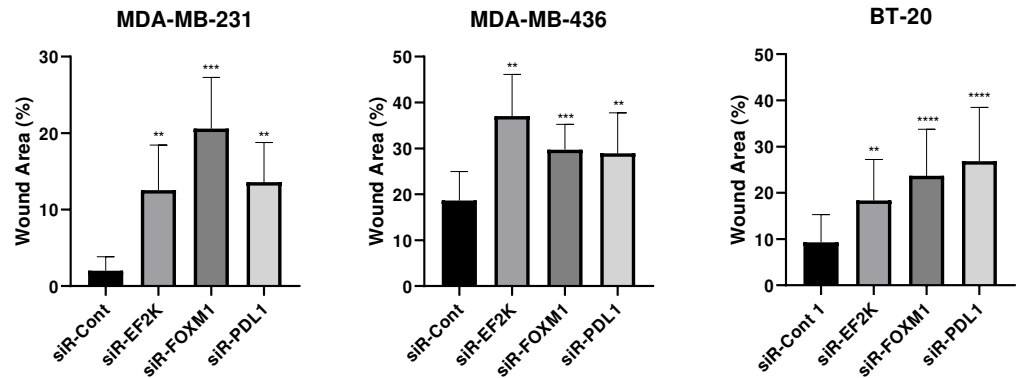
miR-3977'nin hedef genlerinin hücre göçü üzerindeki etkilerini belirlemek için ise, MDA-MB-231, MDA-MB-436 ve BT-20 hücrelerini siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 ile transfekte ederek çizik yara iyileştirme testini gerçekleştirdik (**Resim 6.13.1**). Tüm hücre gruplarında miR-3977 kadar olmasa da, hedef genlerin susturulması hücre göçünü önemli ölçüde bastırmıştır ($p^{**}<0.01$, $p^{***}<0.001$, $p^{****}<0.0001$) (**Tablo 6.13.1**).





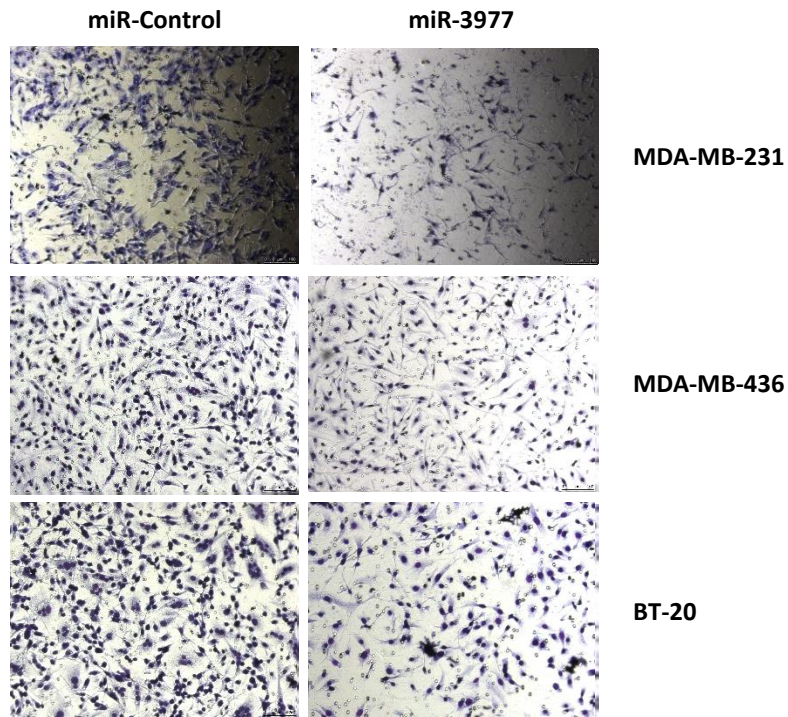
Resim 6.13.1: siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında yara mesafesi.

Tablo 6.13.1: siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında açık kalan yara mesafesi.



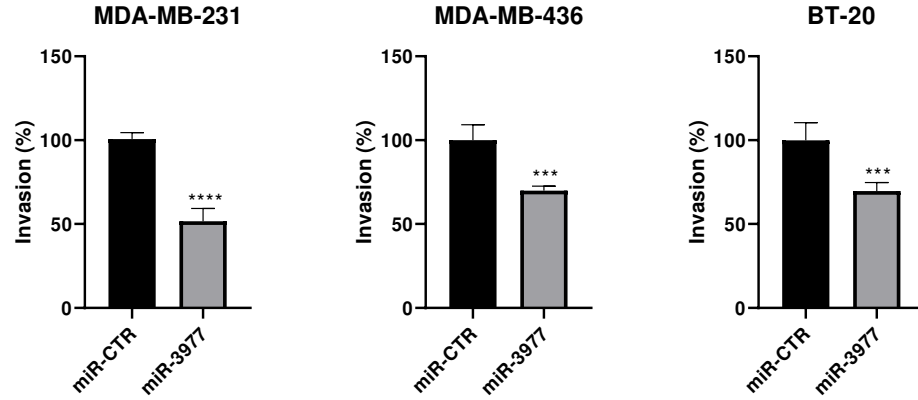
6.14. hsa-miR-3977 ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE İNVAZYONU BASKILAMAKTADIR.

In vitro matrigel invazyon deneyi, miR-3977'nin üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin invaziv kapasiteleri üzerindeki etkisini araştırmak için yapıldı. miR-3977 ile transfekte edilmiş MDA-MB-231, MDA-MB-436 ve BT-20 hücrelerinin kontrol grubuna kıyasla daha az invazyon aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur ($p^{***}<0.001$, $p^{****}<0.0001$) (**Resim 6.14.1, Tablo 6.14.1**).



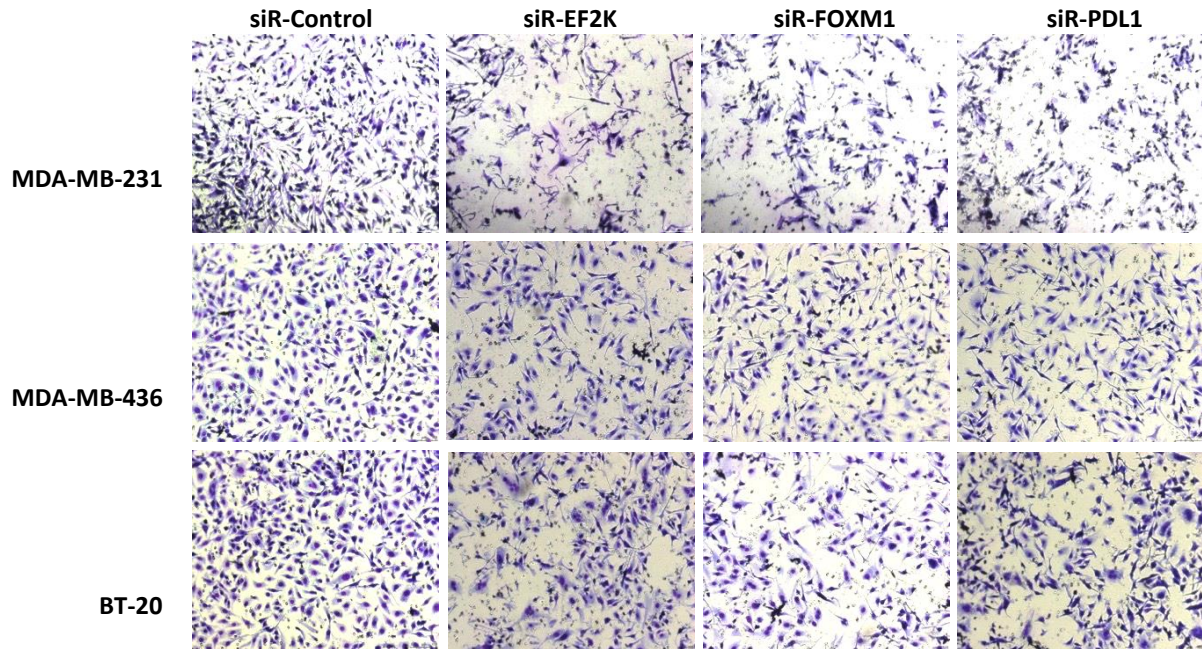
Resim 6.14.1: miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında istila eden hücre sayısı.

Tablo 6.14.1: miR-3977 mimik oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında istilacı hücre yüzdesi.



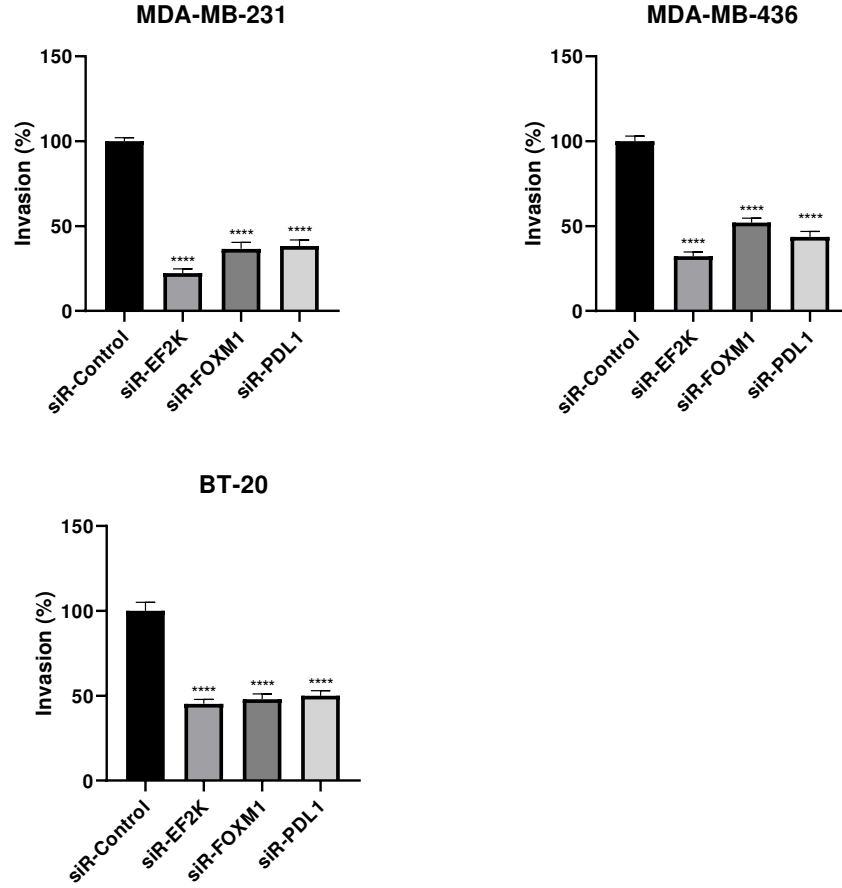
6.15. EEF2K, FOXM1 VE PD-L1 SUSTURULMASI ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE İNVAZYONU AZALTMAKTADIR.

miR-3977'nin hedef genlerinin hücre göçü üzerindeki etkilerini belirlemek için ise, MDA-MB-231, MDA-MB-436 ve BT-20 hücrelerini siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 ile transfekte ederek in vitro matrigel invazyon deneyini gerçekleştirdik. Hedef genlerin baskılanması, tüm hücre hatlarında da invazyonu önemli ölçüde azaltmıştır ($p^{****}<0.0001$) (Resim 6.15.1, Tablo 6.15.1).



Resim 6.15.1: siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında istila eden hücre sayısı.

Tablo 6.15.1: siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 oligonükleotit uygulaması sonucu üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında istilacı hücre yüzdesi.

