T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MCF-7 MEME KANSERİ/CD8^{+} HÜCRE HATTI KO-KÜLTÜR MODELİNDE PD-L1 HEDEFLİ miR-34a'nın İMMÜN KONTROL NOKTASI MODÜLASYON ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Moleküler Biyolog Nuray BAYDAR

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE

VAN-2023

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MCF-7 MEME KANSERİ/CD8^{+} HÜCRE HATTI KO-KÜLTÜR MODELİNDE PD-L1 HEDEFLİ miR-34a'nın İMMÜN KONTROL NOKTASI MODÜLASYON ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Moleküler Biyolog Nuray BAYDAR

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE

VAN-2023

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2022-9988 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum *"MCF-7 Meme Kanseri /CD8^{+} Hücre Hattı Ko-Kültür Modelinde PD-L1 Hedefli Mir-34a'nın İmmün Kontrol Noktası Modülasyon Etkisinin Araştırılması"* başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Nuray BAYDAR

Tarih:

İmza:

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sürecince kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, yardımı esirgemeyen her konuda sabrı, özverisiyle ve mesleki ahlakı ile bilgi yoluma ışık tutan çok değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE'ye

Tez çalışmam ile ilgili resmi işlemlerimi yürüten Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tüm çalışanlarına

Çalışmam esnasında tez yazım ve laboratuvar çalışmalarında sürekli yanımda olan arkadaşım doktora öğrencisi Sedat KÖSTEKCİ'ye

Tez süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' nda öğrenim gören Merve TUNÇYÜREKLİ'ye ve yakın arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Abdurrahman CAN'a

Hayatımın her anlamında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan canım anneme ve babama ve kardeşlerime,

Bu araştırmada Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı ID:9988 tarafından verilen maddi destek için sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

BAYDAR N, MCF-7 Meme Kanseri/CD8$^+$ Hücre Hattı Ko-Kültür Modelinde PD-L1 Hedefli miR-34a'nın İmmün Kontrol Noktası Modülasyon Etkisinin Araştırılması, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji, Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2023. Kanser, bağışıklık sistemi tarafından tanınmaya ve hatta bağışıklık tepkisine yol açabilecek tümör antijenlerinin üretimine katkıda bulunan çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikleri içeren karmaşık bir hastalıktır. Meme kanseri, akciğer kanserinden sonra dünyada en sık görülen ikinci kanser türüdür. Kanser hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınabildiği ve yok edilebildiği kanser immünoterapisi günümüzde popüler bir tedavi yöntemidir. Bu çalışmada, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ve sağlıklı HME1 meme hücrelerinde miR-34a transfeksiyonu ile PD-L1 genini susturarak çözünmüş veya membrana bağlı PD-L1 miktarını azaltmayı ve T hücrelerinin kanser hücrelerini tanıyıp yok etmesini sağlamayı amaçladık. Bu doğrultuda, farklı miR-34a dozları *in vitro* koşullar altında meme kanseri hücre hatlarına transfekte edilmiş ve MTT sitotoksisite deneyi ile IC_{50} sonuçları elde edilmiştir. IC_{50} sonucuna göre, sitotoksik etkiye sahip miR-34a dozu MCF-7 meme kanseri hücre hattında 0.77 nM ve HME1sağlıklı meme hücre hattında 8.08 nM olarak belirlenmiştir. PD-L1 Elisa deneyi, meme kanseri hücrelerinin yüzeyindeki membrana bağlı veya çözünmüş PD-L1 seviyesini incelemek için kullanılmıştır. Sonuçlar, 10 nM miR-34a'nın PD-L1 seviyelerini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Bu çalışmada, miR-34a'nın meme kanserinde PD-L1'e bağlandığı ve bu bölgeyi susturarak PD-L1 ekspresyonunu azalttığı, T hücreleri tarafından tanınmaya izin verdiği ve meme kanseri hücre hatlarında sitotoksik bir etki meydana getirdiği bulunmuştur. Birlikte ele alındığında, kanıtlar miR-34a'nın kanser tedavisinde yararlı olan immünoterapötik bir ilaç olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kanser İmmünoterapisi, Ko-kültür, Meme Kanseri, miR-34a, PD-1/PD-L1.

ABSTRACT

BAYDAR N, Investigation of Immune Checkpoint Modulation Effect of PD-L1 Targeted miR-34a in Breast Cancer/CD8$^+$ Cell Line Co-Culture Model, Van Yüzüncü Yıl University, Institute of Health Sciences, Medical Biology, Master's Thesis, Van, 2023. Cancer is a complex disease that involves a variety of genetic and epigenetic changes that contribute to the production of tumor antigens that are recognized by the immune system and can even lead to an immune response. Breast cancer is the second most common cancer in the world after lung cancer. Cancer immunotherapy, in which cancer cells can be recognized and destroyed by the immune system, is now a popular treatment method. In this study, we sought to reduce the amount of solubilized or membrane-bound PD-L1 by silencing the PD-L1 gene in MCF-7 breast cancer cells and healthy HME1 breast cells by miR-34a transfection, and to enable T cells to recognize and destroy cancer cells. In this direction, breast cancer cell lines were transfected with different doses of miR-34a under in vitro conditions and the IC_{50} results were determined by MTT cytotoxicity assay. According to the IC_{50} result, the dose of miR-34a with cytotoxic effect was determined as 0.77 nM in MCF-7 breast cancer cell line and 8.08 nM in HME1healthy breast cell line. The PD-L1 Elisa assay was used to investigate the level of membrane-bound or solubilized PD-L1 on the surface of breast cancer cells. The results showed that 10 nM miR-34a significantly reduced PD-L1 levels. In this study, it was found that miR-34a binds to PD-L1 in breast cancer and reduces PD-L1 expression by silencing this region, allowing recognition by T cells and inducing a cytotoxic effect in breast cancer cell lines. Taken together, the evidence suggests that miR-34a has the potential to be an immunotherapeutic drug that is useful in the treatment of cancer.

Keywords: Cancer Immunotherapy, Co-culture, Breast Cancer, miR-34a, PD-1/PD-L1.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay ……..……III

Etik Beyan ……..……..……. IV

Teşekkürler …….…….....V

Özet ……...…….....VI

Abstract …….....VII

İçindekiler ……...…….....IX

Simgeler ve Kısaltmalar …….……...……..X

Şekiller Listesi ……...……...….....XI

Tablolar Listesi ……...…….XIII

1. GİRİŞ ……....1

2. GENEL BİLGİLER …….....4

2.1. Kanser ……...4

2.2. Meme Kanseri…...…….……5

2.3.Kanser ve İmmünoterapi…….……6

2.4.PD-1…….....10

2.5. PD-L1/PD-L2…….....……..11

2.6. PD-1/PD-L1 Etkileşim ve Blokajı……...……13

2.7. MikroRNA'lar ve PD-L1……...……..15

2.8. miR-34a Ailesi……...……..16

3. GEREÇ ve YÖNTEM ……21

3.1. Hücre Kültürü ……21

3.2. miR-34a Mimimklerinin Hazırlanması …….....21

3.3. MCF-7 ve HME1 Hücre Hatlarına miR-34a Transfeksiyonu……..……22

3.4. MTT ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi....…….22

3.5. IC_{50} Değerinin Hesaplanması……..……23

3.6. PD-L1 Elisa Testi……..……...……23

3.7. Hücre Göçü Analizi……..24

3.8. Ko-Kültür Çalışması…….25

3.8.1. PBMC Hücrelerinin Çözdürülmesi……...25

3.8.2. PBMC Hücrelerinin Stoklanması……..25

3.8.3. T Hücrelerinin Manyetik Ayrımı……..25

3.8.4. $CD8^+$ T Hücrelerinin Pasajlanması……26

3.9. Kanser Hücre Hatları İle $CD8^+$ T Hücrelerinin Ko-Kültürü…….26

4. BULGULAR ……...28

4.1. miR-34a Transfeksiyonunun MCF-7 ve HME1 Hücre Hatlarına Etkisi…..…....28

4.2. MTT ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi……30

4.3. IC_{50} Değeri…….…..……....31

4.4. PD-L1 Elisa Testi ile PD-L1 Seviyesinin Tespit Edilmesi …….31

4.5. Hücre Göçü Oranının Belirlenmesi……..34

4.6. MCF-7 ve HME1 Hücre Hatları ile $CD8^+$ T Hücrelerinin Ko-Kültürü……...36

5. TARTIŞMA VE SONUÇ ……...38

KAYNAKÇA …….43

ÖZGEÇMİŞ ……....50

EKLER ……...51

EK1, Tez Orjinallik Raporu ……...51

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC : Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu

EMT : Epitel Mezenkimal Geçiş

CO_2 : Karbondioksit

DMSO : Dimetil Sülfoksit

miRNA : MikroRNA

TCR : T Hücre Reseptörü

EDTA : Etilendiamin Tetraasetik Asit

FBS : Fetal Sığır Serumu

IC_{50} : Maksimum İnhibitör Konsantrasyonun Yarısı

MCF-7 : Meme Kanseri

nM : Nanomolar

µL : Mikrolitre

ml : Mililitre

nm : Nanometre

PD-1 : Programlanmış Hücre Ölümü Reseptörü 1

PD-L1 : Programlanmış Hücre Ölüm Ligantı 1

PD-L2 : Programlanmış Hücre Ölüm Reseptörü 2

Rpm : Dakikada Dönüş Sayısı

$CD8^+$: Sitotoksik T Hücreleri

MHC : Majör Histokompatibilite Kompleksi

PHA : Fitohemaglutinin

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. PD-1/PDL-1 etkileşimi ve blokajı……9

Şekil 2. CTLA-4/CD80-CD86 etkileşimi ve blokajı ……..…….....9

Şekil 3. PD-1/PD-L1 etkileşimi ile kanser mikro çevresindeki T hücrelerinin aktivasyonunu, hayatta kalmasını, çoğalmasını ve sitokin salgılamasını engellemesi…14

Şekil 4. miR-34 ailesinin biyogenez……17

Şekil 5. İnsan miR-34a, miR-34b ve miR-34c'nin genomik lokuslarının yapısı……....18

Şekil 6. miR34a'nın gen dizisi ve DNA üzerindeki lokasyonu……..……...20

Şekil 7. miR-34a transfeksiyonu yapılmayan MCF-7 hücre kontrol gruplarının (A) 24 saat sonraki, (B) 48 saat sonraki görünümü. miR-34a transfeksiyonu yapılmayan HME1 hücre kontrol gruplarının (C) 24 sonraki, (D) 48 saat sonraki görünümü……..…….....28

Şekil 8. miR-34a transfeksiyonu yapılan MCF-7 hücrelerinin (A) 24 sonraki, (B) 48 saat sonraki görünümü….……..…...29

Şekil 9. miR-34a transfeksiyonu yapılan HME1 hücrelerinin (A) 24 sonraki, (B) 48 saat sonraki görünümü.……..……....…….29

Şekil 10. MCF-7 hücre hattında 48 saatlik miR-34a transfeksiyonunun hücre proliferasyonuna etkisi ……..……..30

Şekil 11. HME1 hücre hattında 48 saatlik miR-34a transfeksiyonunun hücre proliferasyonuna etkisi ……...31

Şekil 12. Uygulanan miR-34a dozlarının regresyon eğrisi diyagramı……..……..32

Şekil 13. MCF-7 hücrelerinde miR-34a transfeksiyonunun PD-L1 miktarı üzerindeki etkisi ……...33

Şekil 14. HME1 hücrelerinde miR-34a transfeksiyonunun PD-L1 miktarı üzerindeki etkisi ……..…….33

Şekil 15. miR34a uygulanmış MCF-7 ve HME1 (CRL-4010) hücrelerinin 0 ve 48 saat sonraki hücre göçü analizi mikroskop görünümü…….34

Şekil 16. miR-34a uygulanmış MCF-7 hücrelerindeki migrasyon oranı……35

Şekil 17. miR-34a uygulanmış sağlıklı HME1 hücrelerindeki migrasyon oranı…….35

Şekil 18. miR-34a uygulanan MCF-7 hücreleri ile $CD8^+$ T hücrelerinin ko-kültür sonrası canlılık grafiği……..36

Şekil 19. miR-34a uygulanan HME1 hücreleri ile $CD8^+$ T hücrelerinin ko-kültür sonrası canlılık grafiği…….37

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. miR-34a transfekte edilen MCF-7 ve HME1 hücre hatlarına ait 48 saatlik IC_{50} değerleri ……..31

1.GİRİŞ

Kanser, geçmişte ve günümüzde kontrol edilmesi en zor hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir. Gelişmiş teknoloji ve sağlık sistemlerine rağmen kanser hala tıp literatürüne meydan okuyan kötü huylu bir hastalıktır. Öyle ki, Dünya Sağlık Örgütü tarafından 'Yüzyılın Patolojisi' olarak adlandırılmıştır. Yüksek ölüm oranı gelişmiş ülkelerde bile önlenememektedir. Vücudun birçok bölgesinde ortaya çıkma potansiyeli yüksek olan kanserin genetik yatkınlık ve çevresel faktörler gibi nedenleri olduğu bilinmektedir (Erdoğan, 2016). Normal hücrelerde bölünme gerektiği gibi belirli bir sıraya tabidir ve bunu kontrol eden hücre döngüsü kontrol noktaları vardır. Hücrelerde bir aksaklık olması durumunda, apoptoz ve otofaji gibi programlı hücre ölümü yoluyla mevcut hücrenin parçalanmasıyla sorun ortadan kaldırılır. Kanser hücrelerinde ise durum farklıdır. Kanser hücreleri çeşitli faktörlere bağlı olarak kontrolsüz bir şekilde bölünmeye ve çoğalmaya başlayarak vücutta anormal ve olağan dışı durumların ortaya çıkmasına neden olan bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır (Özgöçmen, 2017).

Meme kanseri, farklı histolojik ve gen ekspresyon profillerine dayalı olarak 25 alt tipte sınıflandırılabilen heterojen bir hastalıktır (Imani ve ark., 2018). En yaygın kanser türlerinden biri olan meme kanseri, dünya genelinde kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Bilimsel çalışmalara göre, kadınlarda meme kanseri vakalarının sayısının 2050 yılına kadar 3 milyonu aşması beklenmektedir (Bastaki ve ark., 2020).

Yaşam kalitesini önemli ölçüde sınırlayan bir hastalık olan kanserin önlenmesi ya da bireylerin yaşam kalitesinin artırılması için bilim büyük çaba sarf etmektedir. Teknoloji, moleküler biyoloji ve genetik, biyoteknoloji ve biyokimya gibi bilimlerin gelişmesiyle son 50 yılda kanserle mücadelede büyük ilerlemeler kaydedilmiş olsa da yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Erdoğan, 2016). Cerrahi yöntemler, radyoterapi ve kemoterapi kansere karşı en sık kullanılan tedavilerdir. Mevcut tedavilerin yetersizliğinin hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkilediği iyi bilinmektedir. Benzer nedenlerle ötürü yeni tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi tüm dünyada acil ihtiyaç haline gelmiştir. İmmünoterapi, şu anda geliştirilmekte olan bu tür tedavilerden biridir (Özgöçmen, 2017).

Geleneksel tedavilerden farklı olarak kanser immünoterapisi, kanser hücrelerini tanımak ve öldürmek için hastanın spesifik bağışıklık özelliklerini kullanan bir mekanizmadır. Bağışıklık sistemi vücudun birincil kanser gözetim mekanizması olmasına rağmen, kanser hücreleri çeşitli bağışıklık baskılayıcı sistemler aracılığı ile yok edilmekten kaçabilir. Bu kaçışı önlemek ve anti-tümör immün yanıtı güçlendirmek ve iyileştirmek için immünoterapi temelli bir dizi uygulama yürütülmektedir (Alard ve ark., 2020)

T hücreleri tarafından kontrol edilen bağışıklık sistemi, kanser hücreleri ve patojenlerle enfekte olmuş hücreler gibi anormal şekilde büyüyen hücreleri tanımak ve yok etmek üzere organize edilmiştir. Bu tür anormal hücrelerin tanınması, T hücrelerinin yüzeyindeki T hücre reseptörünün (TCR) hedef hücrelerdeki peptit majör histo-uyumluluk komplekslerine (MHC) bağlanması yoluyla gerçekleşir. Böyle bir etkileşimin sonuçları, yardımcı inhibitör reseptörler, bir dizi uyarıcı sinyal ve bağışıklık kontrol noktaları tarafından düzenlenir ve kontrol edilir. İmmün kontrol noktası sinyal yolakları, antijene özgü T hücrelerinin miktarını ve işlevsel aktivitesini düzenleyerek ototoleransın sürdürülmesinde ve doku hasarının en aza indirilmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Sun ve ark., 2018).

İmmünoterapide "hedefleme" odağı tümörün kendisinden tamamen farklı, kişiselleştirilmiş bir odağa kayar. Burada, konakçı bağışıklık sistemi doğrudan veya dolaylı olarak kanser hücrelerine saldırmak üzere programlanır. Bu tedavi yöntemleri onaylanmıştır, ancak tümör kaynaklı immünosupresyon, düşük tedavi etkinliği ve ilaç direnci nedeniyle, şu anda kullanımda olan immünoterapileri optimize etmek ve yeni tedaviler geliştirmek için araştırmalar devam etmektedir (Esfahani ve ark., 2020).

Kanser tedavisindeki en büyük zorluklardan biri, tümör mikroçevresindeki karmaşık ve kapsamlı tümörden kaçış mekanizmalarının varlığıdır. İmmün kontrol noktası molekülleri önemli immünosupresif moleküllerdir ve kanser hücrelerinin immün yanıtları engellemek için kullandıkları mekanizmalar arasındadır. Bu kontrol noktaları arasında PD-1 ve PD-L1, meme kanseri tedavisinde önemli terapötik hedefler olarak tanımlanmıştır (Bastaki ve ark., 2020). Tüm immün kontrol noktaları arasında, birçok malignitede terapötik bir hedef olduğu kanıtlanmış olan PD-1/PD-L1 yolağı dikkat çekmektedir. Şu anda PD-1/PD-L1 eksenini hedef alan antikorlar birçok denemede

araştırılmakta ve Hodking lenfoma, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, melanom ve renal hücreli karsinom gibi kanserler için onay almıştır (Sun ve ark., 2018).

MikroRNA'lar (miRNA), transkripsiyondan sonra gen ekspresyonunu düzenleyen 20-25 nükleotidlik bir kodlamayan RNA molekülleri sınıfıdır. Hedef genin mRNA'sının 3'çevrilmemiş UTR bölgesine bağlanarak, miRNA'lar çeviriyi baskılar ve nihayetinde mRNA'nın parçalanmasına neden olur. Ayrıca birçok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynarlar. miRNA'lar PD-L1'in hücre yüzeyi ekspresyonunun düzenlenmesinde de önemli bir rol üstlenmiştir. Çalışmalar miR-34a'nın PD-L1 mRNA'sının 3'UTR bölgesine bağlanarak bu bölgeyi baskıladığını ve susturduğunu göstermiştir. PD-L1'in miR-34a transfeksiyonu ile bloke edilmesinin T-hücre apoptozunda azalmaya neden olduğu da bulunmuştur (Wang ve ark., 2015).

Bu çalışmada, lipozom nanopartikülleri içinde kapsüllenmiş miR-34a mimikleri MCF-7 meme kanseri hücre hatlarına ve HME1 sağlıklı hücre hatlarına transfekte edilmiştir. Transfeksiyon sonucunda miR-34a'nın PD-L1 blokajı ve gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Vücuttaki neredeyse tüm karsinogenez süreçleri, tek bir hücrede DNA hasarının gelişmesini içerir. Hasarın onarılamadığı durumlarda, proliferasyonun devamlılığı dokuda olağandışı hücre bölünmesinin önünü açar (Baday, 2013). Kontrolsüz bölünen hücreler dokuda çok agresif davranışlar gösterirler. Kanser hücreleri bu davranışları sayesinde yeni özellikler kazanırlar. Bu özelliklerden bazıları sürekli enerji ihtiyacı, hücre ölümüne direnç, kan damarları oluşturma, büyüme baskılayıcılardan gelen sinyallere duyarsızlık ve çevre dokulara yayılmadır (Disoma, 2016). Kanser, büyüme özellikleri bozulan hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve bu hücrelerin metastaz yoluyla diğer doku ve organlara taşınmasıdır. Farklı dokulara taşınan kanser hücrelerinin çoğalması sonucunda organ ve dokuların işlevselliği ve bütünlüğü etkilenmektedir. Malign tümör terimi de kanseri ifade etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (WHO, 2018).

2020 yılında dünya genelinde 19,3 milyon yeni kanser vakası teşhis edilirken (melanom hariç), yaklaşık 10 milyon kişi kanserden hayatını kaybetmiştir. Kadın meme kanseri, 2,3 milyon vaka ile en sık teşhis edilen kanser olarak akciğer kanserini geçmiştir (Sung ve ark., 2020).

Tümörler iki şekilde karakterize edilir. Bunlar benign ve malign tümörlerdir. Benign tümörler iyi huylu, malign tümörler ise kötü huylu tümör olarak da isimlendirilir. Benign tümörler genellikle bulundukları bölge ile sınırlıdır ve diğer doku ve organlara göç etmezler. Bu özellik tedaviyi kolaylaştırır. Malign tümörler ise kazandığı yeni özellikler nedeniyle vücudun birçok bölgesine göç ederek hastalıkla mücadeleyi çok zor ve karmaşık hale getirirler (Us Altay, 2015). Hızla bölünen ve çoğalan tümör hücreleri yüksek glikolitik fonksiyona sahiptir. Bu da T-hücre aktivasyonu için gereken besinlere erişimi engeller ve büyük miktarlarda laktat üretir. Bu metabolik kalıntıların tümör mikroçevresinde birikmesine bağlı olarak ortaya çıkan besin sıkıntısı sonucunda, işlevi ve çoğalmayı bozan bir geçiş meydana gelir (Qarraj ve ark., 2017).

Tümör büyümesini teşvik ederek karsinogeneze neden olan 50'si proto-onkogen ve 70'i tümör baskılayıcı gen olmak üzere yaklaşık 125 gen tanımlanmıştır (Wolgestein

ve ark., 2013). Kanser hücreleri, onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin düzensiz ekspresyonunun bir sonucu olarak çeşitli mutasyonlara uğrar ve bu değişiklikler yüzlerce genin ifadesinin değişmesine neden olur (Roy ve Saikia, 2016).

Tümör baskılayıcı genler ve onkogenler üzerine yapılan çalışmalar, kanserin moleküler kökeninin anlaşılmasına büyük katkı sağlamıştır (Labazi ve Phillips, 2003). Tümör baskılayıcı genlerin tanımlanması, onkogenezin anlaşılmasına ve mutant gen taşıyıcılarının tespit edilmesine katkıda bulunmuştur (Yokuş ve Çakır, 2012).

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri heterojen bir hastalık olup kadınlarda en sık görülen karsinomdur (Rao ve ark., 2013). Dünya genelinde kanser ölümlerinde ilk üç sırada yer alan meme kanseri, 2020 yılında yaklaşık 2,3 milyon yeni vaka ile akciğer kanserini geride bırakmıştır. Meme kanseri, kadınlarda her dört kanserden birinin ve her altı kanser ölümünden birinin nedenidir (Sung ve ark., 2020). Meme kanseri teşhisi konan hastaların 5 yıllık hayatta kalma oranı %98 iken, bu oran üçüncü evrede %72, dördüncü evrede ise %22'dir (Cuzick ve ark., 2011).

Gelişmekte olan ülkelerde, büyüyen ekonominin neden olduğu yaşam tarzı, sosyo-kültürel değişiklikler ve endüstriyel iş gücündeki kadın oranının artması, meme kanseri riskinin artmasına neden olmuştur. Ayrıca fiziksel hareketsizlik, çocuk doğurmanın ertelenmesi ve aşırı vücut ağırlığı gibi nedenler de Batı ülkelerinin risk faktörü profiline yakınsama olduğunu göstermektedir (Sung ve ark., 2020).

Kadınlarda meme, akciğer ve kolorektal kanser en yaygın kanserlerdir ve tüm yeni tanıların neredeyse yarısını oluşturmaktadır. Meme kanseri tek başına kadınlardaki tüm kanserlerin yüzde 30'unu oluşturmaktadır (Siegel ve ark., 2020). Kadın meme kanseri insidans oranları 2000'li yılların ortalarından bu yana yılda yaklaşık yüzde 0,5 oranında yavaş bir artış göstermektedir (Pfeiffer ve ark., 2018).

Meme kanseri genellikle menopozdan sonra kadınları etkiler. Bununla birlikte, genç hastalarda tespit edildiğinde, kötü bir prognoza ve daha agresif bir davranışa sahiptir. Bu hastalarda lenf nodu tutulumu ve büyük tümörler daha yaygındır (Wang ve

ark., 2018). Hastaların %11'inin premenopozal olduğu ve %50'den fazlasının hormon reseptörü sentezlediği görülmüştür (Pistelli ve ark., 2018).

Çalışmalar meme kanserinin *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonlardan kaynaklandığını ve vakaların tahminen %5-10'unun kalıtsal olduğunu göstermiştir (Mertens ve ark., 2006). Tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerdeki mutasyonlara ek olarak histon modifikasyonu ve promotör metilasyonu gibi epigenetik değişimler de meme kanserinin başlamasına, ilerlemesine ve metastazına yol açabilir (Esteller, 2008).

Meme kanserinin tedavisi cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi ve biyolojik ajanların kullanımını içerir (Akram ve Siddiqui, 2012).

2.3. Kanser ve İmmünoterapi

İmmünoterapi, kanser de dahil olmak üzere bir dizi hastalıkla savaşmak için hastanın kendi bağışıklık sistemini kullanan bir tedavi yöntemidir. Amaç, bağışıklık sistemi hücreleri tarafından saldırıya uğrayan kanser hücrelerini yok etmektir. Kanser immünoterapisinde, tümör hücresi tarafından çeşitli şekillerde susturulan bağışıklık sistemini aktive eden veya güçlendiren ajanlar kullanılarak tümör hücreleri tanınır (Özlük ve ark., 2017).

Tümörler genellikle hastalığın gelişmesini ve ilerlemesini sağlayan spesifik immünosupresif tümör mikroçevreleri içerir. Tümör mikroçevresi tümör hücrelerinin yanı sıra adaptif immün hücreler, doğuştan gelen immün hücreler, mezenkimal hücreler, endotel hücreleri ve perisitler gibi stromal unsurlardan oluşur (de Visser ve ark., 2006). Tümör mikroçevresindeki bu farklı hücreler kemokinler ve sitokinler üreterek veya doğrudan temas yoluyla etkileşime girerler. Tümör büyümesini kontrol etmek ve şekillendirmek için otokrin ve parakrin eylemler uygularlar (Lin ve Karin, 2007). T hücreleri ve tümör ilişkili makrofajlar (TIM) tümör mikroçevresinde daha fazla sayıda bulunan immün hücrelerdir. Tümör büyümesi ve çoğalması esas olarak tümörle ilişkili makrofajlar tarafından desteklenmektedir (Condeelis ve Pollard, 2006).

$CD8^+$ T hücreleri adaptif bağışıklığın sürdürülmesi için çok önemlidir. Saf T hücreleri, antijen uyarımı üzerine sitokin üreten ve kanser hücrelerini ortadan kaldıran efektör T hücrelerine farklılaşır. Zamanla, efektör hücrelerin bir kısmı apoptotik hale gelir

ve efektör hücrelerin geri kalanı hafıza T hücreleri haline gelir. Tümör mikroçevresinde $CD8^+$ T hücrelerinin hipofonksiyonel olduğu bilinmekle birlikte, bu durum T hücre tükenmesi olarak tanımlanmaktadır. T hücreleri büyük miktarda inhibitör reseptör eksprese eder, IL2, interferon gama, TNF-alfa ve granzim sitokinlerini üretme kabiliyetlerini yavaş yavaş kaybeder ve artık kanser hücrelerini ortadan kaldıramaz (Jiang ve ark., 2015).

Kanser immünoterapisi kanser tedavisine yaklaşımı değiştirmiştir. Bu yöntem, kanser hücrelerini doğrudan öldüren diğer ajanlara kıyasla daha fazla hedefe yönelik olup tümöre karşı bağışıklık yanıtını geliştirmeyi amaçlamaktadır (Rosenberg, 2014). Solid tümörler karmaşık bir tümör mikroçevresine sahip olduğundan, immünoterapilerin çoğu ilk olarak hematolojik kanserlerde test edilmiştir. Yakın zamanda Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), solid tümör tedavisinde kontrol noktası blokajı için monoklonal antikorları ve sitokinleri aktive etmek üzere çeşitli immünoterapileri onaylamıştır (Menon ve ark., 2016).

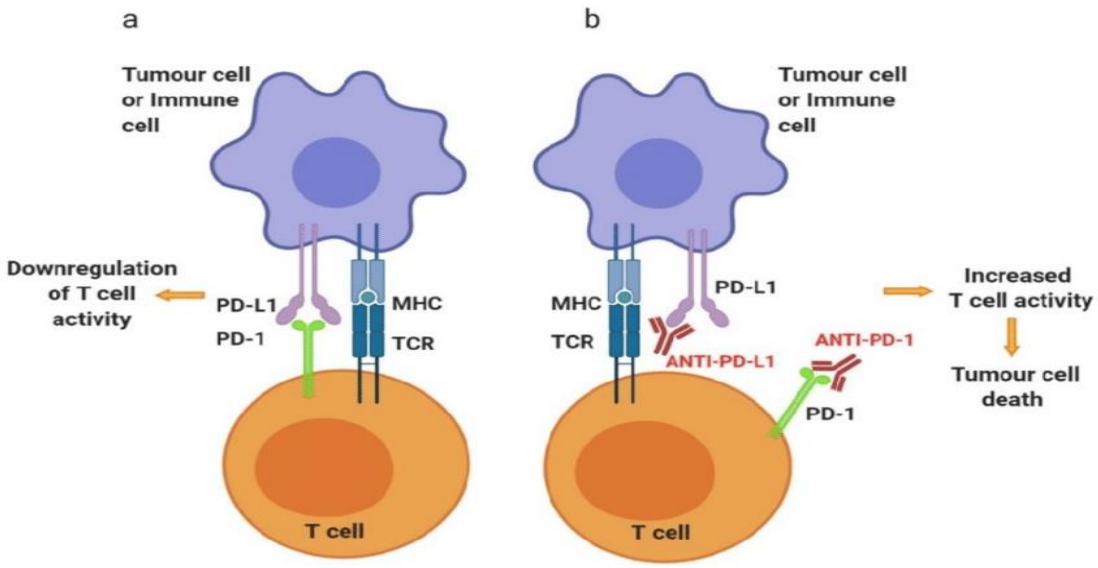
Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan birçok immünoterapi yöntemi bulunmaktadır. Bunlar arasında kontrol noktası inhibitörleri, kanser aşıları, sitokinler, CART T hücre reseptörlerine (TCR) ve uyarıcı reseptörlere karşı agonistik antikorlar yer almaktadır. Ayrıca bispesifik antikorlar ve onkolitik virüsler gibi yeni immünoterapötik yaklaşımlar da bulunmaktadır (Riley ve ark., 2019).

Bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri, bugüne kadar en yoğun şekilde araştırılan immünoterapi sınıfıdır. Bu kontrol noktaları, bir immün yanıtını durdurabilen normal bağışıklık sinyalleridir. Bağışıklık kontrol noktası sinyal yolakları, ototoleransın sürdürülmesinde, normal bağışıklık yanıtlarının süresinin ve gücünün modüle edilmesinde ve sağlıklı dokuya verilen zararın en aza indirilmesinde önemli bir rol oynar. Kontrol noktası inhibitörlerinin tümör hücreleri tarafından aşırı ekspresyonu, tümör mikroçevresinde tümöre özgü T-hücresi bağışıklığını önemli ölçüde bozar. Bu durum, tümör hücrelerini ortadan kaldırılmak üzere etkili bir şekilde işaretleyerek tümör ilerlemesini ve metastazı etkileyebilir. İmmün kontrol noktalarını kullanan birçok tümör, immün kaçış mekanizmalarını ve efektör hücre fonksiyonlarını inaktive eder. Bununla birlikte, antitümör bağışıklık, inhibitör reseptör-ligand etkileşimini bloke ederek immün kontrol noktası yolaklarını inaktive eden antikorlarla geri kazanılabilir (Carosella ve ark.,

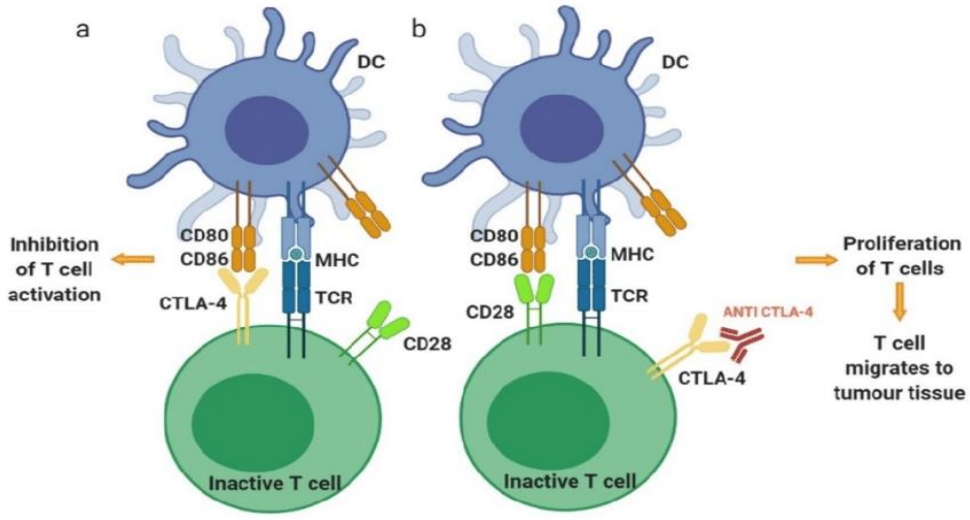
2015). En önemli iki immün kontrol noktası sinyal yolağı PD-1 ve CTLA-4'tür. Kontrol noktasını bloke etmek için en yaygın yöntem CTLA-4 ve PD-1/PDL-1'i bloke etmektir (Riley ve ark., 2019).

PD-1 aktive T hücrelerinde üretilen bir reseptördür ve PD-1 ile PDL-1/PDL-2 arasındaki etkileşim T hücre toleransını artıran ve otoimmüniteyi azaltan bir mekanizmadır (Schildberg ve ark., 2016). PD-1 üreten T lenfositleri ile PDL-1 eksprese eden kanser hücreleri arasındaki etkileşim, antitümör yanıtta azalmaya yol açar. Antitümör bağışıklığı, PD-1/PDL-1 etkileşiminin anti-PDL-1 antikorları ile bloke edilmesiyle geri kazanılabilir (Topalian ve ark., 2012). CTLA-4, CD28 reseptörünün bir homoloğudur ve sadece T hücrelerinde bulunan ve T hücresi aktivasyonunu düzenleyen inhibitör bir moleküldür (Schwartz, 1992). Antijen sunan hücreler üzerindeki B7 reseptörü ile CD28 arasındaki etkileşim, naif T hücrelerinin aktive T hücrelerine dönüşmesi için gereken ko-stimülatör sinyali oluşturur. CTLA-4, CD28'den daha yüksek bir afiniteye sahip olduğundan B7 reseptörüne daha iyi bağlanır ve bu da ko-stimülatör sinyalleşmeyi kesintiye uğratır (O'Day ve ark., 2007).

İmmün kontrol noktaları PD-1 ve CTLA-4 üzerine yapılan bazı çalışmalar, her ikisinin de immün sistemde fren görevi gördüğünü ortaya koymuştur. Bu nedenle, immün kontrol noktaları inhibe edilerek T hücreleri aktive edilirse kanser hücreleri daha etkili bir şekilde ortadan kaldırılabilir (Ljunggren ve ark., 2018).



Şekil 1. PD-1/PDL-1 etkileşimi ve blokajı (**Şekil A:** TCR sinyalini inhibe ederek T-hücresi aktivasyonunu aşağı regüle eder, **Şekil B:** PD-1/ANTİ-PD-1 bağlanması, tükenmiş T hücrelerinin aktivasyonlarını artırabilir ve böylece tümör hücrelerinin T hücresi aracılı ölümünü sağlayabilir (Alard ve ark., 2020).



Şekil 2. CTLA-4/CD80-CD86 etkileşimi ve blokajı (**Şekil A:** MHC tarafından sunulan antijenin TCR'ye bağlanması sonucunda CTLA-4/CD80-CD86'ya bağlanır ve ko-stimülatör sinyal bloke edilerek T hücre aktivasyonu engellenir, (**Şekil B:** CTLA-4/CD80

veya CTLA-4/CD86 etkileşimi anti-CTLA4 ile bloke edilerek T hücre proliferasyonu aktive edilir ve sekonder lenfoid organlara göç ederler (Alard ve ark., 2020).

2.4. PD-1

CD279 molekülü olarak da bilinen PD-1, ilk olarak 1922 yılında Kyoto Üniversitesi'nde IL3, 2B4-14 ve yoksun LyD9 hücre dizilerinde keşfedilmiştir (Ishida ve ark., 1992). *PD-1* geni 2q37.35 lokasyonunda beş ekzon ile yer alır ve lenfositlerde 288 amino asit ve 55 kDa'ya sahip bir transmembran proteini üretir. Üç bölgeden oluşur: bir ekstraselüler N-terminal alanı, bir transmembran alanı ve intraselüler iki tirozin bazlı içeren bir kuyruk (Neel ve ark., 2003). Başlıca rolü, tümör mikroçevresinde güçlü bir direnç mekanizması oluşturarak periferik dokulardaki T hücresi aracılı bağışıklık yanıtlarını düzenlemektir (Berger ve Pu, 2018). PD-1, CTLA-4'ün amino asit dizisine yüzde 20, CD28'e yüzde 15 ve indüklenmiş T yardımcı hücre stimülatörüne yüzde 13 benzerlik göstermektedir (Carreno ve Collins, 2002).