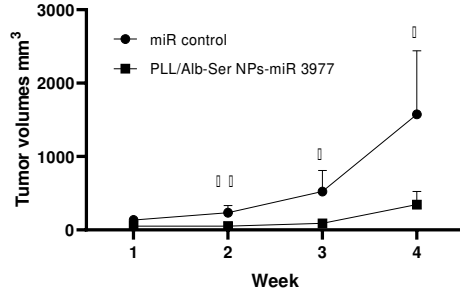


6.16. miR-3977 NANOPARÇACIKLARIN İN VİVO TERAPÖTİK OLARAK UYGULANMASI, İNSAN MEME KANSERİ KSENOGREFLERİ İLE ORTOTOPİK ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ FARE MODELLERİNDE TÜMÖR BÜYÜMESİNİ ENGELLER.

Üçlü negatif meme kanseri tümör oluşumunda miR-3977 ekspresyonunun in vivo etkilerini ve bu miRNA'nın terapötik potansiyelini incelemek için, ortotopik MDA-MB-231 ksenogref fare modellerinde sistemik olarak miR-3977 uygulaması (intravenöz olarak) yaptık. Ksenograft tümörlerinin hacimleri, 4 haftalık tedavi süresince her hafta ölçüldü. Tedavinin 4 haftası boyunca, farelerin davranış ve yeme alışkanlıklarında herhangi bir değişiklik saptanmadı, bu da miR-3977 tabanlı gen iletiminin hiçbir yan etki yaratmadığını gösterdi. PLL/Alb-Ser NPs-miR-3977 ile

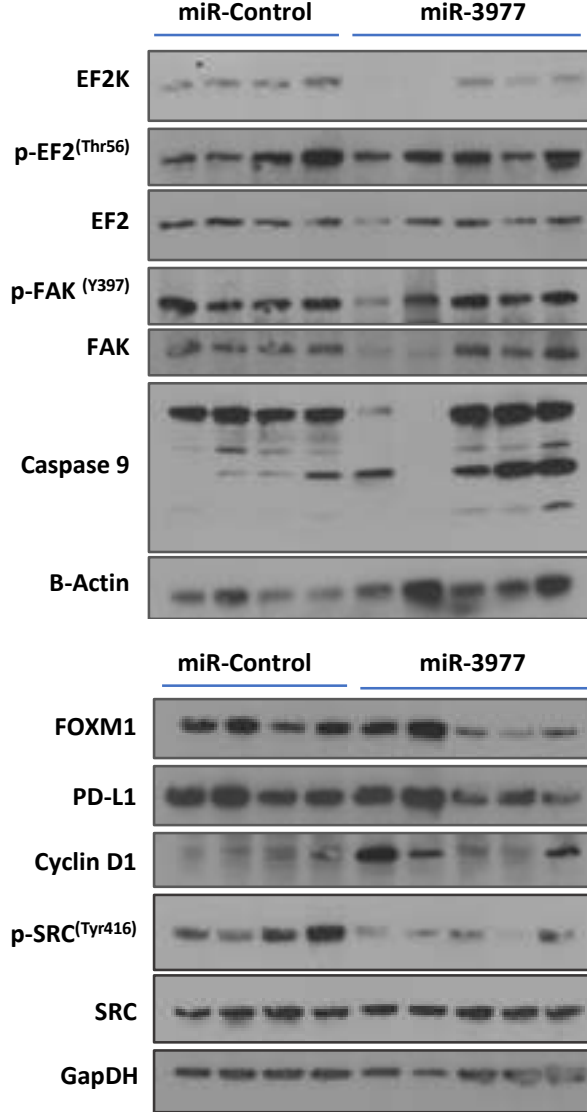
tedavi edilen farelerde, kontrol farelerinden önemli ölçüde daha az tümör büyümesi ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$) görüldü (**Tablo 6.16.1**).

Tablo 6.16.1: PLL/Alb-Ser NPs-miR-3977 ve kontrol miRNA uygulamaları sonucu oluşan tümör hacimleri.



6.17. miR-3977 NANOPARÇACIKLARININ İN VİVO TERAPÖTİK OLARAK UYGULANMASINDA, TÜMÖRLERDEKİ EE2K, FOXM1 VE PD-L1 PROTEİN SEVİYELERİ AZALDI.

Son uygulamadan üç gün sonra tümörler toplandı ve immunoblotlama analizi ile hedef genlerin ekspresyonu, hücre döngüsü ilerlemesi, istila, göç ve apoptoz belirteçleri için analiz edildi. Immunoblotlama analizi sonucunda miR-3977 uygulanan tümörlerde miR-3977'nin hedef genleri olan EF2K, FOXM1 ve PD-L1 protein seviyelerinin düştüğü görüldü. Ayrıca bu tümörlerde metastaz ile ilişkili p-FAK ve invazyon ile ilişkili p-Src protein seviyelerinin azaldığı, G1/S hücre döngüsü kontrol proteini Siklin D1 ve apoptoz belirleyicisi yıkılmış Kaspas 9 protein seviyelerinin arttığı görüldü (**Resim 6.17.1**).



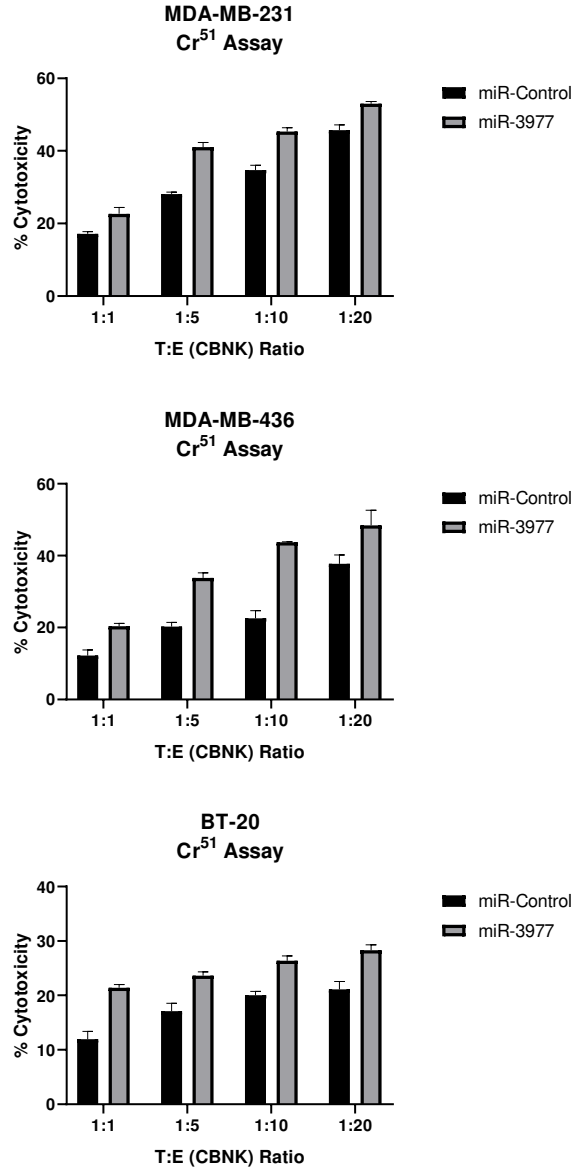
Resim 6.17.1: PLL/Alb-Ser NPs-miR-3977 ve kontrol miRNA uygulamaları sonucu oluşan tümörlerde protein ekspresyon seviyeleri.

6.18. hsa-miR-3977 ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNİN NK ARACILIKLI İMMÜNYANIT İLE YIKIMINI ARTTIRMİŞTIR.

İmmün sistem yanıtında herhangi bir değişikliğin meydana gelip gelmediğinin incelenmesi için kanser hücrelerinin doğal bağışık sistemine ait kordon bağından elde edilmiş doğal öldürücü hücreler veya NK-92 doğal öldürücü hücre hattı ile birlikte farklı Hedef : Efektör oranlarında (T:E) kültürlenmesi gerçekleştirilmiştir. NK hücrelerinin sitotoksitesi Cr^{51} hücre canlılığı testi ile analiz edilmiştir. Tablo 6.18.1’de gösterildiği gibi, 6 gün kültürlenmiş kordon kanı doğal öldürücü hücrelerinin üçlü negatif meme kanseri hücrelerine karşı daha agresif hale geldiği ve

doğal öldürücü hücrelerinin miR-3977 ile transfekte edilmiş MDA-MB-231, MDA-MB-436 ve BT-20 üzerinde önemli ölçüde daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur ($p < 0.001$) (**Tablo 6.18.1**).

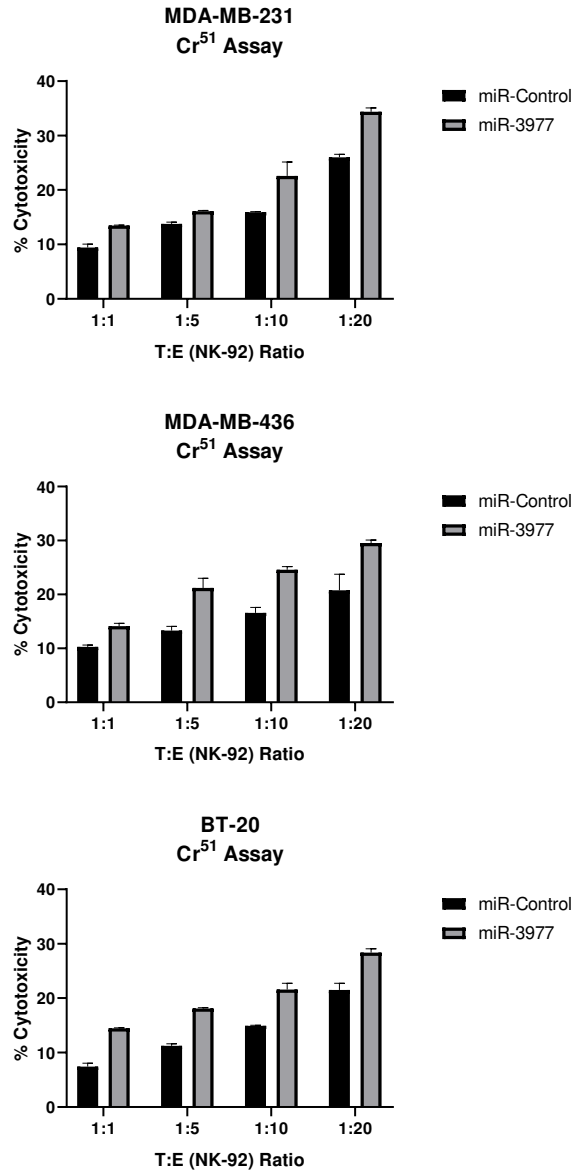
Tablo 6.18.1: miR-3977 ve kontrol miRNA uygulamalarından sonra farklı konsantrasyonlarda ko-kültür çalışmalarında oluşan kordon kanı doğal öldürücü hücrelerinin sitotoksikite değişimleri.



Kordon kanı doğal öldürücü hücreleri gibi NK-92 doğal öldürücü hücre hattının yanıtındaki değişimler de benzer şekilde incelendi. NK-92 hücrelerinin de kordon kanı doğal öldürücü hücreleri gibi miR-3977 ile transfekte edilmiş MDA-MB-231, MDA-MB-436 ve BT-20 üçlü negatif meme kanseri hücre hattı hücrelerine karşı daha

agresif hale geldiği ve sitotoksik aktivitelerinin önemli ölçüde arttığı görüldü ($p<0.01$; $p<0.001$) (**Tablo 6.18.2**).