PD-1, adaptif ve doğuştan gelen bağışıklık yanıtlarının bir inhibitörüdür ve doğal öldürücü (NK) hücreler, aktive T hücreleri, B lenfositleri, makrofajlar, dentrik hücreler ve monositler gibi birçok hücrenin yüzeyinde yer alır. PD-1 özellikle tümöre özgü T hücreleri üzerinde immünoglobulin süper ailesine ait bir protein yapısına sahip bir membran reseptörü olarak bulunur (Ahmadzadeh ve ark., 2009). Aktive T hücrelerinin nükleer faktörü (NFAT), NOTCH, FOX01, IL, INF ve IRF9 gibi transkripsiyon faktörleri PD-1'in transkripsiyonunu indükleyebilir (Staron ve ark., 2014). PD-1 ekspresyonu, bu transkripsiyon faktörlerinin gücüne veya konsantrasyonuna bağlı olarak efektör T hücrelerinin yüzeyinde 24 saat içinde spesifik olarak yukarı regüle edilebilir. Bu nedenle, PD-1 *in vivo* ve *in vitro* T hücresi aktivasyonu için bir belirteç görevi görebilir (Blackburn ve ark., 2009). Programlanmış hücre ölümü-1 olarak bilinen inhibitör bir reseptör olan PD-1, örneğin T hücresi aktivasyonunu azaltarak efektör fonksiyonlarını düzenleyerek, T hücresi farklılaşmasını sağlayarak ve bağışıklık hafızasının gelişimine katkıda bulunarak bağışıklık sisteminin bir düzenleyicisi olarak görev yapar (Sharpe ve Pauken, 2018).

PD-1 pozitif T hücreleri sadece $CD4^+$, $CD8^+$ T hücrelerini değil aynı zamanda CD4, CD8 çift negatif timositleri de içerir. Çalışmalar PD-1 ekspresyonunun lenfosit aktivasyonunun yanı sıra ikincil bir olay olarak gerçekleştiğini göstermiştir. PD-1'in

lenfositlerin efektör işlevlerini düzenlediği ve timusta T-hücresi gelişimi sırasında rol oynadığı da varsayılmıştır (Agata ve ark., 1996).

Bağışıklık sisteminin kontrol noktası moleküllerinden biri olan PD-1, otoimmün doku hasarını önlemek için bağışıklık yanıtlarında T hücresi aktivitesini aşağı yönde düzenler. Tümörlerde ve bazı kronik enfeksiyonlarda uzun süreli antijen maruziyeti kalıcı PD-1 ekspresyonuna yol açarak dejenere hücrelerin ve patojenlerin immün aracılı temizlenmesini sınırlar. Bu nedenlerle, PD-1 molekülünün bloke edilmesi T-hücresi işlevini iyileştirebilir (Jubel ve ark., 2020). PD-1 blokajı, immün kontrol noktalarını terapötik olarak inhibe eder ve hastalığa özgü T-hücresi aktivitesini mümkün kılar. Günümüzde PD-1 blokajının önemli etkileri nedeniyle bazı kanserlerin tedavisinde başarıyla kullanıldığı gösterilmiştir (Sharpe ve Pauken, 2018).

PD-1 molekülünün PD-L1 ve PD-L2 olmak üzere iki ligandı vardır. Bunlar B7 ailesinin üyeleridir ve T hücrelerinin yüzeyindeki yardımcı bir reseptöre bağlanırlar (Zhu ve ark., 2018). Tümör mikroçevresindeki tümör hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen PD-L1, T hücreleri üzerindeki PD-1 reseptörü ile birleşir ve bu hücreler tarafından tanınmaktan kaçınmak için sağlıklı hücre görünümü verir (Pu ve Ji., 2022).

2.5. PD-L1/PD-L2

PD-L1 molekülü, 1999 yılında Dong ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada B7 ailesinin yeni ve farklı bir üyesi olduğu varsayımıyla B7 homolog 1 (B7-H1) olarak adlandırılmıştır (Dong ve ark., 1999). Freeman ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada PD-1 ligandları insanlarda ve farelerde tanımlanmış, ancak daha sonra PD-L1 ve B7-H1 moleküllerinin aynı olduğu bulunmuştur (Freeman ve ark., 2000).

B7 ailesinin bir üyesi olan PD-L1, 290 amino asit ve 33 kDa'lık bir tip 1 transmembran glikoproteindir. İnsan ve fare *PD-L1* genleri %70 sekans benzerliğine sahiptir. Bir transmembran alan, kısa yüklü bir hücre içi alan, bir immünoglobulin sabit alan ve bir değişken içeren bir hücre dışı bölgeden oluşur (Freeman ve ark., 2000).

PD-L1 ve PD-L2, reseptörlere bağlanarak PD-1'in inhibitör etkisine aracılık eder. PD-L2 makrofajlar, kültürlenmiş kemik iliği kaynaklı mast hücreleri ve dentriküler

hücreler tarafından indüklenebilir şekilde ifade edilirken, PD-L1 bu hücrelerin yanı sıra mezenkimal kök hücreler ve B hücreleri tarafından da konstitütif olarak ifade edilir. Ayrıca epitel hücreleri, hepatositler, miyositler, astrositler, vasküler endotel hücreleri ve pankreatik adacık hücreleri gibi hematopoetik olmayan çeşitli hücreler tarafından da üretilir. PD-L1 ayrıca kornea ve plasenta gibi bölgelerde de önemli miktarlarda ifade edilmektedir (Yang ve ark., 2009). PD-L1, mide kanseri, kolorektal kanser, meme kanseri, mesane kanseri ve yumurtalık kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türünde aşırı eksprese edilmektedir (Wang ve ark., 2016).

PD-1'in aktivasyonu ile PD-L1/PD-L2 yolağı arasında örtüşme olduğu bilinse de her iki ligandın da T hücresi yanıtlarını bağımsız olarak düzenlediğine dair kanıtlar vardır. Bazı çalışmalar PD-L1'in periferik T düzenleyici hücrelerinin (Treg) uyarılmasında önemli bir rol oynadığını, PD-L2 molekülünün ise $CD8^+$ T hücre proliferasyonunun baskın bir düzenleyicisi olduğunu göstermiştir (Dyck ve ark., 2017).

Aktive olmuş T hücrelerinin yüzeyindeki PD-1 reseptörü ve tümör hücrelerinde eksprese edilen PD-L1 birbirlerine bağlanır ve farklı sinyallerle sitokin üretimini ve T lenfositlerinin çoğalmasını engelleyerek immün yanıtı inhibe eder (Keir ve ark., 2008).

Son çalışmalar, insan meme kanseri kök hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunun EMT ile ilişkili olduğunu göstermiştir. PD-L1'in BT-549 ve MCF-7 tümör hücrelerinde PD-L1 promotörünün di-metilasyonu ile ilişkili olarak pozitif şekilde düzenlendiği bulunmuştur (Darvin ve ark., 2019). Liu ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada, östrojen reseptörü (ER) α-negatif meme kanserinin farklı alt tiplerinde PD-L1 miktarının daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. PD-L1 mRNA miktarının ER α-pozitif meme kanseri hücre hatlarında (MCF-7 ve T47D) ER α-negatif meme kanseri hücre hatlarına (MDA-MB-231 ve BT-594) göre anlamlı derecede düşük olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark., 2018).

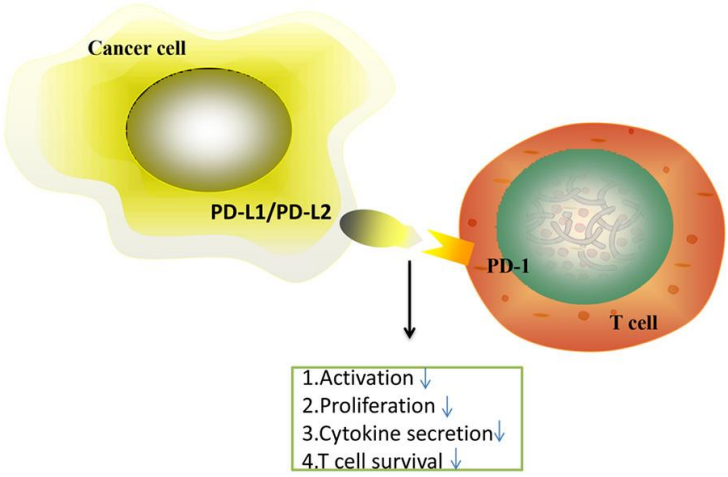
PD-L1'in protein düzenleme mekanizması üzerine yapılan bir çalışmada, PD-L1 proteini miktarının hücre döngüsü sırasında dalgalandığı ve cyclinD-CDK4 ekseninin de insan meme kanseri ve servikal kanser hücrelerinde bu protein seviyelerinin düzenlenmesinde rol oynadığı görülmüştür (Zhang ve ark., 2019). PD-L1 transkripsiyonunu doğrudan veya dolaylı olarak düzenleyen bir dizi onkojenik

transkripsiyon faktörü de tanımlanmıştır ve MYC onkogeninin yüksek ekspresyonunun tümör oluşumunu teşvik ettiği ve insan kanserlerinin %70'inde meydana geldiği bulunmuştur (Dang C, 2012). MYC'nin farmakolojik veya genetik olarak inaktivasyonu sonucunda, başta melanom olmak üzere birçok insan ve fare kanser modelinde PD-L1 ekspresyonunda azalma gözlenmiştir (Wang ve ark., 2017).

2.6. PD-1/PD-L1 Etkileşimi ve Blokajı

PD-1/PD-L1 sinyal yolu, immüno-onkoloji alanında özellikle ilgi çekmiş ve immün kontrol noktası tedavisinin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu sinyal yolu, bağışıklık toleransı ve doku homeostazının temel süreçlerine aracılık eder ve otoimmünite, bulaşıcı hastalıklar ve kanser gelişiminde önemli bir rol oynar (Schöniger ve Jasani, 2022). PD-1/PD-L1 aktivitesi, gen transkripsiyonu, translasyon sonrası modifikasyonlar, eksozomal taşıma ve transkripsiyon sonrası modifikasyonlar dahil olmak üzere birçok faktör tarafından düzenlenir (Sun ve ark., 2018). Bu reseptör-ligand ekseni, protein-protein etkileşimlerinin ve protein stabilizasyonunun modüle edilmesinde önemli bir rol oynar (Hsu ve ark., 2018). Özellikle PD-L1'in N-glikozilasyonu, kanserde immün seçilim ve immünosupresif fonksiyonun düzenlenmesinde önemlidir. N-bağlı glikozilasyon, PD-1/PD-L1 reseptör-ligand etkileşiminin stabilitesini artırarak kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçma yeteneğini geliştirir (Wang ve ark., 2020).

PD-1/PD-L1 sinyal yolu, tümör mikroçevresinde immün toleransın başlatılmasını ve sürdürülmesini kontrol eder. PD-1 ve ligandları PD-L1 veya PD-L2'nin aktivitesi, kanserde dejenere anti-tümör immün yanıtlara karşı T hücrelerinin aktivasyonu, proliferasyonu ve sitotoksik salgılanmasından sorumludur (Han ve ark., 2020). Aktive edilmiş $CD8^+$ hücreleri tarafından ifade edilen PD-1 reseptörü, kanser hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen ligandı PD-L1'e bağlandığında, T hücrelerindeki inhibitör sinyal yolları aktive olur ve bu da duyarlı, işlevsiz ve tükenmiş T hücrelerinde artışa yol açar (Hosseinzadeh ve ark., 2021).



Şekil 3. PD-1/PD-L1 etkileşimi ile kanser mikro çevresindeki T hücrelerinin aktivasyonunu, hayatta kalmasını, çoğalmasını ve sitokin salgılamasını engellemesi (Han ve ark., 2020).

Son zamanlarda PD-1 ve PD-L1, T hücrelerini baskılamadaki rolleri nedeniyle antikor bazlı kanser terapötikleri için en önemli hedeflerden biri olarak ortaya çıkmıştır. PD-1 blokerlerinin melanom, kolorektal kanser ve renal hücreli karsinom hastalarında kabul edilebilir bir toksisite profiline sahip olduğu ve antitümör aktivitenin ilk kanıtını sağladığı bildirilmiştir (Brahmer ve ark., 2010). Daha sonraki çalışmalar PD-1 blokajının çeşitli kanserlerde önemli işlevleri olduğunu göstermiş ve melanom tedavisi için klinik onaya yol açmıştır (Larkin ve ark., 2015). Yakın tarihli bir çalışmada Gao ve arkadaşları PD-1/PD-L1 blokajının antikanser etkiye sahip olduğunu ve PD-L1'in asetilasyona bağlı modülasyonunun translokasyonunu engellediğini rapor etmiştir (Gao ve ark., 2020).

PD-1/PD-L1 ekseninin inhibisyonu patojenlere karşı immün yanıtı artırabilir, bu da PD-1'in T hücrelerini baskılamadaki rolü ile tutarlıdır (Liu ve ark., 2014). Zaho ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, PD-1 ve PD-L1 arasındaki etkileşimin engellenmesinin, hepatoselüler karsinomda PD-1'in B-hücre aktivasyonu üzerindeki immünosupresif etkisine karşı koyduğu gözlemlenmiştir (Zaho ve ark., 2016). Gordon ve arkadaşları, PD-1'in *in vivo* blokajının makrofajların fagositozunu artırdığını ve tümör büyümesini azalttığını bildirmiştir (Gordon ve ark., 2017). Tümöre reaktif T hücrelerini yeniden aktive eden PD-L1 blokajında, sitokin seviyelerindeki bir artış, çoklu pozitif geri bildirim döngülerini indükleyerek ve T hücrelerinin INF-γ seviyelerinde bir artışla tümör

hücrelerini görmesini kolaylaştırarak T hücresi infiltrasyonunu artırabilir (Sun ve ark., 2018).

2.7. MikroRNA'lar ve PD-L1

MikroRNA'lar (miRNA), yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda yüksek oranda korunmuş tek sarmallı kodlamayan RNA'lar sınıfıdır. miRNA'lar, mRNA çevirisini baskılamak veya mRNA degradasyonunu teşvik etmek için mesajcı RNA'ların çevrilmemiş 3'UTR bölgelerine bağlanarak transkripsiyon sonrası düzeyde gen ifadesini susturabilir. Tek bir miRNA, aynı kısa tanıma bölgesine sahip yüzlerce hedef mRNA'yı eş zamanlı olarak düzenleyebilir. Dahası, birçok mRNA'nın kodlamayan 3'UTR bölgesi, farklı miRNA'lar için birden fazla bağlanma bölgesi içerebilir (Zhang ve ark., 2019).

miRNA biyogenezinin oluşum aşamasında, miRNA'nın birincil transkripti olan pri-miRNA, tip III ribonükleaz enzimi Drosha tarafından kesilerek öncül miRNA (pre-miRNA) oluşturulur. Çekirdekten sitoplazmaya eksportin aracılığıyla giren pre-miRNA daha sonra tip III RNA enzimi Dicer tarafından kesilerek olgun miRNA yapısını oluşturur (Kawai ve Amano, 2012).

Son zamanlarda, miRNA adı verilen küçük nükleotid molekülleri, kanser hücresi metabolizmasını, hücre döngüsünü, metastazı, apoptozu ve anjiyogenezi düzenledikleri için tümör gelişiminde ilgi odağı olmuştur (Catela ve ark., 2017). miRNA'lar, translasyonu baskılayarak veya hedef mRNA degradasyonuna aracılık ederek gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenleyicileri olarak hareket eder (Gong vd., 2010). Birçok çalışmadan elde edilen veriler, miRNA'ların akciğer kanserinde prognostik biyobelirteçler olduğunu göstermektedir (Braicu ve ark., 2019). Ayrıca kanser hücresi metabolizmasının düzenlenmesinde veya radyoterapi ve kemoterapiye karşı duyarlılık veya dirençte önemli bir rol oynarlar (Iqbal ve ark., 2019). Bu küçük moleküller, tümörün bağışıklık sisteminden kaçışı üzerinde önemli etkilere sahip olduklarından, tümör büyümesi ve ilerlemesi için uygun mikro ortamların gelişmesine yol açmaktadır (Han ve ark., 2020). miRNA'ların tümör baskılayıcı veya onkogen (oncomiRs) olarak hareket ettiği birçok kanserde miRNA düzensizliğinin nedensel rolünü doğrulamıştır ve miRNA mimikleri ve miRNA hedefleri (antimiRs) klinik öncesi gelişimde umut vaat etmiştir (Rupaimoole ve Slack, 2017).