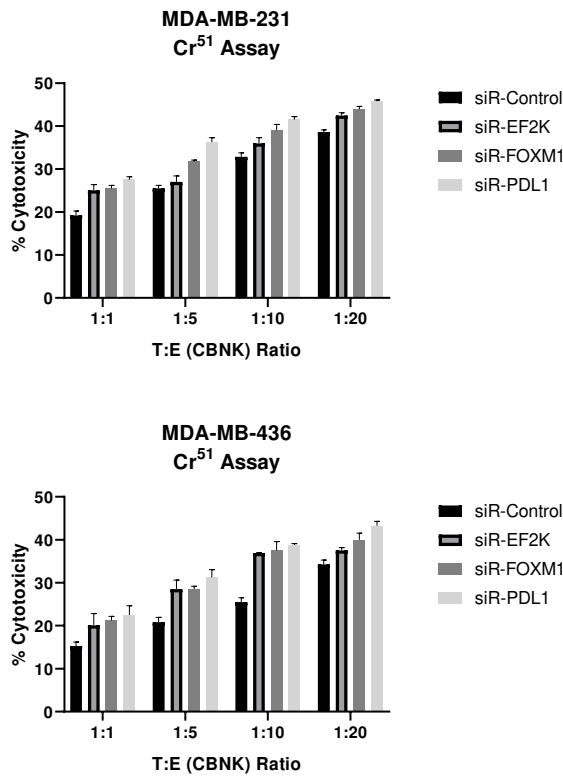
Tablo 6.18.2: miR-3977 ve kontrol miRNA uygulamalarından sonra farklı konsantrasyonlarda ko-kültür çalışmalarında oluşan NK-92 doğal öldürücü hücre hatlarının sitotoksikite değişimleri.

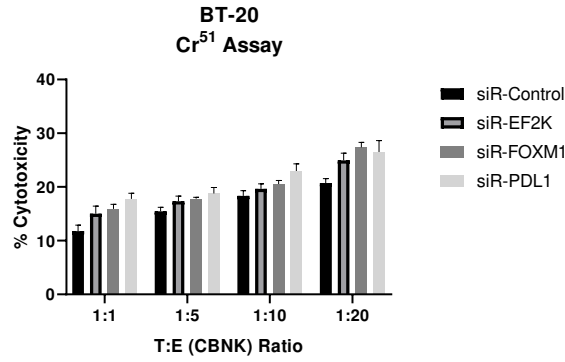


6.19. EEF2K, FOXM1 VE PD-L1 SUSTURULMASI ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRELERİNİN NK ARACILIKLI İMMÜNYANIT İLE YIKIMINI ARTTIRMIŞTIR.

miR-3977'nin neden olduğu NK tabanlı sitotoksik etkinin hangi hedef gen veya genlerden kaynaklandığının araştırılması için miR-3977 ile yapılan Cr^{51} hücre canlılığı testinin bir tekrarı hedef genlerin siRNA uygulamaları ile gerçekleştirilmiştir. 6 gün kültürlenmiş kordon kanı doğal öldürücü hücrelerinin üçlü negatif meme kanseri hücrelerine karşı daha agresif hale geldiği ve kanı doğal öldürücü hücrelerinin siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 ile ayrı ayrı transfekte edilmiş MDA-MB-231, MDA-MB-436 ve BT-20 üzerinde kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği anlaşılmıştır ($p<0.01$; $p<0.001$; $p<0.0001$) (Tablo 6.19.1).

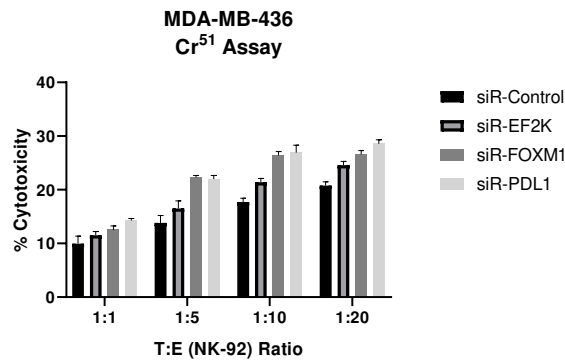
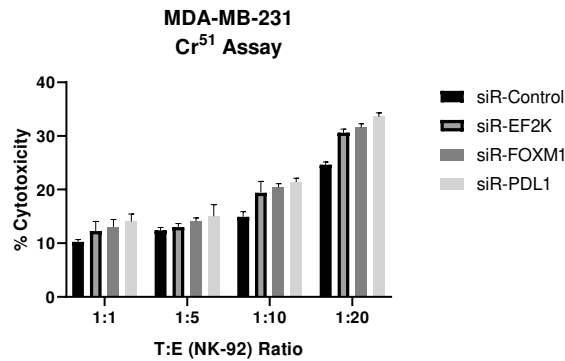
Tablo 6.19.1: siR-EF2K, siR-FOXM1, siR-PDL1 ve kontrol siRNA uygulamalarından sonra farklı konsantrasyonlarda ko-kültür çalışmalarında oluşan kordon kanı doğal öldürücü hücrelerinin sitotoksikite değişimleri.

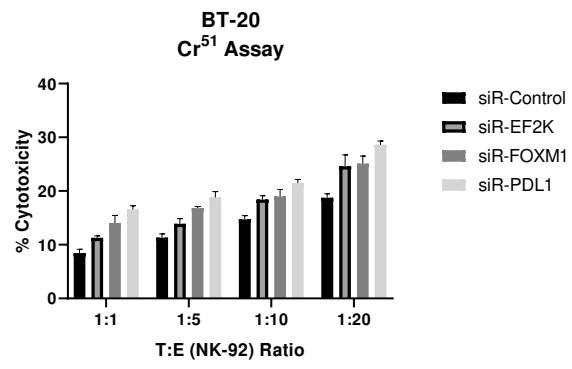




NK-92 doğal öldürücü hücre hattı ile de benzer denemeler gerçekleştirildiğinde kordon kanı doğal öldürücü hücreleri gibi NK-92 hücrelerinin de hedef genleri baskılanmış üçlü negatif meme kanseri hücrelerine karşı daha agresif hale geldiği ve siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 ile transfekte edilmiş MDA-MB-231, MDA-MB-436 ve BT-20 hücreleri üzerinde önemli ölçüde daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği bulundu ($p<0.01$; $p<0.001$) (**Tablo 6.19.2**).

Tablo 6.19.2: siR-EF2K, siR-FOXM1, siR-PDL1 ve kontrol siRNA uygulamalarından sonra farklı konsantrasyonlarda ko-kültür çalışmalarında oluşan NK-92 doğal öldürücü hücre hatlarının sitotoksiste değişimleri.





7. TARTIŞMA

Çok heterojen ve birkaç molekül alt türe sahip olduğu bilinen üçlü negatif meme kanseri, ER, PR ve HER2 ifade eksikliği nedeni ile tamoksifen ve trastuzumab gibi hormon bağımlı tedavilere cevap vermemekte, tek tedavi seçeneği olarak kemoterapi kullanılan tek büyük meme tümörü alt tipi olarak ifade edilmektedir. (Bayraktar ve ark. 2017; Chin ve ark. 2013; Liu ve ark. 2014; Sun ve ark. 2016). Üçlü negatif meme kanseri (TNBC), yüksek invazyon kapasitesi ve hedefe yönelik tedavi eksikliği nedeniyle yüksek riskli bir malignitedir (Liu ve ark. 2018).

Yapılan çalışmalar ökaryotik uzama faktörü 2 kinazın (eEF2K), hücredeki kaynaklar sınırlandığında protein sentezini negatif olarak düzenleyerek tümör sağkalımını ve büyümesini desteklediğini göstermiştir (Wang ve ark. 2017). Bilindiği üzere eEF2K'nin aktivitesi, rapamisin kompleksi 1'in (mTORC1) ve adenosin monofosfatla aktive edilen protein kinazın (AMPK) memeli hedefi gibi besin algılayıcı yollar ile sıkı bir şekilde düzenlenir. mTORC1, farklı inhibitör bölgelerinde kinazı fosforile ederek eEF2K'nin aktivitesini negatif olarak düzenler (Moore ve ark. 2017; Wang ve ark 2014). Dikkat çekici bir şekilde, hem AMPK hem de mTORC1 otofajinin düzenlenmesinde işlev görür. mTORC1, otofaji yolunu ULK1'i fosforile ederek ve inhibe ederek baskılar, AMPK ise mTORC1'i ve fosforile ederek ULK1'i aktiveleştirerek otofajiyi teşvik eder (Kim ve ark. 2011). Besin yokluğu gibi stres koşulları altında, çekirdek hücresel enerji sensörü AMPK, mTORC1'in aktivitesini fosforile eder ve inhibe eder ve sonuç olarak mTORC1 aracılı eEF2K inhibisyonunu baskılar (Moore ve ark. 2017; Agarwai ve ark. 2015). Eşzamanlı olarak, AMPK eEF2K'yı fosforile eder ve aktive eder ve bu, daha sonra eEF2K aşağı akım hedefinin, ökaryotik uzama faktörü 2'nin (eEF2) fosforilasyonu ve inhibisyonu ile sonuçlanır (Moore ve ark. 2017; Johanns ve ark. 2017). Sonuç olarak eEF2'nin fosforilasyonu, uzama sırasında yeni protein zincirlerinin ribozom boyunca eEF2 aracılı translokasyonunu inhibe ederek protein sentezini hafifletir ve amino asitler ve ATP (adenosin-5'-trifosfat) gibi hücresel kaynakları korur. Bu şekilde, eEF2K'nin enerji tasarrufundaki rolü kanserler tarafından yüksek enerji ve metabolik taleplerini

karşılamak için kullanılabilir (Ho ve Gorski 2019). Diğer bir deyişle, kanser ve / veya stres etkeni türüne bağlı olarak, eEF2K, stres koşulları altında sağkalımı arttırmak için otofajiyi farklı şekilde düzenler (Ho ve Gorski 2019; Wang 2017).

Çok önemli ve iyi tanımlanmış onkojenik transkripsiyon faktörü olarak FOXM1, TNBC'de de çeşitli insan kanserlerinde olduğu gibi aşırı seviyede eksprese edilmektedir (Liu ve ark.2006; Wonsey ve Follettie, 2005; Bayraktar ve ark.2017; Bayraktar ve ark.2018). Upregülasyon ekspresyonunun, bazal ve TNBC tipi meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli malignitelerde TP53 mutasyonlarının bir sonucu olduğu ve hücre proliferasyonunu, migrasyonunu, tümör hücrelerinin istilasını, ileri tümör evresiyle ilişkili anjiyogenezi indüklediği bildirilmiştir (Curtis ve ark.2012; Halasi ve Gartel, 2013; Katoh ve ark.2013; Liu ve ark.2006; Barsotti 2009; Song ve ark.2017; Yang ve ark.2018; Fei ve ark. 2017; Ahmad ve ark. 2016; Bayraktar ve ark.2018; Narrandes ve ark.2018; Lu ve ark.2018; Hamurcu ve ark.2019). Ek olarak, FOXM1'nin eEF2K promotörüne bağlandığı ve TNBC'de kanser hücresi çoğalması, hayatta kalması, istilası ve ilaç direncini destekleyen ifadesini düzenlediği bildirilmiştir (Hamurcu ve ark. 2017; Bayraktar ve ark. 2017). Bu nedenle, FOXM1 aracılı ve/veya direk eEF2K sinyal eksenini hedeflemenin, TNBC tedavisi için iyi bir yaklaşım olduğu düşünülebilir (Bayraktar ve ark. 2017, Bayraktar ve ark. 2018; Kabil ve ark. 2018).

Kanser immünoterapisi alanındaki en heyecan verici gelişmelerden biri ise, sitotoksik T-lenfosit ilişkili protein 4 (CTLA4), programlanmış hücre ölüm proteini 1 (PD1) ve programlanmış hücre ölümü 1 ligandı (PD-L1) ile immün kontrol noktası moleküllerinin bloke edilmesi olmuştur (Liu ve ark. 2018; Chen ve Han 2015; Topalian ve ark. 2015; Disis and Stanton 2015). FDA kısa süre önce ipilimumab (anti-CTLA4), nivolumab ve pembrolizumab (anti-PD1) ve atezolizumab ve avelumab (anti-PD-L1) gibi bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerini melanom, böbrek hücresi kanseri, Hodgkin lenfoma, mesane kanseri ve baş ve boyun kanseri, NSCLC gibi çeşitli gelişmiş malignitelerin tedavisi için onaylamıştır. Bununla birlikte, sadece bir hasta alt grubu bu tedaviden yararlanabilir, bazı hastalar sınırlı bir yanıt alır veya bu tedaviye tamamen yanıt vermez (Disis and Stanton 2015; Liu ve ark. 2018; Braun ve ark. 2016). Bu nedenle, kanser immünoterapisine yanıt verenleri tahmin etmek için moleküler biyobelirteçleri tanımlamak çok önemlidir (Liu ve ark. 2018).

Şimdiye kadar, kemoterapi TNBC için adjuvan veya metastatik ortamda mümkün olan tek terapötik stratejidir (Wang ve Guda 2016). Üçlü negatif meme kanserine alternatif tedavi yöntemi olarak VEGF, EGFR, mTOR, PARP1, FGFR, AR, NOTCH, HDAC, CDK, PI3K, MET ve TROP2 gibi farklı moleküler yolları hedefleyen bir seri küçük molekül çalışmaları yapılmıştır (Bardia ve ark. 2016; Bayraktar ve Gluck 2013; Mayer ve ark. 2014; Traina ve ark 2015). Ancak umut vaat eden in vitro sonuçlara rağmen TNBC hedefli tedavilerin çoğunun klinik araştırma etkinlikleri belirsizliğini korumaktadır (Liu ve ark. 2018). Ayrıca, şu ana kadar klinik deneme çalışmaları geçip FDA tarafından onay almış bir miRNA da bulunmamaktadır. Dahası, moleküler farklılaşmasının yanı sıra üçlü negatif meme kanseri diğer katı tümörler gibi sert yapısı ve mikro çevresinde bulunan kimyasal kompozisyonu nedeni ile indüklenmemiş doğal ve kazanılmış immün sistem elemanlarından kaçmayı başarmaktadır (Disis and Stanton 2015). Bununla birlikte, yapılan yeni çalışmalar TNBC için mevcut olan sınırlı terapötik seçenekler göz önüne alındığında immünoterapinin TNBC için umut verici bir strateji olabileceğini göstermektedir (Liu ve ark. 2018).

Liu ve ark. yaptığı çalışmada, 2 büyük ölçekli meme kanseri (BC) genomik verilerine dayanarak TNBC'de immünojenik imzaların kapsamlı bir analizini gerçekleştirilmiş, TNBC, TNBC olmayan ve normal doku arasındaki ve farklı genotipik veya fenotipik özelliklere sahip TNBC'ler içindeki 26 bağışıklık hücresi aktivitesinin ve yollarının zenginleştirme seviyelerini karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak analiz edilen bağışıklık aktivitelerinin ve yollarının neredeyse hepsinin TNBC'de TNBC olmayanlara göre önemli ölçüde daha yüksek zenginleştirme seviyelerine sahip olduğunu bulunmuştur (Liu ve ark. 2018). TNBC çeşitli nedenlerle immünojenik olabilir. TNBC'nin alt tipleri önemli sayıda genetik mutasyona sahiptir ve bağışıklık sistemi, bu mutasyonlar tarafından kodlanan anormal proteinleri yabancı olarak görebilir. Ayrıca TNBC, B hücrelerini de içeren bir prognostik gen imzası ile ilişkilidir. B hücreleri tarafından salgılanan antikolar, tümör antijenlerine bağlanabilir ve tümörde halihazırda başlatılmış olan adaptif bağışıklık tepkisini yükseltebilir (Disis and Stanton 2015). Bu çalışmalar TNBC'nin BC alt tipleri arasında muhtemelen en güçlü immünojenikliği sergilediğini ve dolayısıyla TNBC için immünoterapötik tedavinin mümkün olabileceğini göstermektedir.

Ek olarak, birkaç çalışma TNBC'ye karşı immünoterapi kullanımını araştırmıştır. Örneğin, Nanda ve ark. PD1'e karşı oldukça seçici bir monoklonal IgG4-k antikoru olan pembrolizumabın, gelişmiş TNBC tedavisinde umut verici olabileceğini gösteren ön kanıtlar sağlamıştır (Nanda ve ark. 2016). Emens ve diğ. MPDL3280A tarafından PD-L1'in inhibisyonunun, ağır şekilde önceden tedavi edilmiş metastatik TNBC hastalarında klinik aktiviteyi teşvik ettiğini göstermiştir (Emens ve ark. 2015). Ek olarak, Hartman ve ark. IL-6 ve IL-8'in birlikte inhibe edilmesinin TNBC için etkili bir tedavi stratejisi olabileceğini göstermişlerdir (Hartman ve ark. 2013). Tüm bu gelişmelere rağmen immün ve kanser hücresi ayrımı yapmaksızın PD-1'e bağlanmak için diğer PD-L1 antikorları ile moleküler yarışa dayalı etki etmesi beklenen bu antikor uygulamalarının, genin mikroRNA'lar aracılıklı post-transkripsiyonel seviyede susturulmasına kıyasla oldukça yetersiz ve etkisiz kalacağı söylenebilir. Bu nedenle miRNA uygulamaları ile yapılacak çalışmaların daha kesin ve gerçeği yansıtan sonuçlar vereceğine inanılmaktadır.

Sonuç olarak, gen regülasyonunda önemli ve güçlü bir araç olmaları miRNA'ları potansiyel terapötik hedef yapmaktadır. Ancak unutulmamalıdır ki bir mikroRNA farklı kanser türleri için farklı onkolojik özellikler gösterebildiği için mikroRNA seçiminde incelenecek kanser türüne göre değerlendirmelerde bulunmak büyük önem taşımaktadır.

Tüm bu literatür bilgilerine ve yaptığımız ön araştırmalar dayanarak çalışmamıza temel oluşturan araştırma sorusunu 'üçlü negatif meme kanseri hücre dizilerinde yüksek miktarlarda eksprese edilerek karsinogenezi desteklediği bilinen eEF2K, FOXM1 ve PD-L1'in üçünü bir hedefleyen tek bir miRNA ile post-transkripsiyon düzeyinde susturulmasının, kanser hücrelerinin biyolojik fonksiyonları (metabolizma, migrasyon ve invazyon yeteneği gibi) üzerindeki etkilerinin neler olduğu' şeklinde kurmuş bulunmaktayız. Çalışmamızda bu etkinin önemini daha iyi anlayabilmek için, 'Gerçekleştirilecek gen susturmaları ile üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin programlanmış ölüm yolları indüklenebilir ve/veya bu hücreler doğal öldürücü hücre tabanlı immünoterapi için hedef haline getirilebilir mi? Böylelikle kemoterapinin yan etkileri olmadan tümör dokularında yıkım sağlanabilir mi? Ayrıca klinik çalışmalarda kişiye özgü tedavi yöntemi olarak uygulanırsa, ameliyat edilemeyecek ve/veya ilaç uygulaması yapılamayacak bölgelerde tümör dokusuna

sahip hastalara yeni bir tedavi metodolojisi geliştirilmesine temel oluşturabilir mi?’ gibi temel araştırma sorumuzu destekler nitelikteki sorulara da cevap aranmıştır.

Çalışmamızda törapetik bir tedavi yöntemi geliştirmek üzere, üçlü negatif meme kanseri üzerinde tümör süpresör olarak değerlendirilen EF2K ve FOXM1 moleküler yolaklarını miRNA küçük molekülü kullanılarak hedeflemekteyiz. Ayrıca kanser hücrelerinin immün sistem elemanlarından kaçmasına yardımcı olduğu bilinen ve üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde ifade seviyesi artmış PD-L1 molekülü de hedeflenerek PD-1 / PD-L1 eşleşmesini ortadan kaldırarak immün sistem yanıtının bu kanser türü için bir tedavi seçeneği haline gelmesini amaçlamış bulunmaktayız. İmmün sistem yanıtının değerlendirilmesi, kimerik antijen reseptör (CAR) gibi moleküler değişiklikleri hedefleyerek immün sistem aktivasyonunu arttırmaya yönelik en güncel yöntemlerle çalışmaya imkan veren ve allojenik özelliği ile bireyler arası transferi mümkün olan doğal öldürücü (NK) hücrelerle gerçekleştirilmiştir. Yukarıda ayrıntılı şekilde belirtildiği üzere projemizde sonuçların netliğini arttırmak adına birbiriyle körele pek çok moleküler yöntem bir arada kullanılmıştır. Böylece elde edilen verilerin teknik veya çevre koşullarına bağlı oluşabilecek yanıltıcı değişkenlerden etkilenmesi engellenmiştir.

Yapılan hedef gen ve miRNA eşleşme araştırmaları sonucunda miR-3977’nin eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 hedef genlerine biyoinformatik algoritmalar üzerinde bağlandığı bulunmuştur. Ayrıca nblast analizi ile bu bağlanmaların 7’şerli olduğu ve hedef genlerin 3’UTR bölgelerinde bulunmuştur. Bu sonuç bu bağlanmaların fonksiyonel olarak karşılık bulabileceği hipotezini güçlendirmiştir. Bu algoritmik verilerin biyolojik olarak karşılığının araştırılması için miR-3977 ifadesi arttırılmış üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 hedef genlerinin ifade seviyelerindeki değişiklikler qRT-PCR yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen veriler, artan miR-3977 ekspresyonun eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 hedef gen ifadelerini baskıladığını göstermiştir. Burada hedef genlerdeki baskılanmanın kontrolü olarak siRNA transfeksiyon yöntemi kullanılmıştır.

miR-3977 ile ilgili klinik verilerin analizi sürecinde ise TNBC hastalarına ait TCGA datalarının analizi gerçekleştirilmiş ve miR-3977’nin yüksek ekspresyonun bu hastalarda anlamlı derecede daha uzun hasta sağkalımı ile ilişkili olduğu görülmüştür. Hasta verilerinin deneysel olarak incelenmesi için ise miR-3977’nin üçlü negatif meme kanserindeki bazal ekspresyon seviyesi incelenmiştir. Üçlü negatif ve üçlü

negatif olmayan meme kanseri hücre hatları ile normal meme epitel hücre hatlarında qRT-PCR analizi sonucu miR-3977'nin üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarındaki ekspresyon seviyesinin normal meme epitel hücre hatlarına kıyasla anlamlı derecede oldukça düşük olduğu bulunmuştur. Kontrol olarak siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerin yanıtları değerlendirilmiştir. Bu mRNA seviyesindeki düşüşün protein seviyesindeki karşılığının anlaşılması için Western Blot analizi yapılmış ve qRT-PCR verilerini destekler şekilde miR-3977 seviyesi artmış üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 hedef genlerinin protein seviyelerinin de baskılandığı görülmüştür. Kontrol olarak yine siRNA transfeksiyon yöntemi kullanılmıştır. Tüm bu veriler ışığında çalışmamızda TNBC'de tümör süpresör davranışa sahip olabileceğine inanılan ve daha önce çalışılmamış bu miRNA'nın moleküler mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmıştır.