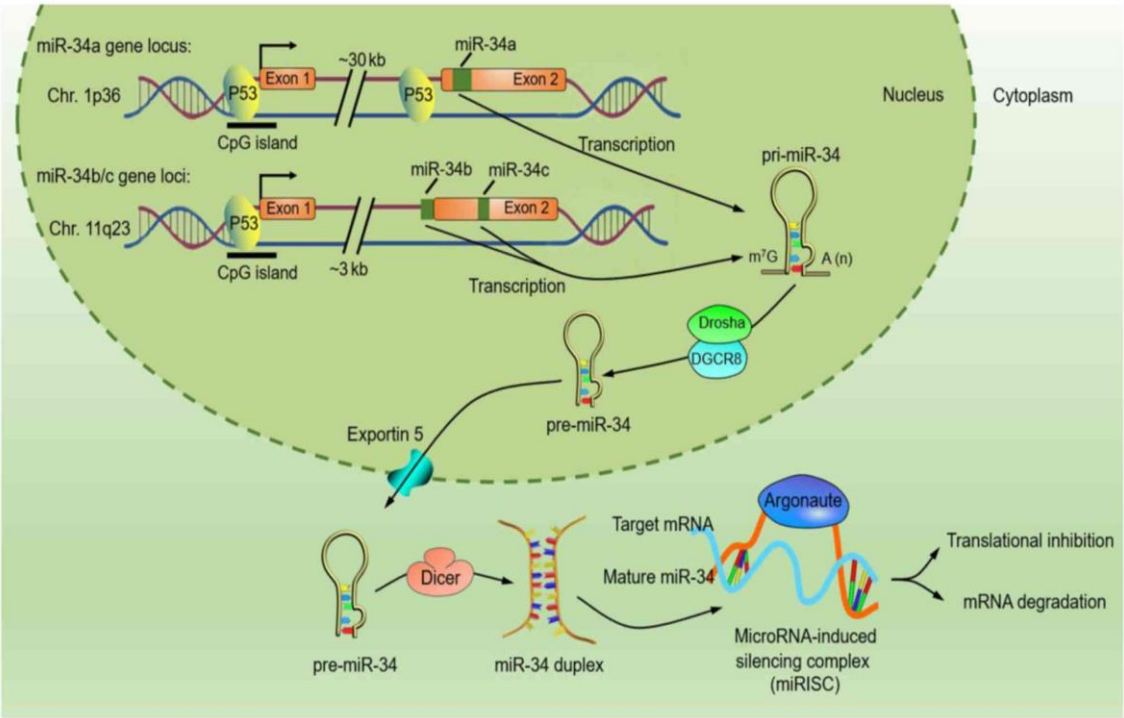
Yakın zamanda miRNA'ların PD-L1 ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu düzenleyici mekanizmada miRNA'lar doğrudan PD-L1 mRNA'sına bağlanarak ya da dolaylı olarak diğer PD-L1 düzenleyicilerinin ifadesini etkileyerek kendilerini gösterebilmektedir. miR-513, bir PD-L1 düzenleyicisi olarak tanımlanan ilk miRNA'dır ve PD-L1 mRNA'sının 3'UTR bölgesine doğrudan bağlanarak PD-L1 ifadesini transkripsiyonel düzeyde baskılamaktadır (Gong ve ark., 2010). PD-L1'in 3'UTR bölgesine doğrudan bağlanabilen bir diğer miRNA ise miR-34a'dır (Wang ve ark., 2015). miR-34 ailesinin üyelerinin hücre göçü, proliferasyon, invazyon, sağkalım, epitelyal mezenkimal geçiş ve ilaç direncinin engellenmesi gibi tümör baskılayıcı özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Li ve ark., 2015).

miR-34a uygulaması ile radyoterapi arasındaki ilişkiyi inceleyen yeni bir çalışmada, miR-34a uygulamasının PD-L1'i hedefleyerek anti-tümör immün yanıtı indüklediği, bunun da $CD8^+$ hücreleri tarafından tümör infiltrasyonunda belirgin bir artışa ve radyoterapiye kıyasla tümör hacminde belirgin bir azalmaya yol açtığı bulunmuştur. Cortez ve arkadaşları tarafından küçük hücreli olmayan akciğer kanseri fare modelinde yapılan çalışmada, miR-34a ile transfekte edilmiş bir lipozom nanopartikülü olan MRX34'ün deney sonunda tümörlerdeki miR34a miktarını artırdığı, aynı zamanda PD-L1 mRNA ve PD-L1 protein seviyelerini önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir. Yüksek miR-34b veya miR-34c ifadesinin PD-L1 protein üretimini inhibe ettiği de bildirilmiştir (Cortez ve ark., 2015).

2.8. miR-34 Ailesi

miR-34 ailesi, tümörlerle ilişkili epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) negatif bir düzenleyicisi olarak hareket eder. Bununla birlikte, tümör oluşumunun önlenmesinde ve tümör ilerlemesinin geciktirilmesinde önemli bir rol oynar. Çeşitli insan kanserlerinde düzensiz olan miR-34, çok iyi bir tümör baskılayıcı olduğu bilinen *P53* geni ile sinerjisi nedeniyle tümör baskılayıcı miRNA olarak kabul edilmiştir (Zhang ve ark., 2019). Birçok kanser hücresinde, çok sayıda olgun miR-34, 5'-fosfat ucu eksikliği nedeniyle inaktiftir. Bu hücrelerin DNA'sına zarar verebilecek bir sinyal verildiğinde, inaktif miR-34, 5'-ucunun fosforilasyonu ile hızla aktive edilebilir (Salzman ve ark., 2016).

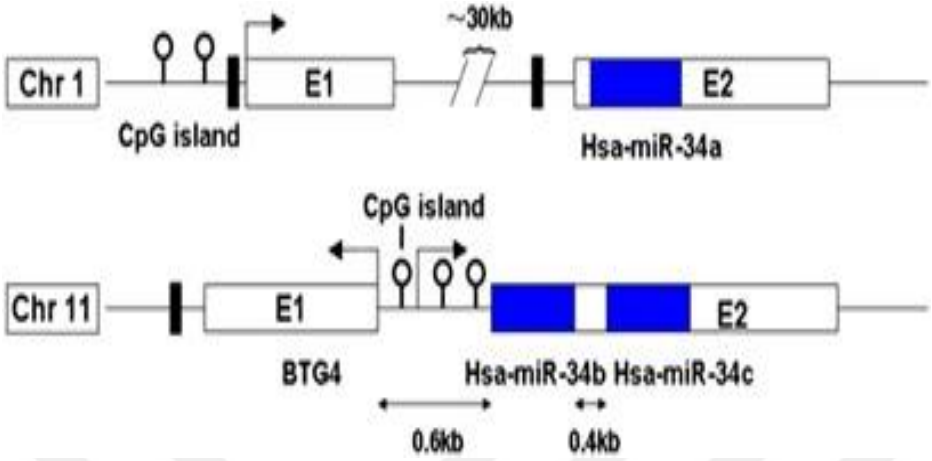
miR-34 ailesi biyogenezi sırasında miR-34 genleri, saç tokası benzeri pri-miR-34 oluşturmak için RNA polimeraz II/III tarafından çekirdekteki transkripsiyon başlangıç bölgesinden kopyalanır. Daha sonra Drosha ve DGCR8 tarafından pre-miR-34'e çevrilir. Oluşan pre-miR-34, eksportin aracılığıyla çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmaya taşınan pre-miR-34, olgun miR-34'ü oluşturmak için Dicer enzimi tarafından kesilir. Olgun miR-34, hedef mRNA'ların kodlamayan 3'UTR bölgelerine bağlanır ve transkripsiyon sonrası aşamada geni susturur veya parçalar (Ha ve Kim, 2014).



Şekil 4. miR-34 ailesinin biyogenezi (Xiong ve ark., 2019).

miR-34 ailesi miR-34a, miR-34b ve miR-34c olmak üzere üç üyeden oluşur. Bu üyeler iki ayrı transkripsiyon birimi tarafından kodlanır. 1p36.22 lokasyonunda bulunan miR-34a tek bir transkripte sahipken, 11q23.1 lokasyonunda bulunan miR-34b ve miR-34c ortak bir transkripte sahiptir. miRNA'lar hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesini 5' ucundaki ikinci ve dokuzuncu nükleotid arasındaki çekirdek dizisi ile tanır. Çalışmalar miR-34a ve miR-34c'nin aynı diziye sahip olduğunu ve bu nedenle benzer mRNA'ları hedeflediğini, miR-34b'nin ise farklı bir tohum sekansına sahip olduğunu göstermiştir (Rokavec ve ark., 2014). miR-34a seviyeleri, akciğer dokusu hariç çoğu insan dokusunda bulunan miR-34b ve miR-34c seviyelerinden daha yüksektir. miR-34a en yüksek oranda

beyin hücrelerinde ifade edilirken, miR-34b/c akciğerde daha yüksek seviyelerde eksprese edilir (Imani ve ark., 2018).



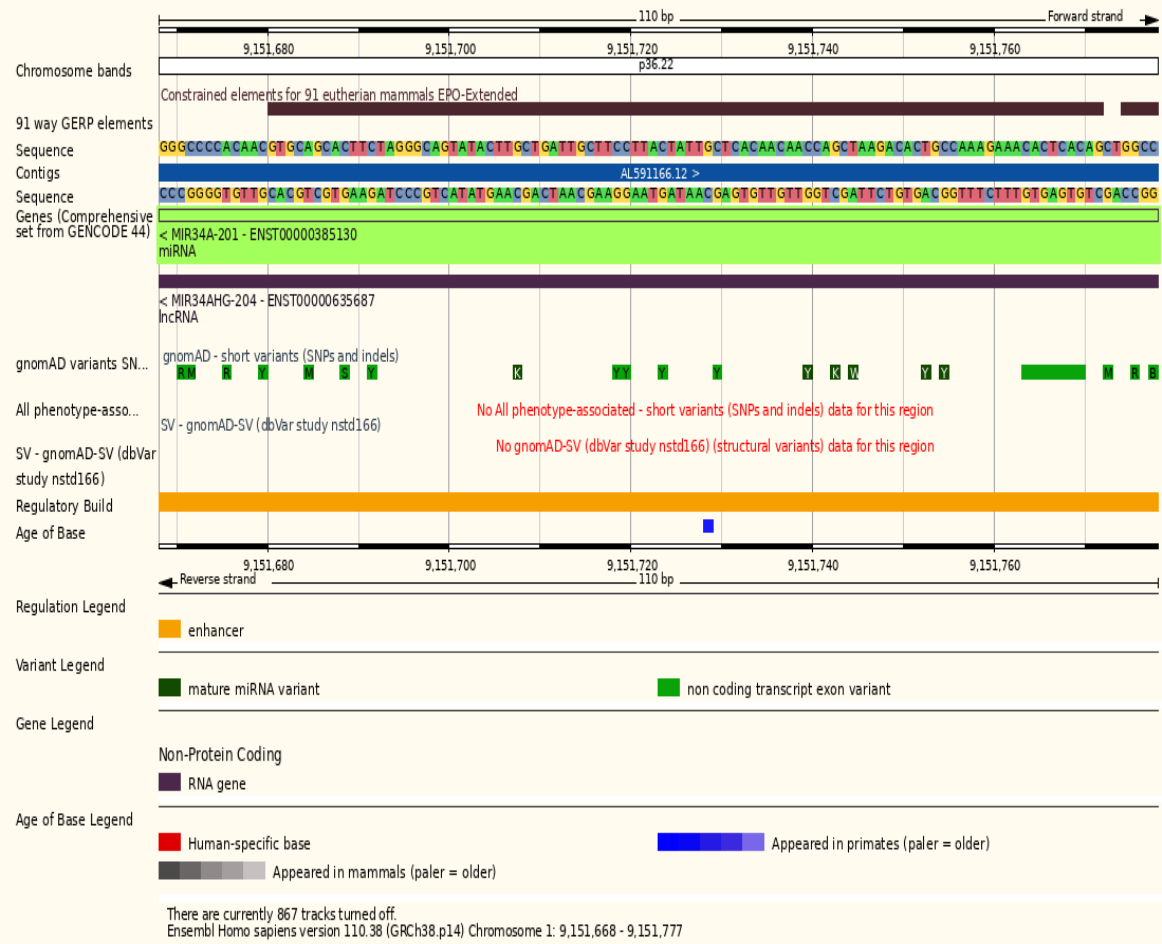
Şekil 5. İnsan miR-34a, miR-34b ve miR-34c'nin genomik lokuslarının yapısı (Li ve ark., 2014).

Son yıllarda, miR-34 ailesinin çeşitli sinyal yolakları aracılığıyla apoptozu önemli ölçüde düzenlediği gösterilmiştir (Adams ve ark., 2016). Transkripsiyon sonrası düzeyde çoklu genlerin düzenlenmesinden, çeşitli onkojenik tetikleyicilere karşı hücre döngüsünün G1/S fazında durdurulmasından ve kanser hücrelerinin öldürülmesinden sorumludurlar (Rokavec ve ark., 2014). apoptomiR'ler olarak yeniden aktive edilen miR-34 mimikleri, çok sayıda kanser hücresinin inhibisyonuna neden olur ve apoptotik yolakları başlatır (Maroof ve ark., 2014). miR-34 mimik replasman tedavisi uygulanan meme kanseri hücre hatlarında miR-34 ekspresyonunda artış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kanser hücresi proliferasyonu, yenilenmesi, hücre döngüsü, epitelyal-mezenkimal geçiş ve hücre göçünün güçlü bir şekilde baskılandığı ve inhibe edildiği bulunmuştur (Bartel, 2009). Genel olarak miR-34a'nın meme kanserinde P53 aracılığıyla doğrudan apoptozu indüklediği kabul edilmektedir. Meme kanserinde miR-34a'nın proapoptotik işlevleri anti-apoptotik proteinlerle etkileşim halindedir (Zhao ve ark., 2013).

Yapılan bir çalışmada, HL-60 ve Kasumi-1 hücrelerinde yüksek miR-34a ifadesinin PD-L1'i bloke ettiği ve hücre yüzeyinde PD-L1 ifadesini azalttığı bulunmuştur. Ayrıca miR-34a transfeksiyonundan sonra PD-L1'e özgü T hücresi apoptozunun azaldığını ve miR-34a'nın PD-L1 mRNA'sını hedefleyerek PD-L1 ekspresyonunu düzenlediğini bildirmişlerdir (Wang ve ark., 2015).

miRNA terapötikleri, belirli bir bölgedeki gen ifadesini düzenleyen bir tür hassas terapi olarak tanımlanmaktadır. Ancak miRNA'ların hedef bölgeye verimli bir şekilde dağıtılması ve ulaştırılmasının önünde bazı engeller bulunmaktadır. RNAaz enziminin RNA'yı kolayca parçalayabilmesi ve miRNA'nın kısa yarı ömrü, bu tür küçük moleküllerin istenen bölgeye yeterli doz ve miktarda ulaştırılamaması anlamına gelmektedir (Sun ve ark., 2017). miRNA mimiklerini ve anti-miR'leri hedef hücrelere iletirken terapötik etkinliği sağlamak zordur. Bu zorluğun üstesinden gelmek için miRNA'ları daha stabil hale getirmek üzere nükleotidler kimyasal olarak modifiye edilmiş veya miRNA bozulmasını önlemek için nano taşıyıcı iletim sistemleri kullanılmıştır. Ancak, kimyasal olarak modifiye edilmiş miRNA'ların membrana yeterince nüfuz edememesi *in vivo* çalışmaları sınırlamıştır (Sun ve ark., 2017).

miR-34a hedef bölgeye yalnızca sınırlı ölçüde ulaşabildiğinden, daha etkili bir iletim mekanizması oluşturmak için çeşitli nanovektörler geliştirilmiştir. Lentivirüsler, adenovirüsler ve retrovirüsler bu dağıtım vektörleri arasında yaygın olarak kullanılan viral vektörlerdir. İstenen gen, ilaç veya nükleik asit virüs içinde kapsüllenir ve viral enfeksiyon yoluyla hedef hücrelerin genomuna aktarılabilir (Sharon ve Kamen, 2018). Lipid bazlı vektörler, nükleik asitlerin transfeksiyonu için genellikle çok tercih edilen viral olmayan vektörlerdir. Lipozomlar, stabilizasyonu sağlamak için hidrofilik bir baş ve hidrofobik bir kuyruk içeren lipit bazlı taşıyıcılardır. Lipozomlar, yüksek transfeksiyon verimlilikleri nedeniyle günümüzde popüler taşıyıcılardır (Xue ve ark., 2015). Fosfolipid çift tabakadan oluşan ve sulu bir çekirdeğe sahip olan lipozom vezikülleri, merkezde sulu bir bölme bulunması nedeniyle hidrofilik ve iyonik ilaç moleküllerinin tutulması için geliştirilmesi ve kullanılması daha kolay ve uygundur. Lipid veya fosfolipid içeren biyouyumlu malzemelerden kolayca hazırlanırlar ve işlevselleştirilmiş lipidlerle uygun ve çeşitli şekilde adapte edilebilirler. Bu nedenle, lipozomlar RNA interferaz (RNAi) ajanlarının iletimi için yaygın olarak kullanılan nanosistemlerdir (Mallick ve Choi, 2014).



Şekil 6. miR34a'nın gen dizisi ve DNA üzerindeki lokasyonu (https://jul2023.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000284357;r=1:9151671-9151785;t=ENST00000385130).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan stok hücre hatları daha önce Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda mevcuttu ve önceki yıllarda ATCC'den (American Type Culture Collection) ticari olarak temin edilmişti. Deneyler için MCF-7 meme kanseri hücre hattı ve HME1 sağlıklı meme dokusu hücre hattı kullanıldı. Hücre hatları %10 FBS ve %1 DMEM besi yerinde çoğaltıldı. Tüm hücreler 37°C'de %5 CO_2 atmosferde inkübe edilmiştir. ATCC tarafından tavsiye edildiği üzere, hücreler %0,25 tripsin ve %0,03 EDTA karışımı ile uzaklaştırılmış ve 1:3 oranında pasajlandı. Kullanılmayan hücreler %95 besiyeri ve %5 DMSO ile hazırlanan hücre dondurma solüsyonunda -80 °C'de kısa bir süre veya sıvı nitrojen içinde daha uzun bir süre saklanmıştır.

Hücre sayımı için bir hematositometre lamı kullanıldı. Bu amaçla, besiyeri çıkarıldı ve hücreler 1XPBS ile yıkandı. Tripsin ilavesinden sonra hücreler petri kabından ayrıştırıldı. Bu hücreler 5 ml besiyeri içeren 15 ml'lik bir falkon tüpüne aktarıldı ve karıştırıldı. Stoktan alınan hücreler besiyeri ile 1/10 oranında seyreltildi. Daha sonra 100 µl alındı ve bir lam üzerine yerleştirildi. Hücreler invert mikroskop altında incelenmiş ve toplam hücre sayısı aşağıdaki formüle göre belirlendi.

Hücreler / ml = her kare X ortalama seyreltme faktörü X 10

Eşit hacimlerde hücre süspansiyonu uygun yoğunlukta yeni plakalara aktarıldı.

3.2. miR-34a Mimiklerinin Hazırlanması

Tez çalışmasında hsa-miR-34a mimikleri kullanıldı. Liyofilize miRNA'lar yeniden süspanse edilmiştir. Yeniden süspanse edilen miRNA'lar küçük hacimlere bölünmüş ve -20 ºC'de saklandı. Ayrıca, süspanse edilmiş miR-34a'yı uygun transfeksiyon ajanına yüklemek için kullanıma hazır miR-34a kompleksleri hazırlanmıştır (Li ve ark., 2010). Çalışmada miR-34a protokole göre hazırlandı. Toz formdaki 5 nM miR-34a üzerine 250 ml DNA/RNAaz içermeyen su eklenerek stok çözelti hazırlandı. Stok çözelti 2 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM ve 200 nM olacak

şekilde seyreltildi. Seyreltilen miR-34a örnekleri transfeksiyon için kullanılmak üzere +4 ºC'de saklandı.

3.3. MCF-7 ve HME1 Hücre Hatlarına miR-34a Transfeksiyonu

MCF-7 ve HME1hücre hatlarında en yüksek transfeksiyon verimliliğini ve düşük sitotoksisiteyi elde etmek için miR-34a 6 farklı konsantrasyonda kullanıldı ve aşağıdaki şekilde optimize edildi. Kültüre alınan MCF-7 ve HME1 hücrelerinin 50 µL örnekleri steril 96 kuyulu petri kaplarına eklendi. Farklı konsantrasyonda (1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM) seyreltilen miR-34a örneklerinin her birinden 100 µL ayrı steril tüplere yerleştirildi. Diğer yandan, steril bir tüpe 14 µL transfeksiyon ajanı (Lipofectmax) eklendi. DMEM besiyerinden 700 µL eklenerek seyreltildi ve 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra, hazırlanan miR-34a örneklerinin her birine 100 µL transfeksiyon ajanı-DMEM karışımı eklenmiş ve 20 dakika inkübe edildi. Ardından, steril 96 kuyulu plakalardaki MCF-7 ve HME1 hücre hatlarının her birine miR-34a ve transfeksiyon ajanı karışımından 100 µL eklendi. MCF-7 ve HME1 hücrelerinde PD-L1 ligand ekspresyonunun inhibisyonunu ve kanser tedavisindeki etkinliğini belirlemek için, hsa miR-34a transfeksiyon ajanı ilgili hücrelere 0-100 nM oranlarında transfeksiyon gerçekleştirildi. Kontrol hücre grubu ise boş nanokompleksler ile transfekte edildi (Gorur ve ark., 2021). Ardından, transfeksiyon işlemi 48 saat boyunca %5 CO_2 içeren bir atmosferde 37 ºC'de etüvde inkübasyon ile gerçekleştirildi.