Üçlü negatif meme kanserinde hücre proliferasyonu üzerindeki prognozitik etkisi bilinen hedef genlerin baskılanmasını sağlayan miR-3977'un etkisinin incelenmesi için klonojenik analiz yapılmıştır. Sonuçta hedef genlerin susturulması ile koordineli olarak artan miR-3977 ekspresyonunun hücre proliferasyonunu anlamlı şekilde baskıladığı bulunmuştur. Bu proliferasyon inhibisyonunun apoptoz aracılıklı hücre ölümünden kaynaklanıp kaynaklanmadığını incelemek üzere yapılan Annexin V/ PI analizi sonucu miR-3977'nin üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde apoptozu tetiklediği anlaşılmıştır. Ayrıca bu hücrelerin G1/S hücre döngüsü kontrol noktasında tutulduğu ve S fazına geçişinin engellediği de görülmüştür.

miR-3977'nin moleküler etkilerini daha fazla incelemek adına migrasyon ve invazyon denemeleri ile çalışmalar devam etmiştir. Buradaki sonuçlar da hedef genlerin siRNA aracılıklı veya miR-3977 ekspresyon artışı ile susturulmasının üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin migrasyon ve invazyon yeteneklerini anlamlı şekilde baskıladığını göstermiştir.

İn vitro da elde edilen bu sonuçların in vivo da benzer etkileri oluşturup oluşturmadığının incelenmesi için ortotopik MDA-MB-231 ksenogref fare modellerinde çalışmalar sürdürülmüştür. Sonuçta in vivo verilerin önceki verileri desteklediği bulunmuştur. Sistemik olarak miR-3977 uygulaması (intravenöz olarak) yapılan farelerde davranış ve yeme alışkanlıklarında herhangi bir değişikliğin olmadığı, ayrıca oluşan tümör hacimlerinin kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde küçük olduğu saptanmıştır. Dahası, bu tümörlerle yapılan Western Blot

alışmalarında eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 hedef genlerin ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna gore azaldığı, G1/S hücre döngüsü kontrol moleküllerinden biri olan Siklin D1'in ekspresyonunun bir miktar arttığı, migrasyon ve invazyon tanı molekülleri olan p-FAK ve p-Src'nin ifadesinin bir miktar azaldığı ve apoptoz yolağında yer alan Caspase 9'un paralanmasının arttığı görlmüştür. Bu veriler miR-3977'nin eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 genlerini baskılayarak ortotopik TNBC fare modellerinde tümör büyümesini, invazyonu ve migrasyonu inhibe ettiğini göstermektedir.

Katı tümörlerde immunoterapi yaklaşımları istenilen düzeyde başarıya sahip değildir. Her ne kadar spesifik antijen hedefleme yöntemleri (KAR gibi geliştirilen yeni teknolojiler) ile lösemi gibi katı olmayan tümörler üzerinde umut vaat edici sonuçlara ulaşıldıysa da, katı tümörler için hala geliştirilmeye ihtiyaç duymaktadırlar. Bu nedenle, araştırmamızın son aşamasında miR-3977'nin, üçlü negatif meme kanserindeki tümör baskılayıcı özelliğinin yanı sıra PD-L1'in veya diğerk hedeflediğı genleri baskılanmasına bağılı olarak NK aracılıklı bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri de araştırmıştır. Bunun için kanser hücrelerinin doğıal bağışıklık sistemine ait kordon bağından elde edilmiş doğıal öldürücü hücreler veya NK-92 doğıal öldürücü hücre hattı ile birlikte kültrlenmesi gerekleştirilmiştir. Hücrelerdeki ölm miktarı diğerk bir değıişle doğıal öldürücü hücrelerin sitotoksik aktivitelerinin tespiti Krominyum 51 analizi ile değıerlendirilmiştir. Sonuç olarak üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında artan miR-3977 ifadesinin hem kordon bağından izole edilen doğıal öldürücü hücrelerin hem de NK-92 doğıal öldürücü hücre hattı hücrelerinin sitotoksik aktivitelerini arttığı bulunmuştur. Bu etkinin PD-L1 inhibisyonu aracılıklı olup olmadığının değıerlendirilmesi için yaptığımız siR-EF2K, siR-FOXM1 ve siR-PDL1 testleri sonucunda ise doğıal öldürücü hücrelerinin sitotoksik aktivite artışının beklendiğı üzere sadece PD-L1 baskılanmasından kaynaklanmadığı, EF2K veya FOXM1 genlerinin susturulmasının da doğıal öldürücü hücrelerinin sitotoksik aktivitelerini arttığına dair ilk kanıtlara ulaşılmıştır.

Sonuç olarak alışmamızda kanser hücrelerinin sıklıkla karşılaştığı besin ve oksijen yokluğu gibi stres koşullarında, hücrelerdeki programlanmış hücre ölm mekanizmalarının aktivasyonunu engelleyerek karsinogenez sürecinin ilerlemesine destek verdiğı bilinen eEF2K'nın ve EF2K'nın yukarı regülasyonunda yer alan ve yüksek onkogenik özelliğı sahip olduğı bilinen FOXM1 transkripsiyon faktörünün post-transkripsiyonel seviyede baskılanması sonucu kanser hücrelerdeki apoptoz

mekanizmalarının tekrar aktive edildiği, kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyon yeteneğinin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca PD-L1 ekspresyonu sayesinde immün bağışıklık sistemi hücrelerinden kaçmayı başaran bu meme kanseri hücrelerinde PD-L1 gen ekspresyonunun baskılanması sonucu kanser hücrelerinin doğal öldürücü hücreler tarafından tanınmasının ve fagolitik yıkım ile ortadan kaldırılması da mümkün kılınmıştır. Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde miR-3977 tabanlı gen susturulmasının TNBC'ye karđı potansiyel bir tedavi stratejisi olabileceğine inanılmaktadır.

Dahası, daha önce üçlü negatif meme kanseri hücreleriyle yapılan hiçbir çalışmada miR-3977'nin işlevi gösterilmemiş, miR-3977'nin eEF2K, PD-L1 ve FOXM1 regölasyonundaki rolü daha önce araştırılmamıştır. Ayrıca daha önce miR-3977 ile üçlü negatif meme kanserinde NK hücresi aracılı sitotoksositeye dair bir araştırma da gerçekleştirilmemiştir. Dahası çalışmamız eEF2K, PD-L1 ve FOXM1 baskılanmasının immün yanıt aktivasyonuna neden olabildiğini gösteren ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Bu açıdan projemizin yüksek özgün degere sahip olduğuna ve literatürdeki büyük bir eksikliği doldurarak gelecek çalışmalara temel oluşturaçağına inanılmaktadır.

8. SONUÇLAR

Çalışmamız, hem kanser hücrelerinde programlanmış hücre ölüm mekanizmalarının yeniden aktivasyonunu hem de NK aracılıklı immün yanıtı aktive ederek karsinogenez sürecinin durdurulmasını ve var olan tümör hücrelerinin yıkımını sağlanmasını miRNA aracılıklı ncRNA terapi ile birlikte yürüten ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Bulgularımız eEF2K, FOXM1 ve PD-L1 sinyal yollarının üçlü hedeflenmesiyle miR-3977'nin tümör baskılayıcı rolü hakkında ilk bilgileri sağlamaktadır. Kanser hücrelerinin metabolik stres ortamlarına adaptasyonunu ve ilerlemesini katalizleyen eEF2K ve oldukça güçlü bir onkogen olan FOXM1 moleküllerinin miR-3977 aktivasyonu ile baskılanması, üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu baskılayarak tümör gelişimini azaltmıştır. miR-3977 yüksek ekspresyonu ayrıca üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin immün sistem elemanlarından saklanması sağlayan PD-L1 sentezini de baskılayarak diğer hedef genlerin de inhibisyonu ile birlikte NK-92 ve CBNK hücrelerinin sitotoksik etkisini arttırmaktadır. Diğer bir söyleyiş ile miR-3977 uygulması, TNBC'de tümör büyümesini azaltan ve ayrıca NK aracılı immün yanıt aktivitesini indükleyen potansiyel bir terapötik stratejidir. Tek tedavi yöntemi olarak kemoterapi kullanılan ve en agresif meme kanseri türlerinden biri olan üçlü negatif meme kanseri için kemoterapinin yan etkilerini taşımayan yeni ve etkin bir terapötik strateji olarak miR-3977 bazlı gen terapisinin yararlı olabileceğine inanılmaktadır.

Ayrıca elde ettiğimiz verilerin üçlü negatif meme kanseri başta olmak üzere eEF2K, FOXM1 ve PD-L1'i yüksek seviyede eksprese eden çeşitli doku hastalıklarına karşı yeni tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine, yeni moleküler hedeflerin tanımlanmasına, biyolojik molekül temelli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine (RNAi, oligonükleotidler, peptidler gibi), hedef spesifik yeni ilaç moleküllerinin tasarlanıp elde edilmesine katkıda bulunacağına inanılmaktadır. Özellikle kanser tedavilerinde yeni metodoloji olarak benimsenen kişiye özgü tedavi uygulamalarının geliştirilmesiyle ilgili yürütülen çalışmalar için sonuçlarımızın temel oluşturacağına

inanmaktayız. Böylelikle miR-3977 ile ulaşılan çoklu etkinin yalnız veya geniş uygulama alanları olan diğ er terap otik ajanlarla k orele olarak kullanılmasının klinik uygulamalarda oldukça efektif sonuçlar doğuracağı d üş n lmektedir. Bunlara ek olarak bu regülasyon ve ilişkilendirme yaklaşımı çerçevesinde gerçekleştirilecek yeni projeler ile sadece   l  negatif meme kanseri üzerinde değıl, aynı zamanda hormon bağımsız gelişim gösteren diğ er kanser türlerinin tedavi yöntemlerinin araştırılmasına da yardımcı olunacağı, böylece birçok kanser türü için geliştirilmeye çalışılan yeni terap otik yaklaşımların tasarlanmasında temel teşkil edeceğı d üş n lmektedir.

9. KAYNAKLAR

Agarwal S, Bell CM, Rothbart SB, et al. AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Control of mTORC1 Is p53- and TSC2-independent in Pemetrexed-treated Carcinoma Cells. *J Biol Chem* 2015;290:27473-86.

Alberti C, Cochella LA. framework for understanding the roles of miRNAs in animal development. *Development*. 2017;144:2548-2559. doi: 10.1242/dev.146613.

Akbani R, Becker KF, Carragher N, Goldstein T, Koning L, Korf U, Liotta L. Realizing the Promise of Reverse Phase Protein Arrays for Clinical, Translational, and Basic Research: A Workshop Report. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2014;13(7):1625-1643.

American Cancer Society. 2019. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2019-2020.pdf>.

Ames E, Hallett WH, Murpy WJ. Sensitization of human breast cancer cells to natural killer cell-mediated cytotoxicity by proteasome inhibition. *Clinical and Experimental Immunology*. 2009;155(3):504-513.

Ames E, Murphy WJ. Advantages and clinical applications of natural killer cells in cancer immunotherapy. *Cancer Immunology and Immunotherapy*. 2014;63(1):21-8.

Arai S, Meagher R, Swearingen M, Myint H, Rich E, Martinson J, Klingemann H. Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy*. 2008;10(6):625-632.

Arina A, Murillo O, Dubrot J, Azpillikueta A, Alfaro C, Pérez-Gracia JL, Bendandi M, Palencia B, Hervás-Stubbs S, Melero I. Cellular liaisons of natural killer lymphocytes in immunology and immunotherapy of cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2007;5(5):599-615.

Ashour AA, Abdel-Aziz AA, Mansour AM, Alpay SN, Huo L, Ozpolat B. Targeting elongation factor-2 kinase (eEF-2K) induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Apoptosis*. 2014;19(1):241-258.

Balacescu O, Visan S, Baldasici O, Balacescu L, Vlad C, Achimas-Cadariu P. miRNA-Based Therapeutics in Oncology, Realities, and Challenges. *Antisense Therapy*. 2018. doi: 10.5772/intechopen.81847.

Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front. Immunol*. 2016;7:550. doi: 10.3389/fimmu.2016.00550.

Barsoum IB, Hamilton TK, Li X, Cotechini T, Miles EA, Siemens DR, Graham CH. Hypoxia Induces Escape from Innate Immunity in Cancer Cells via Increased Expression of ADAM10: Role of Nitric Oxide. *Cancer Research*. 2011;71(24):7433-7441.

Barsotti AM, Prives C. Pro-proliferative FoxM1 is a target of p53-mediated repression. *Oncogene*. 2009;28:4295-305.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2014;116(2):281-97.

Bardia A, Diamond JR, Messersmith WA, Mayer IA, Isakoff SJ, Abramson VG, Berlin J, Starodub A, O'Shaughnessy J, Kalinsky K, et al. Therapy of relapsed/refractory metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC) with an anti-Trop-2-SN-38 antibody-drug conjugate (ADC), sacituzumab govitecan (IMMU-132): Phase II results. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2016;34.

Bayraktar S, Gluck S. Molecularly targeted therapies for metastatic triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013; 138:21-35.

Bayraktar R, Pichler M, Kanlikilicer P, Ivan C, Bayraktar E, Kahraman N, Aslan B, Oguztuzun S, Ulasli M, Arslan A, Calin G, Lopez-Berestein G, Ozpolat B. MicroRNA-603 acts as a tumor suppressor and inhibits triple-negative breast cancer tumorigenesis by targeting elongation factor 2 kinase. *Oncotarget*. 2017;8(7):11641-11658.

Bayraktar R, Ivan C, Bayraktar E, Kanlikilicer P, Nashwa N. Kabil, Kahraman N, Hamada A. Mokhlis, Didem Karakas, Cristian Rodriguez-Aguayo, Aslan B, Jianting Sheng, Stephen Wong, Gabriel Lopez-Berestein, Calin G, Ozpolat B. Dual Suppressive Effect of miR-34a on the FOXM1/eEF2-Kinase Axis Regulates Triple-

Negative Breast Cancer Growth and Invasion. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(17):4225-4241.

Bodduluru LN, Kasala ER, Madhana RM, Sriram CS. Natural killer cells: the journey from puzzles in biology to treatment of Cancer. *Cancer Letters*. 2015;357(2):454-467.

Braun DA, Burke KP, Van Allen EM. Genomic Approaches to Understanding Response and Resistance to Immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2016;22:5642-5650.

Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(29):7350-7360.

Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW, Pasquinelli AE. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Molecular Cell*. 2006. doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.004.

Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6(11):857-66.

Castriconi R, Cantoni C, Chiesa MD, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: Consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA*. 2003;100(7):4120-4125.

Chan DW, Yu SYM, Chiu PM, Yao KM, Liu VWS, Cheung ANY, Ngan HYS. Over-expression of FOXM1 transcription factor is associated with cervical cancer progression and pathogenesis. *The Journal of Pathology*. 2008;215(3):245-252. doi:10.1002/path.2355.

Chen Z, Gopalakrishnan SM, Bui MH, Soni NB, Warrioi U, Johnson EF, Donnelly JB, Glaser KB. 1-Benzyl-3-cetyl-2-methylimidazolium iodide (NH125) induces phosphorylation of eukaryotic elongation factor-2 (eEF-2): a cautionary note on the anticancer mechanism of an eEF-2 kinase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(51):43951-43958.

Chen W, Cai F, Zhang B, Barekati Z, Zhong XY. The level of circulating mirna-10b and mirna-373 in detecting lymph node metastasis of breast cancer: potential biomarkers. *Tumour Biology*. 2013;34(1):455-62.

Chen W, Fan XM, Mao L, Zhang JY, Li J, Wu JZ, Tang JH. MicroRNA-224: as a potential target for miR-based therapy of cancer. *Tumor Biology*. 2015;36(9):6645-6652.

Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J Clin Invest*. 2015;125:3384-3391.

Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Molecular Immunology*. 2013;10(3):230-52.

Cheng Y, Ren X, Zhang Y, Shan Y, Huber-Keener KJ, Zhang L, Kimball SR, Harvey H, Jefferson LS, Yang JM. Integrated Regulation of Autophagy and Apoptosis by eEF2K Controls Cellular Fate and Modulates The Efficacy of Curcumin and Velcade Against Tumor Cells. *Autophagy*. 2013;9(2):208-219.

Chin YR, Yoshida T, Marusyk A, Beck AH, Polyak K, Toker A. Targeting AKT-3 signaling in triple-negative breast cancer. *Cancer Research*. 2013;74(3):964-973.

Davis-Dusenbery BN, Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *Journal of Biochemistry*. 2010. doi.org/10.1093/jb/mvq096.

De Rie D, Abugessaisa I, Alam T, Arner E, Arner P, Ashoor H, De Hoon MJL. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nature Biotechnology*. 2017. doi.org/10.1038/nbt.3947.

Della Chiesa M, Cariomagno S, Frumento G, Balsamo M, Cantoni C, Conte R, Moretta L, Moretta A, Vitale M. The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood*. 2006;108(13):4118-4125.

Derman S, Kızılbey K, Akdeste ZM. Polymeric Nanoparticles. *Journal of Engineering and Natural Sciences*. 2013;31:109-122.

DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics. *CA: A Cancer Journal of Clinicians*. 2014;64(1):52-62.

Disis ML, Stanton SE. Triple-Negative Breast Cancer: Immune Modulation as the New Treatment Paradigm. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2015;35:25-30.

Drake CG, Lipson EJ, Brahmer JR. Breathing New Life Into Immunotherapy: Review of Melanoma, Lung And Kidney Cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2014;11(1):24-37.

Dua I, Tan AR. Immunotherapy for triple-negative breast cancer: a focus on immune checkpoint inhibitors. *American Journal of Hematology/Oncology*. 2017;13(4):20-27.

Emens LA, Braiteh FS, Cassier P, DeLord JP, Eder JP, Shen X, Xiao Y, Wang Y, Hegde PS, Chen DS, et al. Inhibition of PD-L1 by MPDL3280A leads to clinical activity in patients with metastatic triple-negative breast cancer. Paper presented at: AACR Annual Meeting (Pennsylvania). 2015.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6(4):259-69.

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh LW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*. 2013;49(6):1374-403.

Finn RS, Dering J, Ginther C, Wilson CA, Glaspy P, Tchekmedyian N, Slamon DJ. Dasatinib, An Orally Active Small Molecule Inhibitor of Both The Src and Abl Kinases, Selectively Inhibits Growth of Basal-Type/'Triple-Negative' Breast Cancer Cell Lines Growing In Vitro. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2007;105(3):319-326.

Friedländer MR, Lizano E, Houben AJS, Bezdan D, Báñez-Coronel M, Kudla G, Estivill X. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biology*. 2014. doi.org/10.1186/gb-2014-15-4-r57.

Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2010;363(20):1938-48.

Fu LL, Xie T, Zhang SY, Liu B. Eukaryotic elongation factor-2 kinase (eEF-2K): a potential therapeutic target in cancer. *Apoptosis*. 2014;19(10):1527-1531.

Gatza ML, Lucas JE, Barry WT, Kim JW, Wang Q, Crawford MD, Datto MB, Kelley M, Mathey-Prevot B, Potti A, Nevins JR. A pathway-based classification of human breast cancer, *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA*. 2010;107(15):6994-6999.

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2315-9.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of Immunology*. 1984;133(4):1710-15.

Geiger TL, Sun JC. Development and maturation of natural killer cells. *Current Opinion in Immunology*. 2016;39:82-89.

Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med*. 2015;21:938-45.

Gilbert DF, Boutros M. A protocol for a high- throughput multiplex cell viability assay. *Methods in Molecular Biology*. 2016;1470:75-84.

Gillgrass A, Ashkar A. Stimulating natural killer cells to protect against cancer: recent developments. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2011;7(3):367-382.

Giry-Laterrière M, Verhoeven E, Salmon P. Lentiviral Vectors. In: Merten OW., Al-Rubeai M. (Ed.) *Viral Vectors for Gene Therapy*. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Humana Press. 2011;(737):183-209.

Gismondi A, Caldarola S, Lisi G, Juli G, Chellini L, Iadevaia V, Proud CG, Loreni F. Ribosomal stress activates eEF2K–eEF2 pathway causing translation elongation inhibition and recruitment of Terminal Oligopyrimidine (TOP) mRNAs on polysomes. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(20):12668-12680.

Gonzalez-Rodriguez AP, Villa-Álvarez M, Sordo-Bahamonde C, Lorenzo-Herrero S, Gonzalez S. NK Cells in the Treatment of Hematological Malignancies. *J. Clin. Med*. 2019;8:1557.

Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Experimental Cell Research*. 1993;207(1):202-205. doi:10.1006/excr.1993.1182.

Gould SJ, Subramani S. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Analytical Biochemistry*. 1988;175(1):5-13.

Guillerey C, Huntington N, Smyth M. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat Immunol*. 2016;17:1025–1036. <https://doi.org/10.1038/ni.3518>.

Günel, T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR". *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2007;27(5):763-767.

Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014. doi.org/10.1038/nrm3838.

Halasi M, Gartel AL. FOX(M1) News--It Is Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2013;12:245-54.

Hamilton G, Reiner A, Teleky B, Roth E, Kolb R, Spona J, Jakesz R. Natural killer cell activities of patients with breast cancer against different target cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1988;114(2):191-196.

Hamurcu Z, Kahraman N, Ashour A, Ozpolat B. FOXM1 Transcriptionally Regulates Expression of Integrin β 1 in Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Cancer Research Treatment*. 2017;163(3):485-493.

Hartman ZC, Poage GM, Hollander PD, Tsimelzon A, Hill J, Panupinthu N, Zhang Y, Mazumdar A, Hilsenbeck SG, Mills GB, et al. Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer Res*. 2013; 73:3470-3480.

He L, Hannon GJ. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*. 2004. doi.org/10.1038/nrg1379.

Hizli AA, Chi Y, Swanger J, Carter JH, Liao Y, Welcker M, Ryazanov AG, Clurman BE. Phosphorylation of Eukaryotic Elongation Factor 2 (eEF2) by Cyclin A-Cyclin-Dependent Kinase 2 Regulates Its Inhibition by eEF2 Kinase. *Mol Cell Biol*. 2012;33(3):596-604.

Ho CJ, Gorski SM. Treatment response in triple-negative breast cancer: a role for eEF2 kinase-mediated autophagy? *Annals of Translational Medicine*. 2019;8(9):572.

Hwang MS, Yu N, Stinson SY, Yue P, Newman RJ, Allan BB, Dorman D. MiR-221/222 targets adiponectin receptor 1 to promote the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *PLoS One*. 2013;8(6):e66502.