3.4. MTT ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür testi (MTT), meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve sağlıklı meme dokusundan elde edilen hücre hattı HME1'e transfekte edilen miR-34a'nın sitotoksik etkisini belirlemek için gerçekleştirilmiştir. Bu test, MTT'nin canlı hücrelerde mitokondriyal dehidrojenaz enzimi tarafından çözünebilir formazan tuzları oluşturmak üzere parçalanması prensibine dayanmaktadır. Hücreler stoktan alınarak T25 flasklara ekilmiş ve neredeyse tüm yüzey kaplandığında tripsinleştirme yoluyla çıkarılmış ve 96 kuyucuklu ($1x10^5$ hücre/kuyucuk) steril petri kaplarına yerleştirilmiştir. İnkübasyondan sonra (24 saat), besi yeri atılmış ve miR-34a transfeksiyonu için farklı konsantrasyonlar (5-200 µL) kullanılmış ve sitotoksik doz belirlenmiştir. miR-34a ve lipofektamin karışımı her bir kuyucuğa 100 µL olarak

eklenmiş ve ardından 24 ve 48 saat boyunca %5 CO_2 içeren bir atmosferde 37 °C'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklarda miR-34a ile transfekte edilen hücrelerin süpernatantı ayrı Ependorf tüplerine alındı ve Elisa testinde kullanılmak üzere -20 ºC'de saklanmıştır. MTT (0,05 g) steril 10 ml'lik bir falkon tüpüne konuldu ve 10 ml steril PBS eklenerek çözüldü. Hazırlanan MTT çözeltisi (20 µL) kuyucuklara eklenmiş ve 2-4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besi yeri plakalardan uzaklaştırılmış, formazan kristalleri 100 µL DMSO ile çözülmüş ve absorbans değerleri spektrofotometrede 570-690 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedilmiştir (Mosmann, 1983; Urgen, 2010).

3.5. IC_{50} Değerinin Hesaplanması

Uygulanan miR-34a mimiklerinin doza ve zamana bağlı yanıt eğrisi, GraphPad Prism yazılımı (GraphPad Prism 8 Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak konsantrasyonlara karşı inhibisyon yüzdesi çizilerek oluşturulmuştur. Doğrusal olmayan regresyon analizi yapılmış ve bu çalışmada kullanılan MCF-7 ve HME1 hücre tiplerinde miR-34a mimiklerinin IC_{50} değerleri benzer prosedürler kullanılarak hesaplanmıştır (Tülüce ve ark., 2019).

3.6. PD-L1 Elisa Testi

Bu testin amacı, miRNA uygulamasının hücre hatlarında uygulama sonrası çözünmüş ve membrana bağlı PD-L1 seviyesini belirlemektir. miR-34a ile muamele edilen hücrelerin süpernatantları steril Ependorf tüplerine yerleştirilmiş ve 4 ºC'de ve 200 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatantlar steril Ependorf tüplerine aktarılmıştır. PD-L1 Elisa kitindeki standart 5 farklı konsantrasyona (40, 20, 10, 5 ve 2.5) seyreltilerek standartlar hazırlanmıştır. Standartlar, körler ve numuneler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. Daha sonra standart plakaya 50 µL standart ve 50 µL streptavidin-HRP eklendi. Örnekler için 40 µL serum sıvısı (süpernatant), 10 µl PD-L1 antikoru, 50 µl streptavidin-HRP ilave edildi. Plaka bir kapatıcı ile kapatıldı ve %5 CO_2 atmosferli bir etüvde 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi. Kit içerisindeki 30X konsantre yıkama tamponundan 4 ml alındı ve 120 ml'ye seyreltildi. İnkübasyondan sonra, sıvıyı

uzaklaştırmak için plaka hafifçe çalkalanmıştır. Kuyucuklara 300 µl seyreltilmiş yıkama tamponu eklendi ve 1-2 dakika sonra çalkalanarak uzaklaştırılmıştır. Bu prosedür 5 kez tekrarlanmıştır. Daha sonra tüm kuyucuklara (kör dahil) 50 µL CromogenA ve 50 µL Cromogen B eklendi ve 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa (kör dahil) 50 µL durdurma solüsyonu eklendi ve 10 dakika içinde 450 nm dalga boyunda okuma yapıldı. PD-L1 seviyeleri PD-L1 kiti üreticisinin talimatlarına göre bir enzim immunoassay kullanılarak ölçüldü. Son olarak, hücreler normalizasyon için tripsinize edildi ve sayıldı (Romero ve ark., 2020).

3.7. Hücre Göçü Analizi

Hücre göçü deneyinin amacı, hsa-miR-34a'nın MCF-7 ve HME1 hücre hatlarındaki hücre hareketliliği ve göçü (migrasyon) seviyesindeki değişimi üzerine etkisinin tespit edilmesidir. Bu amaçla *in vitro* yara iyileşmesi deneyi yapılmıştır. Stoktan alınan hücreler çoğalması için steril flasklara ekim yapıldı, hücreler %5 CO_2'li atmosferde 37 °C'de inkübe edildi. Hücreler yeterli sayıya ulaştıktan sonra altı kuyucuklu petrilere pasajlanması yapıldı. Bunun için 6-kuyucuklu steril hücre kültürü plaklarına ekilen hücrelere ($7x10^4$ hücre/kuyucuk) 10 nM dozunda miRNA'lar hücrelere transfeksiyonu gerçekleştirildi. Ardından hücrelerin kapladığı flask tabanı 200 ul'lik steril pipet ucu ile düz bir çizgi halinde boydan boya çizildi (0. saat). Ardından yüzen hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için besiyeri bir kez değiştirilmiş ve hücreler 37 °C sıcaklık, %95 nem ve %5 CO_2 koşullarında inkübasyona bırakıldı. Kontrol uygulamasındaki kapanma miktarı dikkate alınarak 0. ve 48. saatlerinde çizilen alanların fotoğrafı Faz-Kontrast Mikroskobu kullanılarak çekildi. Hücre göçü miktarı, belirlenen zaman sürecinde (0. ve 48. saatler) oluşan ilerlemenin, ilk yara genişliği ile farkının ImageJ yazılımı (NIH, Bethesda, ABD) ile ölçülmesiyle hesaplandı. Yara kapatma alanı şu formül ile hesaplandı:

% Yara kapatma alanı = [(At = 0 h – A t = Δ h)/A t = 0 h] × 100%, (0h: 0. saatte ölçülen yara alanı, Δ h; 48. saatte ölçülen yara alanı)

Her deney için en az 5 rastgele örtüşmeyen fotoğraf çekilmiş ve deneyler 3 tekrarlı olarak yapıldı.

3.8. Ko-Kültür Çalışması

3.8.1. PBMC Hücrelerinin Çözdürülmesi

Sıvı nitrojen tankında saklanan PBMC hücre hatları, önceden ısıtılmış damıtılmış su içeren bir behere konuldu. Çözünme tamamıyla gerçekleşmeden önce hücreler önceden ısıtılmış %20 FBS ve tam RPMI-1640 besiyeri bulunan 50 ml'lik bir tüp içerisine eklendi. DMSO'ya maruz kalma süresini azaltmak adına hücreler 25°C, (RT) 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler %10 FBS, %1 PSA içeren tam RPMI-1640 içinde tekrardan süspanse edildi ve petri kabına konularak 37°C ve %5 CO_2 %95 nem içeren bir inkübatörde kültüre edildi. (Ghanekar ve ark., 2007; Owen ve ark., 2007).

3.8.2. PBMC Hücrelerinin Stoklanması

Hücrelerin uzun vadede saklanabilmesi için, pasajlanmış PBMC hücreleri %80-90 doluluk oranına erişinceye kadar 14 gün süresince inkübasyona bırakıldı. PBMC hücrelerinin sıvı nitrojen içerisinde dondurularak korunması amacıyla hücreler 15 mL'lik bir tüpe aktarılmış (yapışık hücreler tripsin/EDTA ile flasktan ayrıldı) ve 25°C, 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler dondurma solüsyonu (%90 FBS - %10 DMSO) içerisinde tekrardan süspanse edildi.

Daha sonra hemen kriyojenik kaplara konuldu. Kriyo flakonları, sıcaklığı -1 °C/dk düşüren Mr Frosty dondurucuya (Thermo Fisher Scientific, ABD) bırakıldı. Flasklar -80 °C dondurucuda 4-24 saat kaldıktan sonra kriyojenik flakonlar çıkarılarak sıvı nitrojen tankında muhafaza edildi (Ghanekar ve ark., 2007; Owen ve ark., 2007).

3.8.3. T Hücrelerinin Manyetik Ayrımı

Manyetik aktive hücre sınıflandırması (MACS) $CD8^+$ T monositler, ticari olarak satın alınmış PBMC'lerinden üretici (MojoSort, USA) tarafından gönderilen protokole göre saflaştırma işlemine tabi tutuldu. Diğer bir deyişle $1x10^7$ PBMC için hücreler 4 ml MojoSort tamponu (%0.5 BSA ve 2 mM EDTA içeren PBS) içerisinde tekrardan süspanse edildi. Elde edilen hücre süspansiyonu 300 g'de 5 dakika santrifüjlendi.

Süpernatant uzaklaştırılarak hücre peleti $1x10^8$ hücre/ml olacak şekilde MojoSort tamponu içerisinde süspansiyona uğratıldı. Bu hücre süspansiyonundan 100 uL alınıp, 10 uL Biotin-Antibody karışımı eklendi. Buz üzerinde 15 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra; 10µL Streptavidin Nanobeads hücreler üzerine eklenerek pipetaj işlemi yapıldı ve iyice karıştırılarak buz üzerinde 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra karışıma 4 ml MojoSort tamponu eklenerek 300 g'de 5 dakika santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant santrifüjden sonra uzaklaştırılırken, pellet üzerine 2,5 ml'ye kadar MojoSort tamponu eklendi. Akabinde hücreler yeniden süspanse edilerek mıknatıslara yerleştirildi ve 5 dakika bekletildi. Daha sonra $CD8^+$ T monositleri içeren sıvı steril olan başka bir tüpe aktarıldı. Bu tüp 25°C'de 5 dakika 1800 rpm'de santrifüjlendi. Bu hücreler daha sonra tüm kültür büyüme ortamında (%10 FBS ve %1 RPMI-1640) tekrardan süspanse edilerek petri kabına ekildi ve 37°C, %5 CO_2 ve %95 nem içeren bir inkübatörde kültüre edildi.

3.8.4. $CD8^+$ T Hücrelerinin Pasajlanması

$CD8^+$ T hücreleri PBMC'den izole edilerek %10 FBS, 50 IU/ml interlökin-2 (proleukin) ve %1 antibiyotik RPMI-1640 tam besiyeri içeren T25 veya T75 hücre kültürü flasklarında kültür ortamına bırakıldı. Flasklar 37°C, %5 CO_2 ve %95 nem koşulları altında inkübasyona bırakıldı. Alt kültürler ve hücre transferleri, tripsin-EDTA veya HyQTase kullanılmadan serolojik bir pipet yardımı ve sıvı yıkama yoluyla mekanik bir şekilde gerçekleştirildi.

3.9. Kanser Hücre Hatları ile $CD8^+$ T Hücrelerinin Ko-Kültürü

Mililitresinde $4x10^6$ hücre/ml içeren 0,5 ml tamamlanmış RPMI-1640 içerisindeki $CD8^+$ T hücresi ile mililitresinde $4x10^6$ hücre/ml içeren 0,5 ml tamamlanmış RPMI-1640 içerisindeki MCF-7 ve HME1 hücreleri, PD-L1 ekspresyonunu azalttığı belirlenen IC_{50} dozunda hsa-miRNA 34-a transfekte edilerek, efektör ve hedef 1:1 olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekimi yapıldı.

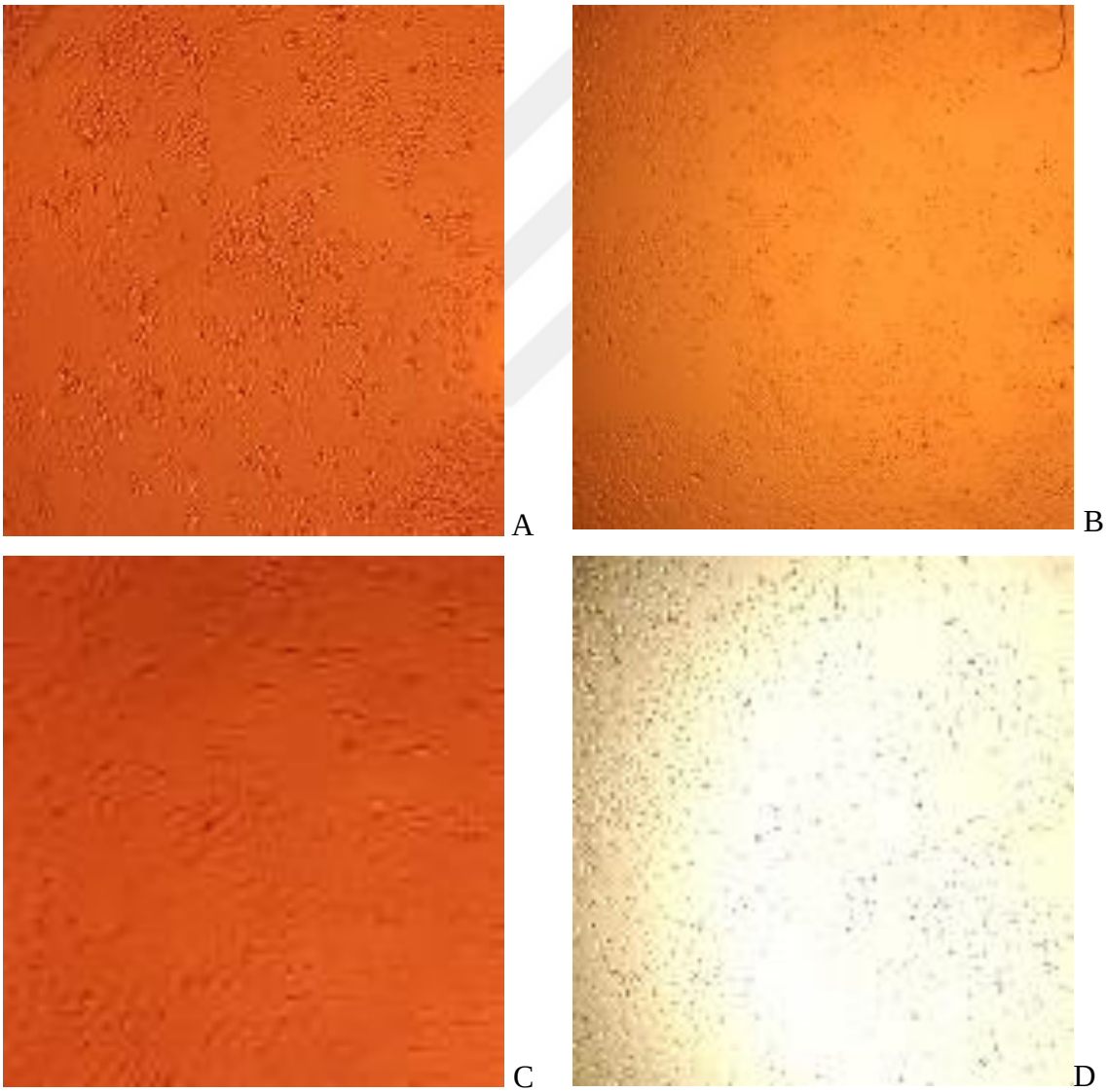
Plakalar %5 CO_2 ve %95 nem içeren bir inkübatörde 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında $CD8^+$ hücrelerinin sitotoksik aktivitesinin belirlenmesi amacıyla hücrelere MTT testi yapıldı. Ayrıca aynı işleme uğrayan diğer

plakalar da inkübasyon sonunda 1500 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Elde edilen süpernatantlar alikotlanarak daha sonra kullanılmak için -80°C'de saklandı. Deney üç tekrar olacak şekilde yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. miR-34a Transfeksiyonunun MCF-7 ve HME1 Hücre Hatlarına Etkisi

miR34a ile transfekte edilen MCF-7 ve HME1 hücreleri transfeksiyondan 24 ve 48 saat sonra mikroskobik olarak incelendi. Kontrol gruplarında miR-34a transfeksiyonu olmadığından, bu hücrelerin proliferasyonunda zamana bağlı bir artış görüldü. miR-34a ile transfekte edilen MCF-7 ve HME1 hücrelerinde zamana ve doza bağlı olarak hücre proliferasyonunun azaldığı gözlendi.



Şekil 7. miR-34a transfeksiyonu yapılmayan MCF-7 hücre kontrol gruplarının (A) 24 sonraki, (B) 48 saat sonraki görünümü. miR-34a transfeksiyonu yapılmayan HME1 hücre

kontrol gruplarının (C) 24 sonraki, (D) 48 saat sonraki görünümü. Mikroskop büyütmesi X 400'dür.


A


B

Şekil 8. miR-34a transfeksiyonu yapılan MCF-7 hücrelerinin (A) 24 sonraki, (B) 48 saat sonraki görünümü. Mikroskop büyütmesi X 400'dür.

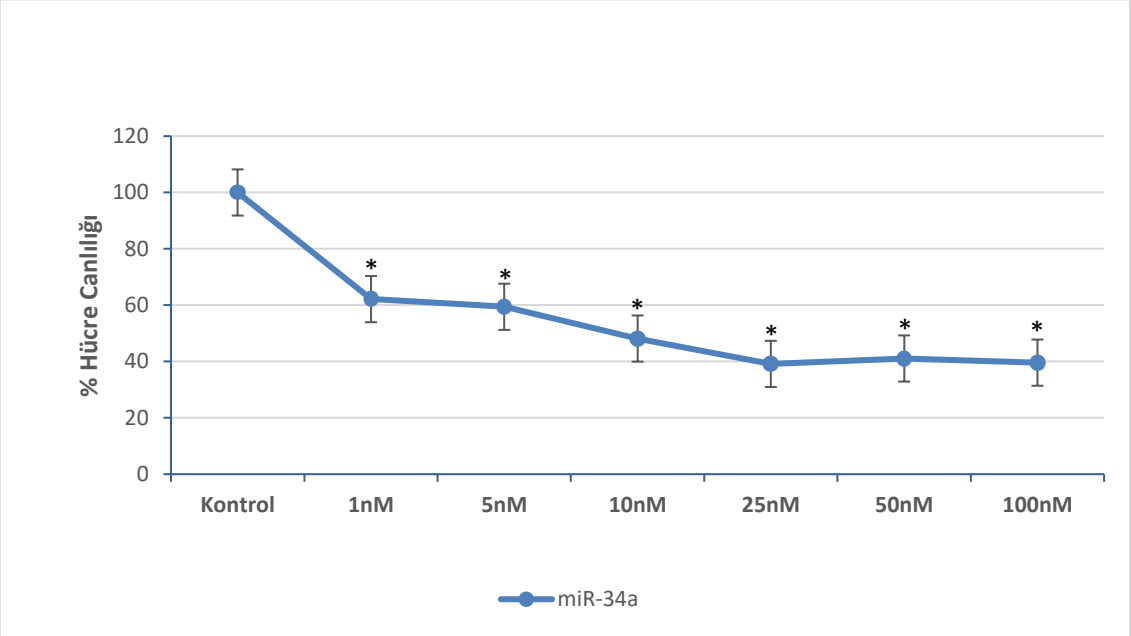

A


B

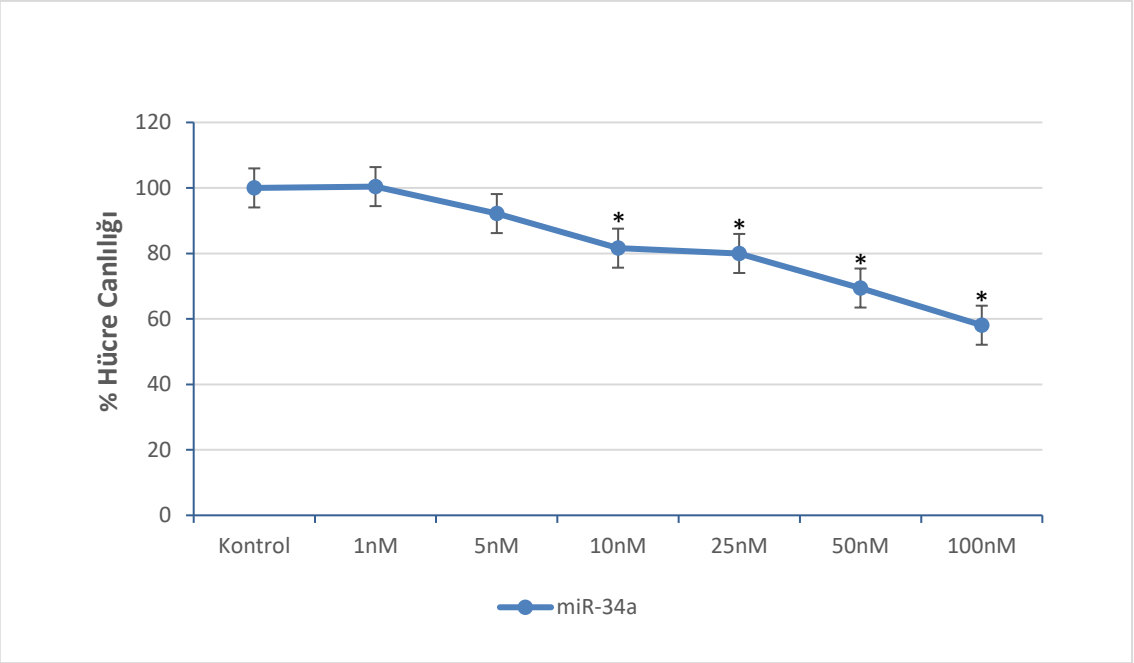
Şekil 9. miR-34a transfeksiyonu yapılan HME1 hücrelerinin (A) 24 sonraki, (B) 48 saat sonraki görünümü. Mikroskop büyütmesi X 400'dür.

4.2 MTT ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

Sitotoksik etki miR-34a ile transfekte edilen MCF-7 ve HME1 hücrelerinde MTT yöntemi ile belirlenmiştir. İlk olarak, miR-34a'nın farklı konsantrasyonları (1, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM) 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra transfeksiyon ajanıyla hücre hatlarına transfekte edilmiş ve sitotoksik doz tespit edilmiştir. MTT analizleri, tüm miR-34a dozlarının hem MCF-7 hem de HME1 hücre hatlarında zamana ve doza bağlı sitotoksik etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu miR-34a dozları arasında 100 nM en etkili sitotoksik doz olmuştur. MCF-7 hücre hattına uygulanan miR-34a dozlarının tümü, kontrol grubuna göre hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma göstermiştir (Şekil 10). Sağlıklı HME1 hücre hattına uygulanan miR-34a dozları (10, 25, 50 ve 100 nM) ise hücre canlılığını kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azaltmıştır (Şekil 11).



Şekil 10. MCF-7 hücre hattında 48 saatlik miR-34a transfeksiyonunun hücre proliferasyonuna etkisi (*p<0.005).



Şekil 11. HME1 hücre hattında 48 saatlik miR-34a transfeksiyonunun hücre proliferasyonuna etkisi (*p<0.005).

4.3. IC_{50} Değeri

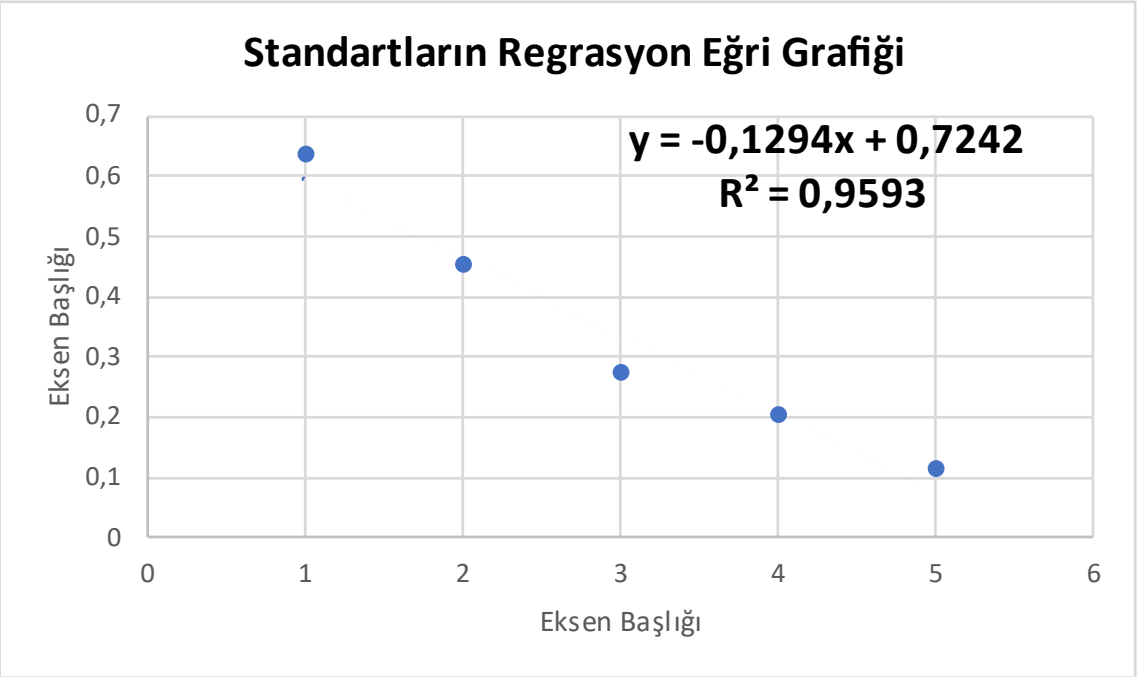
Tablo 1. miR-34a ile transfekte edilen MCF-7 ve HME1 hücre hatlarının 48 saatlik IC_{50} değerleri.

	IC_{50} nM	
	MCF-7	HME1
miRNA	48h	48h
miR-34a	0,77	8,08

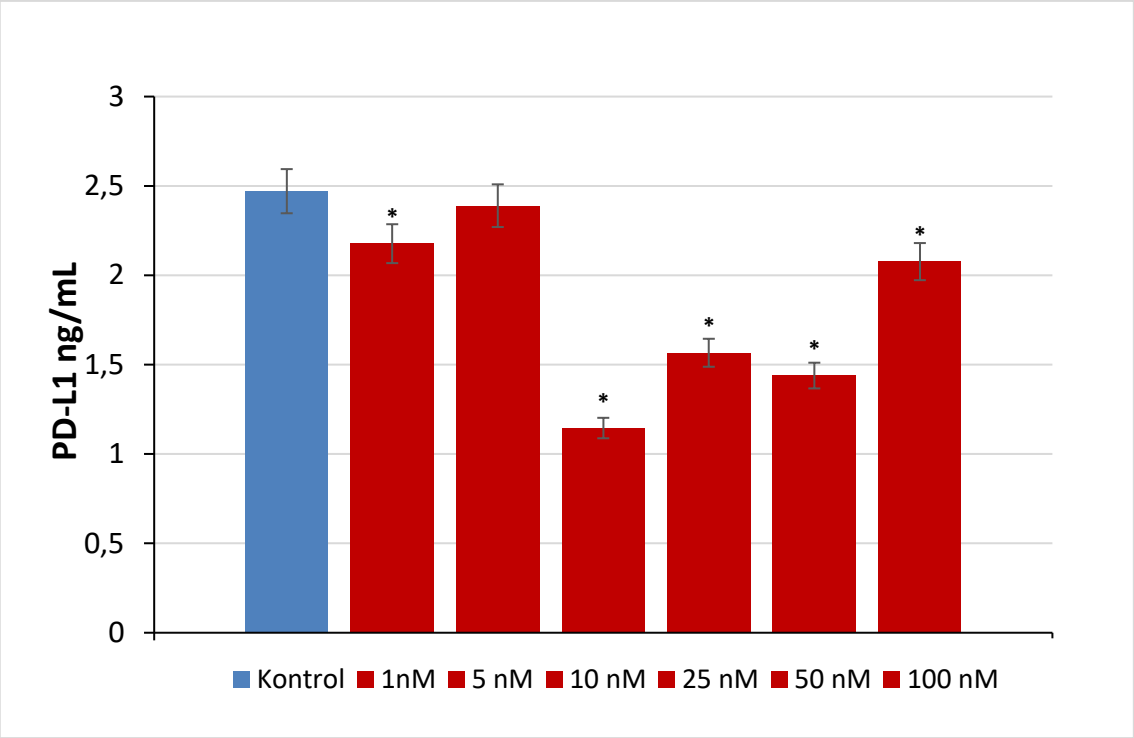
4.4. PD-L1 Elisa Testi ile PD-L1 Seviyesinin Tespit Edilmesi

miR-34a ile transfekte edilen MCF-7 ve HME1 hücrelerindeki PD-L1 seviyeleri PD-L1 ELISA testi kullanılarak belirlenmiştir. PD-L1 ELISA testi analizlerine göre, MCF-7 ve HME1 hücrelerine transfekte edilen tüm miR-34a dozları çözünmüş ve membrana bağlı PD-L1 seviyesini anlamlı bir şekilde azaltmıştır. MCF-7 meme kanseri

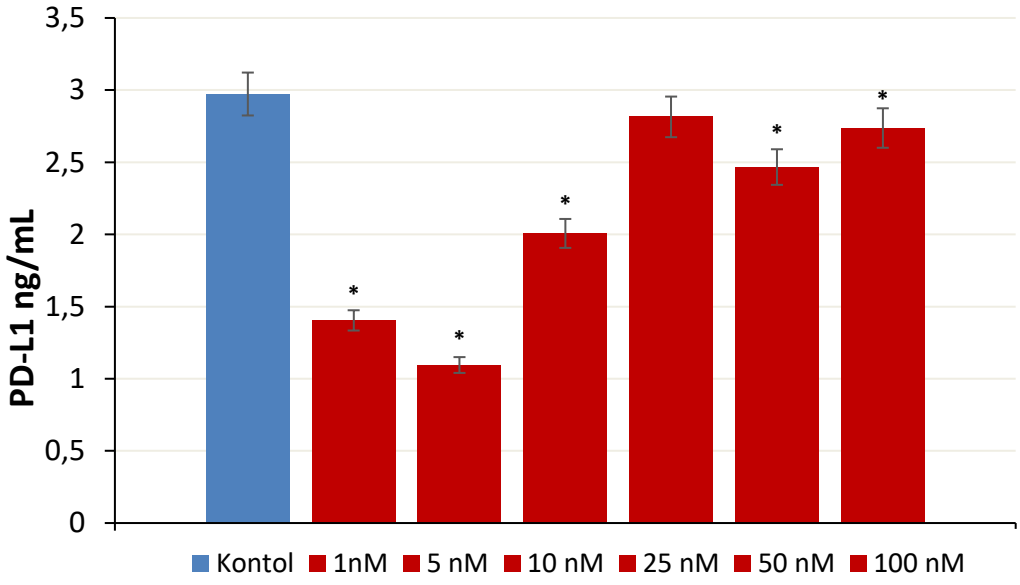
hücrelerine uygulanan miR-34a dozlarından 10 nM, 20 nM ve 50 nM'ın istatistiksel olarak PD-L1 seviyelerini anlamlı bir şekilde azaltmıştır (Şekil 13). Sağlıklı HME1 hücre hattına uygulanan miR-34a dozlarından 1nM ve 5nM'ın istatistksel olarak PD-L1 seviyelerini anlamlı ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 14).



Şekil 12. Uygulanan miR-34a dozlarının regresyon eğrisi diyagramı



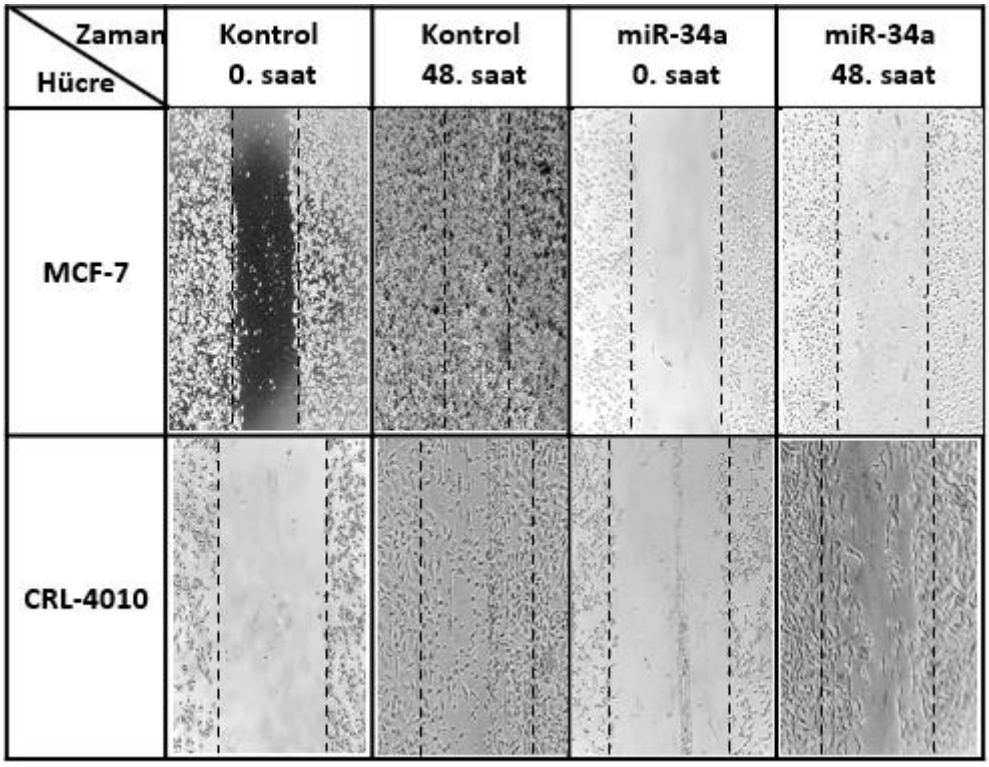
Şekil 13. MCF-7 hücrelerinde miR-34a transfeksiyonunun PD-L1 miktarı üzerindeki etkisi (*p<0.05).



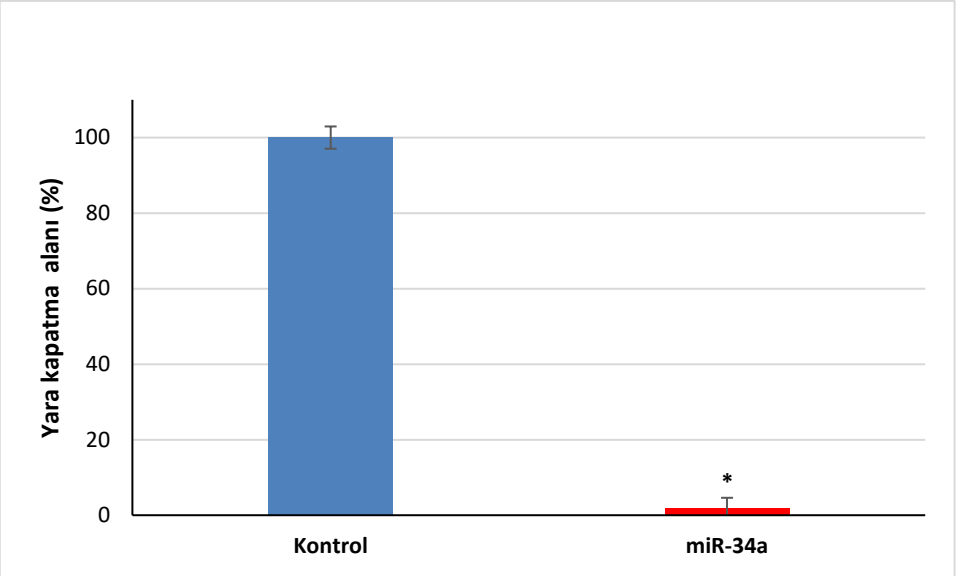
Şekil 14. HME1 hücrelerinde miR-34a transfeksiyonunun PD-L1 miktarı üzerindeki etkisi (*p<0.05).