Huang L, Dai T, Lin X, Zhao X, Chen X, Wang C, Li X, Shen H, Wang X. MicroRNA-224 targets RKIP to control cell invasion and expression of metastasis genes in human breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012;425(2):127-133.

James AM, Cohen AD, Campbell KS. Combination immune therapies to enhance anti-tumor responses by NK cells. *Frontiers in Immunology*. 2013;4:481. doi:10.3389/fimmu.2013.00481.

Johanns M, Pyr Dit Ruys S, Houddane A, et al. Direct and indirect activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase by AMP-activated protein kinase. *Cell Signal* 2017;36:212-21.

Karaboz I, Kayar E, Akar S. Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. *OrLab On-Line Microbiology Journal*. 2008;06(2):01-08.

Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *EMBO Journal*. 2007. doi.org/10.1038/sj.emboj.7601512.

Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011;13:132-41.

Koo CY, Muir KW, Lam EWF. FOXM1: From cancer initiation to progression and treatment. *Gene Regulatory Mechanisms*. 2012;1819(1):28-37. doi: 10.1016/j.bbagr.2011.09.004.

Landen CN Jr, Chavez-Reyes A, Bucana C, Schmandt R, Deavers MT, Lopez-Berestein G, Sood AK. Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Res*. 2005;65(15):6910-8.

Laoukili J, Stahl M, Medema RH. FoxM1: At the crossroads of ageing and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1775:92-102.

Lee, R C, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2011. doi.org/10.1126/science.1065329.

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121:2750-2767.

Li Q, Wang G, Shan JL, Yang ZX, Wang HZ, Feng J, Zhen JJ, Chen C, Zhang ZM, Xu W, Luo XZ, Wang D. MicroRNA-224 is upregulated in HepG2 cells and involved in cellular migration and invasion. *Journal of Gastroenterology Hepatology*. 2010;25(1):164-71.

Li SC, Chan WC, Hu LY, Lai CH, Hsu CN, Lin W. Identification of homologous microRNAs in 56 animal genomes. *Genomics*. 2010. doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.03.009.

Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: Roles beyond cell cycle regulation. *Development*. 2013;140:3079-93. doi:10.1242/dev.091744.

Liu Y, Wu HW, Sheard MA, Sposto R, Somanchi SS, Cooper LJN, Lee DA, Seeger RC. Growth and Activation of Natural Killer Cells Ex Vivo from Children with Neuroblastoma for Adoptive Cell Therapy. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(8): 2132-2143.

Liu JC, Voisin V, Wang S, Wang D, Jones RA, Datti A, Uehling D, Al-awar R, Egan SE, Bader GD, Tsao M, Mak TW, Zacksenhaus E. Combined deletion of Pten and p53 in mammary epithelium accelerates triple-negative breast cancer with dependency on eEF-2K. *EMBO Molecular Medicine*. 2014;6(12):1542-1560.

Liu F, Liu Y, Shen J, Zhang G, Han J. MicroRNA-224 inhibits proliferation and migration of breast cancer cells by down-regulating fizzled 5 expression. *Oncotarget*. 2016;7(31):49130-49142.

Liu R, Proud C. Eukaryotic elongation factor 2 kinase as a drug target in cancer, and in cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2016;37:285-294. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.123>.

Liu Z, Li M, Jiang Z, Wang X. A Comprehensive Immunologic Portrait of Triple-Negative Breast Cancer. *Translational Oncology*. 2018;11(2):311-329.

Lozano GM, Bejarano I, Espino J, González D, Ortiz A, García JF, Rodríguez AB, Pariente JA. Density gradient capacitation is the most suitable method to improve fertilization and to reduce DNA fragmentation positive spermatozoa of infertile men. *Anatolian Journal of Obstetrics ve Gynecology*. 2009-a;3(1):1-7.

Lozano GM, Bejarano I, Espino J, González D, Ortiz A, García JF, Rodríguez AB, Pariente JA. Relationship between Caspase Activity and Apoptotic Markers in Human Sperm in Response to Hydrogen Peroxide and Progesterone. *Journal of Reproduction and Development*. 2009-b;55(6):615-621.

Luna LG. (Ed.) *A Manual of Histological Staining Techniques of the Armed Forces Institute of Pathology*. Blakiston Division, McGraw-Hill. 1968.

Lundqvist A, Abrams SI, Schrupp DS, Alvarez G, Suffredini D, Berg M, Childs R. Bortezomib and depsipeptide sensitize tumors to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a novel method to potentiate natural killer cell tumor cytotoxicity. *Cancer Research*. 2006;66(14):7317-7325.

Mahmood T, Yang PC. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 2012;4(9):429-434.

Makarova KS, Zhang F, Koonin EV. SnapShot: Class 1 CRISPR-Cas Systems. *Cell*. 2017;168(5):946-946. doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.018.

Malmberg KJ, Bryceson YT, Carsten M, Andersson S, Björklund A, Björkström NK, Baumann BC, Fauriat C, Alici E, Dilber MS, Ljunggren HG. NK cell-mediated targeting of human cancer and possibilities for new means of immunotherapy. *Cancer Immunology and Immunotherapy*. 2008;57(10):1541-1552.

Mamassier E, Sylvain A, Thibault ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, Gonçalves A, André P, Romagné F, Thibault G, Viens P, Birnbaum D, Bertucci F, Moretta A, Olive D. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(9):3609-3622.

Mayer IA , Abramson VG , Lehmann BD, Pietenpol JA. New strategies for triple-negative breast cancer--deciphering the heterogeneity. *Clin Cancer Res*. 2014;20:782-790.

McArthur HL. Checkpoint inhibitors in breast cancer: hype or promise? *Clinical Advances in Hematology and Oncology*. 2016;14(6):392-395.

Mittal D, Vijayan D, Smyth MJ. Overcoming Acquired PD-1/PD-L1 Resistance with CD38 Blockade. *Cancer Discov*. 2018;(8):1066-1068. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0798.

Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, Su X, Gonzalez-Angulo AM, Akcakanat A, Chawla A, Curran M, Hwu P, Sharma P, Litton JK, Molidrem JJ, Alatrash G. PD-L1 Expression in Triple-Negative Breast Cancer, *Cancer Immunology Research*. 2014;2(4):361-370.

Moore CEJ, Wang X, Xie J, et al. Elongation factor 2 kinase promotes cell survival by inhibiting protein synthesis without inducing autophagy. *Cell Signal*. 2016;28:284-93.

Nahta R. Molecular Mechanisms Of Trastuzumab-Based Treatment In HER2-Overexpressing Breast Cancer. *ISRN Oncology*. 2012;428062. doi:10.5402/2012/428062.

Nanda R, Chow LQ, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, Pusztai L, Pathiraja K, Aktan G, Cheng JD, et al. Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2016;34:2460-2467.

Newman PJ, Bernt MC, Gorski J, White GC, Lyman S, Paddock C, Muller WA. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*. 1990;247(4947):1912-22.

Nowicki TS, Hu-Lieskovan S, Ribas A. Mechanisms of Resistance to PD-1 and PD-L1 Blockade. *Cancer Journal* (Sudbury, Mass.). 2018;24(1):47-53. doi:10.1097/PPO.0000000000000303.

Olaru AV, Yamanaka S, Vazquez C, Mori Y, Cheng Y, Abraham JM, Bayless TM, Harpaz N, Meltzer SJ. MicroRNA-224 negatively regulates p21 expression during late neoplastic progression in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2003;19(3):471-80.

O'Donnell JS, Long GV, Scolyer RA, Teng MWL, Smyth MJ. Resistance to PD1/PDL1 Checkpoint Inhibition. *Tumour Review*. 2017;52:71-81. doi:10.1016/j.ctrv.2016.11.007

O'Mahony FC, Nanda J, Laird A, Mullen P, Caldwell H, Overton IM, Eory L, O'Donnell M, Faratian D, Powles T, Harrison DJ, Stewart GD. The Use of Reverse Phase Protein Arrays (RPPA) to Explore Protein Expression Variation within Individual Renal Cell Cancers. *Journal of Visualized Experiments*. 2013;71:50221. doi:10.3791/50221.

Öztürk I. (2011). WNT gen ekspresyon düzeyinin apoptotik uyarı verilmiş hücrelerde araştırılması. (Yayınlanmamış yüksek lisans tezi). Dokuz Eylül Üniversitesi/Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İzmir. Tez Kodu: DEU.HSI.MSc-2008970068.

Pandit B, Halasi M, Gartel AL. p53 negatively regulates expression of FoxM1. *Cell Cycle*. 2009;8:3425-7.

Parkhurst MR, Riley JP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clinical Cancer Research*. 2011;17:6287-97.

Pasero C, Gravis G, Grandjeaud S, Guerin M, Thomassin-Piana J, Rocchi P, Salem N, Walz J, Moretta A, Olive D. Highly effective NK cells are associated with good prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Oncotarget*. 2015;6(16):14360-73.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000. doi.org/10.1038/35040556.

Pilarsky C, Wenzig M, Specht T, Saeger HD, Grutzmann R. Identification and validation of commonly overexpressed genes in solid tumors by comparison of microarray data. *Neoplasia*. 2004;6:744-50.

Ren D, Hua Y, Yu B, Ye X, He Z, Li C, Wang J, Mo Y, Wei X, Chen Y, Zhou Y, Liao Q, Wang H, Xiang B, Zhou M, Li X, Li G, Li Y, Zeng Z, Xiong W. Predictive biomarkers and mechanisms underlying resistance to PD1/PD-L1 blockade cancer immunotherapy. *Molecular Cancer*. 2020; 19:19. doi:10.1186/s12943-020-1144-6.

Sakamoto N, Ishikawa T, Kokura S, Okayama T, Oka K, Ideno M, Sakai F, Kato A, Tanabe M, Enoki T, Mineo J, Naito Y, Itoh Y, Yoshikawa T. Phase I clinical trial of autologous NK cell therapy using novel expansion method in patients with advanced digestive cancer. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13:277.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*. 2000;182(3):311-22.

Shenouda MM, Gillgrass A, Nham T, Hogg R, Lee AJ, Chew MV, Shafaei M, Aarts C, Lee DA, Hassell J, Bane A, Dhesy-Thind S, Ashkar AA. Ex vivo expanded natural killer cells from breast cancer patients and healthy donors are highly cytotoxic against breast cancer cell lines and patient-derived tumours. *Breast Cancer Research*. 2017;19:76. doi:10.1186/s13058-017-0867-9.

Shi J, Tricot GJ, Malaviarachchi PA, Szmania SM, Kellum RE, Storrie B, Mulder A, Shaughnessy JD Jr, Barlogie B, Van Rhee F. Bortezomib down-regulates the cell-surface expression of HLA class I and enhances natural killer cell-mediated lysis of myeloma. *Blood*. 2008;111(3):1309-17.

Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nature Reviews Genetics*. 2002;2(11):850-852.

Sriwongsitanont S, Ueno M. Physicochemical Properties of PEG-Grafted Liposomes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2001;50(9):1238-1244.

Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Stivala F, Mazzarino MC, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Nicoletti F, Libra M, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Bäsecke J, Cocco L,

Evangelisti C, Martelli AM, Montalto G, Cervello M, McCubrey JA. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(3):192-222.

Sun WY, Lee YK, Koo JS. Expression of PD-L1 in triple-negative breast cancer based on different immunohistochemical antibodies. *Journal of Translational Medicine*. 2016;14(1):173-185.

Sutlu T, Alici E. Natural killer cell-based immunotherapy incancer: Current insights and future prospects. *Journal of Internal Medicine*. 2009;266(2):154-181.