4.5. Hücre Göçü Oranının Belirlenmesi

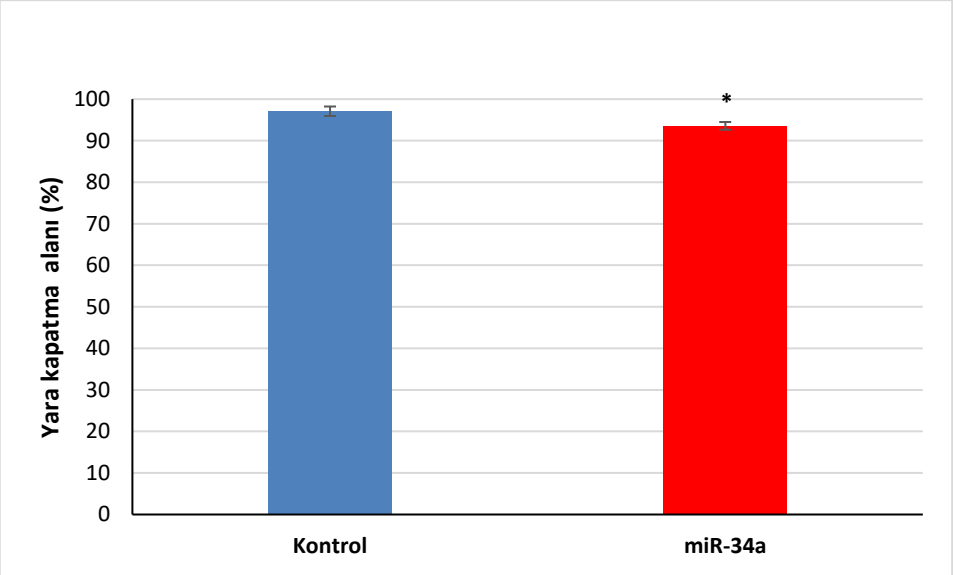
Hücre göçü testinde miR-34a uygulanmış MCF-7 ve sağlıklı HME1 hücrelerinin bulunduğu petri kabı tabanı sıyrılarak yara açıldı ve inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 0. ve 48. saat sonunda mikroskop görüntüleri alındı. miR-34a uygulanan MCF-7 hücrelerinde 48. saat sonunda hücrelerin yarayı kapatamadığı görülürken, kontrol grubunun yarayı tamamen kapattığı gözlemlendi. miR-34a transfekte edilen sağlıklı HME1 hücrelerinin ise yarayı kontrol grubuna göre kapattığı görüldü.



Şekil 15. miR34a uygulanmış MCF-7 ve HME1 (CRL-4010) hücrelerinin 0 ve 48 saat sonraki hücre göçü analizi mikroskop görünümü. Mikroskop büyütmesi X 400'dür.



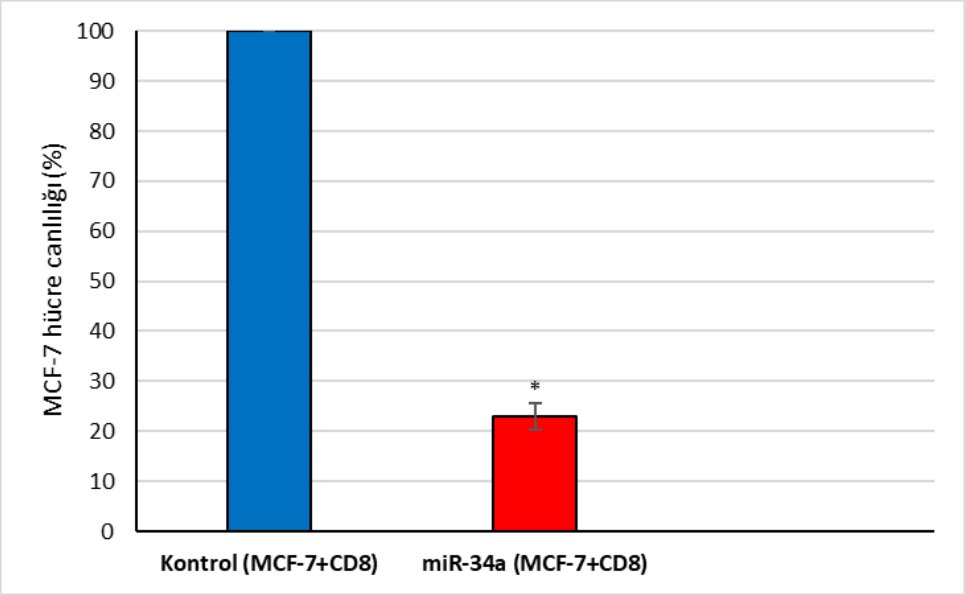
Şekil 16. miR-34a uygulanmış MCF-7 hücrelerindeki migrasyon oranı (*p<0.05).



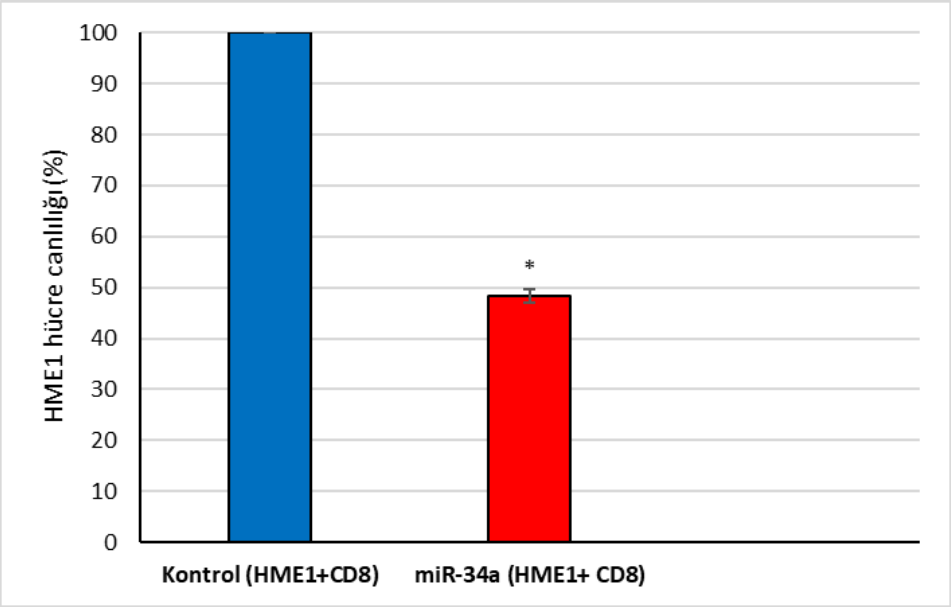
Şekil 17. miR-34a uygulanmış sağlıklı HME1 hücrelerindeki migrasyon oranı (*p<0.05).

4.6. MCF-7 ve HME1 Hücre Hatları ile CD8$^+$ T Hücrelerinin Ko-Kültürü

Çalışmada, miR-34a'nın MCF-7 kanser hücreleri ve HME1 sağlıklı meme hücreleri üzerindeki bağışıklık yanıtlarını tespit etmek için ko-kültür analizi yapılmıştır. PHA ve IL-2 ile uyarılan izole CD8$^+$ T hücreleri miR-34a-transfekte MCF-7 ve HME1 hücreleri ile kültüre alınmıştır. Ko-kültür periyodunun ardından MTT testi ile kontrol grubu hücrelerine kıyasla MCF-7 kanser hücrelerinin yaklaşık %80'inin ve HME1 sağlıklı meme hücrelerinin %50'sinin öldüğü belirlenmiştir.



Şekil 18. miR-34a uygulanan MCF-7 hücreleri ile CD8$^+$ T hücrelerinin ko-kültür sonrası canlılık grafiği (*p<0.05).



Şekil 19. miR-34a uygulanan HME1 hücreleri ile $CD8^+$ T hücrelerinin ko-kültür sonrası canlılık grafiği (*$p<0.05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çağımızın en önemli hastalıklarından biri kanserdir. Kanserin görülme sıklığı genetik yatkınlık veya insan yaşam tarzı nedeniyle hızla artmaktadır. Bu artış sürecinin nedenlerinden bazıları; sentetik gıdaların fazlalığı ve dengesiz beslenme, hareketsiz yaşam tarzı, alkol ve sigara gibi kötü alışkanlıklar ve doğal yaşamdan uzaklaşma olarak sıralanabilir. Üstelik kanser, tüm dünyada görülme sıklığı ve ölüm oranı en yüksek hastalıklardan biridir. Öyle ki bilim insanları tarafından "yüzyılın patolojisi" olarak adlandırılmıştır. Bu kötü huylu hastalıkla mücadelede şu anda bilim tarafından çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında cerrahi yöntemler, radyoterapi ve kemoterapi yer almaktadır. Ancak mevcut yöntemlerin kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan sık ağrı ve rahatsızlık hissi, tedavi sırasında ortaya çıkan ciddi yan etkiler ve tedavi süresinin çok uzun olması hastaların yaşam kalitesini büyük ölçüde etkilemekte ve sürecin sağlıklı bir şekilde ilerlemesini zorlaştırmaktadır. Bu tedavi yöntemleri ile kanser hücrelerine doğrudan saldırılamadığı için sağlıklı hücrelerin de ölümü ile tedavi süreci daha da karmaşık bir hal almaktadır. Bu nedenle yeni alternatif yöntemlerin geliştirilmesi oldukça önemli hale gelmiştir. Bu bağlamda son dönemde kullanılan ve olumlu sonuçlarıyla adından söz ettiren bir diğer teknik de kanser immünoterapisidir.

Kanser immünoterapisi, bağışıklık sisteminin kansere karşı mücadelesini ve eylemini artırmak için son zamanlarda geliştirilen en umut verici yöntemlerden biridir (Salmaninejad ve ark., 2019). Kanser immünoterapisi üzerine yapılan son çalışmalar, birçok kanser türünün tedavisinde kullanılabileceğini ve mevcut tedavi yöntemlerine kıyasla çok olumlu sonuçlar elde edilebileceğini göstermiştir. İmmünoterapötik olarak kullanılan immün kontrol noktası inhibitörleri hastalarda daha yüksek sağkalım ve hastalık ilerleme oranları elde edilebileceğini ortaya koymuştur. Ancak klinik çalışmalarda beklenenden daha düşük hasta başarı oranları elde edilmiştir (Darvin ve ark., 2019).

Bağışıklık kontrol noktası moleküllerinin bloke edilmesi son zamanlarda büyük ilgi ve talep görmektedir. Tasuku Honjo ve James P. Allison, kanser tedavisinde immün kontrol noktası moleküllerinin bloke edilmesine yönelik bilimsel keşifleri nedeniyle 2018 yılında Nobel Ödülü'ne layık görülmüştür. Bu nedenle kontrol noktası inhibitörleri

günümüzde büyük önem taşımaktadır. PD-L1/PD-1 blokajı çeşitli kanser türlerinin tedavisi için FDA tarafından onaylanmış olsa da meme kanseri üzerindeki etkisi hala tartışmalıdır (Bastaki ve ark., 2020).

Birçok çalışmada, immün kontrol noktası blokaj tedavilerinde kullanılan PD-L1'in tedaviye yanıt veren ve vermeyen hastaları ayırt etmek için önemli bir biyobelirteç olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, PD-L1'in aşırı ekspresyonu, immün kaçışta kritik bir rol oynayarak tümör hücrelerinin T hücreleri tarafından öldürülmesini önleyen moleküler bir kalkan görevi görebilir ve birçok kanserde T hücresi apoptozunun artmasına neden olabilir (Darvin ve ark., 2019).

miR-34a proliferasyon, apoptoz ve invazyon ile ilgili birçok onkogeni hedeflediği için tümör baskılayıcı olarak önemli bir rol üstlenmiş ve elde edilen veriler miR-34a temelli tedavilerin kanser tedavisi için umut verici bir yaklaşım olduğunu göstermiştir. Bu tür çalışmaların devamı miR-34a'nın tümör immünoterapisi ve immün dirençte rol oynadığını tespit etmiştir (Wang ve ark., 2015).

Bu çalışmada, transfeksiyon ajanları kullanılarak meme kanseri hücre hatlarına (MCF-7) ve sağlıklı meme hücre hatlarına (HME1) (0-100) nM arasında miR-34a dozları uygulanmış ve 24 ve 48 saat sonra inverted mikroskop altında incelenmiştir. Yapılan incelemelerde kontrol grubundaki hücrelerde proliferasyonda sürekli bir artış gözlenirken, miR-34a ile transfekte edilen meme kanseri hücre hatlarında zamana bağlı bir azalma ve ölü hücre sayısında artış gözlenmiştir (Şekil 10; Şekil 11).

miR-34a ile transfekte edilen meme kanseri hücre hatları (MCF-7) ile sağlıklı meme hücre hatlarında (HME1) oluşan sitotoksik etki MTT yöntemi kullanılarak test edilmiştir. MTT deneyinde elde edilen verilere dayanarak, MCF-7 ve HME1 hücre hatlarına transfekte edilen miR-34a'nın bu hücre hatları üzerinde zaman ve doza bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Sitotoksisite deneyleri sonucunda, meme kanseri hücre hatlarına uygulanan tüm miR-34a dozlarının sitotoksik etki gösterdiği ve MCF-7 hücrelerine uygulanan IC_{50} dozunun 0,77 nM, sağlıklı HME1 meme hücrelerine uygulanan IC_{50} dozunun ise 8,08 nM olduğu tespit edildi. Kullanılan miR-

34a'nın IC_{50} değeri hesaplanarak elde edilen IC_{50} sonuçları Tablo 4.1'de gösterilmiştir. MTT deneyinde elde edilen IC_{50} değeri dikkate alınarak çalışmalara devam edilmiştir.

PD-L1 Elisa deneyinde, miR-34a'nın tüm dozları transfeksiyon ajanı aracılığı ile MCF-7 meme kanseri hücre hattına ve sağlıklı HME1 meme hücre hatlarına transfekte edilmiş ve 48 saat sonra PD-L1 seviyesi belirlenmiştir. Sonuçlara göre, miR-34a mimikleri hem MCF-7 hem de HME1 hücre hatlarında PD-L1 seviyelerini kontrol gruplarına kıyasla önemli ölçüde azaltmıştır. En etkili miR-34a dozu MCF-7 hücre hattında 10 nM olarak belirlenirken, HME1 hücre hattında bu doz 5 nM oldu. Bu çalışmada miR-34a transfekte edilmiş meme kanseri hücrelerinde membrana bağlı veya çözünmüş PD-L1 seviyelerinde azalma olduğu göz önüne alındığında, miR-34a'nın hedeflenen PD-L1 mRNA'sına bağlandığı varsayılabilir. Böylece PD-L1'in miR-34a tarafından bloke edildiği ve bu bölgedeki PD-L1 mRNA'sının ya parçalandığı ya da susturulduğu, bunun da PD-L1 ifadesinde azalmaya yol açtığı söylenebilir. Bu sonuçlar MTT sitotoksisite testinin sonuçlarını desteklemektedir.

miR34a inhibitörü PD-L1'in ifadesini hedef alarak direkt etki ettiğinden, PD-L1'in miR34a tarafından transkripsiyonel düzeyde düzenlendiği ifade edilebilir. Ayrıca, çalışmalar miR-34a'nın PD-L1'in kodlamayan 3'UTR bölgesine doğrudan bağlanmasının transkripsiyonel düzeyde gen susturma için doğrudan bir hedef olduğunu göstermektedir (Wang ve ark., 2015).

PD-L1 Elisa testi sonuçları incelendiğinde, miR-34a'nın 10 nM üzerindeki dozlarının MCF-7 hücrelerinde hedef gen bölgesi olan PD-L1'in ekspresyonunu azaltmadığı tam aksine arttırdığı tespit edilmiştir. Diğer bir ifadeyle dozun artırılmasıyla hedef genin ekspresyonu arasında doğrusal olmayan bir ilişki gözlenmiştir. Shu ve arkadaşlarının (2012) yapmış olduğu çalışmada, MCF-7 ve HCT-116 hücrelerinde doza bağlı hedef gen susturulmasıyla ilgili benzer bulgular elde edilmiştir. Çalışmada miRNA'ların biyolojik aksiyonlarının doza bağımlı olduğu ifade edilirken, hedeflenen proteine ait mRNA'nın maksimum seviyede baskılanması için daha küçük bir optimal doz aralığının gerekli olduğu bildirilmiştir (Shu ve ark., 2012). Yapılan diğer çalışmalarda ise mimik miRNA'ların yüksek dozlarda kullanılmasının, gen ekspresyonunda spesifik olmayan değişikliklere sebebiyet verdiği rapor edilmiştir (Jin ve ark., 2015; Rupaimoole ve Slack, 2017; Lai ve ark., 2019). Başka bir araştırmada kanser tedavisinde kullanılacak

olan mimik miRNA'ların hedef dışı etkilerinin minimalize edilmesi için yüksek dozlarının kullanılmaması gerektiği söylenmiştir (Diener ve ark., 2022). Transfeksiyon ajanı ve miRNA tedarik firmaları da ürün kullanım kılavuzlarında hedef genin susturulması için optimum mimik miRNA dozunun; hücre tipine, hedef gene, hedef mRNA'nın yarılanma ömrüne ve miRNA tipine bağlı olduğunu ifade etmişlerdir. Düşük miRNA dozlarında hedef dışı etkilerin, yanlış ve üst üste bağlanmaların genellikle daha az seviyede olduğunu, bu nedenle de mimik miRNA kullanarak yapılan gen susturma uygulamalarında 1 nM ila 10 nM arasında değişen miRNA konsantrasyonlarının test edilmesi tavsiye edilmektedir.

PD-1/PD-L1 blokajı, $CD8^+$ T hücrelerinin bazı alt tiplerini eski haline getirebilir ve tümör mikroçevresini çeşitli şekillerde yeniden şekillendirerek anti-tümör immün yanıta yol açabilir (Blanck ve ark., 2006). Bu alandaki çalışmalar, T hücrelerinin yüzeyindeki PD-1 reseptörünün, blokajdan sonra PD-L1 ekspresyonu azalmış kanser hücrelerini tanıdığını ve apoptozu indükleyerek onları yok ettiğini göstermektedir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler miR-34a tarafından susturulan PD-L1 geninin ifadesinin azaldığını göstermektedir. Bu durum, miR-34a ile transfekte edilmiş MCF-7 meme kanseri hücrelerinin $CD8^+$ T hücreleri ile ko-kültürde T hücreleri tarafından tanınabileceğini ve yok edilebileceğini göstermektedir. Bu doğrultuda yapılan çalışmalarda miR-34a transfekte edilmiş MCF-7 kanser hücreleri ile $CD8^+$ T hücrelerinin birlikte kültürü sonrasında canlılık testlerinde kanser hücrelerinin ölüm oranının yaklaşık %80 olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda, miR-34a tarafından azaltıldığı tespit edilen PD-L1 seviyelerindeki düşüş ile T hücresi aracılı sitotoksisitede gözlenen artış arasında bir korelasyon vardır.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında miR-34a'nın kanser tedavisinde kullanılabilecek immünoterapötik duyarlı bir ilaç olarak potansiyeli araştırılmıştır. IC_{50} sonuçlarına dayanarak, MCF-7 hücrelerinde 0.77 nM miR-34a'nın sitotoksik etkisinin sağlıklı HME1 hücrelerindeki 8.08 nM dozundan 10 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur. miR-34a uygulamasından sonra düşük PD-L1 seviyesi, miR-34a'nın PD-L1'in mRNA'sına bağlanarak bu bölgeyi susturduğunu ve PD-L1 aşırı ekspresyonunu önlediğini düşündürmektedir. Meme kanseri hücrelerindeki PD-L1 seviyelerindeki

düşüş, kanser hücrelerinin ko-kültür deneylerinde $CD8^+$ T hücreleri tarafından tanındığını göstermiştir.

Çalışmadan elde edilen veriler genel olarak meme kanseri hücre hatlarına transfekte edilen miR-34a'nın bu hücreler üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, hücrelerin yüzeyinde bulunan ve kanser hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınmamasını kolaylaştıran hücre yüzeyi ligandı PD-L1'in miR-34a tarafından bloke edildiğini, çözünmüş veya membrana bağlı PD-L1 seviyesini düşürdüğünü ve böylece proliferasyonu azalttığını göstermektedir. miR-34a'nın artan immünoterapötik aktivitesi, gelecekte immünoterapinin daha fazla alanında kullanılacağını düşündürmektedir. Bu çalışmadan elde edilen verilerin gelecekteki çalışmaları desteklemek üzere kullanılabilmesi için bu alandaki *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların devam etmesi beklenmektedir.

KAYNAKÇA

Adams BD, Parsons C, Slack FJ. The tumor-suppressive and potential therapeutic functions of miR-34a in epithelial carcinomas. Expert Opin Ther Targets. 2016;20(6):737-53.

Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. Int Immunol. 1996;8(5):765-72.

Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. Blood. 2009;114(8):1537-44.

Özlük A. A., Güner Oytun M., Günenç D. Kanser immünoterapisi. İst. Bilim Üniv. Florence Nightingale tıp derg. 2017; 2(1): 21-3.

Akram M, Siddiqui SA. Breast cancer management: past, present and evolving. Indian J Cancer. 2012;49(3):277-82.

Alard E, Butnariu AB, Grillo M, et al. Advances in Anti-Cancer Immunotherapy: Car-T Cell, Checkpoint Inhibitors, Dendritic Cell Vaccines, and Oncolytic Viruses, and Emerging Cellular and Molecular Targets. Cancers (Basel). 2020;12(7):1826.

Baday M. Mide Kanseri Hastalarda xrcc2 ve xrcc3 Gen Polimorfizmlerinin İncelenmesi [Yüksek lisans tezi]. Kars: Kafkas Üniversitesi; 2013.

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell. 2009;136(2):215-33.

Bastaki S, Irandoust M, Ahmadi A, et al. PD-L1/PD-1 axis as a potent therapeutic target in breast cancer. Life Sci. 2020;247:117437.

Berger KN, Pu JJ. PD-1 pathway and its clinical application: A 20 year journey after discovery of the complete human PD-1 gene. Gene. 2018;638:20-5.

Blackburn SD, Shin H, Haining WN, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. Nat Immunol. 2009;10(1):29-37.

Blank C, Kuball J, Voelkl S, et al. Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. Int J Cancer. 2006;119(2):317-27.

Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. J Clin Oncol. 2010;28(19):3167-75.

Braicu C, Zimta AA, Harangus A, et al. The Function of Non-Coding RNAs in Lung Cancer Tumorigenesis. Cancers (Basel). 2019;11(5):605.

Carosella ED, Ploussard G, LeMaoult J, Desgrandchamps F. A Systematic Review of Immunotherapy in Urologic Cancer: Evolving Roles for Targeting of CTLA-4, PD-1/PD-L1, and HLA-G. Eur Urol. 2015;68(2):267-79.

Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. Annu Rev Immunol. 2002;20:29-53.

Catela Ivkovic T, Voss G, Cornella H, Ceder Y. microRNAs as cancer therapeutics: A step closer to clinical application. Cancer Lett. 2017;407:113-22.

Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. Cell. 2006;124(2):263-6.

Cortez MA, Ivan C, Valdecanas D, et al. PDL1 Regulation by p53 via miR-34. J Natl Cancer Inst. 2015;108(1):djv303.

Cuzick J, DeCensi A, Arun B, et al. Preventive therapy for breast cancer: a consensus statement. Lancet Oncol. 2011;12(5):496-503.

Darvin P, Sasidharan Nair V, Elkord E. PD-L1 Expression in Human Breast Cancer Stem Cells Is Epigenetically Regulated through Posttranslational Histone Modifications. J Oncol. 2019;2019:3958908.

de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. Nat Rev Cancer. 2006;6(1):24-37.

Diener C, Keller A, Meese E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic. Trends Genet. 2022;38(6):613-26.

Disoma C. Usnea Filipendula Stirt'in Kolon Kanseri Hücre Soyları Üzerine Sitotoksik Aktivitesinin Araştırılması [Yüksek lisans tezi]. Bursa: Bursa Uludağ Üniversitesi; 2016.

Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. Nat Med. 1999;5(12):1365-69.

Dyck L, Mills KHG. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. Eur J Immunol. 2017;47(5):765-79.

Erdoğan M.K. HT-29 Kolon Kanseri Hücre Hattında Bazı Bitki Ekstreleri ve Bitkisel Etken Maddelerin 5-florouracil (5-fu) ile Kombinasyonunun Apoptotik Yolaklara ve Hücre Çoğalmasına Etkilerinin Araştırılması [Doktora tezi]. Erzurum: Erzurum Atatürk Üniversitesi; 2016.

Esfahani K, Roudaia L, Buhlaiga N, Del Rincon SV, Papneja N, Miller WH Jr. A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future. Curr Oncol. 2020;27(Suppl 2):S87-97.

Esteller M. Epigenetics in cancer. N Engl J Med. 2008;358(11):1148-59.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J Exp Med. 2000;192(7):1027-34.

Gao Y, Nihira NT, Bu X, et al. Acetylation-dependent regulation of PD-L1 nuclear translocation dictates the efficacy of anti-PD-1 immunotherapy. Nat Cell Biol. 2020;22(9):1064-75.

Ghanekar SA, Bhatia S, Ruitenberg J.J, et al. Phenotype and in vitro function of mature MDDC generated from cryopreserved PBMC of cancer patients are equivalent to those from healthy donors. Journal of Immune Based Therapies and Vaccines. 2007;5:7.

Gong AY, Zhou R, Hu G, et al. Cryptosporidium parvum induces B7-H1 expression in cholangiocytes by down-regulating microRNA-513. J Infect Dis. 2010;201(1):160-9.

Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. Nature. 2017;545(7655):495-9.

Gorur A, Bayraktar R, Ivan C, et al. ncRNA therapy with miRNA-22-3p suppresses the growth of triple-negative breast cancer. Mol Ther Nucleic Acids. 2021;23:930-43.

Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15(8):509-24.

Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. Am J Cancer Res. 2020;10(3):727-42.

He L, He X, Lim LP, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. Nature. 2007;447(7148):1130-34.

Hosseinzadeh R, Feizisani F, Shomali N, et al. PD-1/PD-L1 blockade: Prospectives for immunotherapy in cancer and autoimmunity. IUBMB Life. 2021;73(11):1293-306.

Hsu JM, Li CW, Lai YJ, Hung MC. Posttranslational Modifications of PD-L1 and Their Applications in Cancer Therapy. Cancer Res. 2018;78(22):6349-53.

https://jul2023.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000284357;r=1:9151671-9151785;t=ENST00000385130

Hu X, Wang J, Chu M, Liu Y, Wang ZW, Zhu X. Emerging Role of Ubiquitination in the Regulation of PD-1/PD-L1 in Cancer Immunotherapy. Mol Ther. 2021;29(3):908-19.

Imani S, Wu RC, Fu J. MicroRNA-34 family in breast cancer: from research to therapeutic potential. J Cancer. 2018;9(20):3765-75.

Iqbal MA, Arora S, Prakasam G, Calin GA, Syed MA. MicroRNA in lung cancer: role, mechanisms, pathways and therapeutic relevance. Mol Aspects Med. 2019;70:3-20.

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. EMBO J. 1992;11(11):3887-3895.

Jiang Y, Li Y, Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. Cell Death Dis. 2015;6(6):e1792.

Jin HY, Gonzalez-Martin A, Miletic AV, et al. Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. Front Genet. 2015;6:340.

Jubel JM, Barbati ZR, Burger C, Wirtz DC, Schildberg FA. The Role of PD-1 in Acute and Chronic Infection. Front Immunol. 2020;11:487.

Kawai S, Amano A. BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex. J Cell Biol. 2012;197(2):201-8.

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol. 2008;26:677-704.

Labazi M, Phillips AC. Oncogenes as regulators of apoptosis. Essays Biochem. 2003;39:89-104.

Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma [published correction appears in N Engl J Med. 2018 Nov 29;379(22):2185]. N Engl J Med. 2015;373(1):23-34.

Li X, Mertens-Talcott SU, Zhang S, Kim K, Ball J, Safe S. MicroRNA-27a Indirectly Regulates Estrogen Receptor {alpha} Expression and Hormone Responsiveness in MCF-7 Breast Cancer Cells. Endocrinology. 2010;151(6):2462-73.

Li X, Zhao H, Zhou X, Song L. Inhibition of lactate dehydrogenase A by microRNA-34a resensitizes colon cancer cells to 5-fluorouracil. Mol Med Rep. 2015;11(1):577-82.

Li XJ, Ren ZJ, Tang JH. MicroRNA-34a: a potential therapeutic target in human cancer. Cell Death Dis. 2014;5(7):e1327.

Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. J Clin Invest. 2007;117(5):1175-83.

Liu J, Zhang E, Ma Z, et al. Enhancing virus-specific immunity in vivo by combining therapeutic vaccination and PD-L1 blockade in chronic hepadnaviral infection. PLoS Pathog. 2014;10(1):e1003856.

Liu L, Shen Y, Zhu X, et al. ERα is a negative regulator of PD-L1 gene transcription in breast cancer. Biochem Biophys Res Commun. 2018;505(1):157-61.

Ljunggren HG, Jonsson R, Höglund P. Seminal immunologic discoveries with direct clinical implications: The 2018 Nobel Prize in Physiology or Medicine honours discoveries in cancer immunotherapy. Scand J Immunol. 2018;88(6):e12731.

Mallick S, Choi JS. Liposomes: versatile and biocompatible nanovesicles for efficient biomolecules delivery. J Nanosci Nanotechnol. 2014;14(1):755-65.

Maroof H, Salajegheh A, Smith RA, Lam AK. MicroRNA-34 family, mechanisms of action in cancer: a review. Curr Cancer Drug Targets. 2014;14(8):737-51.

Menon S, Shin S, Dy G. Advances in Cancer Immunotherapy in Solid Tumors. Cancers (Basel). 2016;8(12):106.

Mertens AJ, Sweeney C, Shahar E, Rosamond WD, Folsom AR. Physical activity and breast cancer incidence in middle-aged women: a prospective cohort study. Breast Cancer Res Treat. 2006;97(2):209-14.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65(1-2):55-63.

Neel BG, Gu H, Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. Trends Biochem Sci. 2003;28(6):284-93.

O'Day SJ, Hamid O, Urba WJ. Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4): a novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies. Cancer. 2007;110(12):2614-27.

Owen RE, Sinclair E, Emu B, et al. Loss of T cell responses following long-term cryopreservation. J Immunol Methods. 2007;32(1-2):93-11.

Özgöçmen M. Linum Usitatissimum Bitkisinden Elde Edilen Sekoisolarikiresinol Diglukosid Maddesinin Kolon Kanseri Hücre Hatları Üzerine Etkisi [Doktora tezi]. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi; 2017.

Pfeiffer RM, Webb-Vargas Y, Wheeler W, Gail MH. Proportion of U.S. Trends in Breast Cancer Incidence Attributable to Long-term Changes in Risk Factor Distributions. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2018;27(10):1214-22.

Pistelli M, Mora AD, Ballatore Z, Berardi R. Aromatase inhibitors in premenopausal women with breast cancer: the state of the art and future prospects. Curr Oncol. 2018;25(2):e168-e175.

Pu Y, Ji Q. Tumor-Associated Macrophages Regulate PD-1/PD-L1 Immunosuppression. Front Immunol. 2022;13:874589.

Rao C, Shetty J, Prasad KH. Immunohistochemical profile and morphology in triple - negative breast cancers. J Clin Diagn Res. 2013;7(7):1361-65.

Riley RS, June CH, Langer R, Mitchell MJ. Delivery technologies for cancer immunotherapy. Nat Rev Drug Discov. 2019;18(3):175-96.

Rokavec M, Li H, Jiang L, Hermeking H. The p53/miR-34 axis in development and disease. J Mol Cell Biol. 2014;6(3):214-30.

Romero Y, Wise R, Zolkiewska A. Proteolytic processing of PD-L1 by ADAM proteases in breast cancer cells. Cancer Immunol Immunother. 2020;69(1):43-55.

Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. J Immunol. 2014;192(12):5451-8.

Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: A critical analysis. Indian J Cancer. 2016;53(3):441-2.

Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. Nat Rev Drug Discov. 2017;16(3):203-22.

Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, et al. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. J Cell Physiol. 2019;234(10):16824-37.

Salzman DW, Nakamura K, Nallur S, et al. miR-34 activity is modulated through 5'-end phosphorylation in response to DNA damage. Nat Commun. 2016;7:10954.

Sánchez de Cos Escuín J. New Immunotherapy and Lung Cancer. Nueva inmunoterapia y cáncer de pulmón. Arch Bronconeumol. 2017;53(12):682-7.

Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. Immunity. 2016;44(5):955-72.

Schöniger S, Jasani B. The PD-1/PD-L1 Pathway: A Perspective on Comparative Immuno-Oncology. Animals (Basel). 2022;12(19):2661.

Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. Cell. 1992;71(7):1065-8.

Sharon D, Kamen A. Advancements in the design and scalable production of viral gene transfer vectors. Biotechnol Bioeng. 2018;115(1):25-40.

Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. Nat Rev Immunol. 2018;18(3):153-67.

Shu J, Xia Z, Li L, et al. Dose-dependent differential mRNA target selection and regulation by let-7a-7f and miR-17-92 cluster microRNAs. RNA Biol. 2012;9(10):1275-87.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. CA Cancer J Clin. 2020;70(1):7-30.

Staron MM, Gray SM, Marshall HD, et al. The transcription factor FoxO1 sustains expression of the inhibitory receptor PD-1 and survival of antiviral CD8(+) T cells during chronic infection. Immunity. 2014;41(5):802-14.

Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. Immunity. 2018;48(3):434-52.

Sun Y, Zhao Y, Zhao X, Lee RJ, Teng L, Zhou C. Enhancing the Therapeutic Delivery of Oligonucleotides by Chemical Modification and Nanoparticle Encapsulation. Molecules. 2017;22(10):1724.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-49.

Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. Curr Opin Immunol. 2012;24(2):207-12.

Tülüce Y, Masseh HDI, Koyuncu İ, Kiliç A, Durgun M, Özkol H. Novel fluorine boron hybrid complex as potential antiproliferative drugs on colorectal cancer cell line. Anti cancer Agents Med Chem. 2019;19(5):627-37.

Urgen M, Kocabaş F, Nalbantsoy A, Kocabas EH, Uzel A, Bedir E. Bioassay-guided isolation of antibacterial and cytotoxic compounds from the mesophilic Actinomycete M-33-5. Nat Prod Commun. 2010;5(2):249-52.

Us Altay D. Deneysel Olarak Mide Kanseri Oluşturulan Farelerde İrisin Hormonu ve Bazı Kaşektik Faktörlerin Ekspresyonlarının İncelenmesi [Doktora tezi]. Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi; 2015.

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE , Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. Science. 2013;339(6127):1546-58.

Wang J, Jia Y, Zhao S, et al. BIN1 reverses PD-L1-mediated immune escape by inactivating the c-MYC and EGFR/MAPK signaling pathways in non-small cell lung cancer. Oncogene. 2017;36(45):6235-43.

Wang X, Li J, Dong K, et al. Tumor suppressor miR-34a targets PD-L1 and functions as a potential immunotherapeutic target in acute myeloid leukemia. Cell Signal. 2015;27(3):443-52.

Wang X, Teng F, Kong L, Yu J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. Onco Targets Ther. 2016;9:5023-39.

Wang Y, Lewin N, Qaoud Y, Rajaee AN, Scheer AS. The oncologic impact of hormone replacement therapy in premenopausal breast cancer survivors: A systematic review. Breast. 2018;40:123-30.

Wang YN, Lee HH, Hsu JL, Yu D, Hung MC. The impact of PD-L1 N-linked glycosylation on cancer therapy and clinical diagnosis. J Biomed Sci. 2020;27(1):77.

Williams GM. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. Toxicology. 2001;166(1-2):3-10.

Xiong S, Hu M, Li C, Zhou X, Chen H. Role of miR 34 in gastric cancer: From bench to bedside (Review). Oncol Rep. 2019;42(5):1635-46.

Xue HY, Guo P, Wen WC, Wong HL. Lipid-Based nanocarriers for RNA delivery. Curr Pharm Des. 2015;21(22):3140-7.

Yang W, Li H, Chen PW, et al. PD-L1 expression on human ocular cells and its possible role in regulating immune-mediated ocular inflammation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009;50(1):273-80.

Yokuş B. Çakır DÜ. Kanser Biyokimyası. Dicle Üniv Vet Fak Derg. 2012; (1): 7-18.

Zhang J, Bu X, Wang H, et al. Cyclin D-CDK4 kinase destabilizes PD-L1 via cullin 3-SPOP to control cancer immune surveillance Nature. 2018;553(7686):91-5.

Zhang L, Liao Y, Tang L. MicroRNA-34 family: a potential tumor suppressor and therapeutic candidate in cancer. J Exp Clin Cancer Res. 2019;38(1):53.

Zhao G, Guo J, Li D, et al. MicroRNA-34a suppresses cell proliferation by targeting LMTK3 in human breast cancer mcf-7 cell line. DNA Cell Biol. 2013;32(12):699-707.

Zhao L, Yu H, Yi S, et al. The tumor suppressor miR-138-5p targets PD-L1 in colorectal cancer. Oncotarget. 2016;7(29):45370-84.

Zhu B, Tang L, Chen S, et al. Targeting the upstream transcriptional activator of PD-L1 as an alternative strategy in melanoma therapy. Oncogene. 2018;37(36):4941-54.

EKLER

EK1. Tez Orjinallik Raporu

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

G19 –TEZ ORİJİNALLİK RAPORU

Tez Başlığı / Konusu	MCF-7 MEME KANSERİ /CD8+ HÜCRE HATTI KO-KÜLTÜR MODELİNDE PD-L1 HEDEFLİ miR-34a'nın İMMÜN KONTROL NOKTASI MODÜLASYON ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

İntihal taraması yapılan bölümler ve sayfa sayıları

Kapak sayfası	Giriş	Ana bölümler	Sonuç bölümleri	Toplam sayfa sayısı
1	**3**	**36**	**2**	**42**

İntihal taraması yapılan program	Taramanın yapıldığı tarih	Benzerlik oranı %
Turnitin	10/11 / 2023	**%7**

***Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:**

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Teşekkür hariç,
- Kaynakça hariç,
- İçindekiler hariç,
- Alıntılar hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede 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.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı
Nuray BAYDAR
İmza

Öğrencinin Adı Soyadı	Nuray BAYDAR
Anabilim Dalı	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Öğrenci No	19930002001
Programı	Yüksek Lisans

DANIŞMAN ONAYI	**ENSTİTÜ ONAYI**
UYGUNDUR **Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE**	UYGUNDUR **Prof. Dr. Semiha DEDE**