Tanic M, Yanowsky K, Rodriguez-Antona C, Andrés R, Márquez-Rodas I, Osorio A, Benitez J, Martinez-Delgado B. Deregulated miRNAs in hereditary breast cancer revealed a role for miR-30c in regulating KRAS oncogene. *PLoS One*. 2012;7(6):e38847.

Tan Y, Wang Q, Xie Y, Qiao X, Zhang S, Wang Y, Yang Y, Zhang B. Identification of FOXM1 as a specific marker for triple-negative breast cancer. *Int J Oncol*. 2019; 54(1):87-97. doi: 10.3892/ijo.2018.4598.

Tavares CDJ, O'Brien FP, Abramcczk O, Devkota AK, Shores KS, Ferguson SB, Kaoud TS, Warthaka M, Marshall KD, Keller KM, Zhang Y, Broudbelt JS, Ozpolat B, Dalby KN. Calcium/Calmodulin Stimulates the Autophosphorylation of Elongation Factor 2 Kinase on Thr-348 and Ser-500 To Regulate Its Activity and Calcium Dependence. *Biochemistry*. 2012;51(11):2232-2245.

Tekedereli I, Alpay SN, Tavares CDJ, Cobanoglu ZE, Kaoud TS, Sahin I, Sood AK, Lopez-Berestein G, Dalby KN. Targeted Silencing of Elongation Factor 2 Kinase Suppresses Growth and Sensitizes Tumors to Doxorubicin in an Orthotopic Model of Breast Cancer. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e41171. doi:10.1371/journal.pone.0041171.

Terunuma H, Deng X, Dewan Z, Fujimoto S, Yamamoto N. Potential role of NK cells in the induction of immune responses: implications for NK cell-based immunotherapy for cancers and viral infections. *International Reviews of Immunology*. 2008;27(3):93-110.

Terzioğlu G, Keskin AÜ, Yanıkkaya Demirel G. Measurement Methods of Cell Proliferation and a Comparison of Various Commercial Proliferation Kits. *Turkish Journal of Immunology*. 2013;1(3):74-89.

Thornthwaite JT. The Immune System and The Natural Killer Cells. CRI-FHC Newsetters. 2001;4(2):1-4.

Tokur O, Aksoy M. In vivo Sitotoksiste Testleri. Harran Universitesi Veterinerlik Fakultesi Dergisi. 2017;6(1):112-118.

Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. Cancer Cell. 2015;27:450-461.

Traina TA, Miller K, Yardley DA, O'Shaughnessy J, Cortes J, Awada A, Kelly CM, Trudeau ME, Schmid P, Gianni L, et al. Results from a Phase 2 study of enzalutamide (ENZA), an androgen receptor (AR) inhibitor, in advanced AR+ triple-negative breast cancer (TNBC). J Clin Oncol, 33 (2015).

Uwatoko H, Hama Y, Iwata IT, Shirai s, Matsushima M, Yabe I, Utsumi J, Sasaki H. Identification of plasma microRNA expression changes in multiple system atrophy and Parkinson's disease. Molecular Brain. 2019;12:49. doi:10.1186/s13041-019-0471-2.

Vasudevan S. Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. 2012. doi.org/10.1002/wrna.121.

Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. Science. 2011;331(6013):44-49.

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt PL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proceeding of the National Academy of Sciences of USA. 2006;103(7):2257-61.

Wang C, Zheng X, Shen C, Shi Y. MicroRNA-203 suppresses cell proliferation and migration by targeting BIRC5 and LASP1 in human triple-negative breast cancer cells. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research. 2012;31(1):58-64.

Wang D, Stockard CR, Harkins L, Lott P, Salih C, Yuan K, Bunchsbaum D, Hashim A, Zayzafoon M, Hardy R, Hameed O, Grizzle W, Siegal GG. Immunohistochemistry in the evaluation of neovascularization in tumor xenografts. Biotechnic and Histochemistry. 2008;83(0):179-189.

Wang X, Regufe da Mota S, Liu R, et al. Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase Activity Is Controlled by Multiple Inputs from Oncogenic Signaling. *Mol Cell Biol* 2014;34:4088-103.

Wang X, Xie J, Proud CG. Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase (eEF2K) in Cancer. *Cancers (Basel)* 2017;9:162.

Wang X, Guda C. Integrative exploration of genomic profiles for triple negative breast cancer identifies potential drug targets. *Medicine*, 2016; 95:e4321.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993. doi:10.1016/0092-8674(93)90530-4.

Wu N, Zhang J, Zhao J, Mu K, Zhang J, Jin Z, Yu J, Liu J. Precision medicine based on tumorigenic signaling pathways for triple-negative breast cancer. *Spandidos Publications*. 2018;(1):4984-4996. doi:10.3892/ol.2018.9290.

Yang W, Lee DY, Ben-David Y. The roles of microRNAs in tumorigenesis and angiogenesis. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*. 2011;3(2):140-55.

Yörükoğlu K. Testis tümörlerinde prognozu belirleyen histopatolojik parametreler. *Üro-Patoloji*. 2011;(3):91-94.

Zardavas D, Baselga J, Piccart M. Emerging targeted agents in metastatic breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2013;10(4):191-210.

Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *American Journal of Pathology*. 2007;171(3):728-38.

Zhang Y, Cheng Y, Zhang L, Xingcong R, Huber-Keener KJ, Lee S, Yun J, Wang HG, Yang JM. Inhibition of eEF-2 kinase sensitizes human glioma cells to TRAIL and down-regulates Bcl-XL expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011;414(1):129-134.

Zhou K, Liu M, Cao Y. New Insight into microRNA Functions in Cancer: Oncogene-microRNA-Tumor Suppressor Gene Network. *Front Mol Biosci*. 2017;7(4):46.

10. EKLER

EK-1

Evrak Tarih ve Sayısı: 01/07/2019-E.54072



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



Sayı : 28233352-302.14.01-
Konu : Selda KARAMİL'in Tez Konusu Hk.

SBE TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Enstitümüz 28.06.2019 tarih ve 19/58 sayılı yönetim kurulu toplantısında, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı 141369003 numaralı öğrencisi Selda KARAMİL'in 29.09.2017 tarih ve 39/14 sayılı Yönetim Kurulu Kararında "**MikroRNA-224 (miRNA-224) ile Ökaryotik Uzama Faktörü-2 Kinazın (eEf-2K) ve Programlanmış Ölüm Ligandı-1 (PD-L1) Çift Hedeflemesinin Doğal Öldürücü Hücre (Natural Killer Cell) Tabanlı İmmünoterapi ile Üçlü Negatif Meme Kanseri Gelişimine Etkisinin Araştırılması**" olarak belirlenen tez konusunun, etik kurul onayı alınması kaydı ile "**MikroRNA ve Doğal Öldürücü Hücre (Natural Killer Cell) Temelli Kombine İmmünoterapi Yaklaşımının Üçlü Negatif Meme Kanseri Üzerindeki Etkisinin Araştırılması**" olarak değiştirilmesine **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi. Gereğini ve bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Bilal-i Habeş GÜMÜŞ
Enstitü Müdürü V.

Adres: Tıp Fakültesi Dekanlığı Zemin Kat Uncubozköy Kampüsü Manisa
Telefon: (0 236) 2360989 Faks: (0 236) 2382158
E-Posta: saglik.sekreterlik@cbu.edu.tr Elektronik Ağ: saglikbe.cbu.edu.tr

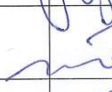
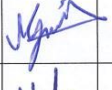
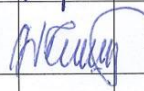
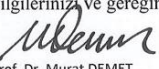
Bilgi İçin: Çisem Tutan (Ayşe Ertik
Vekaletiyle)
Unvanı: Bilgisayar İşletmeni

* B E N F E S A H M N *

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK- 2

T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu
Karar Formu

KARAR TARİH / NO	16/ 10 / 2019/ 20.478.486						
ARAŞTIRMANIN ADI	MikroRNA ve doğal öldürücü hücre (natural killer cell) temelli kombine immunoterapi yaklaşımının üçlü negatif meme kanseri üzerindeki etkisinin araştırılması						
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ- MCBÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji AD						
ARAŞTIRMA EKİBİ	Selda KARAMİL						
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ ☐		YÜKSEK LİSANS--DOKTORA TEZİ ☒			AKADEMİK AMAÇLI ☐	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	03 /10 / 2019 / Tarih ve 44966 Sayılı; dilekçe						
KARAR BİLGİLERİ	Dilekçeniz incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.						
Unvanı/Adı/Soyadı		Araştırma İle İlişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	Unvanı /Adı /Soyadı		Araştırma İle İlişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Murat DEMET Psikiyatri AD		☐	☐	Doç. Dr. Selhan ÖZBEY Spor Bilimleri Fakültesi		☐	☐
Prof. Dr. Betül ERSOY Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD		☐	☐	Dr. Öğr. Üyesi Selim ALTAN Tıp Tarihi ve Etik AD		☐	☐
Prof. Dr. Beyhan Cengiz ÖZYURT Halk Sağlığı AD		☐	☐	Doç. Dr. Nurgül Güngör TAVŞANLI Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik Bölümü		☐	☐
Prof. Dr. Pınar ÇELİK Göğüs Hastalıkları A.D.	-----	☐	☒	Mukadder YILMAZER Avukat		☐	☐
Prof. Dr. Ömer TETİK Kalp Damar Cerrahisi A.D.		☐	☐	Sivil Üye Hüseyin TUNÇAY		☐	☐
Doç. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU Farmakoloji AD	-----	☐	☒	-----	-----	☐	☐
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. <u>Araştırmanız Her Hangi Bir Aşamada Etik Kurulumuzun “İzleme – Denetleme” Görevi Gereği Lüzumu Halinde Haberli / Habersiz Olarak Denetlenebilir.</u> Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname – Bölüm E kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.  Prof. Dr. Murat DEMET Başkan							

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı
Başkanlığı'na

Tez Adı: MikroRNA ve Doğal Öldürücü Hücre (Natural Killer Cell) temelli kombine immünoterapi yaklaşımının Üçlü Negatif Meme Kanseri üzerindeki etkisinin araştırılması.

Tezime ilişkin 20/05/2020 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 7'dir.

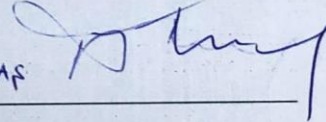
Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Tarih ve İmza
20.05.2020

Adı Soyadı : Selda Karamil
Öğrenci No : 141369003
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji
Programı : Tıbbi Biyoloji

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR.
(Unvan, Ad Soyad, İmza)

Doç. Dr. Hüseyin ALTINTAŞ



Açıklamalar

- 1-Tez Çalışması Orijinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.
- 2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır.(400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)
- 3-TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.
- Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.
- 4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süzülmesinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)
- 5-İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir; aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süre gerektirecektir.
- 6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu" formuna işlenir.
- 7- Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.
- 8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.
- 9-Turnitin Hakkında Bilgi: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Selda	Soyadı	KARAMIL
Doğum Yeri	İzmir	Doğum Tarihi	06.01.1988
Uyruğu	T.C	Telefon	05322216688
Email	seldakaramil@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Manisa Celal Bayar Üniversitesi - Sağlık Bilimleri Enstitüsü- Tıbbi Biyoloji AB	2020
Yüksek Lisans	Ege Üniversitesi - Fen Bilimleri Enstitüsü - Biyomühendislik AD	2014
Lisans	Ege Üniversitesi – Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik AD	2011
Lise	İzmir Özel Türk Fen Lisesi	2005

Yabancı Diller	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi