



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**MEME TÜMÖRLERİNDE ADAPTİF İMMÜN SİSTEMDE
MEYDANA GELEN MOLEKÜLER DEĞİŞİKLİKLERİN
miRNA DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

Müge ÖÇAL DEMİRTAŞ

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU**

**ANKARA
2023**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME TÜMÖRLERİNDE ADAPTİF İMMÜN SİSTEMDE
MEYDANA GELEN MOLEKÜLER DEĞİŞİKLİKLERİN
miRNA DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

Müge ÖÇAL DEMİRTAŞ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
21L0415002 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA
2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Meme Tümörlerinde Adaptif İmmün Sistemde Meydana Gelen Moleküler Değişikliklerin miRNA Düzeyinde Araştırılması” başlıklı tez, bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Müge ÖÇAL DEMİRTAŞ

Tarih: 20/01/2023

İmza:

KABUL ve ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalında MÜGE ÖÇAL
DEMİRTAŞ tarafından hazırlanan “Meme Tümörlerinde Adaptif İmmün Sistemde
Meydana Gelen Moleküler Değişikliklerin miRNA Düzeyinde Araştırılması” adlı tez
çalışması aşağıdaki jüri tarafından

DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20/01/2023

Prof. Dr. Hakan GÜRDAL

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Erkan YILMAZ

Üye

Doç. Dr. Füsün ÖZMEN

Üye

Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Serkan GÖKTUNA

Üye

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

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xv

1. GİRİŞ	1
1.1. Meme Kanseri	1
1.1.1. Meme Kanseri Alt Tipleri ve Tedavi Yaklaşımları	1
1.2. İmmün (Bağışıklık) Sistem	5
1.2.1. Doğal (Innate) İmmün Sistem	6
1.2.2. Kazanılmış (Adaptif) İmmün Sistem	7
1.2.2.1 Humoral İmmünite	8
1.2.2.2 Hücresel İmmünite	9
1.2.3. Meme Kanseri İmmün Sistemin Yeri	16
1.3. mikroRNA (miRNA)	21
1.3.1. miRNA Biyogenezi	21
1.3.2. miRNA'ların Etki Mekanizmaları	23
1.3.3. Meme Kanseri İmmün Sistemde miRNA'ların Rolü	23
1.3.4. Adaptif İmmün Sistemde miRNA'ların Rolü	26
1.3.5. Kanserde Adaptif İmmün Sistem Aracılı miRNA'ların Rolü	28

2. GEREÇ ve YÖNTEM	31
2.1. Gereçler	31
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller	31
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Reaktifler ve Kimyasallar	31
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Antikorlar	32
2.1.4. Çalışmada Kullanılan Kitler	32
2.1.5. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	33
2.2. Yöntem	34
2.2.1. 4T1 Hücre Kültürü	35
2.2.2. <i>In Vivo</i> Deneyler	35
2.2.3. Tümör Dokularının Histopatolojik İncelemesi	37
2.2.4. Dalak Örneklerinden CD8+ T Lenfosit İzolasyonu	38
2.2.5. CD8+ T Lenfosit İzolasyonunun Flow Sitometri ile Doğrulanması	38
2.2.6. CD8+ T Lenfositlerden Total RNA İzolasyonu	39
2.2.7. miRNA Mikrodizin Deneyi	40
2.2.7.1. Hedef miRNA Hazırlığı	40
2.2.7.2. Hibridizasyon Aşaması	41
2.2.7.3. Mikrodizinlerin Yıkama, Boyama ve Tarama Aşamaları	42
2.2.8. miRNA Mikrodizin Veri Analizi	43

2.2.9. Mikrodizin Analizi Sonucunda İfade Farklılığı Gösteren miRNA'ların Doğrulanması	44
2.2.9.1. miRNA cDNA Sentezi	44
2.2.9.2. miRNA'lara Spesifik İleri Primer Tasarımı	45
2.2.9.3. miRNA'ların Eş Zamanlı PZR ile İfade Analizi	46
2.2.10. miRNA Hedef Genlerinin Biyoinformatik Olarak Belirlenmesi	47
2.2.11. miRNA Hedef Genlerinin Yer Aldığı Yolakların Biyoinformatik Olarak Belirlenmesi	47
2.2.12. Biyoinformatik Analiz Sonucunda Belirlenen Hedef Genlerin Doğrulanması	48
2.2.12.1. mRNA cDNA Sentezi	48
2.2.12.2. Hedef mRNA Spesifik Primer Tasarımı	49
2.2.12.3. Hedef Genlerin Eş Zamanlı PZR ile İfade Analizi	49
2.2.13. Apoptoz Deneyi	50
3. BULGULAR	51
3.1. Hayvan Modeli Gruplarına Ait Bulgular	51
3.2. Tümör Dokuların Histopatolojik İncelemesi	53
3.3. CD8+ T Hücre İzolasyonunun Doğrulanması	56
3.4. RNA İzolasyonuna Ait Bulgular	58
3.5. Mikrodizin Analizi Sonucu Elde Edilen Bulgular	59
3.5.1. Gruplar Arasında Anlamlı Farklılık Gösteren miRNA'lar	59
3.5.2. Gruplar Arasında Anlamlı Farklılık Gösteren Ortak miRNA'lar	63
3.5.2.1. K, PT, REM ve REL Grupları Arasındaki Ortak miRNA'lar	63
3.5.2.2. K, PT ve REM Grupları Arasındaki Ortak miRNA'lar	65
3.5.2.3. Ortak miRNA'ların Eş Zamanlı PZR ile Doğrulanması	67
3.6. Doğrulan Ortak miRNA'ların Tahmini Hedef Genlerinin Belirlenmesi	68
3.7. miRNA Hedef Genlerinin Zenginleştiği Yolakların Belirlenmesi	68
3.8. miRNA Hedef Gen İfadelerinin Eş Zamanlı PZR ile Doğrulanması	71
3.9. Flow Sitometri ile Apoptoz Analizi	74
4. TARTIŞMA	76
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	88
ÖZET	91
SUMMARY	92
KAYNAKLAR	93
EKLER	111
Ek-1 Etik Kurul Raporu	111
Ek-2 RNA Örnekleri Agaroz Jel Görüntüsü	112
Ek-3 Mikrodizin %P Değerleri	113
Ek-4 Gruplar Arası Anlamlı İfade Değişimi Gösteren miRNA'ların Eş Zamanlı PZR ile Doğrulanması	114

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca her türlü bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, sağladığı imkanlar ve her zaman motive edici yaklaşımıyla çalışma azmimi yükselten sevgili danışman hocam Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU'na,

Doktora eğitimim boyunca 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında sağladığı maddi destek için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu - Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (TÜBİTAK-BİDEB),

YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı kapsamında eğitimim boyunca maddi destek sağlayan Yükseköğretim Kurulu'na (YÖK),

Tez çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için Öncelikli Alan Lisansüstü Doktora Tez Projesi kapsamında araştırma desteği sunan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğüne,

Hayvan deneylerini gerçekleştirmemde çok yardımı dokunan ve hayvan ünitesini koşulsuz kullanıma açan değerli hocam Prof. Dr. Erkan YILMAZ'a,

Patolojik incelemelerin gerçekleşmesini sağlayan Başkent Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalına,

Tez süreci boyunca gerçekleştirdiğimiz TİK toplantıları ile katkılarını esirgemeyen değerli Prof. Dr. Hakan GÜRDAL ve Dr. Öğr. Üyesi Serkan GÖKTUNA'ya,

Çalışmada kullanılan 4T1 hücre hattını sağladığı için Prof. Dr. Hakan AKBULUT'a,

Çalışmada kullanılan MACS sistemini kullanımımıza sunduğu için Öğr. Gör. Dr. Reza DASTOURİ'ye,

Mikrodizin deneylerindeki desteklerinden dolayı Dr. Seda TAŞIR’a,

Tez çalışmamı gerçekleştirdiğim Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı ailesine ve BGD Lab üyelerine,

Her türlü yardımlarından dolayı Gülden ORTAGENÇ GÜMÜŞ başta olmak üzere Ankara Üniversitesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalına,

Bu zorlu süreçte gösterdiği fedakarlık ve desteği için değerli eşim Arınç DEMİRTAŞ’a,

Sevgi ve desteklerini her zaman hissettiren canım aileme çok teşekkür ederim.

Müge ÖÇAL DEMİRTAŞ

Ocak, 2023

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
~	Yaklaşık
°C	Derece santigrat
µL	Mikrolitre
ACT	Adaptif hücre tedavisi
Ago	Argonat
α	Alfa
AMP	Siklik adenosin monofosfat
AMPK	AMP ile aktive edilmiş protein kinaz
APC	Antijen sunan hücre
AR	Androjen reseptörü
β	Beta
B2M	Beta 2 mikroglobülin
BCR	B hücre reseptörü
BL	Bazal benzeri
bp	Baz çifti
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CAR-T	Kimerik antijen reseptörleri taşıyan T hücre
CCL	CC motif kemokin ligand
CCR	CC motif kemokin reseptör
CD	Başkalaşım kümesi
cDNA	Tamamlayıcı DNA

CK	Keratin
cm	Santimetre
CO ₂	Karbondioksit
CPS	Kombine pozitif skor
Ct	Eşik döngüsü
CTL	Sitotoksik T lenfosit
CTLA-4	Sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen 4
CXCL	CXC motif kemokin ligand
DABG	Detection Above BackGround
DMSO	Dimetil sülfoksit
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktör reseptörü
EMT	Epitelyal mezenkimal geçiş
ER	Östrojen reseptör
FBS	Fetal sığır serumu
G	Yerçekimi kuvveti
γ	Gama
GAPDH	Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz
GATA3	Gata bağlayan protein 3
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör 2
HLA	İnsan lökosit antijeni
hsa	<i>Homo sapiens</i>

IFN	İnterferon
Ig	İmmüoglobülin
IL	İnterlökin
IM	İmmünomodülatör
iTreg	İndüklenmiş düzenleyici T hücre
K	Kontrol grubu
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
L	Uzunluk
LAR	Luminal androjen reseptörü
LT	Lenfotoksin
MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
mg	Miligram
mg	Miligram
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
miRNA	MikroRNA
ML	Mezenkimal benzeri
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mmu	<i>Mus musculus</i>
MPEC	Hafıza öncü efektör hücre
MRE	miRNA yanıt elemanları
mRNA	Mesajcı RNA
MSL	Mezenkimal kök hücre benzeri

mTEC	Medulla timosit epitel hücreleri
MUC	Musin
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NCBI	National center for biotechnology information
NF- κ B	Nükleer faktör kappa b
ng	Nanogram
NK	Doğal öldürücü
PAMP	Patojen ilişkili moleküler patern
PARP	Poli-ADP-riboz polimeraz
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PD-1	Programlı ölüm reseptörü 1
PD-L1	Programlı ölüm ligandı 1
PDPK1	3-fosfoinositit bağımlı protein kinaz
PI	Propidyum Iyodür
PI3K	Fosfatidilinositol 3 kinaz
PIK3R1	Fosfoinositit-3 kinaz düzenleyici alt birim 1
PR	Progesteron reseptörü
PRR	Patern tanıma reseptörü
PT	Primer tümör grubu
PTEN	Protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu
PTPRC	Protein tirozin fosfataz reseptörü tip C
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu

REL	Relaps grubu
REM	Remisyon grubu
RMA	Robust Multiarray Average
RPM	Bir dakikada gerçekleşen devir sayısı
shRNA	Kısa saç tokası RNA
SLEC	Kısa ömürlü efektör hücre
Tcm	Merkezi hafıza T hücresi
TCR	T hücre reseptörü
Tem	Efektör hafıza T hücresi
Tfh	Foliküler yardımcı T hücre
TGF	Transforme büyüme faktörü
Th	Yardımcı T hücre
TIL	Tümör infiltre lenfosit
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
TNF	Tümör nekroz faktörü
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü
UTR	Translasyon olmayan bölge
V	Hacim
W	Genişlik
WebGestalt	WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	T lenfositlerin gelişimsel süreçleri	10
Şekil 1.2.	T lenfositlerin gelişimsel süreçleri boyunca sergiledikleri yüzey belirteçleri	11
Şekil 1.3.	T lenfositler ve antijen sunan hücreler arasındaki ko-stimülatör ve ko-inhibitör molekül interaksyonları	13
Şekil 1.4.	İnsan kanser tipleri arasındaki somatik mutasyon prevalansı	17
Şekil 1.5.	Meme kanseri alt tiplerinin immünolojik sınıflandırması	19
Şekil 1.6.	miRNA biyogenezi	22
Şekil 2. 1.	Çalışmanın genel iş akış şeması	34
Şekil 2. 2.	In vivo deney grupları ve kullanılan hayvan sayısı	36
Şekil 2. 3.	Sağ abdominal meme bezi inguinal uçtan 4T1 TNBC hücrelerinin subkutan enjeksiyonu sonucu oluşan primer tümör taşıyan fare görseli	36
Şekil 2. 4.	Deney gruplarının sonlandırılma süreleri	37
Şekil 2. 5.	Mikrodizin deneyinin genel şematik özeti	40
Şekil 2. 6.	REL gruptan bir örnek için miRNA 4.0. çipinin .DAT uzantılı dosya görüntüsü	43
Şekil 3. 1.	PT, REM ve REL gruplarının tümör büyüme grafikleri	51
Şekil 3. 2.	Deney gruplarına ait dalak örneklerinin boyutlarını belirten görseller	52
Şekil 3. 3.	Deney gruplarının dalak ağırlık verileri ile oluşturulmuş sütun grafiği	52
Şekil 3. 4.	Deney gruplarının dalak örneklerinin uzunluk, genişlik ve yükseklik değerleri ile oluşturulmuş sütun grafiği	53
Şekil 3. 5.	Primer tümör grubuna ait tümör dokularının histopatolojik mikroskop görüntüleri	54
Şekil 3. 6.	Remisyon grubuna ait dokuların histopatolojik mikroskop görüntüleri	55
Şekil 3. 7.	Relaps grubuna ait tümör dokularının histopatolojik mikroskop görüntüleri	56
Şekil 3. 8.	MACS yöntemi ile CD8 pozitif seleksiyon öncesi ve sonrası CD8+ T hücrelerin saflıklarını gösteren saçılım grafikleri	57
Şekil 3. 9.	MACS yöntemi ile CD8 pozitif seleksiyon öncesi ve sonrası CD8+ T hücrelerin saflıklarını gösteren sütun grafiği	58

Şekil 3. 10.	K, PT, REM ve REL gruplarında ifade değişimi gösteren ortak miRNA'lar	63
Şekil 3. 11.	Ortak 3 miRNA'nın hiyerarşik kümeleme analizi sonucu oluşturulan heatmap görseli	64
Şekil 3. 12.	K, PT, REM ve REL gruplarında ifade değişimi gösteren ortak 3 miRNA'nın mikrodizin analizi sonucunda kat değişimlerini belirten sütun grafiği	65
Şekil 3. 13.	K, PT ve REM gruplarında ifade değişimi gösteren ortak miRNA	66
Şekil 3. 14.	K, PT ve REM gruplarında ifade değişimi gösteren ortak miRNA'nın mikrodizin analizi sonucunda kat değişimlerini belirten sütun grafiği	66
Şekil 3. 15.	Ortak miRNA'ların eş zamanlı PZR sonucunu belirten sütun grafiği	67
Şekil 3. 16.	Apoptoz yolağındaki miRNA hedefleri	71
Şekil 3. 17.	K, PT, REM ve REL grupları arasında mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b ve mmu-miR-30b-3p hedefi olan BCL-2 geninin eş zamanlı PZR analizini gösteren sütun grafiği	72
Şekil 3. 18.	K, PT, REM ve REL grupları arasında mmu-miR-30b-3p hedefi olan BCL-XL geninin eş zamanlı PZR analizini gösteren sütun grafiği	72
Şekil 3. 19.	K, PT, REM ve REL grupları arasında BAX geninin eş zamanlı PZR analizini gösteren sütun grafiği	73
Şekil 3. 20.	K, PT, REM ve REL grupları arasında BAK geninin eş zamanlı PZR analizini gösteren sütun grafiği	73
Şekil 3. 21.	mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b ve mmu-miR-30b-3p'nin K, PT ve REM gruplarındaki apoptotik etkisini gösteren saçılım grafikleri ve sütun grafiği	75
Şekil 4. 1.	T hücrelerde TCR sinyalizasyonu ve ilişkili yollar	81
Şekil 4. 2.	T hücre sinyal yolağındaki miRNA hedef genleri	82
Şekil 4. 3.	Apoptoz yolağı	86
Şekil 5. 1.	Çalışma sonucunda TNBC sürecinde önerilen mekanizma	89

ÇİZELGELER

Çizelge 1. 1.	CD4+ T lenfosit alt tipleri ve ana özellikleri	14
Çizelge 2. 1.	Poly(A) kuyruk karışımı	41
Çizelge 2. 2.	Hybridizasyon karışım komponentleri	42
Çizelge 2. 3.	miRNA cDNA Sentez Komponentleri	45
Çizelge 2. 4.	Çalışmada kullanılan miRNA ileri primer listesi	46
Çizelge 2. 5.	miRNA eş zamanlı PZR komponentleri ve reaksiyon koşulları	47
Çizelge 2. 6.	mRNA cDNA sentez komponentleri	48
Çizelge 2. 7.	Çalışmada kullanılan referans ve miRNA hedef gen primer listesi	49
Çizelge 2. 8.	Hedef gen eş zamanlı PZR komponentleri ve reaksiyon koşulları	50
Çizelge 3. 1.	Mikrodizin ve validasyon deneylerinde kullanılan total RNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri	59
Çizelge 3. 2.	Sağlıklı kontrol ve primer tümör grupları arasında 1,25 kat ve üzeri anlamlı ifade değişimi gösteren miRNA'lar	60
Çizelge 3. 3.	Primer tümör ve remisyon grupları arasında 1,25 kat ve üzeri anlamlı ifade değişimi gösteren miRNA'lar	61
Çizelge 3. 4.	Relaps ve remisyon grupları arasında 1,25 kat ve üzeri anlamlı ifade değişimi gösteren miRNA'lar	62
Çizelge 3. 5.	miRWalk ve NCBI veritabanından belirlenen miRNA hedef gen sayıları	68
Çizelge 3. 6.	mmu-miR-93-3p tahmini hedef genlerinin zenginleştiği yolakların listesi	69
Çizelge 3. 7.	mmu-miR-3470b tahmini hedef genlerinin zenginleştiği yolakların listesi	69
Çizelge 3. 8.	mmu-miR-30b-3p tahmini hedef genlerinin zenginleştiği yolakların listesi	70

1. GİRİŞ

1.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, dünya genelinde ve ülkemizde kadınlarda en sık görülen ve en çok ölüme sebep olan kanser türüdür (Arnold ve ark., 2022). 2020 yılındaki 2.26 milyon vaka ve 685 bin ölümlü vaka sayısının, 2030 yılında 2.74 milyon ve 857 bin sayılarına ulaşması öngörülmektedir (Sung ve ark., 2021). Meme kanseri vakalarının %85-90'ı çevresel ve yaşa bağlı olarak sporadik şekilde meydana gelirken, vakaların %10-15'i kalıtsal olarak özellikle BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Hasson ve ark., 2020). Hastaların yaşam süreleri özellikle hastalığın yayılımı ile ilişkilendirilebilir. Amerika Birleşik Devletleri 2022 yılı verilerine göre, lokal evrede 5 yıllık sağkalım %99'dur ve bu evredeki hastaların %65'i tedavi şansı bulmaktadır. Lenf nodu yayılımı olan hastalarda 5 yıllık sağkalım %86 iken, uzak organ metastazı olan hastalarda bu oran %29'a düşmektedir (Cancer.Net, Erişim Tarihi: 17.11.2022). Meme kanserinin standart tedavileri arasında cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormonal tedavi, hedefe yönelik tedavi ve tedavi sahasına son yıllarda giren immünoterapi yer almaktadır (Kumar-Tyagi ve Dhesy-Thind, 2018). Meme kanserinin morfolojik farklılığı ve kompleks moleküler yapısı, heterojeniteye sebep olmakta ve tedavi süreçlerini zorlaştırmaktadır. Bu sebeple, hastalara etkin tedavi seçenekleri uygulayabilmek için histolojik ve moleküler sınıflandırmalar ile meme kanseri alt tipleri tanımlanmıştır (Viale, 2012).

1.1.1. Meme Kanseri Alt Tipleri ve Tedavi Yaklaşımları

Meme kanseri genetik ve klinik olarak heterojen bir hastalıktır. Bu heterojenliği standardize etmek için meme kanseri sınıflandırma sistemleri geliştirilmiştir. Bu sınıflandırma şemaları, tedavi ve prognoza yardımcı olmak için kullanılan bir araca dönüşmüştür.

Tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %98'ini oluşturan karsinomlar, epitelyal hücrelerden köken alır (Zubair ve ark., 2021). Histolojik sınıflandırılması, meme dokusunda lokal olarak kalması veya yayılımına göre in situ karsinom ve invaziv karsinom olarak kategorize edilir. Bunun yanı sıra, sitolojik özelliklerine göre süt kanallarında bulunan luminal epitelyal hücrelerden köken alması durumunda duktal karsinoma, süt sentezini sağlayan epitelyal hücrelerden köken alması durumunda lobular karsinoma olarak alt sınıflara ayrılır (Tsuda ve ark., 2020).

Meme kanserinin patofizyolojik davranışını sadece nükleer derece, mitotik indeks, histolojik derece gibi morfolojik sınıflandırma ve tümör boyutu, lenf nodu tutulumu, metastaz gibi klinik patolojik parametreler ile tahmin etmek teşhis ve tedavisi açısından yetersiz kalmıştır. Bu sebeple gelişen moleküler teknikler sayesinde meme kanserinin moleküler modelleri birçok çalışma ile analiz edilmiş ve günümüzde hastalığın tanı ve tedavisinde kullanılan moleküler sınıflandırma büyük ölçüde oluşturulmuştur (Zubair ve ark., 2021).

Moleküler düzeyde sınıflandırma çalışmaları ilk olarak immünohistokimya yöntemi ile hormon duyarlı, insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (HER2) ve üçlü negatif meme kanseri (TNBC) olarak 3 gruba sınıflandırılmıştır. Hormon duyarlı alt tip, östrojen reseptör (ER) veya progesteron reseptör (PR) ifade eden, bununla birlikte HER2 ifade durumu negatif ya da pozitif olan meme tümörlerini belirtirken, HER2 alt tipi, hormon reseptörleri ifade etmeyen ve HER2 ifadesi gösteren meme kanserleridir. TNBC, 3 biyobelirteç protein ifadesi göstermeyen meme kanserlerinin en agresif alt tipidir (Malhotra ve ark., 2010). Mikrodizin teknolojisi ile yapılan gen ifade analizleri ile klinik veriler karşılaştırılıp Luminal A, Luminal B, HER2 pozitif, bazal benzeri (BL), normal meme benzeri, claudin-düşük ve moleküler apokrin olmak üzere 7 çeşit moleküler alt tip tanımlanmıştır (Bastien ve ark., 2012; Perou ve ark., 2000; Reis-Filho ve Pusztai, 2011; Sørlie ve ark., 2001).

Alt tipler biyobelirteç ve ilaç hedefi olarak tedavi süreçleri açısından büyük önem taşımaktadır. Luminal A, en yaygın alt tip olup yeni teşhis edilen meme kanseri

vakalarının yaklaşık yarısını oluşturur. Luminal A tip meme kanserleri, düşük histolojik dereceli ve tüm alt tipler içerisinde en iyi prognoza sahip alt tiptir. Luminal A alt tipinin ifade profili immünohistokimyasal olarak, ER pozitif, PR $\geq$ %20, HER2 negatif ve proliferasyon indeksi olan Ki67<%20 olarak tanımlanmıştır. Luminal B alt tipi, Luminal A'ya göre daha yüksek histolojik dereceli ve daha kötü prognoza sahiptir. Luminal B profili, ER+, PR<%20 ve/veya HER2+ ve/veya Ki67 $\geq$ %20 şeklinde ifade gösterir. Luminal alt tipler, tamoksifen gibi seçici ER baskılayıcıları ya da anastrozol gibi aromataz inhibitörlerini içeren sistemik hormonal tedavilerden fayda görürler. Ek olarak, Ki67 ifadesinin daha yüksek olması ile Luminal B alt tipinde kemoterapi de tedavi seçenekleri arasındadır (Kudela ve ark., 2020; Tsang ve Tse, 2020; Yersal ve Barutca, 2014).

HER2 pozitif meme kanseri alt tipi, meme kanseri alt tiplerinin %15-20'sini oluşturur ve klinik olarak agresif bir alt tiptir. ER ve PR ifadesi göstermezken yüksek düzeyde HER2 ve Ki67 ifadesi gösterir. Tedavi edilmediğinde kötü prognoz ve metastaz yapabilme eğilimi gösteren HER2 pozitif alt tip, HER2 reseptörünü hedefleyen transtuzumab, pertuzumab gibi monoklonal antikorların ve lapatinib gibi küçük moleküllerin kemoterapi ile kombine kullanımları sonucunda hastalara ortalama 5 yıllık genel sağkalım avantajı sağlamıştır (Ferrando-díez ve ark., 2022; Martínez-Sáez ve Prat, 2021).

Normal meme benzeri alt tip, tüm meme karsinomlarının yaklaşık %5-10'unu oluşturur. ER, PR ve HER2 ekspresyonu olmadığı için TNBC olarak da sınıflandırılabilir ancak CK5 ve epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ifadesi göstermediğinden bazal benzeri kanserler olarak kabul edilmezler (Yersal ve Barutca, 2014). Claudin-düşük alt tip, ER, PR ve HER2 ifadesi göstermemelerinden dolayı TNBC alt tiplerinden biri olarak tanımlanır. Bu alt tip, epitelyal mezenkimal geçiş sürecinde ve kök hücrelerde yüksek ifade gösteren claudin 3, 4, 7, okludin ve E-cadherin dahil olmak üzere adezyon genlerinin düşük ifadesi ile karakterize edilirler (Reis-Filho ve Pusztai, 2011; Yersal ve Barutca, 2014). Moleküler apokrin, ER negatif, androjen reseptörü (AR) pozitif ve HER2 proteininin sıklıkla aşırı ekspresyonu

(~%30) ile karakterize edilen nadir görülen bir meme kanseri alt tipidir (Vranic ve ark., 2017). Normal meme benzeri, claudin-düşük ve moleküler apokrin alt tiplere spesifik klinikte henüz onaylanmış bir sistemik tedavi seçeneği bulunmamakta, bu nedenle genel olarak kemoterapi ajanları ile tedavi edilmeye çalışılmaktadır.

İmmünohistokimyasal olarak TNBC özelliklerine büyük ölçüde benzeyen bazal benzeri meme kanseri, epidemiyolojik verilere göre tüm meme kanseri hastalarının yaklaşık %15-20'sini oluşturur (Garrido-Castro ve ark., 2019). Agresif ve kötü prognoz sergileyen BL alt tip, diğer alt tipler ile kıyaslandığında BL hastalarının hayatta kalma süreleri daha kısadır ve tanıdan sonraki ilk 5 yıl içinde ölüm oranı %40'tır (Gluz ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2015). BL tümörler, ER, PR ve HER2'yi ifade etmezken, CK5, CK14, CK17 ve laminin gibi yüksek seviyelerde bazal miyoepitelyal belirteçleri ifade ederler. Ayrıca P-kadherin, fasin, caveolin 1 ve 2, alfa-beta kristalin ve EGFR'yi aşırı ifade ederler (Heitz ve ark., 2009).

Tüm genom sekanslama çalışmaları, TNBC hastalarının tümörlerindeki heterojeniteyi ortaya koymuştur. Bu çalışmalar sonucunda gen ifadesi ve ontolojisi temelinde TNBC, 6 alt tipe sınıflandırılmıştır. BL1 ve BL2 alt tipleri, hücre döngüsü, MET ve EGF genleri açısından zengin, immünomodülatör (IM) alt tipte, immün sistem yolakları aktiftir. Luminal androjen reseptörü (LAR) alt tipi, artmış androjen ifadesi ve metabolizmasını temsil eder. Mezenkimal benzeri (ML) ve mezenkimal kök hücre benzeri (MSL) alt tipler ise hücre farklılaşması ile ilişkili genlerin yüksek ifadelerini gösterirler (Lehmann ve ark., 2011). Jézéquel ve ark. (2015) yaptığı bir çalışmada, immün metagen verileri, C1 (LAR), C2 (düşük immün yanıt ancak yüksek M2 benzeri makrofajlara sahip BL) ve C3 (yüksek immün yanıt ancak düşük M2 benzeri makrofajlara sahip BL) olmak üzere TNBC'yi 3 alt immün tipte gruplandırmıştır.

Belirlenen TNBC genomik profilleri günümüzde tam olarak tedavi şemalarına dönüşmemiştir. TNBC, morfolojik, moleküler ve klinik heterojenliği ve hedefe yönelik sistemik tedavilerin olmaması nedeniyle klinik açıdan zor bir tümör grubudur.

TNBC hastaları, belirteç reseptörlerin eksikliği nedeniyle endokrin veya HER2 hedefli ilaçlardan fayda görmezler. Bu sebeple, TNBC hastalarının standart sistemik tedavisi, kemoterapidir. Taksan ve antrasiklinlere en iyi yanıt veren alt tip olmasına rağmen hastaların %30'undan daha azı tam yanıt gösterir ve diğer alt tiplere göre daha yüksek nüks ve ölüm oranı sergiler (Garrido-Castro ve ark., 2019). Buna ek olarak, metastatik TNBC hastalarının sistemik tedavi rejimlerinde platin bazlı kemoterapi ve BRCA1/2 mutasyonları olan hastalarda PARP inhibitörleri de kullanılabilir (Fragomeni ve ark., 2018; Yam ve ark., 2017). Son olarak, sistemik tedavi seçenekleri arasına akciğer kanseri ve melanoma hastalarında önemli sağkalım avantajı sağlayan immün kontrol noktası inhibitörleri de girmiştir. 2019 yılında IMpassion130 klinik çalışması sonucunda PD-L1 immün kontrol noktası molekülü ifade eden TNBC hastaları için immün kontrol noktası antikoru (atezolizumab) ile paclitaxel kombinasyonu, hızlı kullanım onayı almış olsa da IMpassion131 çalışması sonucunda sağkalım avantajı açısından fark olmadığı ortaya konmuş ve endikasyon geri çekilmiştir (Miles ve ark., 2021; Schmid ve ark., 2018; Simmons ve ark., 2020). Daha sonra KEYNOTE-355 çalışması, PD-L1 pozitif ve kombine pozitif skor (CPS) $\geq 103,21$ olan metastatik TNBC'li hastalarda tek başına kemoterapiye kıyasla PD-1 antikoru (pembrolizumab) ile kombine tedavinin, sağkalım avantajını ortaya koyması üzerine 2020 yılında adjuvan tedavi olarak onay almıştır (Cortes ve ark., 2020). TNBC hastalarında uygulanan sistemik tedaviler tüm hasta profiline uymamakta ve tedavi alan hastaların büyük çoğunluğu tedavilerden fayda görmemektedir. Bu sebeple, TNBC'nin moleküler özelliklerinin belirlenip standardize edilmesi, tümörlerin iç ve dış çevrelerindeki spesifik değişikliklerin ortaya konması, yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından önem arz etmektedir.

1.2. İmmün (Bağışıklık) Sistem

İmmün sistem, iç ve dış patojenlere karşı organizmayı koruyan, geniş hücre, organ ve protein ağından oluşan kompleks bir savunma mekanizmasıdır. İmmün sistemi önemli kılan, organizmanın kendisinden olmayan patojen ve hücreleri

tanıyabilme ve ortadan kaldırabilme özelliğidir. İmmün sistem mikrobiyal, toksik veya alerjenik yapıların tanınma mekanizmalarına göre memeli konakçıda mevcut olmayan, birçok mikrop ve toksinler tarafından paylaşılan molekülleri doğuştan gelen mekanizmalar ile tanıyan doğal (innate) bağışıklık sistemi ve somatik olarak gen düzenleme mekanizmaları ile özgün yapılar için spesifite sağlayan kazanılmış (adaptif) bağışıklık sistemi olmak üzere iki genel gruba ayrılır (Chaplin, 2010).

1.2.1. Doğal (Innate) İmmün Sistem

Bir patojene karşı ilk tepki doğal immün sistem tarafından gerçekleşir. Doğal immün sistem tarafından kullanılan tanıma molekülleri, çok sayıda hücrede ifade edildiğinden, bir patojen ya da toksinle karşılaşıldıktan sonra uyarılır ve böylece ilk konak tepkisini oluşturur. Cilt ve mukoza gibi anatomik bariyerlerden kaçan patojenler, patojen ilişkili moleküler paternler (PAMP) olarak bilinen ortak yapıları ile doğal bağışıklık sistemi hücrelerinin patern tanıma reseptörleri (PRR) aracılığıyla tanınır. Doğal immünite sistemine en iyi örnek, memeli hücrelerinde bulunmayan ancak gram negatif bakterilerin hücre duvar yapısında yer alan lipopolisakkarit moleküllerinin PRR'lerden biri olan Toll-like reseptör 4 ile tanınmasıdır (Mazgaeen ve Gurung, 2020).

Doğal bağışıklık sistemi çok sayıda hücre, sitokin, kemokin ve kompleman sistemi tarafından düzenlenir. Bunlar makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler, mast hücreleri, bazofiller, eozinofiller, doğal öldürücü (NK) hücreler ve doğal lenfoid hücrelerdir. Makrofajlar ve nötrofiller fagositler olarak görev alır. Bu hücreler, patojenleri yutma (fagositoz) ve çeşitli yollarla öldürme işlevine sahiptirler. Fagositik özelliklerine ek olarak nötrofiller, patojenlerin ortadan kaldırılmasına yardımcı olan granüller ve enzimler içerir. Kısa ömürlü olan nötrofillerin aksine makrofajlar uzun ömürlü hücrelerdir ve adaptif immün sistemin uyarılma sürecinde T lenfositlere antijen sunumunda da rol oynarlar (Silva ve Correia-Neves, 2012). Dendritik hücreler antijen sunan hücreler (APC) olarak işlev görmeleri sebebiyle doğal ve kazanılmış

immün sistem arasındaki haberciler olarak görev alır. Bu işlevleri ile kazanılmış immün yanıtı başlatırlar (L. Song ve ark., 2018). Mast hücreleri ve bazofiller alerji ve astım gibi akut inflamatuvar yanıtların başlatılmasında etkilidir. Mast hücreleri genellikle kan damarlarını çevreleyen bağ dokuda ve mukozal yüzeylerde yaygın olarak bulunurken, bazofiller dolaşımda bulunur. Eozinofiller, fagositik özelliklere sahip olan ve genellikle fagosite edilemeyecek kadar büyük olan parazitlerin yok edilmesinde önemli rol oynayan granülositlerdir (Stone ve ark., 2010). NK hücreleri, tümör hücreleri ve virüs ile enfekte olmuş hücrelerin yok edilmesinde büyük rol oynar. Hedef hücrelerde apoptozu uyaran perforin ve granzim sitotoksik mekanizması ile enfekte veya tümör hücrelerini ölüme götürür. Ayrıca efektif immün yanıt için önemli bir sitokin olan interferon-gamma (IFN- γ) salgılayarak APC'leri ve makrofajları aktive eder (Paul ve Lal, 2017). Doğal lenfoid hücreler, adaptif immün sistem hücreleri T ve B lenfositler ile aynı ortak progenitör hücreden meydana gelirler ancak T veya B hücre reseptörleri eksprese etmezler. Daha çok dokularda ve mukozal bölgelerde yerleşiklerdir. Salgıladıkları sitokin profiline göre 3 gruba ayrılırlar. Tip 1 doğal lenfoid hücreler, tip 1 bağışıklık tepkisinde yer alan imza sitokin IFN- γ ve ana transkripsiyon faktörü T-bet ekspresyonu ile tanımlanır. Tip 2, tip 2 bağışıklık tepkisine katılan imza sitokin IL-5/IL-13'ün ve ana transkripsiyon faktörü GATA3 ifadesi ile karakterize edilir. Tip 3, ROR γ t eksprese eden hücrelerdir ve bağırsak homeostazını sürdürmek için IL-22 ve IL-17 üretebilirler (Zheng ve Zhu, 2022).

1.2.2. Kazanılmış (Adaptif) İmmün Sistem

Doğal bağışıklık sistemi enfeksiyonel ajanları ve tümör hücrelerini ortadan kaldırmada her zaman başarılı olamayabilir. Bu gibi durumlarda antijen sunan hücreler tarafından T lenfosit aracılı hücresel bağışıklık ve B lenfosit aracılı humoral bağışıklık uyarılarak adaptif immün sistem devreye girer. Adaptif immün sistemin esas işlevleri, kendi olmayan (non-self) spesifik antijenleri tanımak, bu antijenlere özgü spesifik efektör immün yanıt oluşturmak, immün yanıt esnasında kendi hücrelerine (self) zarar

vermemek ve de antijene spesifik immünolojik hafıza geliştirmek şeklinde sıralanabilir (Bonilla ve Oettgen, 2010).

1.2.2.1 Humoral İmmünite

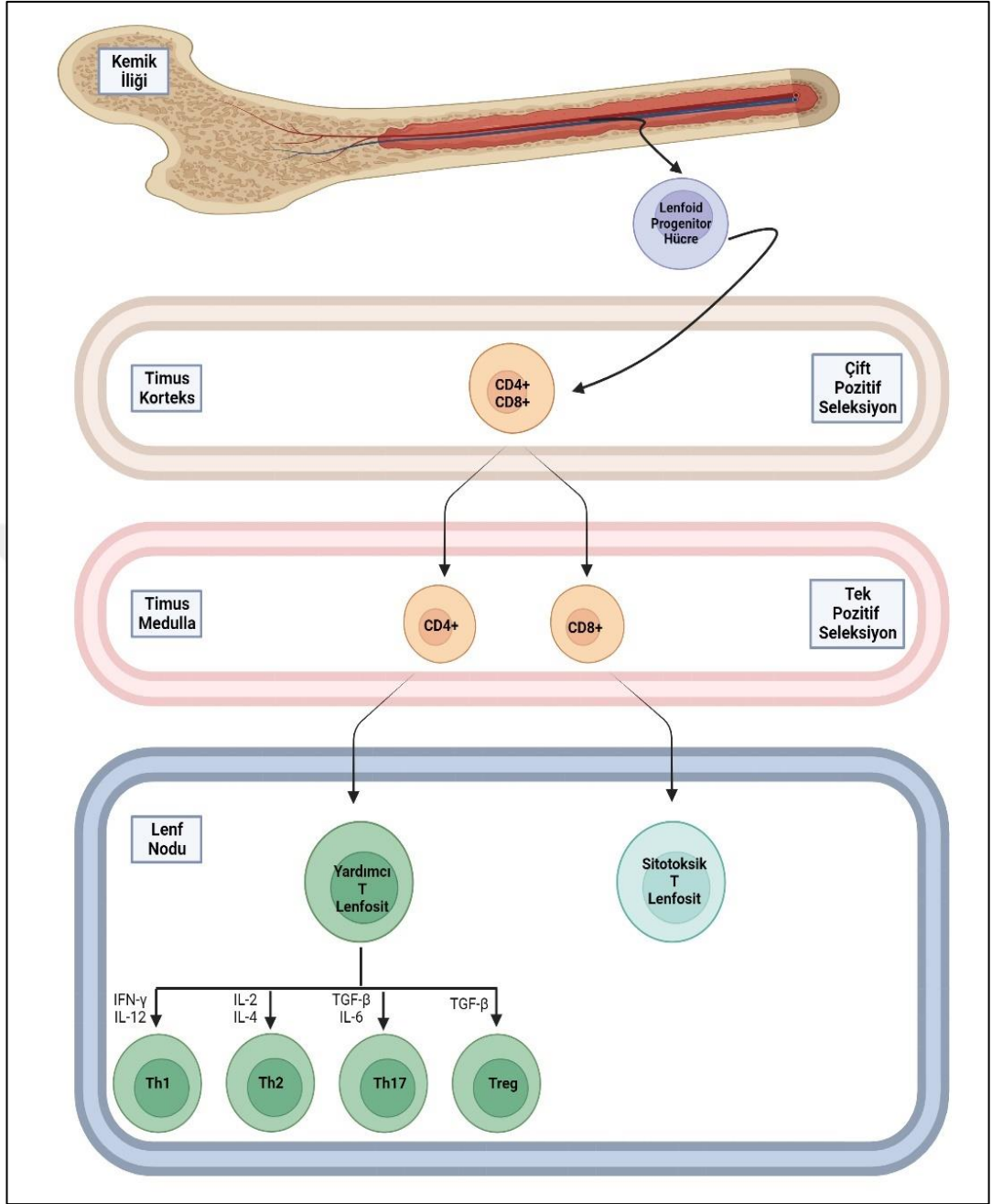
Humoral bağışıklığın esas aktörleri B lenfositler ve bu hücrelerin uyarılması sonucu oluşan plazma hücreleri tarafından üretilen antijenlere spesifik immunoglobulin yapıdaki antikorlardır. B lenfositlerin gelişimi, primer lenfoid organ olan kemik iliğindeki hematopoietik kök hücrelerden başlar ve dalakta son olgunlaşamaya kadar devam eder. B hücre reseptörünün (BCR) oluşturulması, ifadesi ve sinyalizasyonuna yol açan bir dizi gelişimsel ilerleme meydana gelir. Kemik iliğinde pro-B ve pre-B evrelerinde ağır (H) ve hafif (L) zincir imm nogloblin genleri yeniden düzenlenir ve yüzey IgM eksprese edilir. Ayrıca merkezi tolerans adı verilen süreç ile kemik iliğinde kendinden olan hücrelere güçlü bir şekilde bağlanma gösteren olgunlaşmamış B hücreleri apoptoz ile ortadan kaldırılır. Saf (naive) B hücreleri, sekonder lenfoid organ olan dalakta pozitif ve negatif seçim ile kendi hücrelerine reaktif olmayan, immün yeterliliği olan bir repertuvarını oluşturmak için ileri gelişimsel ve olgunlaşma süreçlerine tabi tutulur. B hücrelerin toleransı için apoptoz, fonksiyonel inaktivasyon (anergi) ve immünoglobulin değişken (V) bölgelerinin yeniden düzenlenmesiyle antijen özgüllüğünün değiştirilmesi gibi birçok mekanizma vardır. Olgunlaşmamış B hücreleri dalakta son olarak IgD ve IgM'yi birlikte eksprese eden olgun B hücreleri haline gelir (Edry ve Melamed, 2004; Monroe, 2006; Pelandı ve Torres, 2012; Rolink ve ark., 2001).

B hücreleri, T hücrelerden farklı olarak APC'ler üzerinde bir major histocompatibility complex (MHC) molekülü tarafından antijenlerin sunumuna ihtiyaç duymadan c z n r (soluble) antijenleri, membran immünoglobulinleri olan BCR ile yakalayarak cevap oluşturabilirler. Antijen bağlanması ve aktivasyonunun ardından proliferasyona uğrayan B lenfositler ya düşük afiniteli antikorları hızlı bir şekilde salgılayan ekstrasfolik ler plazmablast haline gelir ya da sekonder lenfoid

organlarda bulunan germinal merkeze girer. Antijenlerin konsantre edildiği germinal merkeze giren B hücresi, somatik hipermutasyon ve afinite olgunlaşmasından geçer. Afinite ile olgunlaşan B hücreleri plazmablastlara ya da hafıza hücrelerine dönüşebilir. Erken yanıtta yer alan ekstrasfoliküler plazmablastın aksine, bu plazmablastlar yüksek afiniteli antikorlar salgılar (Heesters ve ark., 2016; Yuseff ve ark., 2013). Ek olarak, B lenfositler BCR ile yakaladıkları antijenleri hücre içine alarak, sınıf II HLA proteinlerinde hücre yüzeylerinde sunulmak üzere işleyebilirler. Antijen alımı, sınıf II HLA, CD80 ve CD86 ifadelerini indükler. Hücre yüzeyindeki bu kostimülatör moleküller ve antijen taşıyan sınıf II HLA kompleksi ile B lenfositler, antijen sunan hücreler gibi davranarak T lenfositlerin aktive edilmesine katkı sağlarlar (Popi ve ark., 2016).

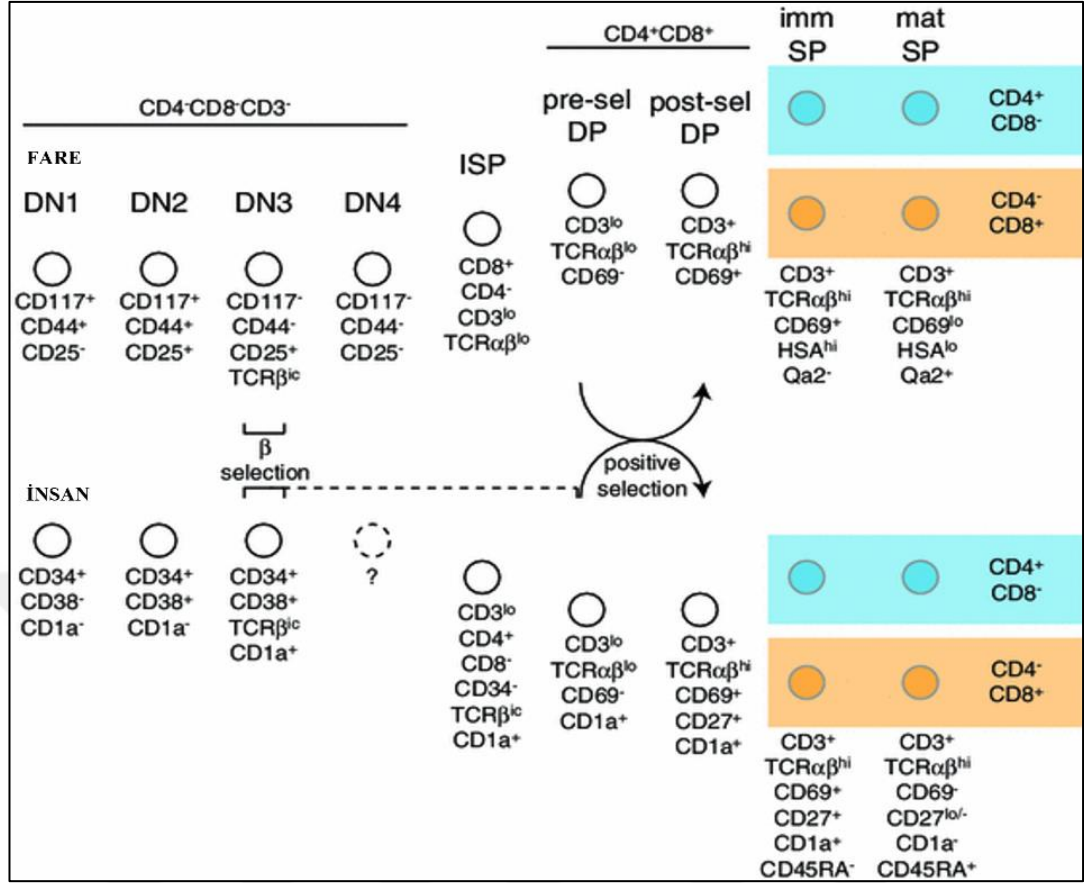
1.2.2.2 Hücresel İmmünite

Hücresel bağışıklık yanıtı, homeostazın ve immünolojik hafızanın oluşturulması ve sürdürülmesinde rol oynayan T lenfositler tarafından yönetilir. T lenfositler, B lenfositler gibi kemik iliğindeki hematopoietik kök hücrelerden farklılaşan lenfoid progenitör hücrelerden köken alır. T lenfositler, patojenlerden, tümör hücrelerinden ve çevreden çeşitli antijenleri tanıma potansiyeli bulunan kendilerine özgü T hücre reseptörleri (TCR) ifade ederler ve TCR ifadesinin kontrolü, CD4+ ve CD8+ alt tiplere farklılaşması ve kendi hücrelerine tolerans göstermesi için eğitildiği yer, primer lenfoid organ olan timüstür (Miller, 1961). T hücrelerin timustaki gelişimi, Şekil 1.1.'de görülebileceği gibi lenfoid progenitör hücrelerin timusa girişi, timüs korteks bölgesinde CD4+ CD8+ çift pozitif (DP) timositlerin üretilmesi, DP timositlerin medulla epitel hücreleri (mTEC) ile etkileşimi sonucunda olgun CD4+ ve CD8+ tek pozitif (SP) T lenfositlerin oluşumu ile sekonder lenfoid organlara göçü şeklinde dinamik ve çok basamaklı bir süreçtir (Famili ve ark., 2017).



Şekil 1.1. T lenfositlerin gelişimsel süreçleri

T lenfositlerin gelişimsel süreçleri oldukça çalışılmış olup her aşamadaki hücrelerin yüzey belirteç molekülleri Şekil 1.2.'de gösterildiği gibi detaylı bir şekilde tanımlanmıştır. Gelişimsel süreçler ve immün fenotipler, insan ve fare arasında oldukça benzerdir (Halkias ve ark., 2014)



Şekil 1.2. T lenfositlerin gelişimsel süreçleri boyunca sergiledikleri yüzey belirteçleri (Halkias ve ark., 2014)

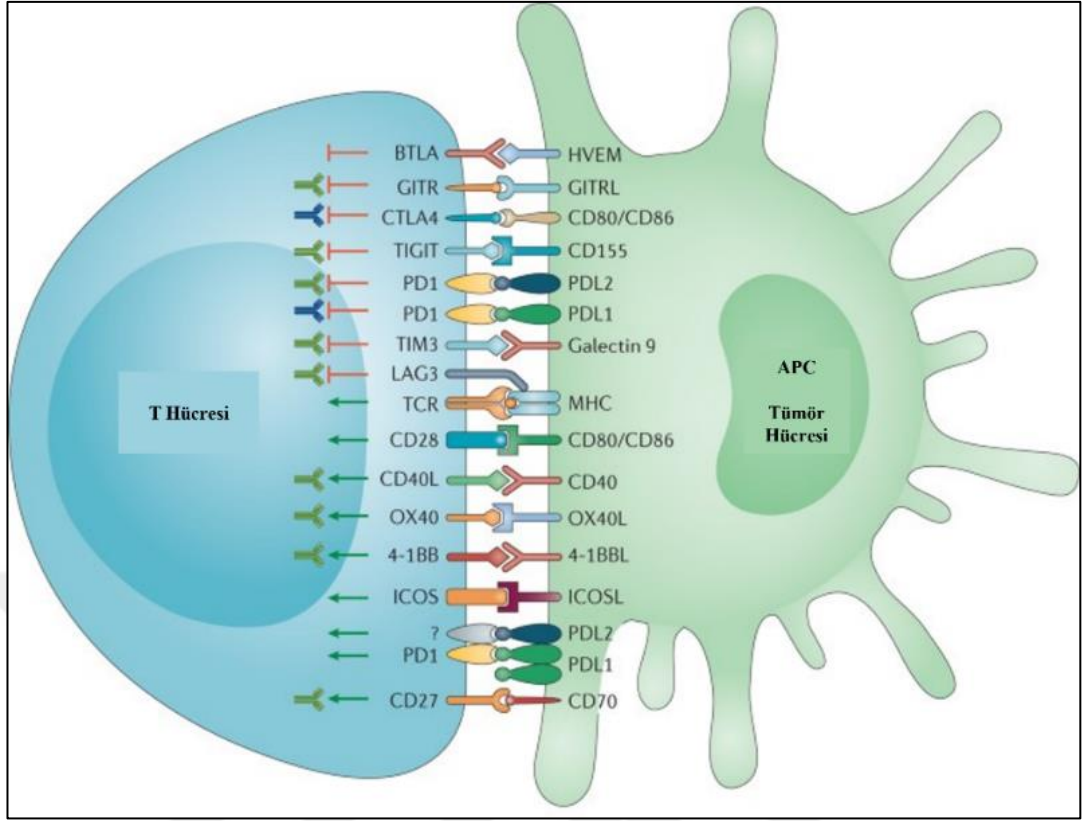
Olgun ve saf T lenfositler, antijenlerle karşılaşmak üzere lenf nodları ve dalakta konumlanmıştır. Sekonder lenfoid organlar, antijen yüklü olgun dendritik hücrelerin toplandığı bölgelerdir. T lenfositler, lenf nodlarının parakorteks bölgesinde bulunurken, dalakta beyaz pulpa (white pulp) bölgesinde bulunan T hücre zonunda yer alırlar (Charles-Janeway ve ark., 2001; Lewis ve ark., 2019).

T hücrelerin bir antijene karşı efektör fonksiyon gösterebilmesi için öncelikle APC'ler tarafından antijenin bu hücrelere tanıtılması gerekmektedir. Doğal immünite tarafından PAMP'ları tanıyan patern tanıma reseptörleri (PRR) dendritik hücreler üzerinde de bulunur. PAMP ve PRR yapılarının birleşmesi, dendritik hücrelerin olgunlaşmasını tetikler ve kostimulator molekülerin ifadesinin artmasına yol açar (Kabelitz ve Medzhitov, 2007). MHC molekülleri üzerinde antijenlerin sunumu, antijenlerin hücre içerisine alınarak işlendiği bir dizi süreci içerir. Hücre içine alınan antijenler, MHC I ile sunum için proteazomlar tarafından 8 - 10, MHC II ile sunum

için lizozomlar tarafından 13 - 18 amino asit uzunluğa indirgenir. Endoplazmik retikulumda, antijenik peptit yapısı, MHC I molekülünde bulunan spesifik antijen oluklarına yerleştirilir. Bu süreç, MHC II molekülleri için endozomlarda gerçekleşir. Lenf nodunda antijen-MHC I veya II kompleksi taşıyan olgun dendritik hücreler, antijen sunan hücreler olarak sırasıyla CD8+ ve CD4+ T lenfositlerin TCR/CD3 komplekslerine bağlanır ve sinyalizasyonu başlatır (Jones ve ark., 2006; Vyas ve ark., 2008).

APC'ler üzerinde antijenik peptit-MHC kompleksi ile T hücrelerin TCR/CD3 kompleksinin birleşimi, TCR sinyalini tetikler ancak tam bir aktivasyonun gerçekleşebilmesi için T hücreler üzerindeki ko-stimülatör reseptörler ile APC'ler üzerindeki ligandlarına bağlanması gerekmektedir. Şekil 1.3.'de görülebileceği gibi T hücrelerin proliferasyon, efektör fonksiyonları ve sağkalımlarını uyaran birçok ko-stimülatör molekül tanımlanmıştır. Özellikle CD28 ve B7-1 (CD80) veya B7-2 (CD86) bağlantısının etkin T hücre aktivasyonu için esas olduğu bilinmektedir (June ve ark., 1987). CD28 reseptör sinyalizasyonu yoluyla IL-2 salgılanması ve BCL-XL gibi anti-apoptotik proteinlerin ifadesinin artması ile T hücre proliferasyon ve sağkalımı desteklenir (Boise ve ark., 1995; Watts, 2010). APC ve T hücreler arasındaki bu reseptör ve ligand bağlantıları immünolojik sinapsların oluşmasına sebep olur. İmmünolojik sinapsların oluşmasında LFA-1, LFA-3, ICAM-1, ICAM-2 gibi hücreler arası adezyon molekülleri de rol oynar. İmmünolojik sinaps yapısının, antijen tanıma ve T hücre göçünü koordine ettiği düşünülmektedir (Dustin, 2010; Lee ve ark., 2002; Tseng ve ark., 2008).

T hücreleri aktive edildikten sonra T hücre fonksiyonlarını baskılayan ko-inhibitör reseptörlerin ifadeleri artar. T hücre aracılı immün yanıtın baskılanmasında gerekli olan ko-inhibitör moleküller, fizyolojik sürecin bir parçasıdır ve T hücre fonksiyonlarının önemli regülatörleridir. CTLA-4, PD-1, TIM-3, TIGIT ve LAG-3 dahil olmak üzere birçok inhibitör reseptör tanımlanmıştır (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. T lenfositler ve antijen sunan hücreler arasındaki ko-stimülatör ve ko-inhibitör molekül interaksyonları (Wykes ve Lewin, 2017)

Kanser alanında ilk kullanım onayı alan CTLA-4 molekülü, immün sistemin önemli bir baskılayıcısıdır (Fellne, 2012). T hücrelerin yüzeyinde bulunan CTLA-4, APC'lerin yüzeyinde bulunan CD80/86 molekülüne CD28 molekülünden daha yüksek afinite ile bağlanarak, T hücrelerin aktivasyonu sonucu uyarılan PI3K/AKT yolağını baskılar. Böylece T hücre proliferasyonu ve sağkalımı bloke edilirken, pro-apoptotik faktörler uyarılarak T hücrelerin ortadan kaldırılması sağlanır (Van Coillie ve ark., 2020). Bir diğer önemli ko-inhibitör reseptör ise PD-1/PD-L1 bağlantısıdır. Aktive NK hücreleri, B lenfositler, makrofajlar, dendritik hücreler ve monositler üzerinde ifade olabilen PD-1 reseptörü, özellikle tümöre spesifik T hücrelerin üzerinde yüksek düzeyde ifade edilir (Ahmadzadeh ve ark., 2009). PD-L1 molekülü ise makrofajlar, bazı aktive T ve B hücreler, dendritik hücreler ve bazı epitelyal hücrelerin yüzeyinde ifade edilir (Sharpe ve ark., 2007). PD-1 ve PD-L1 bağlantı ile PTEN aracılı PI3K/AKT yolağı inhibe edilerek efektör T hücre cevabı baskılar ve T hücrelerin apoptozunu indükler (Boussiotis, 2016). Regülatör T hücrelerin immün baskılayıcı

işlevleri, CTLA-4 ve PD-1 gibi ko-inhibitör reseptörler ile gerçekleşir (Schnell ve ark., 2020; Wing ve ark., 2008).

Antijen tanıtımı sonrası aktive olan CD4+ T lenfositler, farklı efektör alt tiplere farklılaşarak spesifik sitokinlerin salgılanması yoluyla bağışıklık tepkisinde önemli rol oynarlar. Son çalışmalar ışığında, T-yardımcı 1 (Th1), T-yardımcı 2 (Th2), T-yardımcı 9 (Th9), T-yardımcı 17 (Th17), foliküler yardımcı T lenfosit (Tfh), indüklenmiş T-düzenleyici lenfosit (iTreg), düzenleyici tip 1 lenfosit (Tr1) ve CD4+ sitotoksik T lenfositler (CTL) olarak 8 çeşit CD4+ T lenfosit hücre tipi tanımlanmıştır. Alt tiplerin farklılaşması, spesifik sitokin ve transkripsiyon faktörü sinyalizasyonlarını içeren karmaşık ağlara bağlıdır. Efektör CD4+ T lenfositlerin alt tipleri, sitokin profilleri ve fonksiyonları Çizelge 1.1.'de belirtilmiştir (Couture ve ark., 2019; Luckheeram ve ark., 2012; Y. Song ve ark., 2021).

Çizelge 1.1. CD4+ T lenfosit alt tipleri ve ana özellikleri

CD4+ T Lenfosit Hücre Grubu	Hücre Farklılaşmasında Rol Alan Sitokinler	Transkripsiyon Faktörleri	Efektör Sitokinler	Fonksiyonu
Th1	IFN- γ , IL-12	T-bet	IFN- γ , TNF- α	Hücre içi patojenlere (virüsler, bakteriler) karşı bağışıklık, kanser immün gözetimi
Th2	IL4	GATA3	IL-4, IL-5, IL-13	Parazitlere karşı bağışıklık, B hücreleri tarafından IgE üretimi
Th9	TGF- β , IL-4	PU.1, Foxo1	IL-9	Parazitlere karşı bağışıklık, mukus salgısı, kanser immün gözetimi
Th17	IL6, IL 23, TGF- β	ROR γ t	IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22	İnflamasyon, hücre dışı patojenlere karşı bağışıklık, doku homeostazı, kanser immün gözetimi
CD4+ CTL	IL-2, IL-15	Eomes	Granzim B, Perforin	Sitotoksikite, kanser immün gözetimi
Tfh	IL6, IL21	Bcl6	IL-21	B hücrelere yardım
iTreg	TGF- β , IL-2	Foxp3	TGF- β , IL-10	İmmün toleransı, immün sistemin baskılanması
Tr1	IL27, IL10	c-Maf, AhR	IL-10	İmmün toleransı, immün sistemin baskılanması

CD8+ T lenfositler, efektör fonksiyonlarını sitotoksik T lenfositler (CTL) olarak gösterir. Bir inflamatuvar ya da tümör bölgesi içinde, antijen spesifik bir CTL, TCR aracılığıyla spesifik antijenini taşıyan hedef hücre ile yüksek afinite ile bağlanır. Antijen spesifik bir CTL'nin TCR'sinin uyarılması, CTL ile hedef hücre arasındaki adezyon molekülü çiftlerinin bağlanma afinitesini hızla artırarak iki hücreli bir konjugat oluşturur. CTL'ler tarafından hedef hücrenin ortadan kaldırılması, granül ekzositoz, Fas ve/veya TNF (tümör nekroz faktörü) gibi sitotoksik sitokinlerin salınması yoluyla meydana gelir. Granül ekzositoz, CTL'ler tarafından hedef hücre ölümünün çoğundan sorumludur. Granül ekzositoz yolağı, CTL'nin sitotoksik granüllerinin içeriğinin salınmasını ifade eder. Konjugat oluşumundan kısa bir süre sonra, CTL'nin hücre iskeleti, sitotoksik granüllerinin CTL-hedef hücre teması bölgesine getirilmesi için yeniden düzenlenir. Granüller, CTL membranı ile kaynaşır ve granüllerin sitotoksik içerikleri, hedef hücre membranına doğru yönlü olarak ekzositozlanır. Bu granül içerikleri arasında perforin ve granzimler bulunmaktadır. Perforin gözenek oluşturucu bir proteindir ve granzimler bir serin proteaz ailesidir. Hedef hücreye endositoz ile girişi takiben, perforin, endolizozomal veziküllerde porlar açarak granzimlerin hedef hücrenin sitoplazmasına salınmasını kolaylaştırır. Granzim A kaspazdan bağımsız bir DNA hasarı yolu başlatırken, granzim B klasik kaspaz aracılı apoptozu tetikler. DNA'sının ve diğer önemli hücre içi substratlarının bozulması üzerine hedef hücre ölür. Bu ölüm şekli, perforin/granzim aracılı sitotoksikite olarak adlandırılır (Basu ve ark., 2016; Gordy ve He, 2012). Fas proteini, memeli hücrelerinde yaygın olarak ifade edilen bir transmembran ölüm reseptörüdür. Saf CD8+ T lenfositler Fas ligandı ifade etmezken, antijenle karşılaşarak aktive edildikten sonra Fas ligandı sentezlenir ve farklılaşan CTL'lerde özel taşıma veziküllerinde depolanır. Konjugat oluşumu üzerine, Fas ligandı içeren taşıma vezikülleri, CTL plazma membranı ile birleşir. Fas ligandı, hedef hücrede Fas reseptörüne bağlanır ve hedef hücrede kaspazları ve endonükleazları aktive ederek apoptozu indükler (Fu ve ark., 2016). CTL'ler, TNF ve lenfotoksin (LT) gibi sitotoksik sitokinler üreterek hedef hücreleri öldürebilir. Hedef hücrenin apoptozu, CTL tarafından üretilen TNF'nin hedef hücre yüzeyindeki TNF reseptörü 1'e (TNFR1) bağlanmasıyla indüklenebilir. TNFR1'e de bağlanan LT'nin de benzer bir etkisi vardır. CTL'ler aynı zamanda IFN γ salgılayarak B hücrelerini, antikor bağımlı hücresel sitotoksikite veya kompleman

aktivasyonu yoluyla öldürmeyi kolaylaştıran antikorlar üretmesi için uyarır (Ye ve ark., 2018).

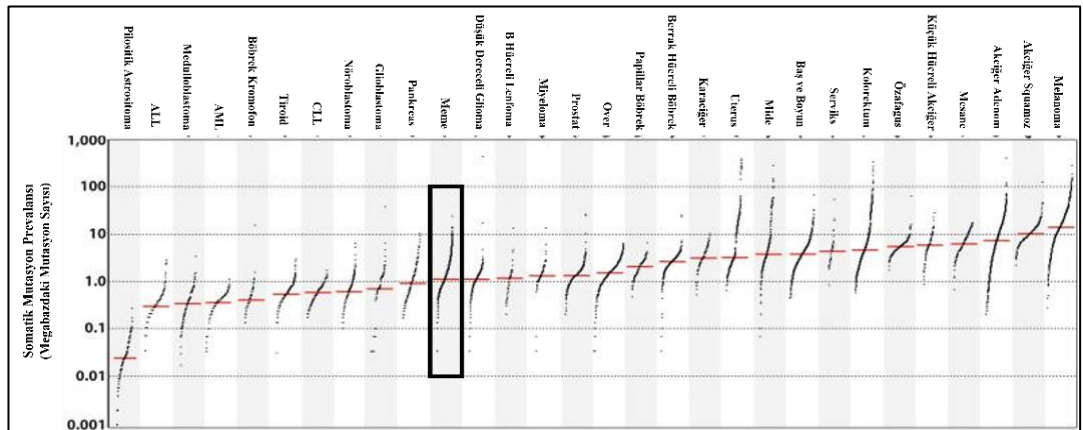
Antijenle uyarılan CD8+ efektör T hücrelerinin popülasyonu fenotipik ve işlevsel olarak heterojendir. Efektör CD8+ T hücreleri immün yanıt sırasında çoğalıp farklılaştıkça, çoğu hücre terminal olarak daha kısa ömre sahip olan ve enfeksiyonel ajanın ortadan kaldırılmasından sonra apoptoz yolu ile ölen son aşama efektörlerine farklılaşırken, yaklaşık %5-10'luk küçük bir hücre grubu, hafıza hücresi öncüllerine farklılaşır (Kaeche ve Wherry, 2007; Williams ve Bevan, 2007). Kısa ömürlü efektör hücreler (SLEC) veya efektör hafıza hücresi (Tem) olarak tanımlanan alt grup, IL-12, IFN- γ ve IL-2 gibi yüksek seviyelerde pro-inflamatuar sitokinlere maruz kalma, T-bet ve Bim-1'in ifade artışı yanı sıra aktive CD8+ T hücrelerinde mTOR aktivitesinin artmasına neden olur ve efektör fenotipi destekler. Bu hücreler daha sonra Bim'e bağlı apoptoz yoluyla terminal sürece girer ve ölür (Joshi ve ark., 2007; Mescher ve ark., 2006). Buna karşılık, hafıza öncü efektör hücreler (MPEC) veya merkezi hafıza hücresi (Tcm) olarak tanımlanan bir grup aktive CD8+ T hücresi, BCL-6, Bmi-1, Tcf7 ve Eomes'u yüksek düzeyde ifade eder. Ayrıca, büyüme faktörünün azalmasını takiben mTOR aracılı anabolik durumdan AMPK/FAO aracılı katabolik duruma geçebilirler ve Bcl-2 ve Mcl-1 gibi anti-apoptoz faktörlerini düzenleyerek efektörden hafızaya doğru geçişte hayatta kalabilirler (Cui ve Kaeche, 2010; Parish ve Kaeche, 2009).

1.2.3. Meme Kanseriinde İmmün Sistemin Yeri

İmmün sistem tarafından tümörleşmeye giden hücrelerin ortadan kaldırılması, immün gözetim olarak adlandırılan süreç ile ifade edilir. Bu sürecin eliminasyon, denge ve kaçış olarak üç aşaması tanımlanmıştır (Swann ve Smyth, 2007). Makrofajlar ve NK hücreleri gibi doğal immünite elemanları ve özellikle CD8+ T lenfositler gibi adaptif immünite hücreleri aracılığıyla tümör hücrelerinin ortadan kaldırıldığı eliminasyon aşamasında, normal hücrelerde var olmayan (neoantijenler) ya da var olan ancak fazla ifade gösteren moleküller, immün sistem tarafından yakalanıp yok edilir ve kanser oluşumu engellenir. Ancak tümörleşmeye giden hücrelerde genetik instabilite sonucu oluşan heterojen yapı nedeniyle, immün sistem bazı tümör

hücrelerini yok ederken bazılarını azalmış immünojenitesinden dolayı gözden kaçırarak bir denge fazı da ortaya çıkarabilir. Denge fazında immün sistem hücrelerinin gözetiminden kaçan tümör hücreleri ise çoğalarak kansere sebep olabilir. Tüm bu mekanizma kanserin immün düzenlemesi olarak adlandırılır (Dunn ve ark., 2004; Vinay ve ark., 2015). Kanserın immün düzenlemesi, tümörü destekleyen inflamasyon ve immün sistem cevabından kaçış olarak kanserin ayırt edici özellikleri arasında tanımlanmıştır (Hanahan, 2022; Hanahan ve Weinberg, 2011). Kanser hücreleri, immün sistem baskısından kurtulmak için tanınmayı veya kendisine karşı oluşan immün yanıtı engelleyen çeşitli mekanizmalar geliştirir. Tümör hücreleri denge ve kaçış fazlarında immün sistem tarafından tanınmayı önlemek için, MHC moleküllerinin ifadesini azaltma, immün baskılamada rol alan regülatör T hücre, myeloid kökenli baskılayıcı hücre, M2 makrofaj gibi hücreleri ortama çekme, immün sistemi baskılayan IL-10, TGF- β gibi sitokinleri salgılama veya mikroçevredeki diğer hücrelere salgılatma ve PD-L1 gibi immün kontrol noktası molekülleri aracılığıyla tümöre karşı oluşmuş immün cevabı baskılama gibi mekanizmaları kullanır (Barriga ve ark., 2019).

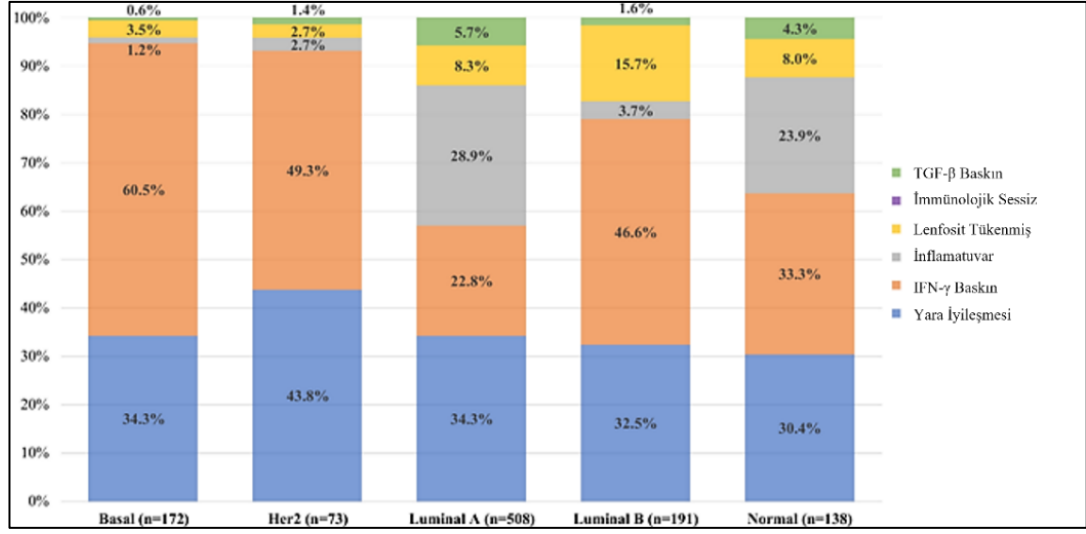
Meme kanseri son yıllara kadar immünolojik olarak sesiz bir tümör tipi olarak tanımlanmıştır. Çeşitli tümörlerin somatik mutasyon yüklerinin analiz edildiği bir çalışmada (Şekil 1.4.), meme kanserinin immün sistemi uyuracak yeni antijenler ortaya koyma noktasında melanom ve akciğer kanseri kadar etkin olmadığı gösterilmiştir (Alexandrov ve ark., 2013).



Şekil 1.4. İnsan kanser tipleri arasındaki somatik mutasyon prevalansı

Bu sebeple tümör immünolojisi çalışmaları çoğunlukla melanom ve akciğer kanserine odaklanmış, meme kanserinde çalışmalar son birkaç yıla kadar kısıtlı kalmıştır. Ancak meme tümörlerinin mikroçevresinde T lenfositlerin yer aldığı ve hücre profili bazında iyi prognoz ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Normal ve meme kanserli hastaların kıyaslandığı bir çalışmada, tümör mikroçevresinde bulunan CD4+ T hücrelerin, hastaların sonuçları üzerinde olumsuz prognostik etkileri olabileceği, buna karşılık CD8+ T hücrelerin, daha iyi klinik sonuçlara yol açan anti-tümör bağışıklığa aracılık eden anahtar efektör hücre popülasyonu olduğu gözlemlenmiştir (Huang ve ark., 2015). Erken evre TNBC hastalarında CD4+ yardımcı T hücrelerin yüksek olmasının ise sağkalım avantajı sağladığı bildirilmiştir (Schmidt ve ark., 2018). Başka bir çalışmada ise CD8+ sitotoksik T hücrelerin ve tümör infiltrate lenfositlerin (TIL), TNBC hastalarında prognostik değeri olduğu vurgulanmıştır (Vihervuori ve ark., 2019). Meme kanserli hasta verilerinden yapılan bir meta-analiz çalışması sonucunda ise intraepitelyal ve stromal TIL'lerin iyi prognoz indikatörü olabileceği ancak, PD-1+ TIL ve FoxP3+ TIL'ler gibi alt grupların kötü prognozla ilişki gösterdiği belirtilmiştir (Yu ve ark., 2016). TNBC hasta parafin blokları ile yapılan ayrı bir çalışmada ise CD8+ PD1+ immün hücre grubunun prognostik değeri olduğuna dikkat çekilmiştir (Yeong ve ark., 2019).

The Cancer Genome Atlas veri tabanı kullanılarak yapılan bir çalışmada, 10000 örnek ile 33 farklı tümör, makrofaj ve lenfosit imzalarındaki farklılıklar, Th1:Th2 hücre oranı, neoantijen yükü gibi faktörler açısından analiz edilmiş ve yara iyileşmesi, IFN- γ baskın, inflamatuvar, lenfosit tükenmiş, immünolojik olarak sessiz ve TGF- β baskın olmak üzere 6 farklı immün alt tip tanımlanmıştır (Thorsson ve ark., 2018). Meme kanseri özelinde incelendiğinde Şekil 1.5'te de görülebileceği gibi meme kanserinin immünolojik olarak sessiz bir kanser tipi olarak ifade edilemeyeceği ve hatta meme tümörlerinin alt tipler bazında immünolojik olduğu ortaya konmuştur.



Şekil 1.5. Meme kanseri alt tiplerinin immünolojik sınıflandırması (Gatti-Mays ve ark., 2019)

Meme kanseri immünojenitesi ve kaçış mekanizmalarının araştırıldığı bir çalışmada, hastaların CD8+ T lenfositleri mikrodizin ve sekans teknolojisi ile incelenmiş ve TNBC alt tipinde, tümör infiltrate T lenfosit skorunun, TCR çeşitliliğinin, neoantijen ve T lenfosit klonal çoğalma skorunun, antijen işleme ve sunum sürecinin, ko-stimülatör reseptör ve ligandların ve aynı zamanda ko-inhibitör reseptörlerin diğer alt tiplere göre fazla olduğu ortaya konmuştur. Tüm bu veriler ışığında TNBC hastalarında, T hücre cevabının ortaya çıktığı ancak çeşitli mekanizmalar ile baskılandığı vurgulanmaktadır. Ek olarak, meme kanserinde alt tip spesifik kombinasyonel immün tedavilerin daha etkili olacağı belirtilmiştir (Hammerl ve ark., 2020).

Meme kanserine immüno-onkolojik tedaviler açısından bakıldığında immün kontrol noktası blokajı, adaptif hücresel tedavi ve kanser aşıları şeklinde kategorize edilebilir. İmmün kontrol noktası blokajında temel hedef, tümör mikroçevresinde bulunan tümör hücrelerine spesifik lenfositlere karşı olan baskının ortadan kaldırılmasıdır. İmmün kontrol noktası PD-L1 ifadesi özellikle TNBC hastalarında yüksektir ve kötü prognoz ile ilişkilidir (Mittendorf ve ark., 2014). Bu sebeple, PD-1/PD-L1 tedavileri ile ilgili yapılan çoğu pre-klinik ve klinik çalışma TNBC alt tipine odaklanılmıştır. TNBC grubunda kemoterapi veya radyoterapi kombinasyonlarının PD-L1 ifadesini arttırması ile çalışmalar özellikle kombine tedavilere yönelmiştir

(Morisada ve ark., 2017; Peng ve ark., 2015). Hatta klinikte, PD-L1 ifadesi gösteren ileri evre TNBC hastaları için PD-1 antikoru pembrolizumab ve kemoterapi kombinasyonu standart tedavi şemalarında yerini almıştır (Cortes ve ark., 2020). Meme kanseri alt tiplerinde en yüksek CTLA-4 ifadesi gösteren alt tip, TNBC'dir (Peng ve ark., 2020). Fare modelinde yapılan bir çalışmada, musin 1 (MUC1) mRNA aşısı ve CTLA-4 antikorunun kombine kullanımının, CTLA-4 antikoru ile monoterapiye göre tümör mikroçevresinde CD8⁺ T hücrelerin sayısını arttırdığı ve tümör hücrelerinin apoptozunu indüklediği rapor edilmiştir (Lin ve ark., 2022). TNBC hastalarında henüz onaylı bir CTLA-4 antikoru olmamakla beraber, pre-klinik ve klinik çalışmalar devam etmektedir. TNBC hastalarının tümörlerinde T hücre infiltrasyonu iyi prognoz ile ilişkili olduğundan adaptif hücre tedavileri (ACT), TNBC için yeni bir tedavi opsiyonu sunar. Bu alanda özellikle T hücrelerin TCR'lerinin genetik olarak modifiye edilmesi ile oluşturulan kimerik antijen reseptörleri taşıyan T hücre (CAR-T) tedavilerinde, tümör hücreleri yüzeyinde aşırı ifade edilen proteinlerin antijenik hedef olarak T hücrelere yüklenmesi esas amacı oluşturur. TNBC özelinde yapılan çalışmalarda, EGFR, AXL, MUC1, c-Met, ROR1, TROP2 gibi moleküller, antijenik hedefler olarak kullanılmaktadır (Dees ve ark., 2020). CAR-T tedavi yaklaşımları klinik çalışmalara girmiş olmakla beraber henüz onay alan bir ilaç bulunmamaktadır (ClinicalTrials.gov, Erişim Tarihi: 29.11.2022). Meme kanserinde aşı çalışmaları ile kanser hücrelerinin antijenik yapıları hedeflenerek CTL ve NK hücreleri aracılığıyla tümöre özgü immün yanıtın artırılması amaçlanır. Bu amaçla peptitler, karbonhidratlar, DNA ve RNA molekülleri ve dendritik hücreler aşı çalışmalarında kullanılmaktadır (Burke ve ark., 2019). DNA ve peptit kanser aşılarının kombine olarak kullanıldığı bir in vivo çalışmada, fare meme tümörüne karşı humoral ve hücrel immün yanıtın aktive edildiği ve tümör büyümesini büyük ölçüde önlediği belirtilmiştir (Safavi ve ark., 2020). Yapılan kısıtlı çalışmalar umut vaat etse de aşı tedavileri için uygulama zamanı, sıklığı ve kombinasyon tedavi stratejileri gibi çözülmesi gereken sorunlar bulunmaktadır.

1.3. mikroRNA (miRNA)

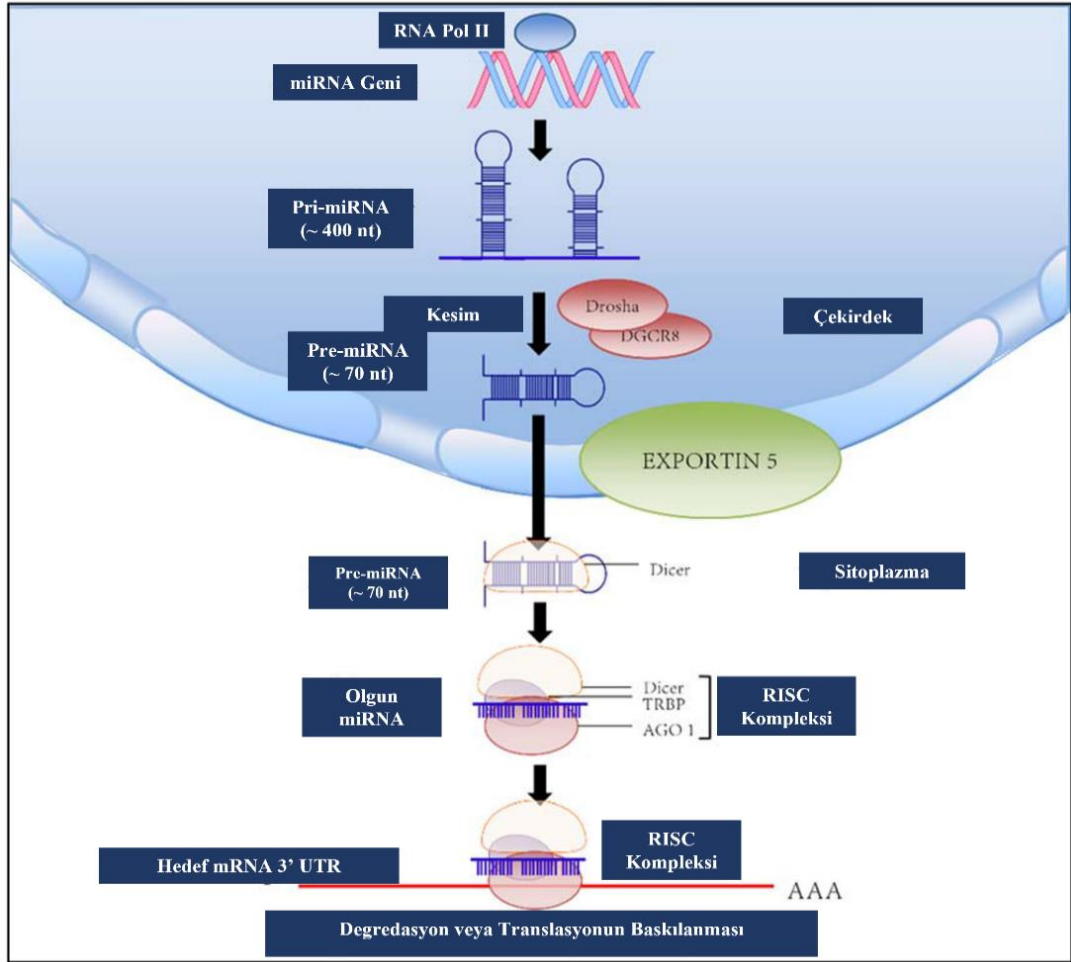
Kodlanmayan kısa RNA molekülleri olan miRNA'lar, 19-24 nükleotid uzunluğunda protein kodlamayan regülatör moleküllerdir ve regülatör rollerini post-transkripsiyonel düzeyde hedef mRNA degradasyonu veya translasyonun baskılanması şeklinde gösterirler (Rani ve Sengar, 2022).

1.3.1. miRNA Biyogenezi

miRNA'lar, genomun protein kodlayan gen bölgeleri içerisindeki intronlar ve translasyona uğramayan bölgelerinden (UTR) ya da kendi gen bölgelerinden transkribe edilirler (Olena ve Patton, 2010).

miRNA sentezinin ilk aşaması genomik DNA'dan RNA polimeraz II tarafından transkribe edilen pri-miRNA olarak adlandırılan kök döngü (stem-loop) yapılarına sahip uzun transkriptlerin oluşturulmasıdır (Şekil 1.6.). Daha sonra pri-miRNA, çekirdekte endonükleaz Drosha ve kofaktör DGCR8 tarafından yaklaşık 70 nükleotid uzunlukluğunda öncü miRNA'ya (pre-miRNA) işlenir. DGCR8, pri-miRNA'da N6-metiladenilat GGAC dizisini tanıırken, Drosha, pri-miRNA'nın karakteristik saç tokası (hairpin) yapısının tabanındaki pri-miRNA dupleksini ayırır. Oluşan pre-miRNA, exportin 5 ve Ran-GTPase kompleksi tarafından çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada başka bir nükleaz olan Dicer tarafından saç tokası yapısının uzaklaştırılması ile 19-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA yapısı meydana gelir. Bu işlem aynı zamanda RNA tarafından uyarılan susturma kompleksinin (RNA-induced silencing kompleks; RISC) oluşumunu da tetikler. Çift zincir miRNA yapısından sadece bir zincirin RISC yapısına katılmasını sağlayan kompleks içerisindeki Argonaute 2 (Ago2) RNaz enzimidir (Ha ve Kim, 2014). Hangi dizinin RISC yapısına katılacağı, dubleksin pürin ve pirimidin bileşenlerinden kaynaklı termodinamik özelliklerine bağlıdır (S. Miller ve ark., 2008). Ago2 tarafından iki miRNA zincirinden biri, RISC yapısına seçilerek rehber iplik (miR) olarak işlev görür. Yolcu iplik (passanger) ya da miR* olarak adlandırılan diğer iplik ise RISC yapısı

tarafından dekode edilir (Meijer ve ark., 2014). Rehber iplik, pre-miRNA saç tokasını 5'-ucundan kaynaklanıyorsa miRNA-5p, 3'-ucundan kaynaklanıyorsa miRNA-3p olarak adlandırılır ve bu iki olgun miRNA zinciri farklı dizileri hedefler (Annese ve ark., 2020).



Şekil 1.6. miRNA biyogenezi (Pisarello ve ark., 2015)

miRNA'ların esas sentez yolu, Drosha/DGCR8 ve Dicer proteinlerinin yer aldığı kanonik yolak olsa Drosha/DGCR8-bağımsız ve Dicer-bağımsız olarak kanonik olmayan yollar da tanımlanmıştır. Drosha/DGCR8-bağımsız yolakta, mRNA kırılması sırasında intronlardan üretilen mirtronlar ve 7-metilguanozin (m7G) başlıklı pre-miRNA'lar, Drosha aktivitesine gerek duymadan direkt Dicer substratları olarak işlev görürler (Ruby ve ark., 2007; Xie ve ark., 2013). Dicer-bağımsız yolakta ise, Drosha/DGCR8 tarafından endojen kısa saç tokası RNA (shRNA) transkriptlerinden

üretirler. Bu pre-miRNA'lar, Dicer substratları olmak için yeterli uzunlukta olmadıklarından sitoplazma içinde olgunlaşmalarını tamamlamak için AGO2 tarafından olgun miRNA formatına getirilirler (Cheloufi ve ark., 2010).

1.3.2. miRNA'ların Etki Mekanizmaları

Çoğu çalışma miRNA'ların negatif regülatörler olarak işlev gösterdiklerini ortaya koymuştur. miRNA'lar, hedef mRNA'nın 3' UTR'sinde bulunan hedef dizisine bağlanarak translasyonel baskılamayı veya mRNA'yı degradasyondan koruyan poliadenil kuyruğunun ve 5' başlığın uzaklaştırılmasını indükleyerek işlev gösterirler (Ipsaro ve Joshua-Tor, 2015). Aynı zamanda, hedef mRNA'nın 5' UTR ve kodlama dizisi dahil olmak üzere diğer bölgelerinde ve promotör bölgelerin içinde de miRNA bağlanma dizileri olduğu tespit edilmiştir (Xu ve ark., 2014).

Rehber iplik ve AGO'dan oluşan miRISC kompleksi, hedef mRNA üzerindeki miRNA yanıt elemanları (MRE) aracılığıyla hedef özgünlüğünü sağlar. MRE ve miRNA dizisinin tamamlayıcılık derecesi, hedef mRNA'nın AGO2 aracılı degradasyonu veya miRISC aracılı translasyonel baskılama olup olmayacağını belirler. miRNA ve MRE dizisi tamamen bağlanması, AGO2 endonükleaz aktivitesini indükler ve hedef mRNA degrade edilir (Chi ve ark., 2009; Jo ve ark., 2015). Hayvan hücrelerinde miRNA:MRE bağlantısı çoğu zaman tam olarak tamamlayıcı değildir. RISC kompleksinde bulunan miRNA dizisinin 5' bulunan 2-8 nükleotid uzunluğunda kök bölgesinin (seed region) hedef mRNA dizisine bağlanması, mRNA üzerindeki ribozomların uzaklaşmasına ve protein sentezinin aksamasına neden olarak translasyonel baskılamaya neden olur (Wilczynska ve Bushell, 2015).

1.3.3. Meme Kanserinde miRNA'ların Rolü

miRNA'lar, gen regülasyonunda önemli bir rol oynayan ve hemen hemen tüm önemli hücresel fizyolojik süreçte yer alan regülatör moleküllerdir. Bu hücresel süreçlerde meydana gelen patolojik gen ifade değişimleri kanserin başlıca sebeplerini

oluşturur. Protein kodlayan genlerdeki ifade değişimleri, kodlanmayan RNA moleküllerinin de ifade düzeylerinde değişimler olabileceğine ve hatta gen ifade değişimlerinin miRNA'lerden da kaynaklı olabileceğini düşündürmüştür. Sonuçta birçok çalışma ile neredeyse bütün kanser tiplerinde onkogen ve tümör baskılayıcı gen olarak davranan miRNA sınıfları olduğu gösterilmiştir (Menon ve ark., 2022). miRNA'ların çalışma prensiplerine göre (onkomiR veya tümör baskılayıcı miRNA), kanserin teşhisi ve prognozu için biyobelirteç ve hatta ilaç hedefi olarak kullanılma potansiyelleri, kanser alanında çok çalışılan bir alan olmasına sebep olmuştur.

Meme kanserinde, miRNA'ların önemi sadece hastalığın ilerlemesinde değil, aynı zamanda hastalığı klinik ve moleküler olarak tanımlayan spesifik meme alt tiplerinde de belirtilmiştir. Luminal A alt tipte, 67 miRNA'nın, Luminal B alt tipte ise 657 miRNA'nın regülasyonunun bozulduğu gösterilmiştir. Özellikle onkogenik miR-1290, Ki67 düşük Luminal A alt tipte anlamlı derecede azalma bulunmuştur (Endo ve ark., 2013). 29 erken evre meme kanseri hastalarında yapılan bir miRNA çalışmasında ise HER2+ alt tipinin, miR-302c, miR-520d, miR-181c, miR-376b ve miR-30e gibi bir dizi miRNA ile ilişkili olduğunu ortaya konmuştur (Lowery ve ark., 2009). Başka bir çalışmada, miR-4728-3p'nin, HER2 geni içerisinde bulunan bir introndan kodlandığı ve ifadesinin HER2+ meme kanserleri ile ilişkisi olduğu belirtilmiştir (Persson ve ark., 2011). TNBC alt tipinde de profileme çalışmaları yapılmış olup, bir meta-analiz çalışmasında, miR-155 ve miR-21 ifadesinin azalmasının sağkalımı kötü yönde etkilediği vurgulanmıştır (Lü ve ark., 2017). Başka bir çalışmada, miR-155, miR-493, miR-30e, miR-27a ifade düzeylerinin TNBC alt tiplerinde teşhis araçları olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Gasparini ve ark., 2014).

Yapılan çalışmalar, spesifik miRNA veya miRNA kümelerinin, prediktif belirteçlerden ve potansiyel tedavi hedeflerinden yoksun üçlü negatif meme kanserinin, klinik fayda sağlayabileceğini göstermiştir. Bir çalışmada, miR-205'in bir tümör baskılayıcı miRNA olduğu ve TNBC'de ifadesinin azaldığı bulunmuştur. miR-205'in ifade düşüklüğü hedefi olan integrin $\alpha 5$ ifadesinin artmasına neden olarak kanserin kök hücre özelliği ve metastazına katkı sağlamaktadır (Xiao ve ark, 2018). miR-200c/miR-141, TNBC'de metilasyon yoluyla baskılanır ve ifade düşüklüğü,

epitelyal mezenkimal geçişte (EMT) rol oynayan E-kadherini baskılayan ZEB1 ifadesi ile ilişkilendirilmiştir ve ZEB1 ifadesindeki artış TNBC’de kötü prognoz ile bağlantılıdır (Damiano ve ark., 2017). Başka bir çalışmada, miR-31’in TNBC’de hipermetile olduğu ve hedefleri RhoA ve WAVE3’n ifade artışı ile invazyon ve metastaz süreçlerine katkı sağladığı belirtilmiştir (Luo ve ark., 2016). Bir başka çalışmada, miR-210-3p’nin TNBC’de HIF1 α ve P53 gibi aerobik glikoliz sürecinde rol alan genleri regüle ederek Warburg etkisine katkıda bulunduğu ortaya konmuştur (Du ve ark., 2020). miR-210 ifadesi ile ilgili başka bir çalışmada, TNBC hasta örneklerinde tümör mikroçevresinde bulunan immünoglobulin üreten plazma hücrelerinde, miR-210 ifadesinin artış gösterdiği bulunmuştur (Bar ve ark., 2020). In vitro bir çalışmada ise miR-770-5p’nin DNMT3A’yı hedefleyerek TNBC hücrelerinde EMT ve invazyonu regüle ettiği gösterilmiştir (Noyan ve ark., 2021). Kemoterapiye direnç, TNBC hastalarında terapötik başarısızlığın ana nedenlerinden biridir. miR-105/93-3p’nin SFRP1’i hedefleyerek Wnt/ β -katenin yolağının bir aktivatörü olduğu ve TNBC hücrelerinde kemoterapi direncinin artmasına yol açtığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2017). Yüksek miR-449 ifadesinin, TNBC hücrelerini doksorubisine duyarlı hale getirdiği ve kemoterapi alan TNBC’li hastalarda iyi prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Tormo ve ark., 2019). TNBC ve miRNA çalışmaları, genel olarak kanser hücrelerinin proliferasyon, apoptoz, invazyon, metastaz ve ilaç direnci gibi süreçlerinde araştırılmış olup, immün sistem hücreleri açısından çalışmalar oldukça kısıtlıdır.

Klinik açıdan bakıldığında meme kanserinde onaylı bir biyobelirteç veya ilaç hedefi miRNA bulunmamakla beraber klinik çalışmaların hepsi, miRNA’ları tedavi cevabı ve ilaç direncinde, özellikle sıvı biyopsi örneklerinde biyobelirteç olarak incelemektedir (ClinicalTrials.gov Erişim Tarihi: 30.11.2022). Bununla birlikte miRNA’lar, tedavi ajanları olarak da işlev gösterebilirler. Özellikle kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi ile kombine kullanımları hem tedavi etkinliğinin arttırılmasında hem de ilaç direncinin önlenmesinde fayda sağlayabilir. Artan alışmalar ve gelişen ilaç taşıma sistemleri ile yakın bir tarihte miRNA’ların terapötik ajanlar olarak klinikte yerini alması beklenmektedir.

1.3.4. Adaptif İmmün Sistemde miRNA'ların Rolü

İmmün sistemin her aşamasında rol alan miRNA'lar, doğal ve adaptif immün sistemin gelişimi ve işlevini kontrol eden birçok sinyal yolağını geniş ölçüde etkileme potansiyeline sahiptirler.

miRNA aracılı gen regülasyonunun T hücre bağışıklığında önemi, ilk olarak olgun miRNA'ların oluşumu için gerekli olan Dicer molekülünün, T hücrelerde seçici olarak silindiği çalışmalarla ortaya konmuştur. Timusta T hücre progenitörlerinde Dicer ablasyonu sonucunda Treg hücre farklılaşmasının azaldığı bulunmuştur (Cobb ve ark., 2006). Dicer yokluğunda, timüs T hücre progenitörlerinde konvansiyonel T hücrelerin gelişiminin önemli bir değişikliğe sebep olmadığı ancak periferde Dicer eksikliği olan konvansiyonel T hücrelerinin, yardımcı T hücre soylarına farklılaşmadığı ve anormal efektör fonksiyonlar sergilediği rapor edilmiştir (Cobb ve ark., 2005; Muljo ve ark., 2005). T hücre gelişim süreçlerinin ilk aşamasında, pro-apoptotik faktörleri hedefleyen miR-17-92'nin yüksek ekspresyona sahip olduğu, ancak olgunlaşma sırasında ifadesinin azaldığı ve böylece T hücre gelişimi sırasında hücrelerin hayatta kalma süreçlerini regüle ettiği belirtilmiştir (O'Connell ve ark., 2010). Başka bir çalışmada, T lenfositlerin timüsta gelişim süreçlerinde miR-181a'nın çift pozitif (CD4+, CD8+) hücre antijen duyarlılığını arttırdığı, Bcl-2, CD69 ifadesini baskıladığı ve böylece T hücrelerin pozitif klon seçiminde etkin olduğu bildirilmiştir (Neilson ve ark., 2007). miR-150 ise T hücre progenitörlerinde düşük ifade olurken, farklılaşmış T hücrelerde ifadesi artar (Baltimore ve ark., 2008). CD8+ tek pozitif hücre farklılaşmasında herhangi bir miRNA'nın fonksiyonu henüz ortaya konmamışken, CD4+ tek pozitif klon seçiminde miR-126'nın süreçte etkin olduğu bildirilmiştir (Hu ve ark., 2018). Ayrıca, miR-146a, miR-223 ve miR-205'in de T hücre gelişiminde rol aldığı çalışmalar ile ortaya konmuştur (Emamgolizadeh-Gurt-Tapeh ve ark., 2020).

Olgun ve saf T hücrelerin aktivasyonu, proliferasyon, efektör fonksiyon, immün hafıza oluşumu ve hücre ölümü ile sonuçlanan bir dizi hücre içi sinyal yolağını başlatır. Bu sinyal yolağı süreçlerinde değişen gen ifade profilleri, sadece transkripsiyonel

olarak değil aynı zamanda miRNA'ların da rol aldığı post-transkripsiyonel regülasyonlar olarak da meydana geldiği çalışmalar ile ortaya konmuştur. CD3+ T lenfositlerin CD3 antikorları ile in vitro olarak stimule edildiği bir çalışmada miR-155, miR-21, miR-146a, miR-17, miR-590-5p, miR-210, miR-106b ve miR-301a miRNA'larının ifadelerinin arttığı belirtilmiştir (Sousa ve ark., 2017). Ayrıca TCR stimülasyonu sonucunda, aktivasyonun erken aşamalarında MEK1 ve ERK1'i hedefleyen miR-15a/16 ifadesinin düşerek T hücre proliferasyonuna katkı sağladığı bulunmuştur (Urena ve ark., 2022).

Spesifik olarak CD4+ T hücrelerde Dicer ifadesi bloklanan farelerde, azalmış proliferasyon ve yüksek apoptoz seviyeleri tespit edilmiştir (Muljo ve ark., 2005). İnsan primer CD4+ T hücre kültüründe yeni nesil dizileme ile yapılan bir çalışmada, aktivasyondan sonra miRNA repertuvarının değiştiği rapor edilmiştir (Rodríguez-Galán ve ark., 2021). TCR ve CD28 ko-stimülatör aracılı T hücre aktivasyonu sonucunda miR-214'ün ifadesi büyük ölçüde arttığı ve hedefi olan PTEN ifadesini baskılayarak T hücrelerin proliferasyonlarını desteklediği bilinmektedir (Jindra ve ark., 2010). Aktive CD4+ yardımcı T hücrelerde miR-182 ifadesi yüksektir ve Foxo1 hedef genini inhibe ederek protein sentezini baskılar ve CD4+ T hücrelerin proliferasyonlarını artırır (Stittrich ve ark., 2010). Aktive CD4+ T hücrelerde, miR-155 ve miR-221'in yüksek ifadesinin ise PIK3R1'i hedefleyerek ifadesi baskıladığı ve hücre proliferasyonu ve sitokin üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Grigoryev ve ark., 2011). miR-126'nın PI3K/AKT yolağı ile CD4+ Foxp3+ regülatör T hücrelerinin indüksiyonu ve fonksiyonunu regüle ettiği ortaya konmuştur (Qin ve ark., 2013).

CD8+ T hücre aktivasyonunda miRNA'nın rolü, CD4+ T hücrelerine göre daha az karakterize edilmiş olup viral ajan ile aktive edilmiş CD8+ T hücrelerde yapılan bir çalışmada miRNA biyogenezinde önemli olan Dicer molekülünün, aktivasyonun erken aşamalarında gerekli olmadığı ancak hücrelerin hayatta kalmasında ve efektör yanıtta gerekli olduğu bildirilmiştir (Zhang ve Bevan, 2010). Bir çalışmada, negatif feedback olarak immün baskılayıcı rol oynayan miR-146a eksikliğinin, aktive CD8+ T hücrelerde proliferasyonu, CD25 ve CD69 aktivasyon belirteçleri ve IL-2, IFN- γ gibi efektör sitokinlerin ifadesini arttırdığı gösterilmiştir (Yang ve ark., 2012). Erken

ve geç T hücre aktivasyon çalışmasında, CD8+ T hücrelere kıyasla CD4+ T hücrelerde miR-18a ve miR-21'nin ifadesi aktivasyon ile artış göstermiş, miR-223 ve miR-451 ifadeleri ise düşüş göstermiştir. Bu alışma sonucunda CD4 ve CD8 T lenfositler arasında antijen tanıma süreçlerinde farklılıklar olabileceği vurgulanmıştır (Teteloshvili ve ark., 2015). Antijene spesifik CD8+ T lenfositlerin saf, efektör ve merkezi hafıza alt tiplerinde miRNA profillerinin incelendiği bir çalışmada, saf hücrelere kıyasla efektör T hücrelerde miR-16, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-150, miR-15b ve let-7f'nin ifadesinin düşük olduğu ve hafıza T hücrelerde bu miRNA'larının ifadelerinin tekrar artış gösterdiği bulunmuştur (Wu ve ark., 2007). Başka bir çalışmada, let-7, CD8 T hücrelerin farklılaşma ve fonksiyonları için önemli bir negatif regülatör olarak tanımlanmıştır. TCR aracılı aktive CD8+ T hücrelerde let-7'nin mimic ile arttırılan ekspresyonu, Myc ve Eomes'i hedefleyerek efektör sitotoksik T lenfositlerin klonal genişlemesinde ve farklılaşmasında bozulmaya neden olarak anti-viral ve anti-tümör immün yanıtlarında azalmaya yol açmıştır (Wells ve ark., 2017). Efektör sitokin IFN-γ'yı doğrudan hedefleyen miR-29'un, bakteriyel enfeksiyon ajanı ile aktivasyonu sonrasında CD4+ ve CD8+ T hücrelerde ifadesi azalır (Ma ve ark., 2011). Periferde bulunan olgun CD8+ T hücrelerin farklılaşmasında PTEN'i hedefleyen miR-17-92 kümesi, miR-155 ve PDCD4' hedefleyen miR-21'in etkin rol oynadığı bildirilmiştir (Liang ve ark., 2015). CD8+ T hücrelerin enfeksiyon yanıtında miR-155, sitotoksikite ve efektör sitokin üretim süreçlerine katkı sağlar (Gracias ve ark., 2013; Lind ve ark., 2013). T hücre aktivasyonu sırasında kalsiyum-NFAT yolağı ile indüklenen miR-31'in, CD8+ T hücre yanıtında negatif regülatör olarak T hücrelerinin tip I interferonlara duyarlılığını arttırdığı ve PD-1 gibi birçok inhibe edici molekülün ifadesini artırarak kronik enfeksiyon sırasında T hcreci tükenmesini teşvik ettiği gösterilmiştir (Moffett ve ark., 2017).

1.3.5. Kanserde Adaptif İmmün Sistem Aracılı miRNA'ların Rolü

Hematolojik malignitelerde T ve B hücrelerdeki bozukluklarının bir sebebinin de miRNA'lardan kaynaklı olabileceği çalışmalarla gösterilmiştir (Han ve ark., 2020). Meme kanserinin de içinde bulunduğu solid tümörlerde, immün sistem hücrelerinde miRNA'ların fonksiyonları, genel olarak tümör mikroçevresinde bulunan immün

sistem bileşenlerinde incelenmiştir. Hepatit B virüsü (HBV) kaynaklı hepatoselüler karsinomada artan TGF- β sinyalinin, miR-34a ifadesini baskılayarak hedefi olan kemokin CCL22'nin ifadesinin artmasına ve Treg hücreleri üzerinde bulunan reseptörü CCR4'e bağlanarak mikroçevreye Treg hücrelerinin toplanmasına ve immün baskılayıcı bir ortam oluşturmaya katkı sağladığı bulunmuştur (Yang ve ark., 2012). Başka bir çalışmada, insan melanom hücrelerinde yüksek miR-30b/30d ifadesinin, hedefi GALNT7 ifadesini azaltarak immünoşüpresif IL-10 sitokininin artan üretimine yol açtığı gösterilmiştir (Gaziel-Sovran ve ark., 2011). Kolorektal kanserde yapılan bir araştırmada, calreticulin'i hedefleyen miR-27a'nın MHC-I aracılı antijen tanıtım sürecini bozarak tümör infiltrate CD8⁺ T hücrelerin aktivasyon ve sitotoksik aktivitelerini engellediği ve böylece tümör ilerlemesini desteklediği belirtilmiştir (Colangelo ve ark., 2016). Kolon kanserinde T hücrelerin inhibisyonundan sorumlu IDO1 genini hedefleyen miR-448'in baskılanması ile CD8⁺ T hücre yanıtının arttığı gösterilmiştir (Lou ve ark., 2019). Melanom hücresi kökenli eksozomlarda bulunan miR-181a/b, miR-498 ve miR-3187 gibi miRNA'ların TNF ve CD45 moleküllerini hedefleyerek CD8⁺ T hücre aktivasyonlarını kısıtladığı bulunmuştur (Vignard ve ark., 2020). miRNA'lar, immün kontrol noktası moleküllerini hedefleyerek kansere karşı immün yanıtın arttırılmasına katkı sağlayabilir. Glioblastoma fare modelinde yapılan bir çalışmada, CTLA-4'ü hedefleyen miR-138'in sistemik olarak verilmesinin tümör gerilemesine neden olduğu rapor edilmiştir (Wei ve ark., 2016). Ayrıca yassı hücreli oral karsinomda, miR-138'in CD8⁺ T hücrelerde ifade artışının anti-tümör etkisi bildirilmiştir (Li ve ark., 2019). Melanom fare modelinde çalışmada, miR-28'in, PD1, TIM3 ve BTLA gibi immün kontrol noktası molekülleri hedefleyerek T hücre tükenme profilini düzenlediği ve tükenmiş T hücreleri tarafından IL-2 ve TNF- α sitokinlerinin bozulmuş sekresyonunu yeniden kazandırdığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2016). Üçlü negatif meme kanseri fare modelinde miR-149-3p'nin, direkt olarak PD-1'i hedefleyerek CD8⁺ T hücre aktivasyonunu regüle ettiği bulunmuştur (Zhang ve ark., 2019). Biyoinformatik olarak yapılan bir çalışmada, PD-L1'i hedefleyen miR-195/miR-497 ifade artışının, TNBC hastalarında tümör progresyonu ve immün tolerans için biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Yang ve ark., 2018). Erken ve metastatik meme kanseri hastaların plazma örneklerinden yapılan bir çalışmada, miR-10b, miR-19a, miR-20a, miR-126 ve miR-155'in erken meme kanseri

hastalarına göre metastatik hastalarda ifade profillerinin değiştiği ve prognostik değeri olduğu rapor edilmiştir (Thomopoulou ve ark., 2021). Fare modeli çalışmasında, SOCS1'i hedefleyen miR-155'in meme kanseri hücrelerinde aşırı ifadesinin, CXCL9-10-11 üretimini uyararak, tümör bölgesine T hücre girişini arttırdığı, tümör büyümesini inhibe ettiği ve immün kontrol noktası tedavisine duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2022).

Bu doktora tez çalışması ile meme kanseri alt tipleri içerisinde en agresif ve kötü prognoz sergileyen ve kısıtlı tedavi seçeneği bulunan l negatif meme kanseri fare modelinde, tümör gelişim, remisyon ve relaps süreçlerinde adaptif immün sistemin tümöre karşı en etkin hücre grubu olan CD8+ T lenfositlerdeki miRNom profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Tümör gelişiminin farklı evrelerindeki CD8+ T hücre aracılı immün yanıtta rol oynayan miRNA'ların ortaya konması ve meme kanseri immnolojisinde yeni prognostik biyobelirteçlerin açığa çıkarılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

4T1 Fare TNBC Hücre Hattı	ATCC, CRL-2539
6-8 Haftalık Yabani Tip Balb/c Fare	Ankara Üniversitesi
70 µm Cell Strainer	Corning, 431751
40 µm Cell Strainer	Corning, 431750
LS Kolon	MACS Miltenyi Biotec, 130-042-401

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Reaktifler ve Kimyasallar

RPMI-1640 Besiyeri	Hyclone, SH30027.01
Fetal Bovine Serum	Hyclone, SH30071.03
Penicillin/Streptomycin	Hyclone, SV30010
L-Glutamin	Biowest, X0550-100
Trypsin	Hyclone, SH30042.01
1X PBS	Hyclone, SH30256.01
DMSO	Serva, 39757.01
Matrigel Basement Membrane Matrix	Corning, 354234
Formaldehit	Sigma-Aldrich, 104003
Hematoxylin	Agilent, CS700
Eosin	Agilent, CS701
EDTA	Sigma, E9884
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, A2058
Trizol	Ambion, 15596018
Chloroform	Sigma, C2432
Isopropanol	Sigma, I9516
Ethanol	Merck, 1.00983.2511

Borik Asit	Sigma, 0588-1KG
Tris	Serva, 37190.02
Agaroz	Lonza, 50004
Red Safe Stain	Intron, 21141
6X Gel Loading Dye	New England Biolabs, B7021S
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific, SM0321
Molecular Biology Grade Water	Biological Industries, 01-869-1A
dNTP Mix	Thermo Scientific, R0192
Sodyum Klorür	Merck, 7647-14-5
HEPES	Millipore, 391340
Kalsiyum Klorür	Merck Millipore, 102378
Propidium Iodide Solution	Biolegend, 421301

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Antikorlar

Fare CD8a MicroBeads	MACS Miltenyi Biotec, 130-117-044
APC Anti-Mouse CD3	Tonbo Biosciences, 20-0032
FITC Anti-Mouse CD45	Tonbo Biosciences, 35-0451
PE Anti-Mouse CD4	Tonbo Biosciences, 50-0041
PE-Cy5 Anti-Mouse CD8a	Tonbo Biosciences, 55-0081
FITC Annexin V	Biolegend, 640906

2.1.4. Çalışmada Kullanılan Kitler

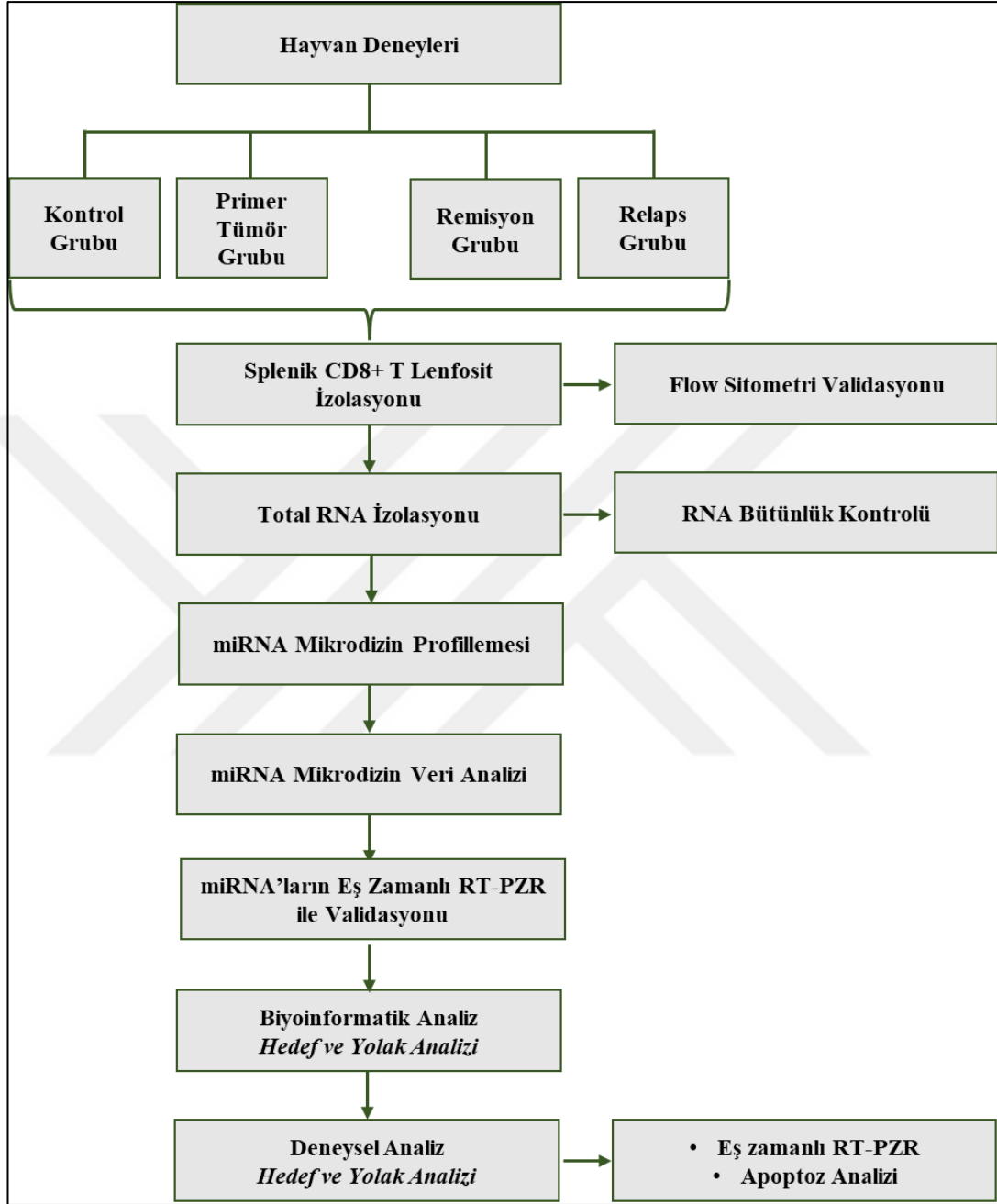
RNA Labeling Kit	Applied Biosystem, P/N 901910
Hybridization Control Kit	Applied Biosystem, P/N 900454
Hybridization, Wash, and Stain Kit	Applied Biosystem, P/N 900720
GeneChip miRNA 4.0 Array	Applied Biosystem, 902412
miScript II RT Kit	Qiagen, 218161
Transcriptor HF cDNA Synthesis Kit	Roche, 05081963001
Taq DNA Polimeraz	Gene Direx, MB101-0500

miScript SYBR Green PCR Kit	Qiagen, 218073
FastStart DNA Green Master Kit	Roche, 06402712001

2.1.5. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

CD8+ T hücreler, manyetik hücre ayırma platformu (MACS Miltenyi Biotec, 130-042-303) ile Midi Separator (MACS Miltenyi Biotec, 130-042-302) kullanılarak izole edilmiştir. RNA konsantrasyon ve saflık tayinleri Nanodrop (Thermo Scientific, ND-1000) spektrofotometre cihazı ile yapılmıştır. Mikrodizin çiplerinin hibridizasyonu GeneChip® Hybridization Oven 640 (Affymetrix, 800139) fırınında gerçekleştirilmiştir. Mikrodizin çiplerinin yıkama ve boyama aşamaları GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix, 00-0079) yıkama istasyonunda gerçekleştirilmiştir. Mikrodizin çiplerinin tarama işlemi GeneChip® Scanner 3000 (Affymetrix, 00-0073) ile gerçekleştirilmiştir. İfade analizleri için LightCycler 480 Thermocycler (Roche, 05015243001) cihazı kullanılmıştır. CD8+ T hücre izolasyonunun doğrulaması ve apoptoz deneyi NovoCyte 2000R Flow Cytometer System (Agilent, 2010002AA) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

2.2. Yöntem



Şekil 2. 1. Çalışmanın genel iş akış şeması

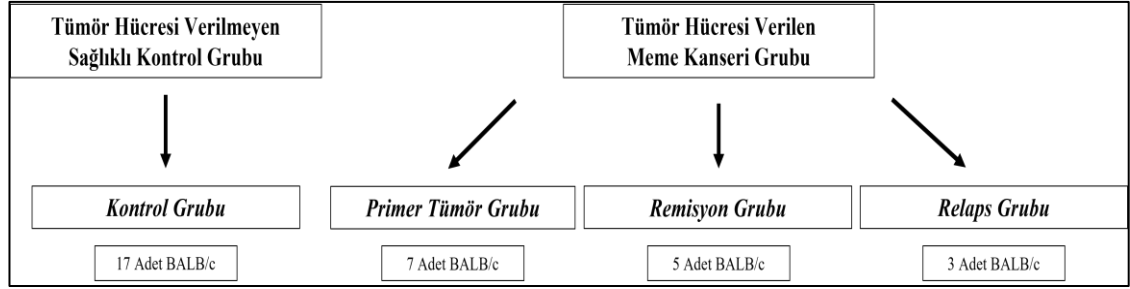
Çalışmada izlenen yöntemsel süreçler, Şekil 2.1.'de sunulan iş akış şemasında yer almaktadır.

2.2.1. 4T1 Hücre Kültürü

4T1 fare üçlü negatif meme kanseri hücre hattı, 75 cm²'lik T-75 flasklarda %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren RPMI-1640 besiyeri içerisinde 37°C ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan inkübatörde kültüre edilmiştir. Flasklardaki hücre yoğunluğu %80'e ulaştığında tripsin enzimi ile hücreler kaldırılarak pasajlanmış ve hayvan deneyleri için gerekli miktarlarda çoğaltılmıştır. Enjeksiyon için kullanılan 4T1 hücrelerin pasaj numaraları 10 – 12 arasındadır. Stok olarak saklanacak hücreler, %10 DMSO içeren FBS solüsyonunda kriyotüpler içerisinde sıvı nitrojen tankında muhafaza edilmiştir.

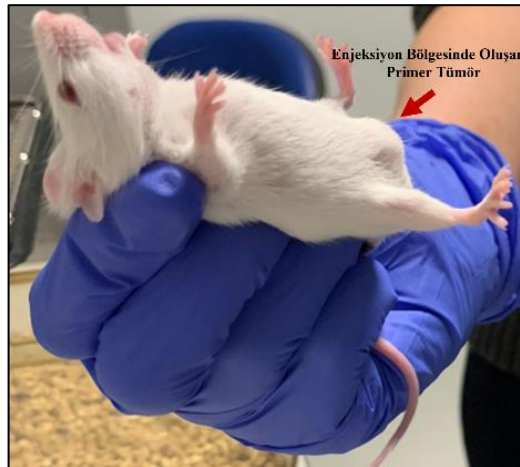
2.2.2. *In Vivo* Deneyler

Üçlü negatif meme tümörü oluşum ve gelişim süreçlerindeki immün sistem değişimlerini incelemek amacıyla 6-8 haftalık dişi immün-kompetan BALB/c farelerde, 4T1 hücreleri ile allograft meme kanser modeli oluşturulmuştur. BALB/c farelerde 4T1 hücrelerinin tümör oluşum ve gelişim aşamaları insan meme kanserini taklit ederek hayvan modeli sağlamaktadır. BALB/c farelerde 4T1 hücreleri ile primer tümör gelişiminin iki fazlı olduğu rapor edilmiştir (Tao ve ark., 2008). Primer tümör oluşumunun gerçekleştiği ilk faz, 2 hafta içerisinde gözlenmektedir. 3. ve 4. haftalarda gerçekleşen regresyon fazı, nekrozun artışı ve lenfosit infiltrasyonu dolayısıyla doğal ve adaptif immün cevap ile ilişkilendirilmiştir. 5. ve 6. haftadan itibaren ikinci büyüme fazına girilerek primer tümörün tekrar büyüme gösterdiği ve hatta akciğer, karaciğer, lenf düğümleri ve beyinde metastatik odakların geliştiği belirtilmiştir. Bu bilgilerden yola çıkarak meme kanseri immünitesini incelemek amacıyla geliştirdiğimiz hayvan modelinde kontrol (K), primer tümör (PT), remisyon (REM) ve relaps (REL) olarak 4 grup bulunmaktadır. Mikrodizin deneylerinde kontrol grubu için toplam 10, primer tümör, remisyon ve relaps grupları için toplam 9 , validasyon çalışmaları için 13 adet Balb/c fare kullanılmıştır (Şekil 2.2.).



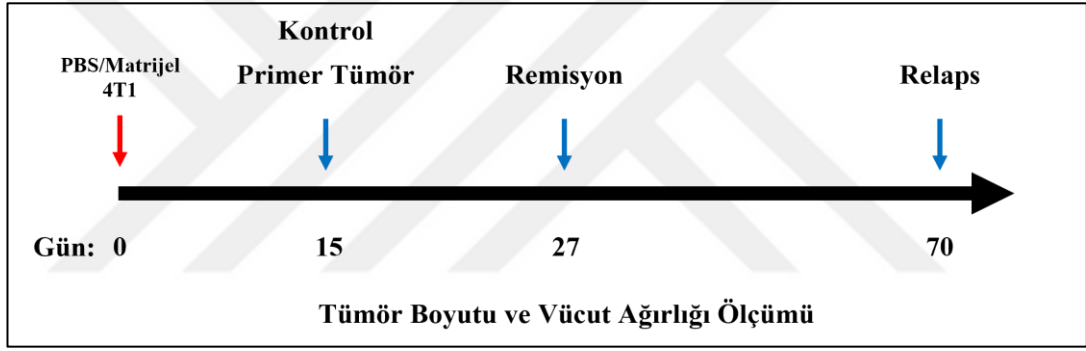
Şekil 2. 2. *In vivo* deney grupları ve kullanılan hayvan sayısı

Kontrol grubu, sadece PBS/matrijel enjeksiyonu yapılan sağlıklı grubu temsil ederken, 4T1 enjekte edilmiş ve 2 hafta içerisinde tümör geliştirmiş fareler, primer tümör grubunu oluşturmaktadır. Remisyon grubu, primer tümörü oluşan ve 4 hafta içerisinde primer tümörü kaybolan gruptur. Meme kanseri hücrelerinin farelere enjeksiyonundan sonra 2 hafta içerisinde primer tümörü oluşmuş, takip eden 2 hafta içerisinde kaybolmuş ve 1. aydan sonra tekrar primer tümörün ortaya çıktığı fareler, relaps grubunu oluşturmaktadır. Tümör hücresi verilecek fare grupları, 1×10^6 hücre/fare olacak şekilde 50 μ L PBS içerisinde 1:1 oranında matrigel ile karıştırılarak sağ abdominal meme bezinin inguinal uçundan subkutan olarak 26 G uçlu enjektör ile enjekte edilmiştir (Şekil 2.3.). Bu yöntemin invazif yöntem olan ortotopik enjeksiyona kıyasla ameliyat kaynaklı yan etkileri ortadan kaldırarak aynı oranda tümör geliştirme başarısı sağladığı bildirilmiştir (Tavera-Mendoza ve Brown, 2017). Ayrıca sadece PBS ile enjeksiyona göre tümör hücrelerine mikroçevre sağlayan matrigel ile enjeksiyonun, daha yüksek etki gösterdiği rapor edilmiştir (Katsuta ve ark., 2016).



Şekil 2. 3. Sağ abdominal meme bezi inguinal uçtan 4T1 TNBC hücrelerinin subkutan enjeksiyonu sonucu oluşan primer tümör taşıyan fare görseli

Fareler enjeksiyondan sonra sakrifiye edilene kadar kilo kaybı gibi genel sağlık kontrolleri için haftada en az iki kere kontrol edilmiş ve ağırlıkları ölçülmüştür. Tümör geliştiren farelerin tümör boyutları dijital kumbas ile haftada en az iki kere ölçülerek tümör hacimleri $V = (L.(W)^2) / 2$ formülü ile hesaplanmıştır. Çalışmaya minimum 100 mm³ primer tümör oluşturan fareler dahil edilmiştir. Her grup için Şekil 2.4.'te belirtilen sürelerde CO₂ inhalasyonu ile fareler sakrifiye edilerek sitotoksik T lenfositlerdeki değişimleri miRNA seviyesinde incelemek amacı ile sekonder lenfoid organ olan dalakları alınmış ve direkt CD8+ T hücre izolasyonu yapılmıştır. Aynı zamanda histopatolojik inceleme için tümör taşıyan farelerden tümör örnekleri %10 formaldehit solüsyonu içerisine alınarak oda sıcaklığında (25°C) muhafaza edilmiştir. Hayvan çalışmalarına ait etik kurul belgesi Ek-1'de yer almaktadır.



Şekil 2. 4. Deney gruplarının sonlandırılma süreleri

2.2.3. Tümör Dokularının Histopatolojik İncelemesi

Tümör dokularının patolojik incelemeleri Başkent Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. %10 formaldehit içerisinde muhafaza edilen PT ve REL gruplarından alınan tümör dokuları ve REM grubundan primer tümörün gelişim gösterdiği ve kaybolduğu bölgeye ait dokular, öncelikle formaldehitten uzaklaştırılmak için Whatman kağıdına alınmıştır. Tümör dokuları doku takip sistemi ile fiksasyon, dehidrasyon, şeffaflaştırma ve parafin infiltrasyonu işlemlerine tabi tutulmuştur. Bu işlemlerden sonra tümör dokuları parafin bloklara gömülmüştür. Parafin bloklardan mikrotom aracılığıyla 5 mikronluk kesitler alınarak lam üzerinde kurutulmuştur. Kesitte bulunan parafin, ksilen ile uzaklaştırıldıktan sonra

hematoksilen-eozin boyaması yapılmış ve ışık mikroskobu altında histopatolojik tanı için incelenmiştir.

2.2.4. Dalak Örneklerinden CD8+ T Lenfosit İzolasyonu

CD8+ T lenfosit izolasyonu, manyetik hücre ayırım sistemi ile pozitif seçim antikorlu fare CD8a microbead kullanılarak kit protokolüne göre uygulanmıştır. Her fare grubundan 1 mL soğuk PBS içerisine alınan fare dalakları, öncelikle 3 mL soğuk PBS içeren bir petri kabında enjektör pistonu ile parçalanarak 70 ve daha sonra 40 µm hücre filtresinden (cell strainer) geçirilmiş ve hücre süspansiyonu haline getirilmiştir. Hücre süspansiyonu, 400 g'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatantın uzaklaştırılmasını takiben hücre peleti, her grup için belirlenen hücre sayısı göre her 10^7 total hücre için 90 µL PBS Buffer (%0.5 BSA ve 2 mM EDTA içeren PBS) ile süspanse edilmiştir. Resüspanse edilen hücrelere her 10^7 total hücre için 10 µL CD8a microbeads antikorlu eklenerek karıştırılmış ve +4°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Manyetik platforma yerleştirilen LS kolon öncelikle 3 mL PBS Buffer ile aktive edildikten sonra hücre süspansiyonu LS kolona aktarılmıştır. Kolonda akış gösteren hücreler, bağlanma göstermeyen CD8- hücreler olup atılmıştır. Manyetik boncuklarla işaretli olan hücreler manyetik alan varlığında kolona bağlı kalmıştır. Spesifik olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak amacıyla LS kolon 3 mL PBS Buffer ile yıkanmıştır. Daha sonra LS kolon manyetik alandan çıkarılarak 15 mL tüpe yerleştirilmiştir. LS kolon içerisine 5 mL PBS Buffer eklendikten sonra kolonun enjektörü ile hızlı bir şekilde basınç uygulanarak CD8+ T hücreler toplanmıştır. Elde edilen CD8+ T hücre süspansiyonu, 400 g'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir ve supernatant uzaklaştırılmıştır. CD8+ T hücre pelet örnekleri sonraki deneyler için -80°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.5. CD8+ T Lenfosit İzolasyonunun Flow Sitometri ile Doğrulanması

İzole edilen CD8+ T hücrelerin saflığını belirlemek ve izolasyon aşamasının kontrolünü yapmak amacıyla 2.2.4'de bahsedildiği şekilde elde edilen kontrol ve

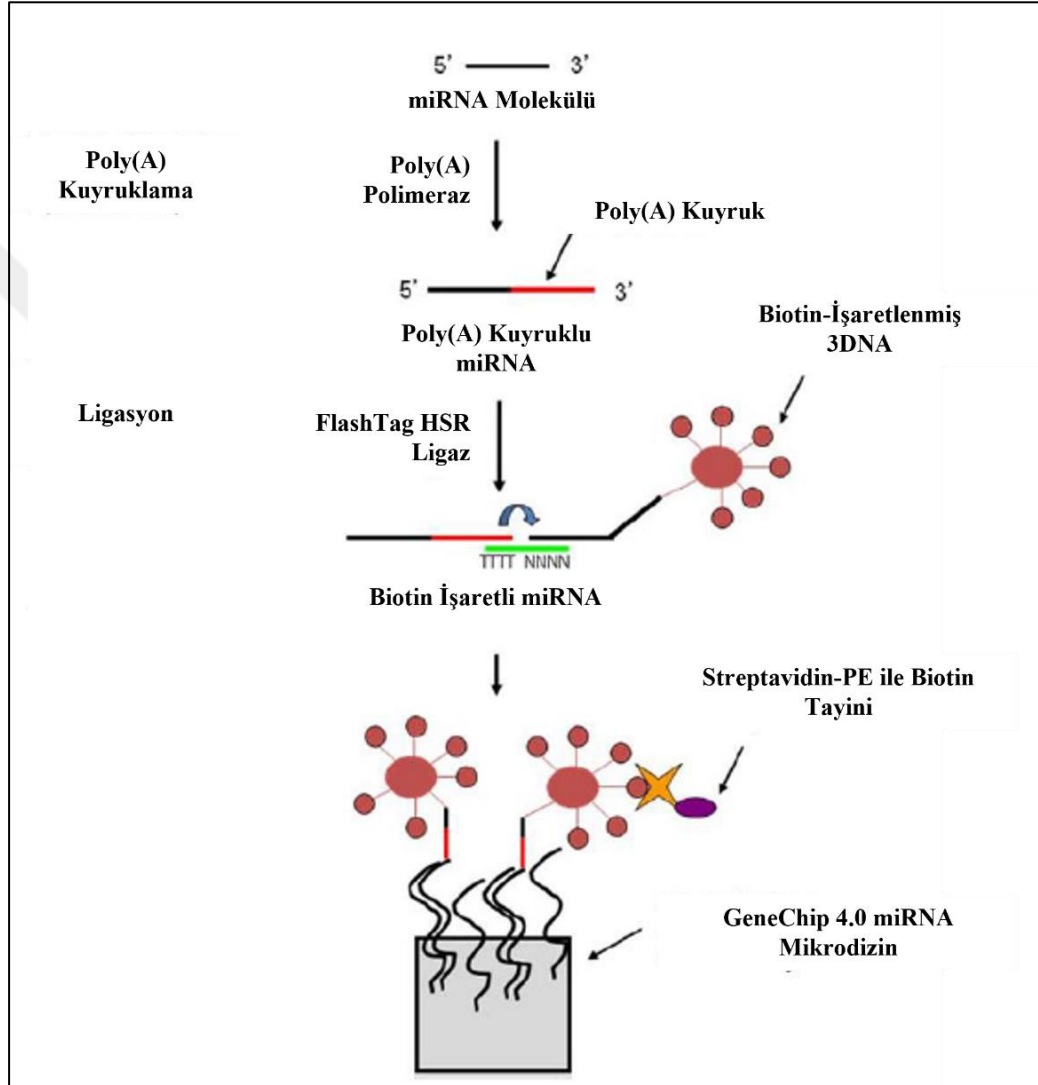
primer tümör grupları dalak örneklerinden elde edilen izolasyon öncesi total hücre peleti ve izolasyon sonrası CD8+ T hücre peleti, anti-CD45, anti-CD3, anti-CD4 ve anti-CD8 antikorlarını içeren antikor kokteyli (anti-CD3, anti-CD4 ve anti-CD8 için 0,2 mg/mL, anti-CD45 için 0,5 mg/mL içeren PBS Buffer) ile +4°C’de yarım saat inkübe edildikten sonra flow sitometri ile popülasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Deney üç biyolojik tekrar ile gerçekleştirilip izolasyon öncesi ve izolasyon sonrası CD8+ T hücre popülasyonu belirlenmiştir.

2.2.6. CD8+ T Lenfositlerden Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu Trizol yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. -80°C’de pelet halinde saklanan CD8+ T hücreler çözündürülerek 500 µL Trizol eklenmiş ve hücrelerin patlatılması için ince uçlu enjektörden geçirilerek 1,5 mL tüplere aktarılmıştır. Trizol içerisindeki phenolü uzaklaştırmak amacıyla, başlangıçta konulan Trizol hacminin 1/5 oranında kloroform eklenmiş ve tüpler iyice çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir. Tüpler 13.300 x RPM’de +4°C’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası total RNA’yı içeren üstteki berrak faz, yeni bir 1,5 mL tüpe aktararak suyu uzaklaştırmak için Trizol miktarının yarısı kadar izopropanol eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra tüpler 13.300 x RPM’de +4°C’de 15 dakika santrifüj edilmiş ve supernatantları uzaklaştırılmıştır. Trizol kaynaklı tuzları uzaklaştırmak ve yıkama işlemi için pelet üzerine Trizol miktarı kadar, taze hazırlanmış %70’lik ethanol eklenmiş ve 10.000 x RPM’de +4°C’de 5 dakika santrifüj edilerek supernatant aspire edilmiştir. Yıkama işlemi aynı şekilde bir kez daha tekrarlanmıştır. Pelet üzerine 20 µL nükleaz içermeyen su eklendikten sonra buz üzerine alınmıştır. Saflık ve konsantrasyon ölçümlerini takiben örnekler %1’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve görüntüleme sonrası RNA bütünlüğü açısından değerlendirilmiştir. RNA örnekleri -80°C’de muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılan örneklere ait RNA jel görüntüleri Ek-2’de yer almaktadır.

2.2.7. miRNA Mikrodizin Deneyi

Mikrodizin deneyleri her örnek için 500 ng total RNA örneği ile K, PT, REM ve REL grupları için her gruptan 3 biyolojik tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Mikrodizin deney süreci Şekil 2.5.'te belirtilen kit protokollerine göre uygulanmıştır.



Şekil 2. 5. Mikrodizin deneyinin genel şematik özeti (<https://www.thermofisher.com>)

2.2.7.1. Hedef miRNA Hazırlığı

Her RNA örneği için son hacim 8 µL olacak şekilde 500 ng total RNA örnekleri hazırlanmıştır. Daha sonra örnek tüplerine 2 µL RNA Spike Control Oligos

eklenmiştir. miRNA moleküllerinin PolyA kuyruğunun uzatılması amacıyla RNA örnekleri, Çizelge 2.1.'e göre hazırlanan 5 µL PolyA Tailing Master Mix ile muamale edilmiş ve 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra RNA örneklerini Biotin ile etiketlemek için 4 µL FlashTag Biotin HSR Ligation Mix ve 2 µL T4 DNA Ligase ile muamale ederek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her örnek tüpüne 2,5 µL HSR Stop Solution eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve buz üzerine alınmıştır.

Çizelge 2. 1. Poly(A) kuyruk karışımı

Reaktifler	Hacimler
ATP Karışımı (1:500 1 mM Tris ile dilue edilmiş)	1 µL
PAP Enzimi	1 µL
10X Reaksiyon Buffer	1,5 µL
25 mM MnCl ₂	1,5 µL
Toplam Hacim	5 µL

2.2.7.2. Hibridizasyon Aşaması

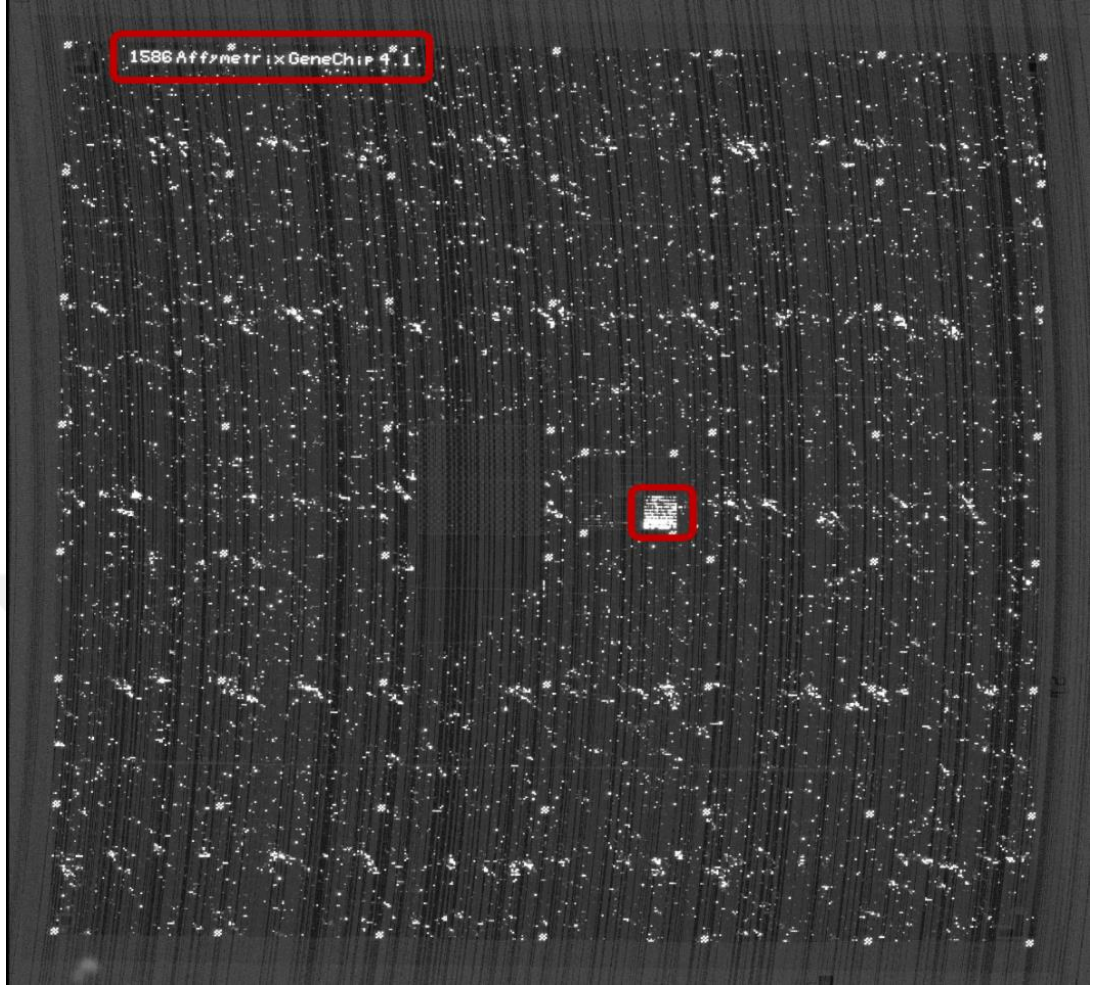
Öncelikle 20X Eukaryotic Hybridization Controls, her örnek için 6,6 µL olacak şekilde 65°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra Biotin ile etiketlenmiş 23,5 µL RNA örnekleri, miRNA problemleri içeren mikrodizinlerle hibridizasyon için Çizelge 2.2.'de belirtilen hacimlerde hazırlanan hibridizasyon karışımı ile muamale edilmiştir. Hibridizasyon kokteyli, 99°C'de 5 dakika ve 45°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Her örneğin hibridizasyon kokteylinden 130 µL çekilerek çip üzerinde bulunan septa deliklerinden birine her örnek bir çipe olacak şekilde yüklenmiştir. Örnek yüklemesinden sonra septalar kapatılarak çipler hibridizasyon fırınına yerleştirilmiştir. Hibridizasyon fırınında 48°C'de 60 RPM'de 17 saat inkübe edilmiştir.

Çizelge 2. 2. Hybridizasyon karışım komponentleri

Reaktifler	Hacimler
2X Hybridization Mix	66 µL
%27,5 Formamide	19,2 µL
DMSO	12,8 µL
20X Hybridization Controls	6,6 µL
Control Oligo B2, 3nM	2,2 µL
Nükleaz İçermeyen Su	3,7 µL
Toplam Hacim	110,5 µL

2.2.7.3. Mikrodizinlerin Yıkama, Boyama ve Tarama Aşamaları

İnkübasyondan sonra çipler hibridizasyon fırınından alınarak hibridizasyon kokteyli, septa aracılığıyla çipten çekilmiştir. miRNA 4.0 mikrodizinlerine uygun protokol ile yıkama ve boyama işlemleri yıkama istasyonunda gerçekleştirilmiştir. Daha sonra çiplerin tarayıcı ile görüntüleri alınmıştır. Tarama sonucu oluşan .DAT uzantılı dosya, analiz için .CEL uzantılı sayısal değerleri içeren formata dönüştürülmüştür. Hibridizasyon aşamasında çiplerde problem olup olmadığı, hibridizasyon aşamasında karışıma eklenen kontroller ile tespit edilmiştir. Kontrol aşaması, AGCC 4.0 (Affymetrix® GeneChip Command & Console Software) yazılımı ile tarama sonucu oluşan .DAT uzantılı dosyalar üzerinden yapılmıştır. Şekil 2.6.'da görülebileceği gibi gridli görüntü ve çip isminin görüntüde bulunuyor olması hibridizasyon, yıkama, boyama ve tarama prosedürlerinin başarılı olduğunu göstermektedir.



Şekil 2. 6. REL gruptan bir örnek için miRNA 4.0. çipinin .DAT uzantılı dosya görüntüsü

Kontrol aşamalarından bir diğeri .CEL uzantılı sayısal verileri içeren dosyadan hibridizasyon yüzdelерinin (%P) incelenmesidir. Affymetrix® Expression Console (v1.4.0) programına yüklenen .CEL dosyalarından alınan bu değерlerin, %18 ve üzerinde olması hibridizasyonun başarılı olduğunu belirtmektedir. Tüm çipler %P değeri açısından kontrol edilmiştir. Mikrodizin %P değерleri Ek-3'te yer almaktadır.

2.2.8. miRNA Mikrodizin Veri Analizi

Mikrodizin veri analizinde ilk aşama olan normalizasyon, Affymetrix® Expression Console (v1.4.0) programı ile .CEL uzantılı dosyalar üzerinden gerçekleştirilmiştir. Teknik hatalardan kaynaklanan farklılıkları elimine etmek için arka plan düzeltilmesi, quantile normalizasyon ve verinin logaritma 2 tabanına

dönüştürülmesini sağlayan RMA (Robust Multiarray Average) ve DABG (Detection Above Background) metotları ile mikrodizin miRNA ifade verisi normalize edilmiştir. Normalize edilmiş veriler, Expression Console programından .TXT formatında alınmıştır ve gruplar arası ifade farklılıkları ve istatistiksel analizler için Microsoft Excel eklentisi olan BRB-Array Tools (V.4.6.1) programına yüklenmiştir (Simon ve ark., 2007). İstatistiksel analizlere geçmeden önce miRNA 4.0 çiplerinde bulunan 203 organizmaya ait problardan sadece fareye (mmu) ait problemler filtrelenmiştir. BRB-Array Tools programı ile 3'er örnekten oluşan K, PT, REM ve REL olarak 4 grubu içeren totalde 12 mikrodizin verisi, gruplar arası ifade farklılığı gösteren miRNA'ları belirlemek için sınıf karşılaştırması (Class Comparison) ile kıyaslanarak 1,25 kat ve üzeri değişim gösteren ve istatistiksel olarak anlamlı olan (t-test; $p < 0,05$) miRNA'lar belirlenmiştir. Belirlenen miRNA'lar için Average linkage metodu ile kümeleme analizi BRB-Array Tools programı içerisindeki Cluster 3.0 ile gerçekleştirilmiştir. Gruplar arası ortak miRNA'ların kesiştirilmesi, Venny 2.1 aracılığıyla yapılmıştır (Oliveros, 2007-2015).

2.2.9. Mikrodizin Analizi Sonucunda İfade Farklılığı Gösteren miRNA'ların Doğrulanması

Mikrodizin veri analizi sonucunda gruplar arasında anlamlı ifade değişimi gösteren miRNA'ların bağımsız bir yöntem olan eş zamanlı PZR ile validasyonu gerçekleştirilmiştir. Mikrodizin deneylerinin gerçekleştirildiği total RNA örneklerinden öncelikle miRNA'lar için tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi yapılmış sonrasında sentezlenen cDNA'lar kullanılarak eş zamanlı PZR ile ifade değişimleri saptanmıştır.

2.2.9.1. miRNA cDNA Sentezi

miRNA'lar için cDNA sentezi, miScript II RT Kit ile kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. İlk aşama, 3' uçlarında poly(A) kuyruğu bulunmayan uygun miRNA'lara, sentez için primer dizisi sağlayan universal tag'i içeren kuyruğun

eklenmesidir. Daha sonra üreticinin sağladığı universal tag'e spesifik primer ile cDNA sentezi, Çizelge 2.3.'te belirtilen hacimlerle gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan örnekler 37°C'de 60 dakika ve 95°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra eş zamanlı PZR deneyi için her örnek 5 ng/μL olacak şekilde sulandırılmış ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 2. 3. miRNA cDNA Sentez Komponentleri

Reaktifler	Hacimler
5X miScript HiSpec Buffer	4 μL
10X miScript Nucleics Mix	2 μL
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 μL
Total RNA (250 ng)	değişken
Nükleaz İçermeyen Su	değişken
Toplam Hacim	20 μL

2.2.9.2. miRNA'lara Spesifik İleri Primer Tasarımı

Eş zamanlı PZR reaksiyonu için gerekli geri primer, eş zamanlı PZR kiti içerisinde universal tag'e spesifik olarak çıkarken, miRNA'lara özgü ileri primerlerin tasarımı miRNA'ların kısa uzunlukları nedeniyle klasik mRNA primer tasarımından farklı stratejileri gerektirmektedir. miRNA'lar için ileri primer tasarımı, (Timotijević ve ark., 2015) tarafından belirtilen yöntemle göre "miRNA Primer Design Tool" kullanılarak dizayn edilmiştir (Maulik ve Piyush, 2017). Bu yöntemde, miRNA dizisinin 3' ucundan 6 nükleotid çıkararak, 5' ucuna erime sıcaklığı ve primer uzunluğunu ayarlamak için rastgele 3-5 nükleotid dizisi eklemektedir. Bu yöntemle göre dizayn edilen miRNA ileri primer dizileri Çizelge 2.4.'te belirtilmektedir.

Çizelge 2. 4. Çalışmada kullanılan miRNA ileri primer listesi

miRNA Adı	Primer Dizisi (5' → 3')
mmu-miR-15a-5p	GGGTAGCAGCACATAATGG
mmu-miR-93-3p	GTTACTGCTGAGCTAGCAC
mmu-miR-3470b	GTGGTCACTCTGTAGACCA
mmu-miR-18a-5p	GGTAAGGTGCATCTAGTGC
mmu-miR-151-5p	GTTTTGAGGAGCTCACAG
mmu-miR-6980-5p	TTTTTGTGGGGGGGGGAGG
mmu-miR-19b-3p	GTTTGTGTGCAAATCCATGCAA
mmu-miR-5100	GTTTTCGAATCCCAGCGGT
mmu-miR-16-5p	GTTTGGTAGCAGCACGTAAATA
mmu-miR-25-3p	GTGCATTGCACTTGTCTCG
mmu-let-7a-5p	GGGTGAGGTAGTAGGTTGT
mmu-miR-30e-5p	GTTTGGTGTAACATCCTTGAC
mmu-miR-93-5p	GTCAAAGTGCTGTTCGTGC
mmu-miR-30b-3p	GTGCTGGGATGTGGATGTT
miR-30a-5p	Qiagen, MS00007359
miR-222-3p	Qiagen, MS00007609

2.2.9.3. miRNA'ların Eş Zamanlı PZR ile İfade Analizi

Eş zamanlı PZR deneyleri miScript SYBR Green PCR Kit ile kit protokolüne uygun şekilde Çizelge 2.5.'te belirtilen reaktifler ve reaksiyon koşuluna göre gerçekleştirilmiştir. İfade analizinde referans gen yerine analizi yapılacak tüm miRNA'ların Ct değerlerinin geometrik ortalaması alınarak ortalama değerler ile normalizasyonları yapılmıştır (Mestdagh ve ark., 2009). Eş zamanlı PZR analiz yöntemi olarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ yaklaşım metodu kullanılmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001). Eş zamanlı PZR deneyi üç biyolojik ve iki teknik tekrar ile gerçekleştirilmiş olup iki

grup arasındaki istatistiksel anlamlılık düzeyi Student's t-test ile belirlenmiştir ve $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Çizelge 2. 5. miRNA eş zamanlı PZR komponentleri ve reaksiyon koşulları

Reaktifler	Hacimler	Reaksiyon		
2X SYBR Green PCR Mix	5 µL	Başlangıç Aktivasyonu	95°C 15 dakika	1 döngü
10X miScript Universal Primer	1 µL			
100 µM miRNA-Spesifik İleri Primer	1 µL	Denatürasyon	94°C 15 saniye	40 döngü
cDNA (5 ng/µL)	1 µL	Bağlanma	55°C 30 saniye	
Nükleaz İçermeyen Su	2 µL	Uzama	70°C 30 saniye	
Toplam Hacim	10 µL			

2.2.10. miRNA Hedef Genlerinin Biyoinformatik Olarak Belirlenmesi

miRNA hedef genlerinin biyoinformatik olarak belirlenmesinde miRWalk 3.0 (Sticht ve ark., 2018) veritabanı kullanılarak 3'UTR pozisyonunda bağlanma gösteren hedefler listelenmiştir. Hedef gen listelerinde özellikle CD8 T hücre ile ilişkili genleri zenginleştirmek için NCBI Gene (Brown ve ark., 2015) veritabanı aracılığıyla *Mus musculus* organizmasında CD8 T hücre ile ilişkilendirilmiş genler indirilerek miRNA hedef gen listeleri ile kesiştirilip ortak olan genler belirlenmiştir. Ortak hedef genlerin tespiti Venny 2.1 ile yapılmıştır.

2.2.11. miRNA Hedef Genlerinin Yer Aldığı Yolakların Biyoinformatik Olarak Belirlenmesi

Yolak zenginleştirme analizi, WebGestalt (WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit) (Liao ve ark., 2019) arayüzü aracılığıyla KEGG Pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Kanehisa ve Goto, 2000) veritabanında miRNA hedef gen listeleri üzerinden gerçekleştirilmiştir.

2.2.12. Biyoinformatik Analiz Sonucunda Belirlenen Hedef Genlerin Doğrulanması

Hedef gen ve yolak analizleri sonucunda immün sistem ile ilişkili yolaklar ve araştırılan miRNA'ların hedefi olarak belirlenen genlerin eş zamanlı PZR ile doğrulamaları yapılmıştır. Mikrodizin deneylerinde kullanılan total RNA örneklerinden öncelikle mRNA molekülleri için cDNA sentezlenmiş ve ifade değişimlerini saptamak amacıyla sentezlenen cDNA'lar kullanılarak eş zamanlı PZR ile analizleri gerçekleştirilmiştir.

2.2.12.1. mRNA cDNA Sentezi

Total RNA örnekleri ile gerçekleştirilen cDNA sentezi için Transcriptor HF cDNA Synthesis Kit kullanılmış olup, kit protokolü uygulanmıştır. Sentez için Çizelge 2.6.'da belirtilen bileşenler kullanılarak öncelikle 250 ng total RNA örneği ile Anchored-oligo(dT) primer 65°C'de 10 dakika denatüre edilmiştir. Daha sonra diğer komponentler eklenerek 55°C'de 30 dakika ve 85°C'de 5 dakika inkübasyon ile sentez işlemi gerçekleştirilmiştir. Her örnek eş zamanlı PZR deneyi için 10 ng/µL olacak şekilde sulandırılmış ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 2. 6. mRNA cDNA sentez komponentleri

Reaktifler	Hacimler
5X Reaksiyon Buffer	4 µL
RNase Inhibitor (40 U/mL)	0,5 µL
dNTP Karışımı (10 mM)	2 µL
DTT	1 µL
Reverse Transcriptase	1,1 µL
Anchored-oligo(dT) ₁₈ Primer (50 pmol/mL)	1 µL
Total RNA (250 ng)	değişken
Nükleaz İçermeyen Su	değişken
Toplam Hacim	20 µL

2.2.12.2. Hedef mRNA Spesifik Primer Tasarımı

Hedef genler ve referans genler için uygun primerler, Primer-Blast programı ile tasarlanmıştır (Ye ve ark., 2012). Primer tasarımında spesifikliğin yanı sıra gen dizisinin izin verdiği ölçüde özellikle ileri ve geri primerlerin erime sıcaklıkları arasında maksimum 1°C fark olmasına, en az 1000 bp uzunluğunda intron dizisi içermesine ve ekson-ekson bağlantısında olmasına dikkat edilmiştir. Çalışmada kullanılan ileri ve geri primerler Çizelge 2.7.'de listelenmiştir.

Çizelge 2. 7. Çalışmada kullanılan referans ve miRNA hedef gen primer listesi

Primer Adı	Primer Dizisi (5' → 3')
GAPDH_F	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
GAPDH_R	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG
B2M_F	CTGTATGCTATCCAGAAAACCCCT
B2M_R	TTCAATGTGAGGCGGGTGG
BCL-XL_F	GTGGAAAGCGTAGACAAGGAGA
BCL-XL_R	TGCATTGTTCCCGTAGAGATCC
BCL-2_F	AACATCGCCCTGTGGATGAC
BCL-2_R	TGCACCCAGAGTGATGCAG
BAX_F	AATATGGAGCTGCAGAGGATGATT
BAX_R	TGATCAGCTCGGGCACTTTAG
BAK_F	GAGCAGAGTCATTCAGGTGACA
BAK_R	TGTTCTGCTGGTGGAGGTA

2.2.12.3. Hedef Genlerin Eş Zamanlı PZR ile İfade Analizi

Hedef genlerin ifade analizi için eş zamanlı PZR deneyi FastStart DNA Green Master Kit ile Çizelge 2.8.'de belirtilen reaktifler ve reaksiyon koşuluna göre gerçekleştirilmiştir. Referans gen olarak GAPDH ve B2M genleri kullanılmış ve her iki referans genin Ct değerlerinin geometrik ortalaması alınarak $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ metodu ile

hedef genlerin ifadeleri analiz edilmiştir. Örnekler %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrolleri yapılmıştır. Eş zamanlı PZR deneyi üç biyolojik ve iki teknik tekrar ile gerçekleştirilmiş olup iki grup arasındaki istatistiksel anlamlılık düzeyi Student's t-test ile belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi $p < 0,05$ kabul edilmiştir.

Çizelge 2. 8. Hedef gen eş zamanlı PZR komponentleri ve reaksiyon koşulları

Reaktifler	Hacimler	Reaksiyon		
SYBR Green Master Mix	5 µL	Ön İnkübasyon	95°C 10 dakika	1 döngü
10 µM İleri Primer	0,4 µL			
10 µM Geri Primer	0,4 µL	Denatürasyon	95°C 10 saniye	40 döngü
cDNA (10 ng/µL)	1 µL	Bağlanma	56°C - 60°C 10 saniye	
Nükleaz İçermeyen Su	3,2 µL	Uzama	72°C 10 saniye	
Toplam Hacim	10 µL			

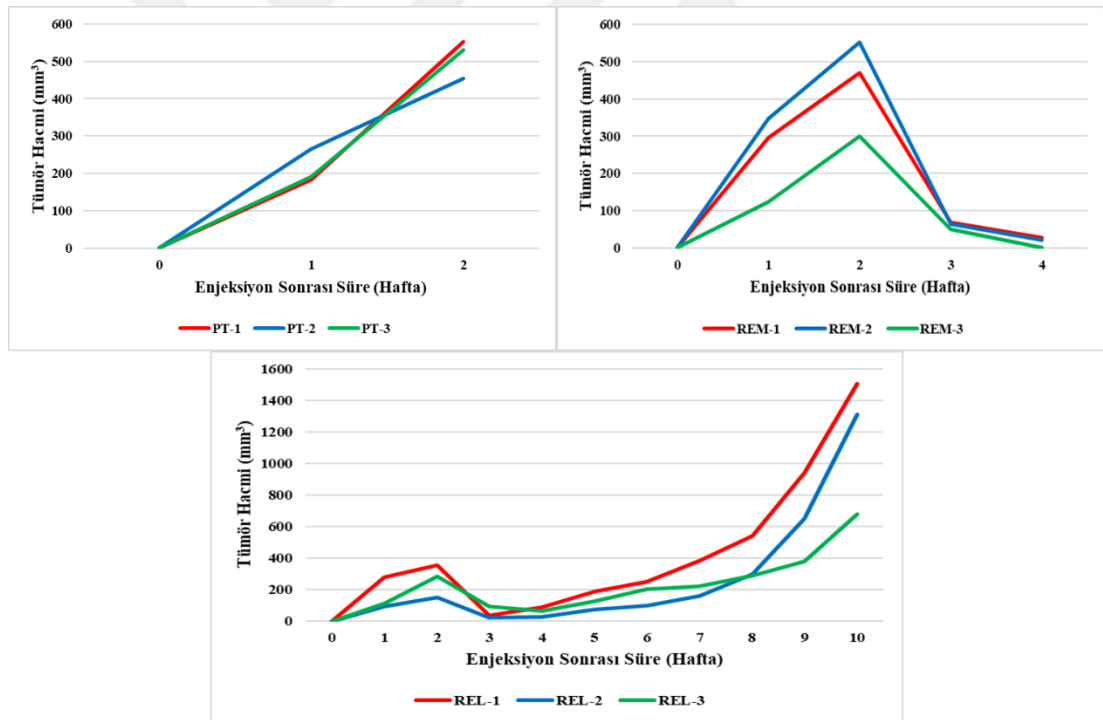
2.2.13. Apoptoz Deneyi

CD8⁺ T hücrelerin K, PT ve REM gruplarındaki hücre ölüm süreçlerini incelemek için 2.2.4.'te bahsedildiği şekilde elde edilen fare dalaklarından izole edilmiş CD8⁺ T hücre peleti, 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde 1X Annexin-V Binding Buffer (10 mM Hepes/NaOH; pH: 7,4; 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) ile süspanse edilmiştir. Süspanse edilen örneklerden 100 µL alınarak üzerine 5 µL FITC-Annexin-V ve 5 µL PE-Propidyum İyodür (PI) eklenmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. Okuma öncesi örneklerle 400 µl 1X Annexin-V Binding Buffer eklenerek analizleri flow sitometri cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Apoptoz deneyi en az iki biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir. Student's t-test ile istatistiksel anlamlılık seviyesi belirlenmiş ve $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

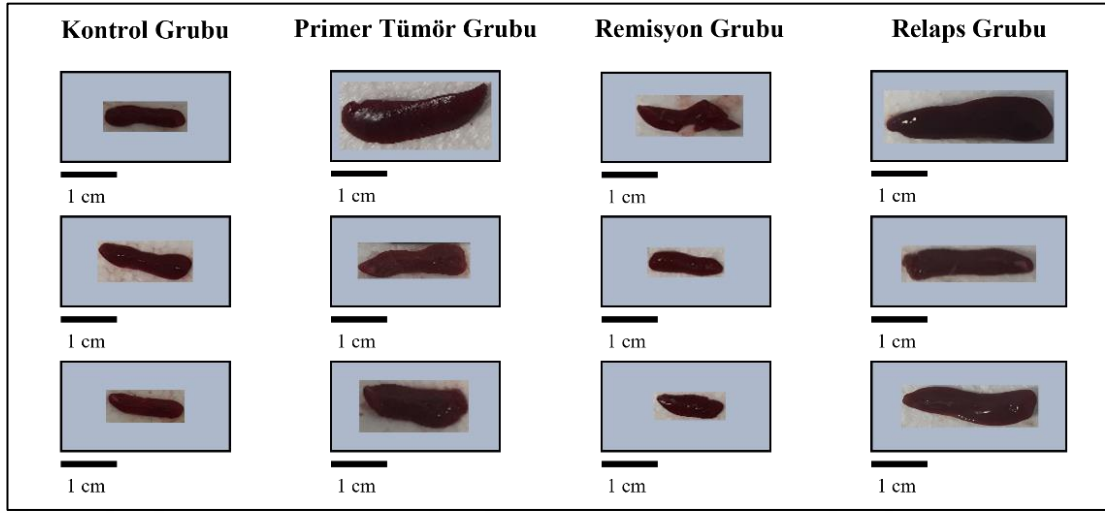
3.1. Hayvan Modeli Gruplarına Ait Bulgular

4T1 hücreleri ile immün-kompetan dişi Balb/c farelerde PR, REM ve REL gruplarının oluşturulması tümör boyutları ölçülerek tümörün oluşumu, gerilemesi ve tekrar ortaya çıkması ile belirlenmiştir. Şekil 3.1.'de belirtilen grafiklerde görülebileceği gibi PT grup, 2 hafta içerisinde tümör geliştirmiştir. REM grubunda 2 hafta içerisinde gelişen primer tümör 4. haftanın sonunda kaybolmuştur. REL grubunda ise 2 hafta içerisinde gelişen primer tümör 3. – 4. haftada kaybolmuş ve 5. haftadan itibaren primer tümör tekrar büyüme göstererek nüks etmiştir.



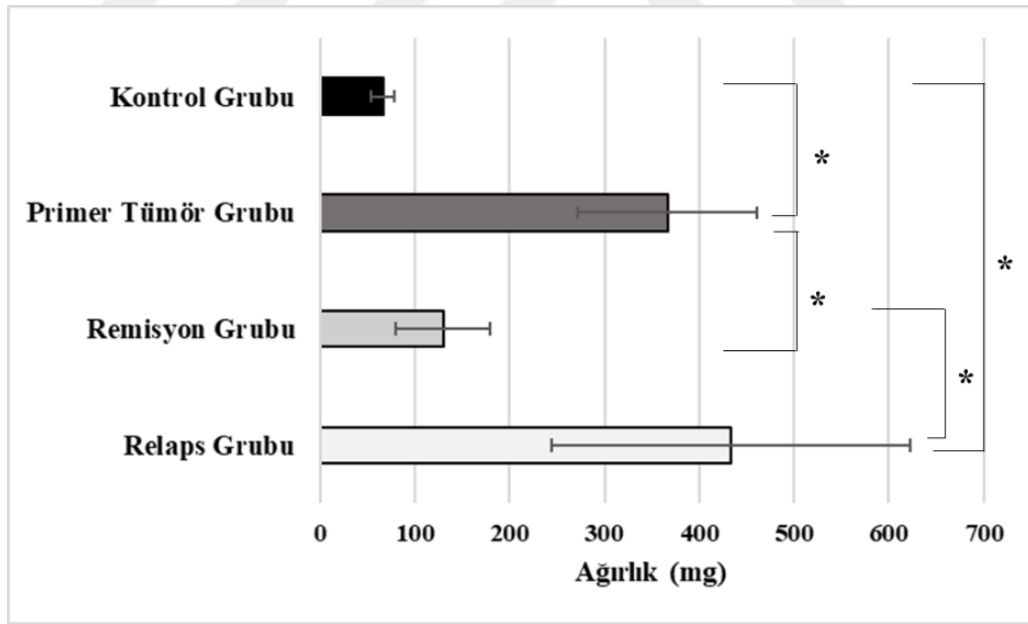
Şekil 3. 1. PT, REM ve REL gruplarının tümör büyüme grafikleri

Tüm deney gruplarından Şekil 2.4'te belirtilen sonlandırılma sürelerine göre alınan dalak örneklerinin boyutları, tümör taşıyan ve taşımayan gruplar arasında farklılık göstermiştir (Şekil 3.2.).



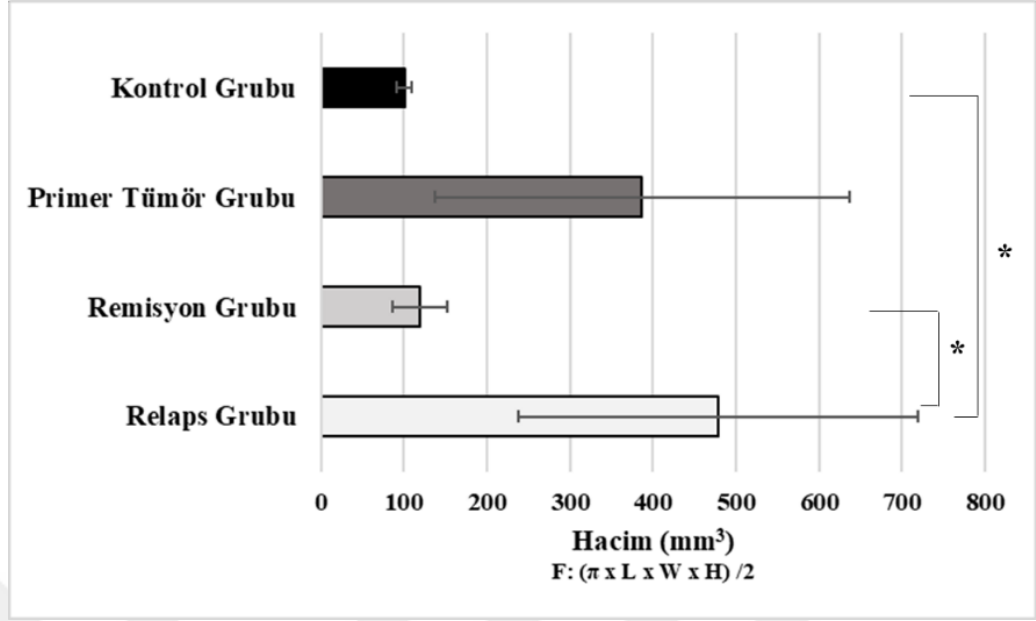
Şekil 3. 2. Deney gruplarına ait dalak örneklerinin boyutlarını belirten görseller

Şekil 3.3.'te görülebileceği gibi dalak ağırlıkları K grubuna göre PT ve REL gruplarında anlamlı artış gösterirken, REM grubunda anlamlı fark gözlemlenmemiştir.



Şekil 3. 3. Deney gruplarının dalak ağırlık verileri ile oluşturulmuş sütun grafiği (t-test, * $p < 0,05$)

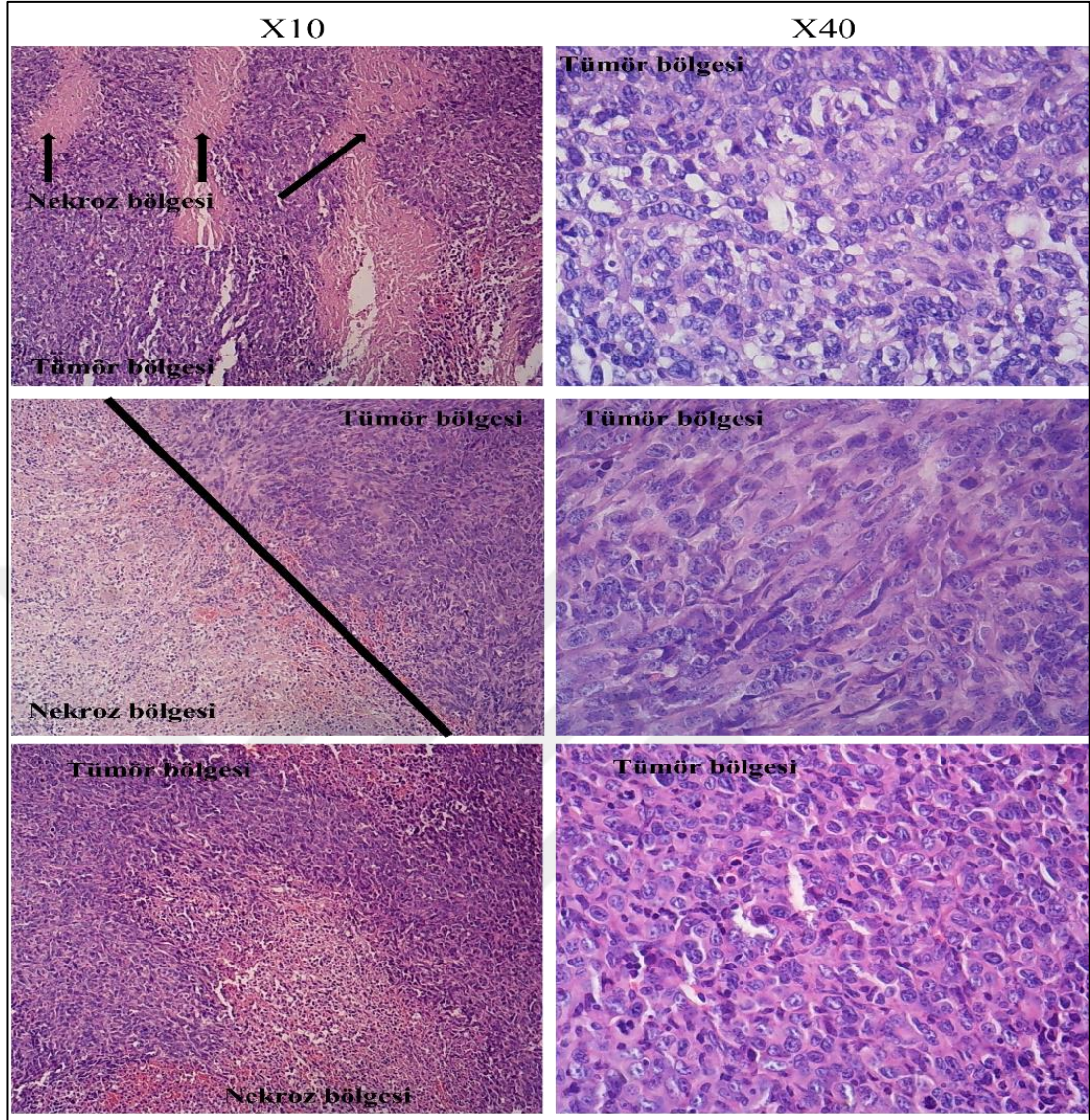
Tümör taşıyan gruplardan alınan dalak örneklerinin, kontrol grubuna kıyasla hacimlerinde artış saptanmış olup, REM grubunda kontrol grubuna göre değişim gözlenmemiştir (Şekil 3.4.).



Şekil 3. 4. Deney gruplarının dalak örneklerinin uzunluk, genişlik ve yükseklik değerleri ile oluşturulmuş sütun grafiği (t-test, *p<0,05)

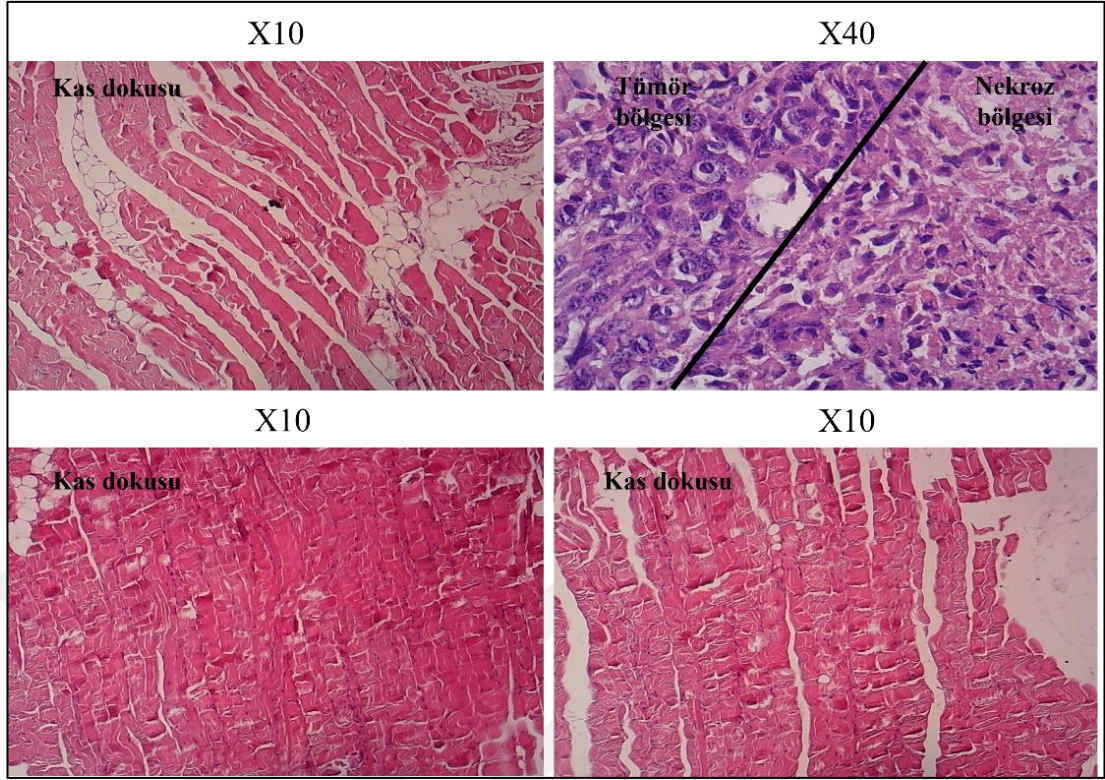
3.2. Tümör Dokuların Histopatolojik İncelemesi

PT grubundan alınan tümör dokularının patoloji incelemeleri sonucunda bazal benzeri meme kanseri tanısı konulmuş olup tümör dokusunda nektorik bölgeler tespit edilmiştir (Şekil 3.5.).



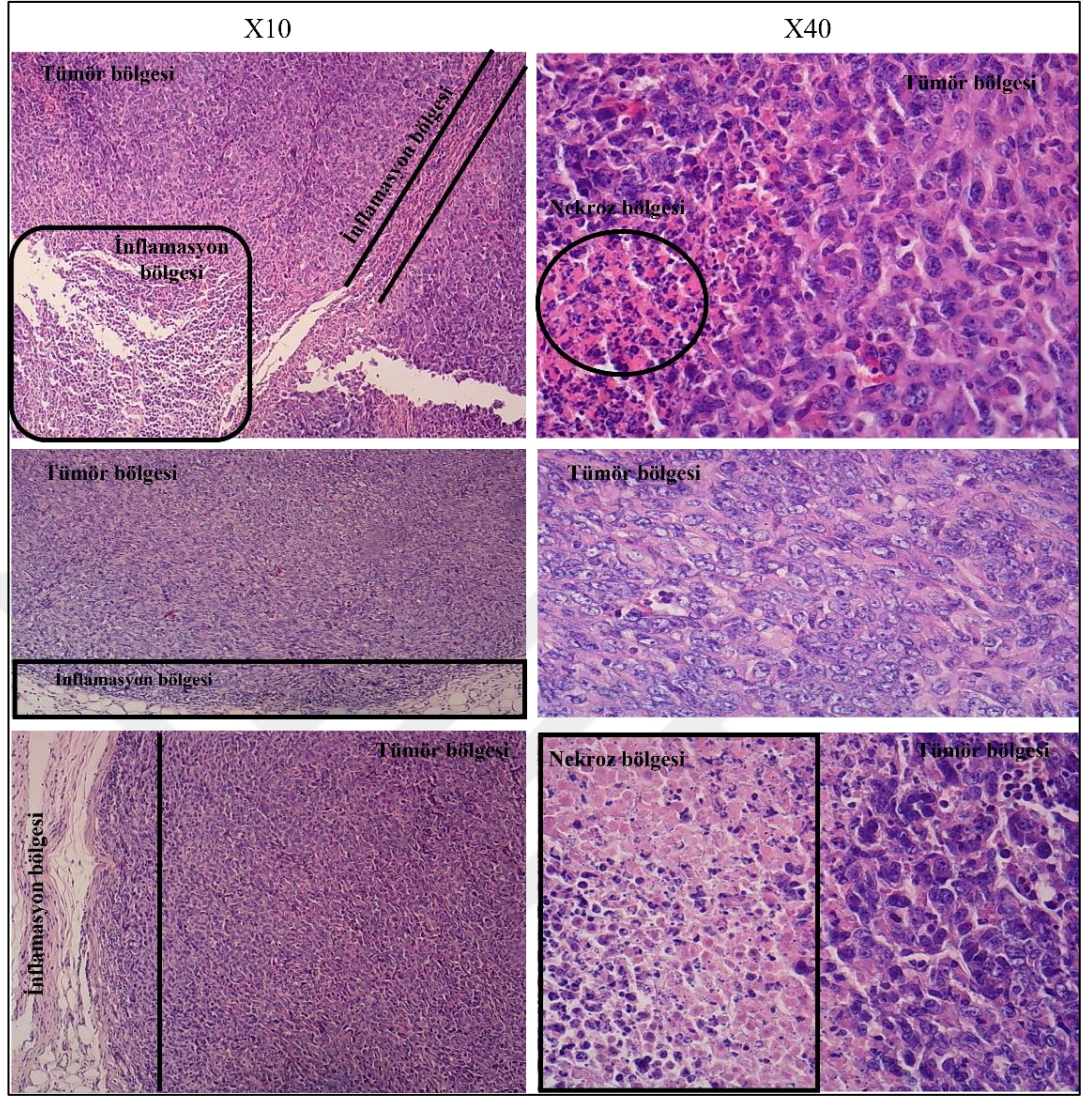
Şekil 3. 5. Primer tümör grubuna ait tümör dokularının histopatolojik mikroskop görüntüleri

Tümör dokusunun kaybolduğu remisyon grubunda primer tümörün geliştiği bölgeden alınan dokular patolojik açıdan incelenmiştir. Patoloji tanısında az sayıda bazal benzeri meme kanseri hücresi varlığı ve çoğunlukla kas hücresi varlığı saptanmıştır (Şekil 3.6.). REM grubunda tümör dokularının kaybolduğu doğrulanmıştır.



Şekil 3. 6. Remisyon grubuna ait dokuların histopatolojik mikroskop görüntüleri

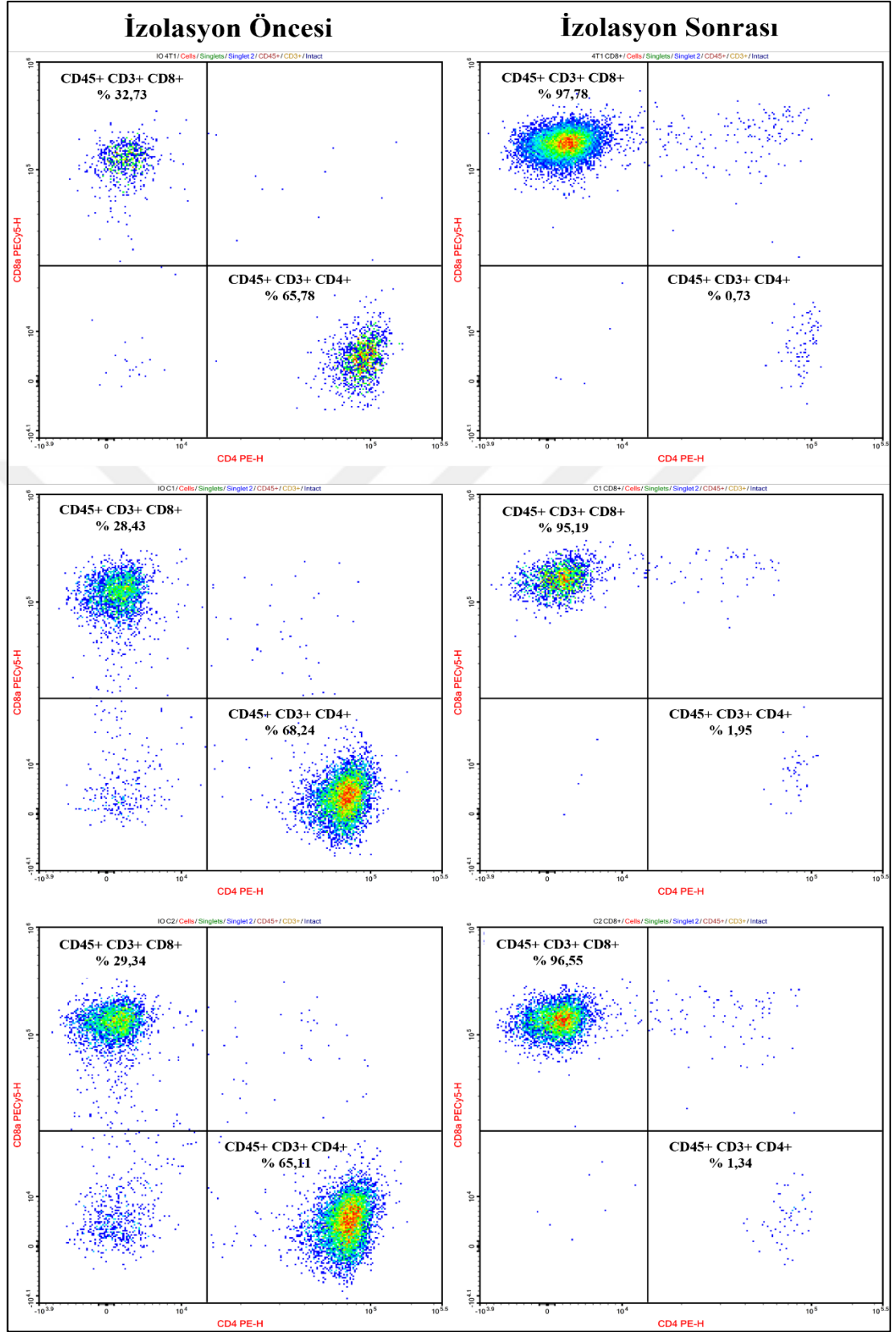
REL grubundan alınan tümör dokularının patoloji tanısı, bazal benzeri meme kanseri olarak saptanmıştır. Tümör hücreleri yanı sıra doku içerisinde nekrotik alanların varlığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda özellikle tümör dokusunun dış bölgesinde inflamatuvar hücrelerin varlığı belirlenmiştir (Şekil 3.7.).



Şekil 3. 7. Relaps grubuna ait tümör dokularının histopatolojik mikroskop görüntüleri

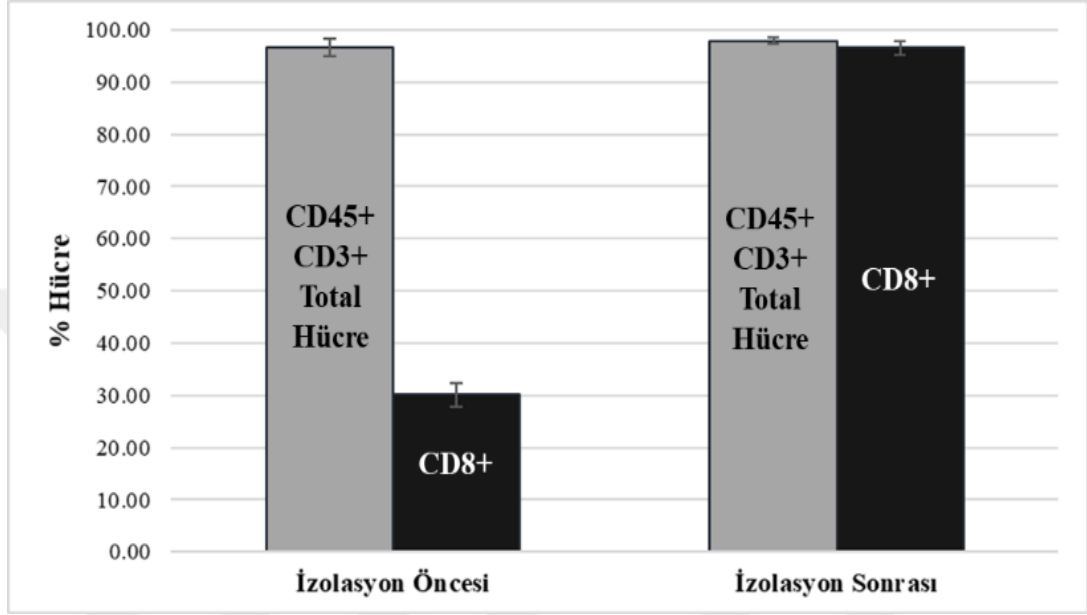
3.3. CD8+ T Hücre İzolasyonunun Doğrulanması

Manyetik ayırım yöntemi ile CD8+ T hücre izolasyonunun başarılı bir şekilde uygulandığını doğrulamak için üç biyolojik tekrar ile izolasyon öncesi ve sonrası hücre süspansiyon örnekleri, T hücre soyunu temsil eden CD45+ (lökosit belirteci), CD3+ (T hücre belirteci), CD8+ (sitotoksik T hücre belirteci) ve CD4+ (yardımcı T hücre belirteci) ifadeleri açısından flow sitometri ile analiz edilmiştir (Şekil 3.8.).



Şekil 3. 8. MACS yöntemi ile CD8 pozitif seleksiyon öncesi ve sonrası CD8+ T hücrelerin saflıklarını gösteren saçılım grafikleri

CD45+ CD3+ total hücre popülasyonunda CD8+ hücre oranı, izolasyon öncesi örneklerde yaklaşık %30'ken, izolasyon sonrasında %96,5 olarak saptanmıştır (Şekil 3.9.). İzolasyon öncesine göre izolasyon sonrasında artan CD8+ T hücrelerin yüzdesi, izolasyon başarısını ve elde edilen CD8+ T hücrelerin saflığını belirtmektedir.



Şekil 3. 9. MACS yöntemi ile CD8 pozitif seleksiyon öncesi ve sonrası CD8+ T hücrelerin saflıklarını gösteren sütun grafiği

3.4. RNA İzolasyonuna Ait Bulgular

K, PT, REM ve REL gruplarına ait CD8+ T hücrelerden izole edilen total RNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri Çizelge 3.1.'de yer almaktadır. Çalışmada kullanılan tüm RNA örneklerinin 260/280 oranı 1.8 - 2.1 arasındadır.

Çizelge 3. 1. Mikrodizin ve validasyon deneylerinde kullanılan total RNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri

Örnek Adı	Konsantrasyon (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
K-1	146,40	1.92
K-2	210,80	1.90
K-3	155,80	1.97
PT-1	213,30	1.98
PT-2	111,00	1.93
PT-3	184,90	1.96
REM-1	126,90	1.84
REM-2	77,10	1.84
REM-3	65,30	1.80
REL-1	992,10	2.07
REL-2	537,10	2.03
REL-3	912,50	2.08

3.5. Mikrodizin Analizi Sonucu Elde Edilen Bulgular

3.5.1. Gruplar Arasında Anlamlı Farklılık Gösteren miRNA'lar

K, PT, REM ve REL grupları arasında 1,25 ve üzeri anlamlı ($p < 0,05$) kat değişimi gösteren miRNA'ların belirlenmesi, BRB-Array Tools programı ile sınıf karşılaştırması (Class Comparison, paired t-test) analizi uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Primer tümör oluşumu boyunca rol oynayan miRNA'ları belirlemek için karşılaştırılan PT ve K grupları arasında 41 miRNA'nın anlamlı ifade değişimi gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 3.2.). Bu miRNA'lardan 39'unda ifade artışı saptanırken, sadece 2 miRNA'nın ifadesi azalmıştır.

Çizelge 3. 2. Sağlıklı kontrol ve primer tümör grupları arasında 1,25 kat ve üzeri anlamlı ifade değişimi gösteren miRNA'lar

miRNA	Kat Değişim (PT/K)	p-değeri	miRNA	Kat Değişim (PT/K)	p-değeri
mmu-miR-18a-5p	23,45	0,0101	mmu-miR-17-3p	2,76	0,0250
mmu-miR-451a	16,2	0,0105	mmu-miR-17-5p	2,74	0,0115
mmu-miR-3068-3p	12,68	0,0062	mmu-miR-152-3p	2,58	0,0454
mmu-miR-15a-5p	11,93	0,0146	mmu-miR-16-5p	2,54	0,0042
mmu-miR-30e-5p	6,63	0,0004	mmu-miR-29a-3p	2,26	0,0084
mmu-miR-221-3p	6,62	0,0264	mmu-miR-93-5p	2,23	0,0004
mmu-miR-194-5p	6,31	0,0319	mmu-let-7i-5p	2	0,0361
mmu-miR-126a-3p	6,12	0,0342	mmu-miR-22-3p	1,99	0,0228
mmu-miR-30a-5p	5,1	0,0246	mmu-miR-362-5p	1,9	0,0098
mmu-miR-222-3p	4,66	0,0042	mmu-miR-30b-3p	1,76	0,0001
mmu-miR-27a-3p	4,32	0,0069	mmu-miR-7085-5p	1,64	0,0476
mmu-miR-467a-5p	4,32	0,0325	mmu-miR-150-5p	1,63	0,0288
mmu-miR-187-3p	3,8	0,0016	mmu-miR-26a-5p	1,6	0,0427
mmu-miR-20a-5p	3,54	0,0065	mmu-miR-3470b	1,39	0,0041
mmu-miR-1198-5p	3,54	0,0284	mmu-miR-700-3p	1,34	0,0485
mmu-miR-690	3,33	0,0032	mmu-miR-7079-5p	1,33	0,0203
mmu-miR-6937-5p	2,97	0,0444	mmu-miR-1839-3p	1,3	0,0010
mmu-miR-24-2-5p	2,86	0,0326	mmu-miR-103-3p	1,3	0,0229
mmu-miR-93-3p	2,82	0,0269	mmu-miR-146a-5p	0,5	0,0172
mmu-miR-669a-5p	2,78	0,0274	mmu-miR-151-5p	0,47	0,0023
mmu-miR-669p-5p	2,78	0,0274			

Oluşan primer tümörün gerilemesinde rol oynayan miRNA'ları saptamak için PT ve REM grupları arasında ifade farklılığı gösteren miRNA'lar kıyaslanmış ve 75 miRNA'nın 1,25 kat ve üzeri anlamlı ifade değişimi gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 3.3.). Bu miRNA'lardan 18'i, PT grubuna göre REM grubunda ifade artışı gösterirken çoğunluğunun ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 3. 3. Primer tümör ve remisyon grupları arasında 1,25 kat ve üzeri anlamlı ifade değişimi gösteren miRNA'lar

miRNA	Kat Değişim (REM/PT)	p-değeri	miRNA	Kat Değişim (REM/PT)	p-değeri
mmu-miR-6980-5p	8,84	0,0471	mmu-miR-200c-3p	0,28	0,0031
mmu-miR-7030-5p	4,04	0,0358	mmu-miR-378a-5p	0,28	0,0297
mmu-miR-7118-5p	3,86	0,0452	mmu-miR-187-3p	0,27	0,0017
mmu-miR-6931-5p	3,63	0,0290	mmu-miR-17-5p	0,25	0,0026
mmu-miR-6968-5p	2,8	0,0319	mmu-miR-1198-5p	0,23	0,0022
mmu-miR-8110	2,8	0,0423	mmu-miR-20a-5p	0,23	0,0050
mmu-miR-6909-5p	2,78	0,0284	mmu-miR-3084-3p	0,23	0,0073
mmu-miR-3547-5p	2,53	0,0330	mmu-miR-106b-5p	0,22	0,0072
mmu-miR-211-3p	2,4	0,0412	mmu-miR-17-3p	0,22	0,0360
mmu-miR-3473e	2,34	0,0182	mmu-miR-28a-5p	0,2	0,0061
mmu-miR-3473b	2,29	0,0308	mmu-miR-5100	0,19	0,0276
mmu-miR-762	2,15	0,0121	mmu-miR-30e-5p	0,17	0,0014
mmu-miR-3960	1,62	0,0227	mmu-miR-138-5p	0,17	0,0464
mmu-miR-3104-5p	1,54	0,0310	mmu-let-7g-5p	0,17	0,0473
mmu-miR-328-5p	1,54	0,0319	mmu-miR-30a-5p	0,16	0,0087
mmu-miR-5126	1,47	0,0475	mmu-miR-423-3p	0,15	0,0147
mmu-miR-3091-5p	1,37	0,0369	mmu-miR-181b-5p	0,13	0,0013
mmu-miR-7005-5p	1,28	0,0142	mmu-miR-139-5p	0,13	0,0138
mmu-miR-1839-3p	0,79	0,0031	mmu-miR-222-3p	0,12	0,0186
mmu-miR-3470b	0,75	0,0023	mmu-miR-194-5p	0,11	0,0022
mmu-miR-181a-5p	0,66	0,0230	mmu-miR-30c-5p	0,11	0,0158
mmu-miR-191-5p	0,65	0,0454	mmu-miR-106a-5p	0,1	0,0150
mmu-miR-30b-3p	0,61	0,0008	mmu-miR-27a-3p	0,098	0,0086
mmu-miR-181a-2	0,61	0,0137	mmu-miR-99b-5p	0,096	0,0105
mmu-miR-362-5p	0,52	0,0046	mmu-miR-25-3p	0,091	0,0117
mmu-miR-26a-5p	0,51	0,0315	mmu-miR-130b-3p	0,087	0,0037
mmu-miR-361	0,48	0,0358	mmu-miR-20b-5p	0,085	0,0030
mmu-miR-16-5p	0,42	0,0015	mmu-miR-27b-3p	0,076	0,0122
mmu-miR-93-5p	0,38	0,0037	mmu-let-7e-5p	0,071	0,0464
mmu-miR-425-5p	0,37	0,0136	mmu-miR-15a-5p	0,067	0,0031
mmu-miR-152-3p	0,36	0,0313	mmu-miR-451a	0,065	0,0117
mmu-miR-669a-5p	0,34	0,0260	mmu-miR-221-3p	0,064	0,0159
mmu-miR-669p-5p	0,34	0,0260	mmu-miR-30b-5p	0,061	0,0110
mmu-miR-24-2-5p	0,33	0,0147	mmu-miR-18a-5p	0,054	0,0068
mmu-miR-93-3p	0,33	0,0186	mmu-miR-126a-3p	0,047	0,0141
mmu-miR-532-5p	0,32	0,0477	mmu-miR-143-3p	0,038	0,0233
mmu-miR-15b-5p	0,31	0,0442	mmu-miR-19b-3p	0,036	0,0019
mmu-miR-361-5p	0,29	0,0063			

Tümör gerilemesi sonrası primer tümörün nüks etmesinde rol oynayan miRNA'ların belirlenmesi için REM ve REL grupları arasında ifade farklılığı gösteren miRNA'lar kıyaslanmış ve 78 miRNA'nın 1,25 kat ve üzeri anlamlı ifade değişimi

gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 3.4.). 30 miRNA, REL grubunda REM grubuna göre ifade düşüşü gösterirken, 48 miRNA'nın ifadesi artmıştır.

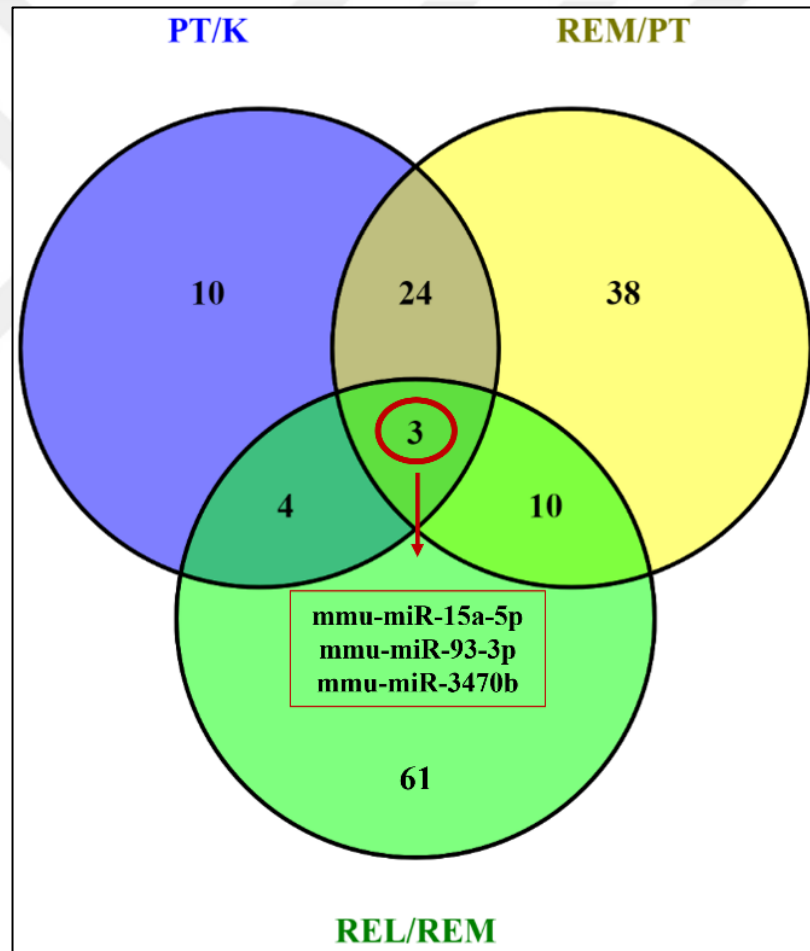
Çizelge 3. 4. Relaps ve remisyon grupları arasında 1,25 kat ve üzeri anlamlı ifade değişimi gösteren miRNA'lar

miRNA	Kat Değişim (REL/REM)	p-değeri	miRNA	Kat Değişim (REL/REM)	p-değeri
mmu-miR-5100	159,19	7,40E-06	mmu-miR-8119	1,45	0,0273
mmu-miR-7658-5p	28,31	0,0024	mmu-miR-504-3p	1,44	0,0103
mmu-miR-6937-5p	25,01	0,0014	mmu-miR-125a-3p	1,42	0,0044
mmu-miR-714	23,33	0,0067	mmu-miR-3472	1,42	0,0064
mmu-miR-5119	14,76	0,0091	mmu-miR-3081-5p	1,34	0,0126
mmu-miR-7221-3p	11,37	0,0002	mmu-miR-6984-5p	1,32	0,0151
mmu-miR-346-3p	10,68	0,0006	mmu-miR-421-3p	1,31	0,0034
mmu-miR-7686-5p	10,47	0,0011	mmu-miR-503-5p	1,31	0,0143
mmu-miR-1931	10,45	2,75E-05	mmu-miR-3473g	1,28	0,0235
mmu-miR-6970-5p	10,17	0,0009	mmu-mir-151	0,77	0,0345
mmu-miR-143-3p	8,01	0,0296	mmu-miR-5620-3p	0,76	0,0149
mmu-miR-1949	7,87	0,0010	mmu-miR-7075-5p	0,66	0,0093
mmu-miR-3620-5p	7,42	0,0014	mmu-miR-6968-5p	0,58	0,0452
mmu-miR-7648-3p	6,06	0,0057	mmu-miR-103-3p	0,54	0,0494
mmu-miR-664-5p	5,93	0,0182	mmu-let-7c-5p	0,51	0,0468
mmu-miR-15a-5p	5,16	0,0228	mmu-miR-191-5p	0,5	0,0008
mmu-miR-7069-5p	4,2	0,0097	mmu-let-7f-1-3p	0,48	0,0432
mmu-miR-6912-5p	4,07	0,0103	mmu-miR-709	0,47	0,0064
mmu-miR-3470b	3,92	0,0002	mmu-miR-1224-5p	0,44	0,0346
mmu-miR-5112	3,92	0,0063	mmu-miR-361-5p	0,42	0,0238
mmu-miR-1934-3p	3,92	0,0354	mmu-miR-24-3p	0,39	0,0053
mmu-mir-3069	3,61	0,0450	mmu-let-7b-5p	0,38	0,0355
mmu-miR-1894-3p	3,5	0,0170	mmu-let-7d-5p	0,37	0,0029
mmu-miR-6922-5p	3,48	0,0037	mmu-miR-3473e	0,36	0,0264
mmu-miR-712-5p	3,48	0,0063	mmu-miR-3473b	0,35	0,0227
mmu-miR-7016-5p	3,08	0,0458	mmu-miR-8101	0,32	0,0049
mmu-miR-7669-3p	2,92	0,0033	mmu-miR-7030-5p	0,32	0,0310
mmu-miR-5128	2,88	0,0100	mmu-miR-23b-3p	0,28	0,0254
mmu-miR-7047-5p	2,34	0,0424	mmu-miR-378a-3p	0,27	0,0496
mmu-miR-5130	2,05	0,0152	mmu-miR-342-3p	0,25	0,0008
mmu-miR-7048-5p	2,03	0,0054	mmu-miR-6366	0,22	0,0336
mmu-mir-7648	1,97	0,0174	mmu-miR-151-3p	0,2	0,0104
mmu-miR-149-3p	1,97	0,0268	mmu-miR-2137	0,17	0,0015
mmu-miR-6991-5p	1,95	0,0168	mmu-miR-6980-5p	0,15	0,0109
mmu-miR-7036b-3p	1,63	0,0465	mmu-miR-146a-5p	0,15	0,0244
mmu-miR-93-3p	1,61	0,0068	mmu-miR-138-5p	0,14	0,0225
mmu-miR-6981-5p	1,53	0,0468	mmu-miR-342-5p	0,14	0,0339
mmu-miR-3102-5p.2-5p	1,49	0,0063	mmu-miR-541-5p	0,12	0,0479
mmu-miR-3470a	1,49	0,0433	mmu-miR-151-5p	0,04	0,0011

3.5.2. Gruplar Arasında Anlamlı Farklılık Gösteren Ortak miRNA'lar

3.5.2.1. K, PT, REM ve REL Grupları Arasındaki Ortak miRNA'lar

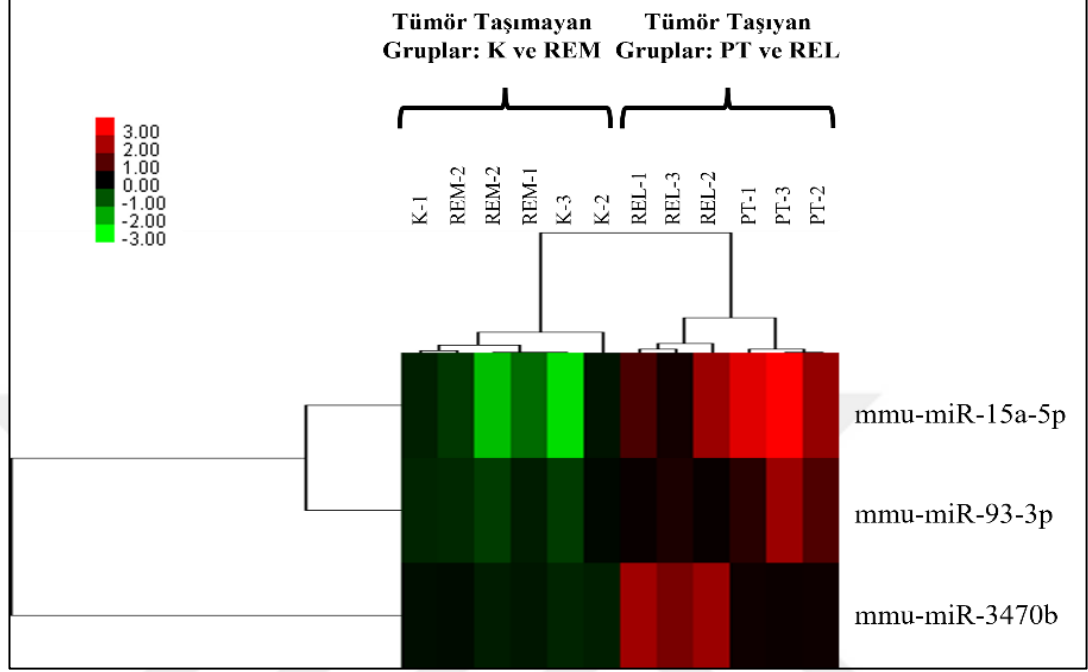
TNBC oluşum, gerileme ve nüks aşamalarında CD8+ T hücre aracılı immün sistem yanıtında ortak olan miRNA'ları belirlemek için K/PT, PT/REM ve REM/REL grup kıyaslamalarında çıkan miRNA listeleri kesiştirilerek mmu-miR-15a-5p, mmu-miR-93-3p ve mmu-miR-3470b miRNA'larının ortak olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.10.).



Şekil 3. 10. K, PT, REM ve REL gruplarında ifade değişimi gösteren ortak miRNA'lar

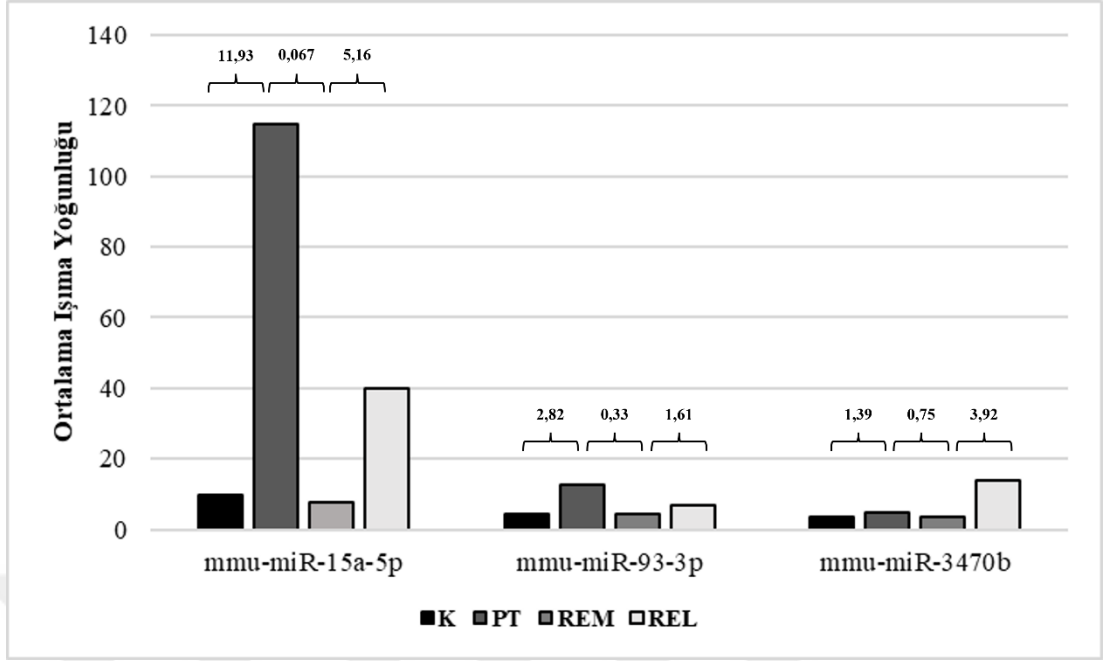
Üç ortak miRNA için BRB-Array Tools programı ile yapılan kümeleme analizi (Cluster) sonucunda tümör taşıyan (K ve REM) ve tümör taşımayan (PT ve REL) deney grupları 2 grup olarak ayrılmıştır (Şekil 3.11.). PT ve REL gruplarında 3

miRNA'nın ifadesinin yüksek, K ve REM gruplarında ise ifadesinin düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 3. 11. Ortak 3 miRNA'nın hiyerarşik kümeleme analizi sonucu oluşturulan heatmap görseli

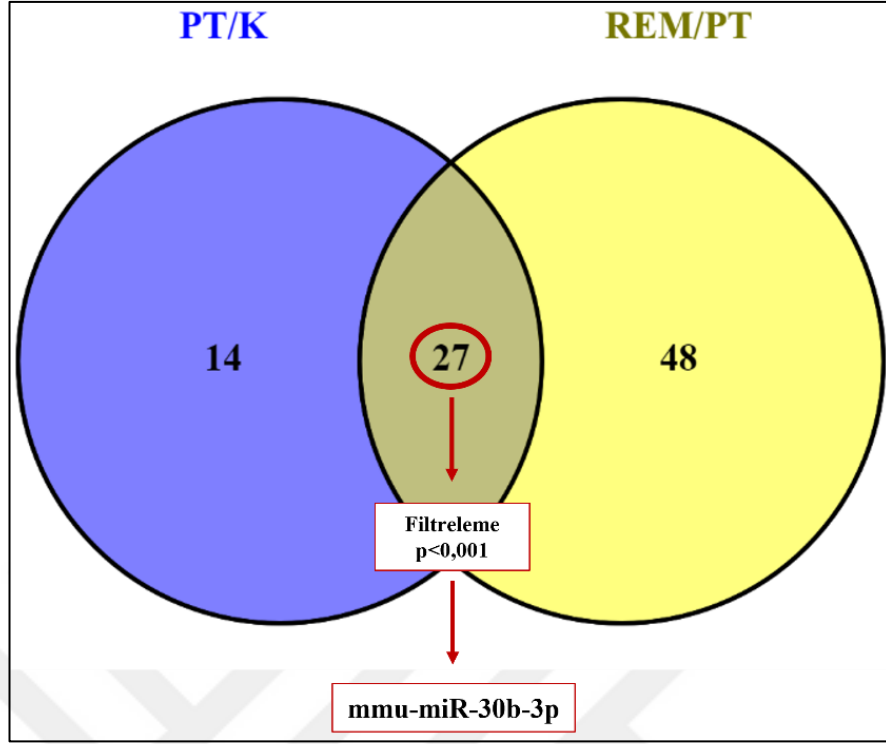
Mikrodizin analiz verileri incelendiğinde ortak 3 miRNA'nın aynı modelde ifade artış ve azalış gösterdiği bulunmuştur. Bu miRNA'lar, sağlıklı kontrol grubunda düşük ifade gösterirken, primer tümör varlığında ifade artışı göstermekte olup tümörün kaybolması sonucunda neredeyse sağlıklı kontrol grup kadar ifadeleri düşmekte ve primer tümörün tekrar ortaya çıkışıyla ifadeleri artmaktadır (Şekil 3.12.).



Şekil 3. 12. K, PT, REM ve REL gruplarında ifade değişimi gösteren ortak 3 miRNA'nın mikrodizinin analizi sonucunda kat değişimlerini belirten sütun grafiği (sütunlar üzerinde belirtilen sayılar kat değişimlerini ifade etmektedir)

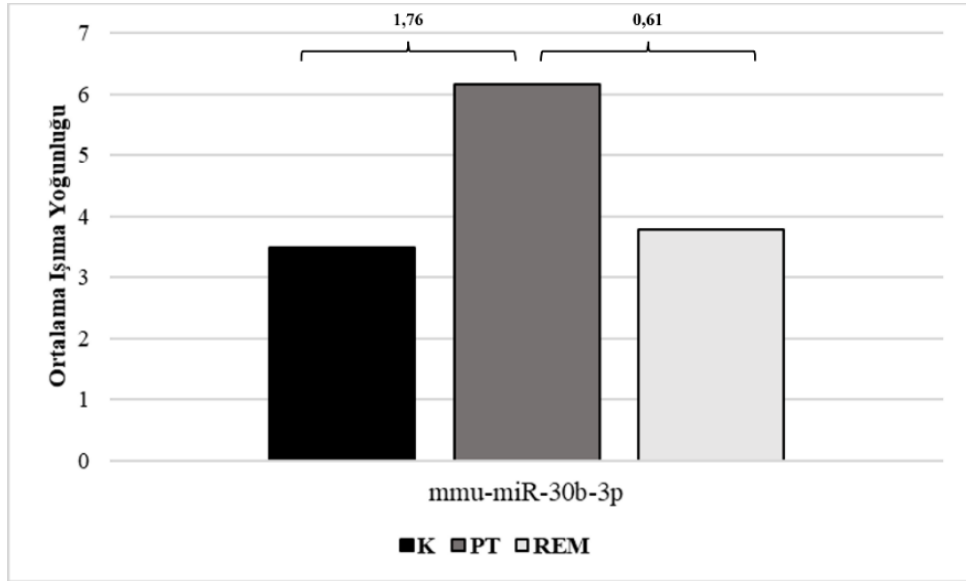
3.5.2.2. K, PT ve REM Grupları Arasındaki Ortak miRNA'lar

Primer tümör oluşumu ve gerileme süreçlerinde rol oynayan ortak miRNA'ları belirlemek için PT/K ve REM/PT grup kıyaslamalarından elde edilen istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$), 1,25 ve üzeri kat değişimi gösteren miRNA listeleri kesiştirildiğinde ortak 27 miRNA tespit edilmiştir. 27 miRNA listesini daraltmak ve istatistiksel anlamlılık seviyesini arttırmak adına liste, $p < 0,001$ olacak şekilde filtrelendiğinde mmu-miR-30b-3p isimli sadece tek bir ortak miRNA bulunmuştur (Şekil 3.13.).



Şekil 3. 13. K, PT ve REM gruplarında ifade değişimi gösteren ortak miRNA

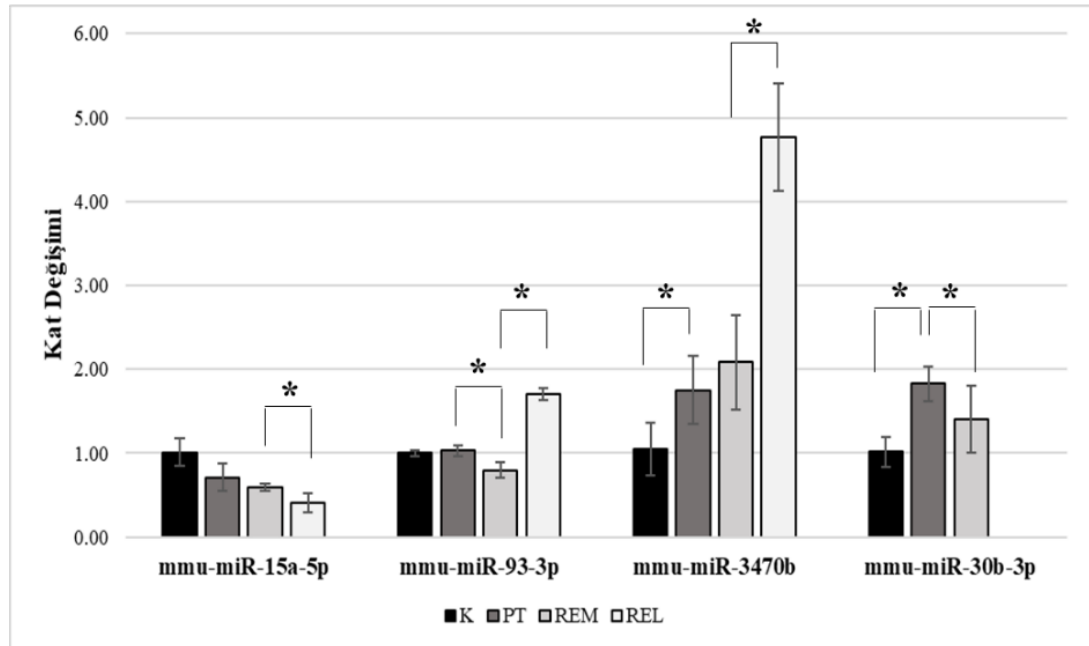
Mikrodizin analizi sonucunda mmu-miR-30b-3p, diğer ortak 3 miRNA ile aynı modeli (paterni) sergileyerek kontrol grubunda düşük ifade göstermiş, primer tümör grubunda ifadesi artmış ve remisyon grubunda tekrar ifadesi düşmüştür (Şekil 3.14.).



Şekil 3. 14. K, PT ve REM gruplarında ifade değişimi gösteren ortak miRNA'nın mikrodizin analizi sonucunda kat değişimlerini belirten sütun grafiği (sütunlar üzerinde belirtilen sayılar kat değişimlerini ifade etmektedir)

3.5.2.3. Ortak miRNA'ların Eş Zamanlı PZR ile Doğrulanması

Mikrodizin analizi sonucunda K, PT, REM ve REL grupları arası anlamlı ifade değişimi gösteren 3 ortak miRNA (mmu-miR-15a-5p, mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b) ve K, PT ve REM grupları arasında anlamlı ifade değişimi gösteren mmu-miR-30b-3p'nin eş zamanlı PZR deneyi ile ifade analizleri gerçekleştirilmiştir. mmu-miR-15a-5p mikrodizin veri analizi sonucunda gözlemlenen ifade değişimi, eş zamanlı PZR ile saptanamamıştır. Bu nedenle, miR-15a-5p ile ileri analizlere devam edilmemiştir. mmu-miR-93-3p eş zamanlı PZR analizinde K ve PT grupları arasında anlamlı fark gözlenmezken, REM grubunda PT grubuna göre anlamlı ifade azalması ve REL grubunda REM grubuna göre anlamlı ifade artışı doğrulanmıştır. mmu-miR-3470b ifadesinde, mikrodizin veri analizi ile uyumlu olarak PT grubunda K grubuna göre ve REL grubunda REM grubuna göre anlamlı artış gözlemlenmiştir. Ancak PT ve REM grupları arasında ifade, anlamlı olarak değişim göstermemiştir. mmu-miR-30b-3p eş zamanlı PZR analizi sonucunda mikrodizin veri analizi ile uyumlu olarak PT grubunda K grubuna göre anlamlı ifade artışı ve REM grubunda PT grubuna göre anlamlı ifade düşüşü ile doğrulanmıştır (Şekil 3.15.).



Şekil 3. 15. Ortak miRNA'ların eş zamanlı PZR sonucunu belirten sütun grafiği (t-test, *p<0,05)

Mikrodizin veri analizi sonucunda gruplar arasında anlamlı ve yüksek ifade değişimi gösteren mmu-miR-222-3p, mmu-miR-18a-5p, mmu-miR-151-5p, mmu-miR-6980-5p, mmu-miR-19b-3p, mmu-miR-25-3p ve mmu-miR-30e-5p'ye ait validasyon sonuçları Ek-4'te yer almaktadır.

3.6. Doğrulan Ortak miRNA'ların Tahmini Hedef Genlerinin Belirlenmesi

Eş zamanlı PZR ile doğrulaması gerçekleştirilen mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b ve mmu-miR-30b-3p'nin biyoinformatik olarak tahmini hedef gen listeleri miRWalk veritabanından elde edilmiştir. Hedef gen listeleri ile NCBI Gene veritabanından indirilen CD8 T hücre ilişkili gen listesinden ortak olan genler belirlenmiştir (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3. 5. miRWalk ve NCBI veritabanından belirlenen miRNA hedef gen sayıları

miRNA Adı	miRWalk 3.0. 3'UTR Tahmini Hedef Gen Sayısı	NCBI Veritabanı ile Ortak Tahmini Hedef Gen Sayısı
mmu-miR-93-3p	2460	93
mmu-miR-3470b	6554	231
mmu-miR-30b-3p	5521	202

3.7. miRNA Hedef Genlerinin Zenginleştiği Yolakların Belirlenmesi

Grupları arasında anlamlı ifade değişimi gösteren mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b ve mmu-miR-30b-3p miRNA'larının hedef gen listeleri ile bu genlerin fonksiyon gösterdikleri yolaklar belirlenmiştir. 3 miRNA'nın hedef genlerinin özellikle T hücre aktivasyonu, hücre ölümü, hareketi ve gen düzenlemesinden sorumlu yolaklarda zenginleştiği tespit edilmiştir (Çizelge 3.6., Çizelge 3.7., Çizelge 3.8.).

Çizelge 3. 6. mmu-miR-93-3p tahmini hedef genlerinin zenginleştiği yolların listesi

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	FDR
Otofaji	10	3.42E-05
NF-kappa B sinyal yolağı	9	3.42E-05
Sitokin-sitokin reseptör interaksyonu	13	1.45E-04
Apoptoz	9	1.64E-04
Nekroptoz	10	1.71E-04
Doğal öldürücü hücre aracılı sitotoksiste	7	0.0018
FoxO sinyal yolağı	7	0.0025
T hücre reseptör sinyal yolağı	6	0.0032
Hücre adezyon molekülleri	7	0.0079
Notch sinyal yolağı	4	0.0087
Fokal Adezyon	7	0.0175
TNF sinyal yolağı	5	0.0227
Adipositokin sinyal yolağı	4	0.0253
JAK-STAT sinyal yolağı	6	0.0253
İnsülin sinyal yolağı	5	0.0486

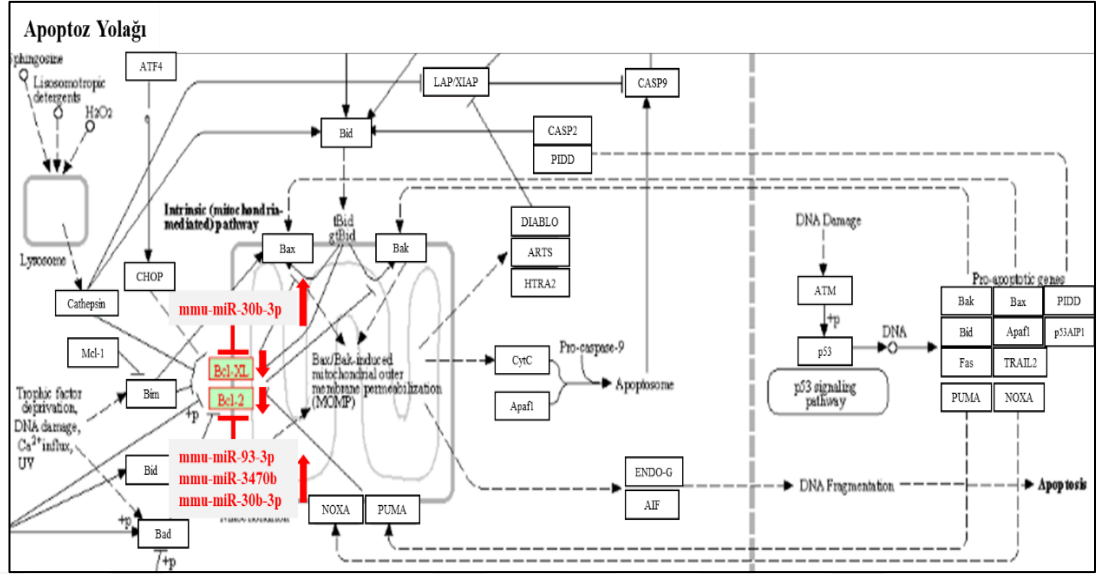
Çizelge 3. 7. mmu-miR-3470b tahmini hedef genlerinin zenginleştiği yolların listesi

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	FDR
JAK-STAT sinyal yolağı	27	1.78E-14
Apoptoz	23	5.70E-13
PI3K-Akt sinyal yolağı	34	7.09E-12
T hücre reseptör sinyal yolağı	19	1.02E-11
Doğal öldürücü hücre aracılı sitotoksiste	20	1.76E-11
Hücre adezyon molekülleri	23	3.03E-11
FoxO sinyal yolağı	20	1.18E-10
TNF sinyal yolağı	18	3.09E-10
Sitokin sitokin reseptör interaksyonu	28	5.99E-10
ErbB sinyal yolağı	15	2.89E-09
MAPK sinyal yolağı	26	8.71E-09
Fokal adezyon	21	1.57E-08
İnsülin sinyal yolağı	17	6.32E-08
Kemokin sinyal yolağı	20	7.37E-08
Otofaji	16	1.36E-07
Nekroptoz	17	1.46E-06
NF-kappa B sinyal yolağı	12	1.13E-05
VEGF sinyal yolağı	9	1.73E-05
Aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi	17	1.96E-05
Adipositokin sinyal yolağı	9	8.15E-05
mTOR sinyal yolağı	13	1.06E-04
Ras sinyal yolağı	16	1.69E-04
Antijen işleme ve sunum	9	5.16E-04
Mitofaji	7	0.0013
Hippo sinyal yolağı	10	0.0058
TGF-beta sinyal yolağı	7	0.0065
Wnt sinyal yolağı	8	0.0400

Çizelge 3. 8. mmu-miR-30b-3p tahmini hedef genlerinin zenginleştiği yolların listesi

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	FDR
JAK-STAT sinyal yolağı	26	<2.2e-16
Sitokin sitokin reseptör interaksyonu	32	7.13E-14
T hücre reseptör sinyal yolağı	18	1.61E-11
Doğal öldürücü hücre aracılı sitotoksiste	18	1.80E-10
PI3K-Akt sinyal yolağı	28	2.50E-09
Hücre adezyon molekülleri	17	2.96E-07
Kemokin sinyal yolağı	18	5.12E-07
NF-kappa B sinyal yolağı	13	9.02E-07
TNF sinyal yolağı	13	1.58E-06
Apoptoz	14	2.63E-06
Otofaji	11	2.53E-04
Antijen işleme ve sunum	8	0.0018
Adipositokin sinyal yolağı	7	0.0020
FoxO sinyal yolağı	9	0.0044
ErbB sinyal yolağı	7	0.0050
İnsülin sinyal yolağı	9	0.0063
Nekroptoz	10	0.0089
Fokal adezyon	10	0.0183
Mitofaji	5	0.0244
Ras sinyal yolağı	10	0.0406

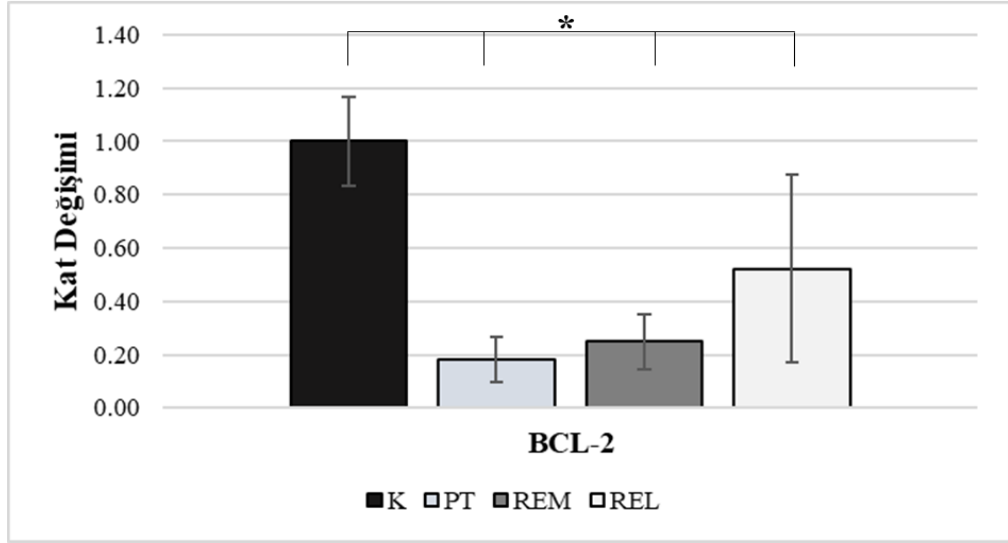
PT ve REL gruplarında mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b ve PT grubunda mmu-miR-30b-3p ifadesinin genel olarak yüksek olması ve apoptoz sürecinde 3 miRNA'nın anti-apoptotik protein BCL-2 genini ve mmu-miR-30b-3p'nin ayrıca anti-apoptotik BCL-XL genini hedefliyor olması CD8+ T hücrelerinin sağkalımlarını etkiliyor olabileceğinden T hücrelerin ortadan kaldırılmasında etkin olan apoptoz yolağına odaklanılmıştır (Şekil 3.16.).



Şekil 3. 16. Apoptoz yolağındaki miRNA hedefleri

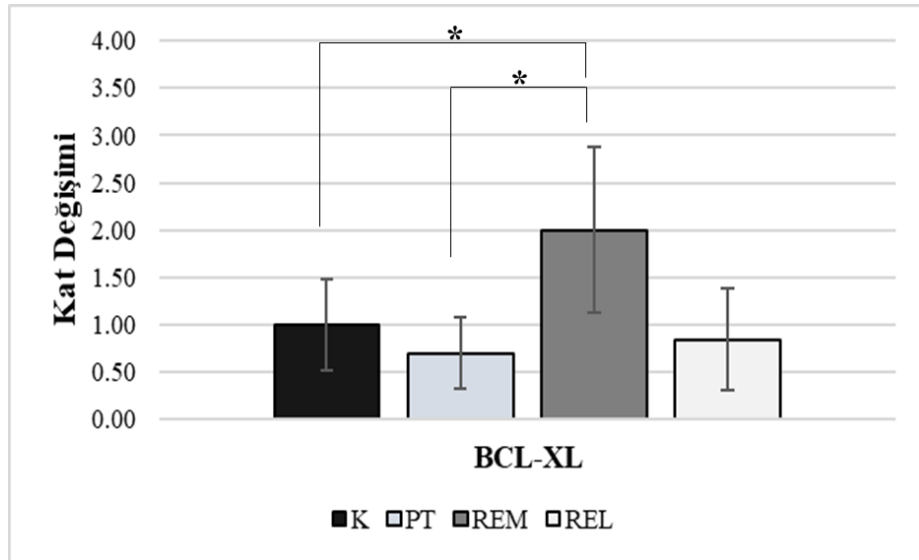
3.8. miRNA Hedef Gen İfadelerinin Eş Zamanı PZR ile Doğrulaması

Apoptoz sürecinde miRNA hedef gen doğrulaması için mmu-miR-93-3p ve mmu-miR-3470b hedefi olan anti-apoptotik BCL-2 ve mmu-miR-30b-3p hedefi olan anti-apoptotik BCL-2 ve BCL-XL genleri için eş zamanlı PZR yöntemi sonucunda analizler gerçekleştirilmiştir. Apoptoz yolağının akışını anlamak açısından miRNA hedefi olmayan ancak apoptoz sürecinde etkin rol oynayan pro-apoptotik BAX ve BAK genleri için de gruplar arası ifade profilleri belirlenmiştir. 3 miRNA'nın da hedefi olan anti-apoptotik BCL-2 geninde K grubuna göre PT, REM ve REL gruplarında anlamlı ifade azalışı gözlemlenmiştir. PT grubuna göre REM grubunda ve REM grubuna göre REL grubunda ifade artışı belirlenmiştir (Şekil 3.17.).



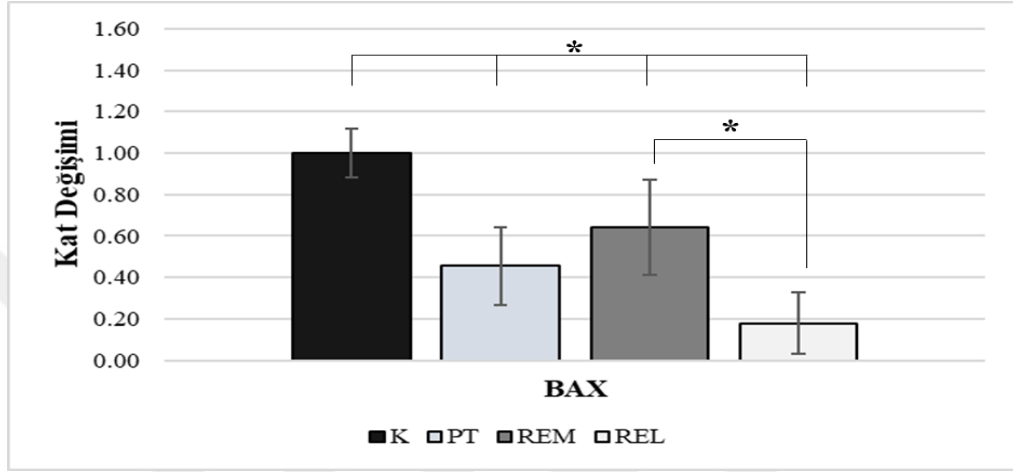
Şekil 3. 17. K, PT, REM ve REL grupları arasında mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b ve mmu-miR-30b-3p hedefi olan BCL-2 geninin eş zamanlı PZR analizini gösteren sütun grafiği (t-test, *p<0,05)

mmu-miR-30b-3p hedefi olan anti-apoptotik BCL-XL ifadesi, K ve PT grupları arasında azalma göstermiştir. REM grubunda PT grubuna göre anlamlı olarak ifadesi artarken, REL grubunda REM grubuna göre ifade düşüşü gözlemlenmiştir (Şekil 3.19.). miRNA hedef genleri BCL-2 ve BCL-XL'in PT grubunda ifadelerinin azalması, meme tümörü oluşmuş farelerde CD8+ T hücrelerin apoptozunu uyarırken, REM grubunda artan ifadeleri ile sağkalımı desteklemektedir.



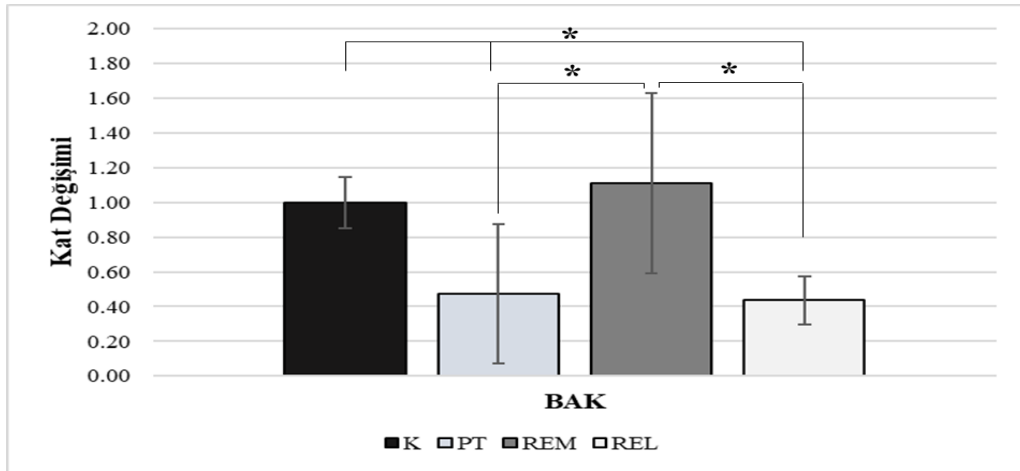
Şekil 3. 18. K, PT, REM ve REL grupları arasında mmu-miR-30b-3p hedefi olan BCL-XL geninin eş zamanlı PZR analizini gösteren sütun grafiği (t-test, *p<0,05)

Apoptozun mitokondriyal yolağında görev alan, BCL-2 ve BCL-XL ile direkt etkileşimi bulunan pro-apoptotik BAX geninin ifadesinde K grubuna göre diğer gruplarda anlamlı ifade azalışı gözlemlenmiştir. PT grubuna göre REM grubunda ifade artışı olurken, REL grubunda REM grubuna göre anlamlı ifade azalışı saptanmıştır (Şekil 3.19.).



Şekil 3. 19. K, PT, REM ve REL grupları arasında BAX geninin eş zamanlı PZR analizini gösteren sütun grafiği (t-test, *p<0,05)

Pro-apoptotik BAK geni ifadesi, K grubuna göre PT ve REL gruplarında anlamlı olarak azalmıştır. PT grubuna göre REM grubunda BAK ifadesi anlamlı olarak artarken, REL grubunda REM grubuna göre ifadesi anlamlı olarak azalış göstermiştir (Şekil 3.20.).

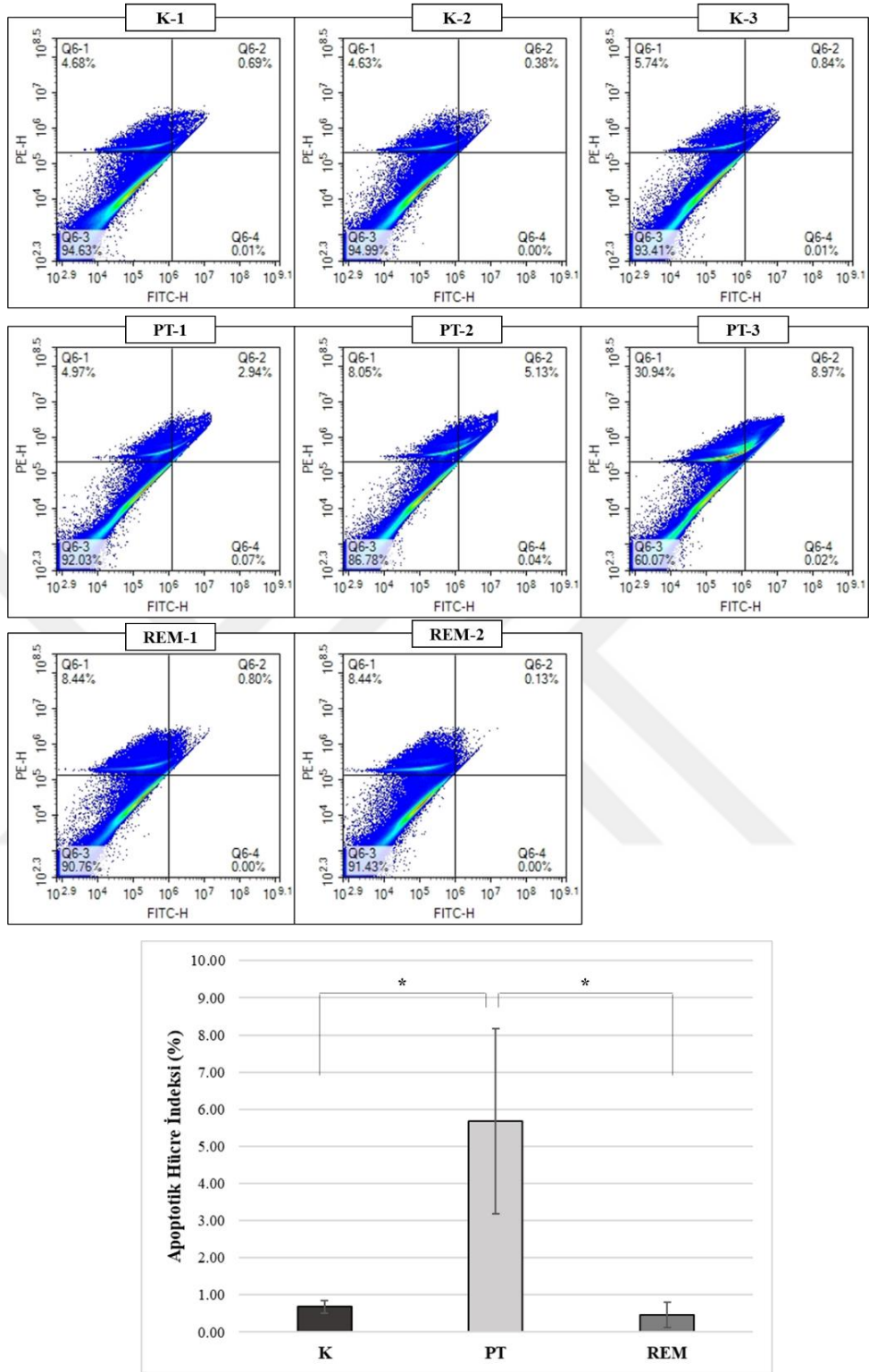


Şekil 3. 20. K, PT, REM ve REL grupları arasında Bak geninin eş zamanlı PZR analizini gösteren sütun grafiği (t-test, *p<0,05)

Eş zamanlı PZR analizleri sonucunda anti-apoptotik BCL-2 ve BCL-XL genleri ile pro-apoptotik BAX ve BAK genleri, gruplar arasında aynı yönde ifade değişimi göstermiştir. Eş zamanlı PZR analizi sonucu elde edilen kat değişim değerleri ile BAX/BCL-2 oranına bakılarak apoptozun yönü anlaşılmaya çalışılmıştır (Azimian ve ark., 2018). BAX/BCL-2 oranı, PT grubunda K grubuna göre 2,52, REM grubunda PT grubuna göre 1,03, REL grubunda REM grubuna göre ise 0,54 olarak saptanmıştır. mRNA düzeyinde elde edilen bu değerler, PT grubunda K grubuna göre apoptoz artışını, REM grubunda ise PT grubuna göre değişim olmadığını ve REL grubunda REM grubuna göre ise apoptozun azaldığını göstermektedir.

3.9. Flow Sitometri ile Apoptoz Analizi

miRNA'ların apoptoz yolağında anti-apoptotik genleri hedeflemesi ve eş zamanlı PZR yöntemi ile K grubundan PT grubuna geçişte apoptozun azalması ve PT grubundan REM grubuna geçişte apoptoz artışı sonucunda ileri validasyon için flow sitometri analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda, PT grubunda K grubuna göre anlamlı apoptoz artışı ve REM grubunda PT grubuna göre anlamlı apoptoz azalışı ile mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b ve mmu-miR-30b-3p miRNA'larının üçlü negatif meme kanseri oluşum ve gerileme süreçlerinde CD8⁺ T hücrelerin sağkalımını regüle ettiği doğrulanmıştır (Şekil 3.21.).



Şekil 3. 21. mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b ve mmu-miR-30b-3p'nin K, PT ve REM gruplarındaki apoptotik etkisini gösteren saçılım grafikleri ve sütun grafiği (t-test, *p<0,05)

4. TARTIŞMA

Kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanserinin yaklaşık %15'ini oluşturan üçlü negatif meme kanseri (TNBC) alt tipi, diğer alt tiplere göre daha kötü prognoz sergilemektedir (Dent ve ark., 2007). Kötü prognozu, hızlı bölünme özelliği sayesinde kazandığı heterojenik yapı ile çoğunlukla daha invazif ve uzak organ metastazı yapabilme kapasitesi ile bağlantılıdır. Erken evrelerde sağkalım oranları, TNBC olmayan (non-TNBC) alt tipler ile benzerlik gösterirken (TNBC: %94,74; non-TNBC: %96,50), özellikle metastatik yayılımın olduğu 4. evrede bu oranlar arasındaki fark (TNBC: %10,81; non-TNBC: %33,44) ciddi ölçüde artmaktadır (Hsu ve ark., 2022). Erken evreden metastatik sürece geçişte birçok faktör olmakla birlikte, kanser hücrelerinin ayırt edici özelliklerinden biri olan immün düzenleme (immune-editing) ile immün sistem baskısından kaçış mekanizmaları da önemli rol oynamaktadır. Meme kanseri son yıllara kadar geleneksel olarak immünojenik bir kanser şeklinde kabul edilmemekle birlikte, erken evre TNBC'ler, yüksek seviyelerde immün infiltrasyon göstermektedir. Ancak nüks gösteren TNBC'lerde, immün aktive edici gen ekspresyon imzaları ve TIL'lerin önemli ölçüde azaldığı ortaya çıkarılmıştır (Hutchinson ve ark., 2020; Szekely ve ark., 2018). Bu bilgiler, meme kanserinde alt tip bazında özellikle erken evrede, kanser hücrelerine karşı bir immün yanıtın olduğu ancak daha agresif forma geçişte immün sistemin çeşitli mekanizmalar ile baskılandığını göstermektedir. Bu doktora tez çalışmasında, TNBC oluşum ve gelişim süreçlerinde immün sistem yanıtını araştırmak için öncelikle, fare üçlü negatif meme kanseri hücre hattı 4T1 ile allograft in vivo fare modeli oluşturulmuştur. BALB/c farelerde 4T1 hücreleri ile oluşturulan kanser modelinin, insandaki TNBC sürecini taklit ederek tümörün oluşumu, gelişimi ve spontan bir şekilde metastaz oluşumu aşamalarını içeren bir pre-klinik model olduğu belirtilmiştir (Pulaski ve Ostrand-Rosenberg, 2000). Tao ve ark. (2008) yaptığı çalışmada ise BALB/c farelerde 4T1 hücreleri ile primer tümör gelişiminin iki fazlı olduğunu bildirmiştir. Primer tümörün ilk oluşumu, enjeksiyondan sonra iki hafta içerisinde gerçekleşir. Tümörün oluşum gösterdiği bu aşama, çalışmamızda erken evre TNBC sürecini incelemek için Primer Tümör (PT) grubu olarak adlandırılmıştır. Primer tümör gelişimini takiben 3. ve 4. haftalarda gerçekleşen

regresyon fazı, nekrozun artışı ve lenfosit infiltrasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bu aşamada, primer tümörü kaybolan gruptan aldığımız örnekler, erken evrede primer tümöre karşı oluşan immün yanıtı incelemek için Remisyon (REM) grubu olarak adlandırılmıştır. 5. ve 6. haftadan itibaren ikinci büyüme fazına girilerek primer tümörün tekrar büyüme gösterdiği ve hatta spontan olarak akciğer, karaciğer, lenf düğümleri ve beyinde metastatik odakların geliştiği belirtilmiştir. Bu aşama, evre IV insan meme kanseri için hayvan modeli sağlamaktadır. Çalışmamızda primer tümörün tekrar ortaya çıkışını temsil eden bu gruptan alınan fare örnekleri, Relaps (REL) grubumuzu oluşturmuştur. Bu çalışmada, sağlıklı kontrol grubunu (K) da içeren toplam 4 grup ile TNBC oluşum ve gelişim süreçleri immün sistem açısından incelenmiştir.

Birkaç çalışma, TNBC'li hastalarda tümöre sızan mononükleer immün hücrelerin sayısı ile nüksüz sağkalım arasında doğrusal bir ilişki olduğunu göstermiştir (Adams ve ark., 2014; Loi ve ark., 2013). Tümör dokusu içerisindeki mononükleer hücrelerin fenotipi, özellikle hastalığın seyrini etkilemektedir. Bu bağlamda, özellikle immün cevabın ana efektör hücreleri CD8⁺ T hücreler başta olmak üzere, CD4⁺ yardımcı T hücreler, doğal öldürücü hücreler, M1 makrofajlar ve dendritik hücrelerin tümör dokusunda yer alması iyi prognoz göstergesi olarak belirtilirken, regülatör T hücreler, M2 makrofajlar ve olgunlaşmamış dendritik hücrelerin varlığı kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Deng ve ark., 2019). Ek olarak, meme kanserinde CD8⁺ T hücrelerin tümör dokusuna infiltrasyonu ile standart kemoterapi ve anti-CTLA-4, anti-PD-1 gibi immün kontrol noktası blokajı tedavilerine daha iyi yanıt verdiği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2016; Mao ve ark., 2014; Rashidian ve ark., 2017; Seo ve ark., 2013). Aktive edilmiş CD8⁺ T lenfositlerin kanser hücrelerini çeşitli mekanizmalarla öldürebildiği bilinmektedir (Martínez-Lostao ve ark., 2015). Bu nedenle meme kanserinde özellikle hedefe yönelik tedavilere, belirteç yoksunluğu nedeniyle uygun olmayan TNBC alt tipinde, CD8⁺ T hücrelerin tümör dokusundaki fonksiyonu ve bunu düzenleyen mekanizmaları karakterize etmek önemlidir. Bu tez çalışmasında odak noktamız olan CD8⁺ T lenfositler, tümör hücrelerini direkt öldürme kapasitesine sahip, iyi prognoz göstergesi olması sebebiyle seçilmiş olup TNBC oluşum ve gelişim aşamalarında bu hücrelerdeki

moleküler profillerin ortaya konması ile kanser hücrelerine karşı oluşturulan immün yanıtın anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. CD8+ T hücreler ile TNBC ilişkisini inceleyen çalışmalar, genel olarak standart tedavilere yanıtları açısından klinik verilerden gelmekte ve çoğunlukla tümör mikroçevresindeki lokal immün yanıtlara odaklanmaktadır. Ancak, immün sistem sistemik bir şekilde koordine edilmektedir. Dolayısıyla tümöre karşı immün yanıt, lokal immün hücrelerin yanı sıra periferik immün sistemin tüm hücrelerini kapsamaktadır. Bu sebeple çalışmamızda tümör dokusundaki CD8+ T hücrelerden ziyade sekonder lenfoid organ olan dalaktan izole edilen CD8+ T hücreler ile çalışmalar yürütülmüş ve TNBC oluşum ve gelişiminde immün sistemin ilk tepkisi araştırılmaya çalışılmıştır.

CD8+ T hücrelerde fonksiyon gösteren yolaklarda yer alan protein ve gen ifadeleri oldukça çalışılmış olup, aktivasyon, efektör fonksiyon, hafıza hücrelerine geçiş ve tükenmiş fenotipin oluşum süreçlerinde rol oynayan moleküllerin profilleri ortaya çıkarılmıştır (Fuchs ve ark., 2019; Sousa ve ark., 2019; van der Leun ve ark., 2020; Wherry ve ark., 2007). Hücreler birçok yolağı regüle etme kapasitene sahip, kodlanmayan kısa RNA molekülleri olan miRNA'ların, CD8+ T hücrelerin fonksiyonlarını nasıl regüle ettiği sorusunun cevabını bulmak için araştırmalar, genellikle CD3 antikoru veya enfeksiyon ajanı ile *in vitro* olarak uyarımın ardından mekanizmayı aydınlatmaya odaklanmıştır (Gagnon ve Ansel, 2019). Melanom (Nguyen ve ark., 2021), glioma (J. Yang ve ark., 2017), kolorektal kanser (Lou ve ark., 2019b; J. Zheng ve ark., 2021) gibi solid tümörlerde CD8+ T hücrelerdeki miRNA rollerini inceleyen çalışmalar olmakla beraber , TNBC oluşumu ve gelişimi boyunca CD8+ T hücrelerdeki moleküler değişiklikleri miRNA profilleri düzeyinde inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Tüm bu bilgiler ve eksikliklerden yola çıkarak kurguladığımız bu doktora tez çalışmasında, *in vivo* modelde üçlü negatif meme tümörlerinin oluşum, gerileme ve rekürans süreçlerinde tümör hücrelerine karşı oluşan immün yanıtın durumu, CD8+ T lenfositlerdeki miRNA imzaları açısından değerlendirilmiştir.

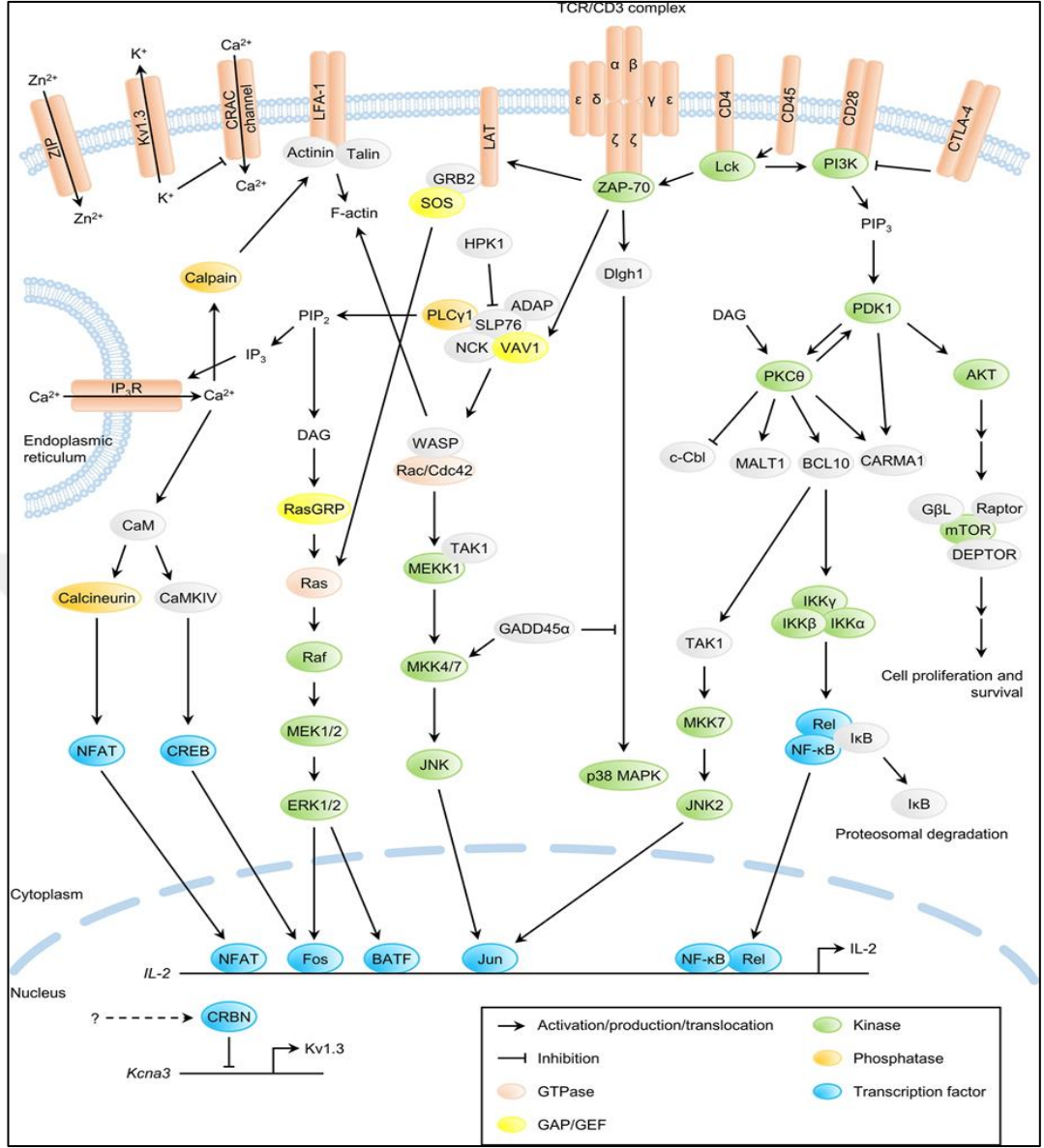
Araştırma bulgularında immün sistemin fonksiyonuna dair ilk veri, tümör taşıyan PT ve REL gruplarındaki dalak ağırlıkları ve boyutlarının, K ve REM

gruplarına göre artan değerleridir (Şekil 3.3. ve Şekil 3.4.). Splenomegali olarak adlandırılan bu artış, 4T1 ile oluşturulan fare meme kanseri modelinde daha önce gözlenmiş olup doğrudan tümör büyümesi ile ilişkilendirilmiş ve tümör hücrelerinden kaynaklı beyaz kan hücrelerinin sayılarının artışı olarak belirtilmiştir (duPre' ve Hunter, 2007; Sterle ve ark., 2018). Tümöre karşı oluşan doğuştan ve adaptif immün yanıtı sistemik olarak düzenleyen sekonder lenfoid organ olan dalağın (Bronte ve Pittet, 2013) sonuçlarımızdaki hacimsel artışı ile TNBC oluşumu ve gelişiminde immün sistemin fonksiyon gösterdiği doğrulanmıştır.

Çalışmamızın devamında K, PT, REM ve REL gruplarından izole edilen splenik CD8+ T hücrelerde mikrodizin yöntemi ile miRNA profilleri belirlenmiştir. Primer tümörün oluşumuyla erken evre TNBC grubunu temsil eden bireyler ile sağlıklı bireyler arasında, 41 miRNA'nın anlamlı şekilde, 1,25 kat ve üzeri ifade değişimi gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 3.2.). Primer tümörün oluşumundan gerileme sürecine geçişte hangi miRNA'ların rol aldığını anlamak için PT grubu REM grubu ile kıyaslanarak 75 miRNA'nın anlamlı ifade değişimi gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 3.3.). Tümörün kaybolduğu REM grubu ile nüks gösteren REL grupları kıyaslanarak 78 miRNA'nın, ileri TNBC evresine geçişte fonksiyon gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 3.4.). Çalışmayı daha odaklı bir şekilde sürdürebilmek nedeniyle tüm gruplarda biyobelirteç olabilecek miRNA'ları belirlemek için 3'lü (K/PT, PT/REM, REM/REL) ve 2'li kıyaslama (K/PT, PT/REM) sonuçlarında ortak olan miRNA'lara odaklanılmıştır (Şekil 3.10. ve 3.13.). Eş zamanlı PZR ile en az 2 kıyas arasında doğrulamaları yapılan mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b ve mmu-miR-30b-3p'nin (Şekil 3.15.) erken evre PT grubunda ifadelerinin artması, daha sonra tümörü kaybolan REM grubunda ifadelerinin düşmesi ve mmu-miR-93-3p ve mmu-miR-3470b için nüks görülen ileri evre REL grubunda tekrar ifadelerinin artması aynı paterni sergilemeleri açısından ve özellikle tümör taşıyan farelerde yüksek ifade göstermelerinden dolayı tümör hücrelerine immün sistemden kaçış sağlıyor olabilir düşüncesiyle CD8+ T hücreler ile ilişkili hedef genleri belirlenerek zenginleştikleri yollar tespit edilmiştir. Sonuçta, CD8+ T hücreler ile bağlantılı olarak bu 3 miRNA'nın, T hücre reseptör (TCR) sinyal yolağı ile T hücre aktivasyonunu (Mørch ve ark., 2020), TCR yolağı ile bağlantılı olarak aktive edilen ve T hücrelerin

apoptozdan korunmanın yanı sıra çoğalma ve farklılaşmalarını destekleyen sitokinlerin üretiminde rol oynayan NF- κ B sinyal yolağını (Hayden ve ark., 2006), immün regülasyondan sorumlu JAK-STAT sinyal yolağını (Shuai ve Liu, 2003), immün cevabın erken dönemlerinde CD8+ T hücrelerin proliferasyonu destekleyen ancak ileri aşamalarda CD8+ T hücrelerin apoptoz sürecinden sorumlu TNF sinyal yolağını (Ye ve ark., 2018), hücrelerin sağkalımından sorumlu otofaji yolağını (Xu ve ark., 2014) ve hücrelerin ortadan kaldırılmasında rol oynayan apoptoz (Zhang ve ark., 2005) ve nekroptoz (Chen ve ark., 2011) yollarını regüle edebileceği belirlenmiştir.

CD8+ T hücrelerde TCR sinyalizasyonu kilit bir rol oynamaktadır. CD8+ T hücrelerin yüzeyinde bulunan $\alpha\beta$ T hücre reseptörleri, CD3 ve CD8 moleküllerinin oluşturduğu kompleks ile antijen sunan hücrelerin yüzeyinde bulunan antijen taşıyan MHC-I moleküllerinin birleşimi ve co-reseptör molekül CD28-CD80/86 bağlantısı ile efektör aktivasyon gerçekleşir ve TCR sinyal yolağı uyarılır. TCR sinyalizasyonu, T hücrelerin klonal proliferasyonu ve efektör fonksiyonlarını sergileyebilmeleri için Şekil 4.1.'de görülebileceği gibi birçok yolak ile bağlantı halindedir.



Şekil 4. 1. T hücrelerde TCR sinyalizasyonu ve ilişkili yollar (Hwang ve ark., 2020)

mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b ve mmu-miR-30b-3p'nin hedef genlerinin TCR yolağında zenginleşmesi dikkat çekmiştir (Şekil 4.2.).

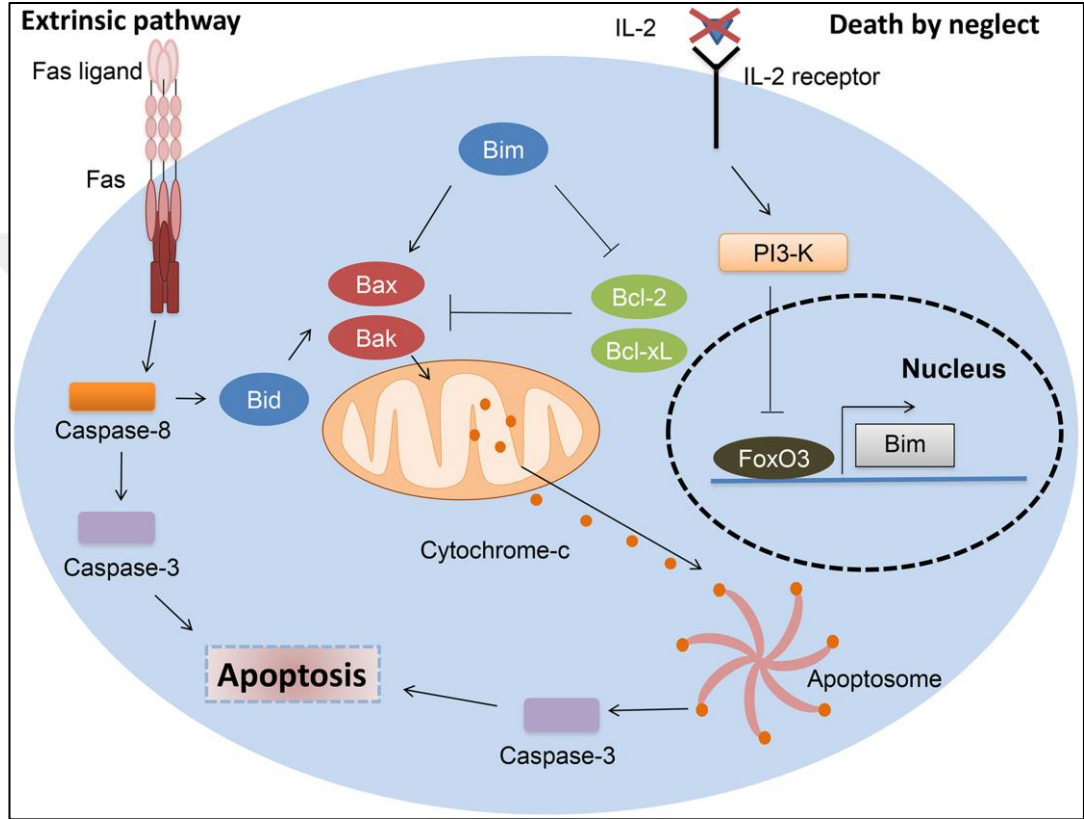
transkripsiyon faktörleri NF- κ B ve AP-1'in aktivasyonu için gerekli kinaz PRKCQ ve Ras-Raf-MAPK yolağında bir GTPaz olan NRAS genlerini hedeflemesi ile TNBC hücrelerine karşı CD8+ T hücre aracılı sistemik immün yanıtın baskılanmasında rol oynuyor olabileceğini göstermektedir. Daha önce literatürde belirtilmemiş olan miR-93-3p ve PDPK1, PRKCQ ve NRAS ilişkilerinin ileri analizleri, meme kanseri immünolojisi açısından önemli olabilir. Bir diğer miRNA olan mmu-miR-3470b'nin, TCR sinyalizasyonunda özellikle CD28/ICOS aracılı PI3K-AKT yolağı ve Ras-Raf-MAPK yolağındaki birçok geni hedefliyor olması mmu-miR-93-3p ile benzer şekilde CD8+ T hücrelerin proliferasyon ve immün cevabının baskılanmasına yol açıyor olabilir. miR-3470b ve kanser immünolojisi açısından literatürde henüz bir bağlantı yayımlanmamıştır ve çalışmalar daha çok enfeksiyon ve nöral hastalıklar üzerinedir. 2012 yılında Rabies viral enfeksiyonu ile indüklenen farelerin beyin dokularında yapılan bir miRNA çalışmasında, mmu-miR-3470b'nin anlamlı bir şekilde artış gösterdiği ve farklı hedef genler ile biyoinformatik olarak MAPK sinyal yolağı ilişkisi ortaya konmuştur (Zhao ve ark., 2012). Bu çalışma, mmu-miR-3470b'nin immün sistem sürecinde rol aldığına dair bir ilişki teşkil etmektedir. Biyoinformatik olarak elde ettiğimiz mmu-miR-3470b ile T hücre proliferasyonunda etkin rol oynayan PI3K-Akt ve Ras-Raf-MAPK yolağında zenginleşen miRNA hedef genlerinin deneysel süreçler ile valide edilmesi gerekmektedir. Gruplar arası anlamlı ifade değişimi gösteren bir diğer ortak miRNA mmu-miR-30b-3p'nin, TCR sinyal yolağında CD3, CD28, PTPRC gibi aktivasyondan sorumlu genleri, özellikle proliferasyonda pozitif rol oynayan PIK3R1, RASGRP1, MAPK1 genlerini biyoinformatik olarak hedeflediği bulunmuştur. PT grubunda artan ifadesi ile diğer 2 ortak miRNA'ya benzer bir şekilde CD8+ T hücrelerin aktive edilmesi ve klonal çoğalmasını erken dönemde regüle ediyor olabilir. 3 ortak miRNA arasında miR-30b-3p, en çok çalışılan miRNA olmakla birlikte kanser immünolojisi ve özellikle CD8+ T hücrelerdeki fonksiyonlarına dair çalışma bulunmamaktadır. Otoimmün göz iltihap rahatsızlığı bulunan sıçanlarda yapılan bir deneysel çalışmada, periferik kan lenfositlerindeki miRNA profili incelenmiş ve miR-30b-3p'nin anlamlı bir şekilde sağlıklı gruba göre ifadesinin azaldığı bulunmuştur (Guo ve ark., 2015). T hücrelerin anahtar rol oynadığı otoimmün üveit patogenezinin incelendiği bu çalışmada, miR-30b-3p ifadesinin azalması, sonuçlarımız ile bağlantılı olarak TCR aktivasyonu ve proliferasyonunda aktif rol

oyunayan hedef genlerin ifadelerinin artışı sonucu otoimmüniteye sebep olan T lenfositlere katkı sağlıyor olabilir. Başka bir çalışmada, insan ve fare arasında %100 homoloji bulunan miR-30b'nin insan kökenli antijen sunan hücrelere mimic ile transfeksiyonu sonucunda kontrol grubuna göre antijen sunumunda %38 azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca miR-30b-3p mimic ile transfekte edilmiş fare kemik iliği kökenli dendritik hücrelerin CD4+ T hücreler ile co-kültür edilmesi ile T hücrelerin proliferasyonu kontrol mimic grubuna göre %27 azalmıştır (Naqvi ve ark., 2016). İmmün hücrelerde yapılan bu çalışmalarla benzer bir şekilde, çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgularla mmu-miR-30b-3p'nin özellikle immün-baskılayıcı şekilde regülasyondan sorumlu olduğu düşünülebilir. Hepatoselüler karsinoma hücrelerinde ifadesi arttırılan miR-30b-3p'nin PI3K/Akt yolağını baskılayarak kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği ve yüksek miR-30b-3p ifadesi gösteren hepatoselüler karsinoma hastalarının, düşük ifade gösteren bireylere göre uzun yaşadığı belirtilmiştir (Gao ve ark., 2019). Bu sonuçlardan miR-30b-3p'nin hücre tipinden bağımsız olarak anti-proliferatif regülasyondan sorumlu olduğu söylenebilir. Sonuç olarak, erken evre PT grubunda ve ileri evre REL grubunda artan mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b, mmu-miR-30b-3p ifadeleri, TCR sinyalizasyonu ve ilişkili PI3K-Akt ve Ras-Raf-MAPK yolları üzerinden TNBC'ye karşı oluşan sistemik CD8+ T hücre yanıtını baskılıyor olabilir. Bu sonuç, mikrodizin deneyleri sonucu biyoinformatik analizler ile elde edilmiş olup biyolojik olarak validasyonu gerekmektedir.

Ortak 3 miRNA'nın biyoinformatik olarak TCR sinyalizasyonu sonucunda özellikle anti-proliferatif etki göstermeleri ve hücre ölüm mekanizmalarından apoptoz yolağında özellikle anti-apoptotik genleri hedefliyor olmaları, tümör taşıyan PT ve REL gruplarında tümör hücreleri ile savaşıma potansiyeline sahip CD8+ T hücrelerin fonksiyon gösteremediği ve hatta ortadan kaldırılarak bir çeşit immün kaçış gerçekleştiğini düşündürmüştür. Apoptoz yolağı, T hücrelerin gelişimsel süreçlerinde, efektör fonksiyonlarından sonra homeostazın korunmasında ve tükenmişlik fenotipinde önemli bir yolaktır (Murali ve Mehrotra, 2011). PT ve REL gruplarında ifadeleri artan mmu-miR-93-3p ve mmu-miR-3470b'nin özellikle intrinsik apoptoz yolağında anahtar rol oynayan anti-apoptotik BCL-2 genini hedefliyor olması ve de PT grubunda artış gösteren mmu-miR-30b-3p'nin anti-apoptotik BCL-2 ve BCL-XL

genlerini hedeflemesi, tümör hücrelerine karşı oluşan CD8+ T hücre aracılı immün cevapta fonksiyon gösteremeyip ortadan kaldırıldıklarını belirtiyor olabilir. Bu sebeple ileri analizlerde özellikle CD8+ T hücrelerin sağkalım-ölüm kaderlerini incelemek için apoptoz yolağındaki miRNA hedef genleri ve akışı anlamak açısından hedef genlerin ilişkili olduğu genler eş zamanlı PZR ile incelenmiştir. Sağlıklı kontrol grubuna göre PT grubunda BCL-2 ifadesinin anlamlı bir şekilde azaldığı ve REM grubunda ifadesinin artma trendi gösterdiği doğrulanmıştır (Şekil 3.17.). Ortak 3 miRNA ile gruplar arasında gösterdiği ters ifade, BCL-2'nin mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b, mmu-miR-30b-3p miRNA'larının hedefi olma ihtimalini güçlendirmiştir. Benzer bir sonuç, PT grubunda ifadenin azalması ve REM grubunda artışı ile mmu-miR-30b-3p'nin bir diğer anti-apoptotik hedef geni BCL-XL'de de gözlemlenmiştir. Anti-apoptotik gen ifadelerinin tümör taşıyan farelerin CD8+ T hücrelerinde azalması, bu anti-tümör hücrelerin apoptoz aracılığıyla ortadan kaldırılmasına katkı sağlıyor olabilir. Daha önce miR-93-3p ve BCL-2 ilişkisi, berrak hücreli renal karsinoma hücrelerinin anti-miR-93-3p ile transfekte edildiği bir çalışmada, anti-apoptotik BCL-2 ifadesinin azaldığı ve pro-apoptotik BAX ifadesinin arttığı şeklinde gösterilmiştir (L. Wang ve ark., 2017). miR-3470b ile BCL-2 arasındaki ilişki daha önce değinilmemiş olup, bu çalışma ile bu ilişki ilk kez kurulmaktadır. BCL-2'nin miR-30b-3p'nin direkt hedefi olduğuna dair doğrulama ise miR-30b'nin prekürsör (stem-loop) formu ile luciferaz deneyi sonucunda HEK-293 hücrelerinde gösterilmiştir (Wei ve ark., 2014). Mitokondriyal apoptoz yolağında bir diğer önemli anti-apoptotik gen olan BCL-XL, PT grubunda artış gösteren mmu-miR-30b-3p'nin biyoinformatik olarak hedefi bulunması üzerine yapılan eş zamanlı PZR deneyi sonucunda miRNA ile ters ilişki göstererek PT grubunda anlamlı bir şekilde azaldığı ve REM grubunda tekrar artışa geçtiği bulunmuştur (Şekil 3.18.). Literatürde miR-30b-3p'nin apoptoz sürecinde BCL-XL geni üzerinden regülasyon yaptığına dair bir kanıt yoktur ve bu çalışma ile bu ilişki ilk kez ortaya konmuştur. Ortak 3 miRNA ve BCL-2, BCL-XL hedef genlerin direkt ilişkisi, ileri analizler ile de doğrulanmalıdır. Aktive edilmiş T hücrelerin hayatta kalma programlarının değiştiği bilinmektedir. Bu çalışma ile TNBC erken ve ileri evrelerinde, CD8+ T hücrelerde mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b ve mmu-miR-30b-3p aracılığıyla BCL-2 ve BCL-XL anti-apoptotik genler baskılanarak apoptoz sürecinin indüklendiği dolaylı olarak gösterilmiştir. Şekil 4.3.'te

görülebileceği gibi apoptozun mitokondriyal yolağında BCL-2 ve BCL-XL ile direkt etkileşime giren, aktive edilmeleri sonucunda mitokondriden Sitokrom C salınımı ile apoptozom oluşumuna katkıda bulunan pro-apoptotik genler BAX ve BAK'ın deney gruplarındaki ifade durumları eş zamanlı PZR ile analiz edilerek CD8+ T hücrelerin sağkalım ve ölüm durumları incelenmiştir.



Şekil 4. 3. Apoptoz yolağı (Rodrigues ve ark., 2014)

BCL-2 ve BCL-XL ile benzer paterne sahip olarak BAX ve BAK genlerinde K grubuna göre PT grubunda ifade düşüşü ve de PT grubuna göre REM grubunda ifade artışı gözlemlenmiştir (Şekil 3.19.-20.). Mekanizma olarak, supresör BCL-2 ve BCL-XL moleküllerinin bu gruplarda azalan ifadesi sonucu BAX ve BAK genlerinde artış beklenmektedir. Apoptozun ne yönde olduğunu anlamak için BAX/BCL-2 oranı kullanılarak, PT grubunda K grubuna göre 2,52 kat ile artış, REM grubunda PT grubuna göre ise 1,02 kat ile değişim göstermediği ve de REL grubunda REM grubuna göre 0,54 bulunmuştur. Nihai sonuç, geç apoptoz belirteci olan Annexin-V ile flow sitometri analizi sonucunda PT grubunda K grubuna göre anlamlı apoptoz artışı ve

REM grubunda PT grubuna göre anlamlı apoptoz azalışı ile splenik CD8+ T hücrelerin TNBC oluşumunun erken evrelerinde apoptoz yolağı aracılığıyla baskılandığını göstermektedir. Flow sitometri ile tümör taşıyan farelerde gözlemlenen CD8+ T hücrelerdeki apoptoz artışının mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b ve mmu-miR-30b-3p aracılığıyla BCL-2 ve BCL-XL genleri üzerinden regüle ediliyor olabileceği düşünülmektedir. Daha önce klinik veriler ile ortaya konan dolaşımdaki veya tümör dokusundaki CD8+ T hücrelerin varlığının iyi prognoz göstergesi olması ve sayılarının azalması ile hastalığın seyrinin kötü yönde etkilenmesi sonuçlarımız ile uyumludur (Lin ve ark., 2018; Stanton ve Disis, 2016).

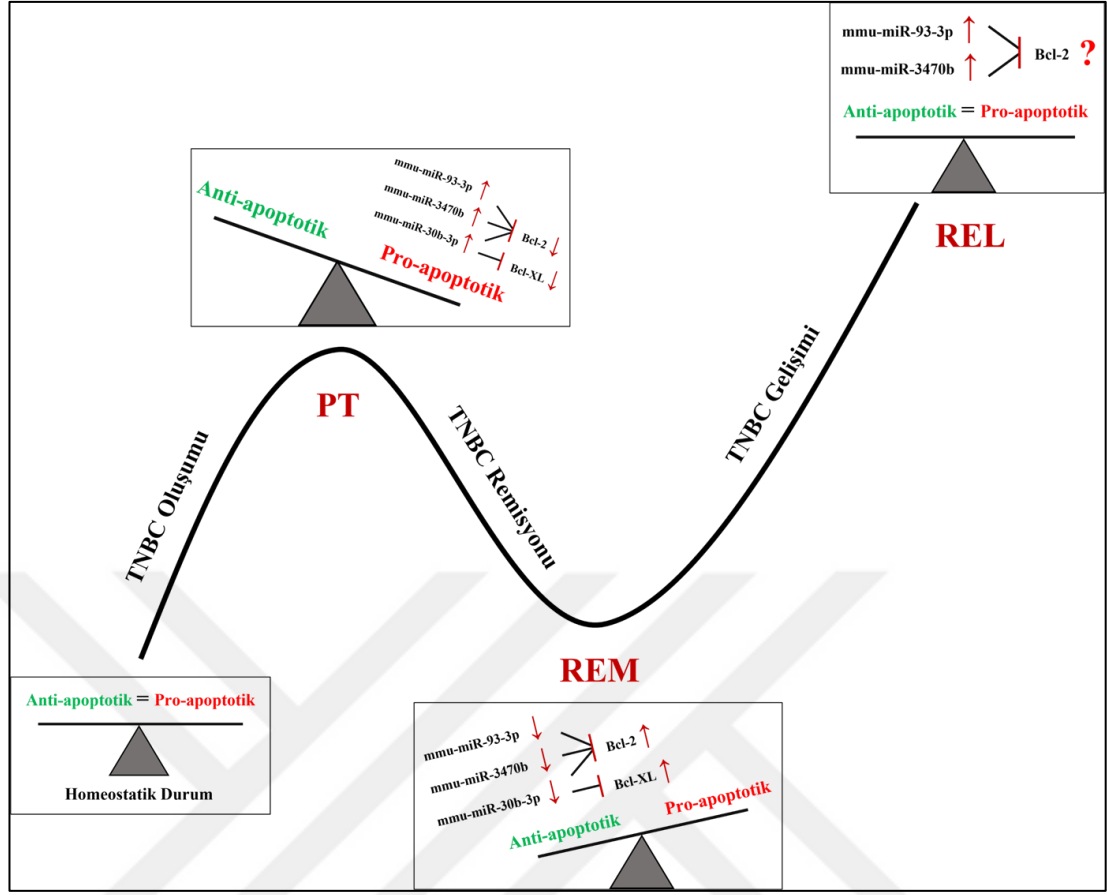
Sonuç olarak, TNBC oluşumunda apoptoz yolağı ile CD8+ T hücreler ortadan kaldırılmaktadır. Bu süreçte artan mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b, mmu-miR-30b-3p ifadeleri, BCL-2 ve BCL-XL hedeflerini baskılayarak fonksiyon gösteriyor olabilir. Üçlü negatif meme kanserinde, mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b ve mmu-miR-30b-3p tümöre karşı immün yanıtın durumunu belirleyen biyobelirteçler olarak kullanılabilir. Daha önce ortaya konmamış bu mekanizmanın ileri deneyler ile doğrulanması gerekmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma sonucunda,

- Erken evre TNBC oluşumunda splenik CD8+ T hücrelerde anlamlı farklılık gösteren miRNA profilleri belirlenmiştir.
- Tümörün gerilemesi sonucunda anlamlı değişim gösteren miRNA profili aydınlatılmıştır.
- Nüks sürecine geçişte rol oynayan anlamlı miRNA profili belirlenmiştir.
- Gruplar arası anlamlı olarak yüksek değişim gösteren mmu-miR-222-3p, mmu-miR-18a-5p, mmu-miR-151-5p, mmu-miR-6980-5p, mmu-miR-19b-3p, mmu-miR-5100, mmu-miR-16-5p, mmu-miR-25-3p, mmu-miR-30e-5p ve mmu-miR-93-5p miRNA'ları, eş zamanlı PZR ile doğrulanmıştır.
- TNBC oluşum ve gelişim süreçlerinde ifadesi artan ve anlamlı olarak değişim gösteren ortak miRNA'lar belirlenerek, bu miRNA'lar (mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b ve mmu-miR-30b-3p), eş zamanlı PZR ile doğrulanmıştır.
- Gruplar arasındaki ortak miRNA'ların tahmini hedef genlerinin özellikle TCR sinyal yolağı ve apoptoz yolağında rol aldıkları tespit edilmiştir.
- TNBC'li farelerde ifadeleri artan ortak miRNA'ların apoptotik süreçte hedefledikleri BCL-2 ve BCL-XL genlerinin eş zamanlı PZR ile bu örneklerde ifadelerinin azaldığı doğrulanmıştır.
- TNBC oluşum sürecinde CD8+ T hücrelerin apoptoza uğradıkları doğrulanmış ve ortak 3 miRNA'nın bu süreci regüle ediyor olabileceği gösterilmiştir.

TNBC oluşum, remisyon ve gelişim süreçlerinde splenik CD8+ T hücrelerde önerdiğimiz mekanizma Şekil 5.1.'de yer almaktadır.



Şekil 5. 1. Çalışma sonucunda TNBC sürecinde önerilen mekanizma

3 ortak miRNA'nın, TNBC'li farelerde CD8+ T hücrelerin apoptoz sürecine etkileri daha ileri deneyler ile aydınlatılmayı gerektirmektedir. Bu bağlamda, ileride yapılması planlar deneyler şu şekildedir;

- CD8+ T hücrelerde apoptoz sürecini BCL-2 ve BCL-XL genleri üzerinden düzenlediği düşünülen 3 ortak miRNA'nın lusiferaz deneyi ile hedef gen ilişkileri doğrulanacaktır.
- 3 ortak miRNA'nın CD8+ T hücrelerdeki apoptoz yolağı üzerine etkileri mimic ve inhibitör transfeksiyon sonucu mRNA ve protein düzeyinde gösterilecektir.
- İleri evre TNBC grubunda apoptoz süreci flow sitometri ile doğrulanacaktır.

- Doğrulamalar sonucunda TNBC hasta örneklerinde 3 ortak miRNA'nın ifade durumu araştırılacaktır.
- Üçlü negatif meme tümörü mikroçevresinde bulunan CD8+ T hücrelerin ortak 3 miRNA ve hedef genlerinin ifade durumu analiz edilecektir.



ÖZET

Meme Tümörlerinde Adaptif İmmün Sistemde Meydana Gelen Moleküler Değişikliklerin miRNA Düzeyinde Araştırılması

Dünya genelinde kadınlarda en sık görülen kanser tipi olan meme kanseri, kompleks ve heterojen bir hastalıktır. Üçlü negatif meme kanseri alt tipi, meme kanserlerinin yaklaşık %15'ini oluşturur ve kemoterapi, PARP inhibitörleri ve immün kontrol noktası inhibitörleri gibi sistemik tedavi seçenekleri olmasına karşın hala en agresif ve en kötü prognoz gösteren meme kanseri alt tipidir. Son yıllarda meme kanseri ve immün sistem ilişkisi ile ilgili yapılan çalışmalar ışığında meme kanserinin immünolojik olarak sessiz bir kanser tipi olmadığı, alt tipler bazında immünolojik olarak tanımlanabileceği belirtilmiştir. Üçlü negatif meme kanseri alt tipinde ise tümöre karşı immün cevabın ortaya çıktığı ancak çeşitli mekanizmalar ile baskılandığı vurgulanmaktadır. İmmün sistem hücrelerinin regülasyonunda, 19-24 nükleotit uzunluğunda çoklu hedef genlerin düzenlenmesi yoluyla çeşitli hücresel yollarda düzenleyici rol oynayan kodlanmayan kısa RNA molekülleri (mikroRNA ya da miRNA) etkin rol almaktadır. Meme kanserinin de içinde bulunduğu solid tümörler ve immün sistem ilişkisi ile ilgili çalışmalar olmakla birlikte, meme kanseri immünolojisinde immün hücreler açısından miRNA çalışmaları oldukça kısıtlıdır. Bu doktora tez çalışmasında, fare modelinde üçlü negatif meme kanserinin oluşum ve gelişim süreçlerinde immün sistemde meydana gelen değişimleri incelemek amacıyla, immün sistem hücrelerinden tümör hücreleri ile savaşta en etkin hücre grubu olan CD8⁺ T lenfositlerin miRNA profilleri mikrodizin yöntemi ile belirlenmiştir. TNBC oluşum, remisyon ve tekrar ortaya çıkış sürecini temsil eden ve de kontrol örneklerini içeren dört farklı grupta belirlenen miRNA ifade profilleri ile mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b ve mmu-miR-30b-3p'nin gruplar arasında ortak bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı ifade değişimi gösterdiği bulunmuştur. Belirtilen ortak 3 miRNA'nın eş zamanlı PZR ile doğrulamaları yapılarak özellikle tümör oluşumu ve gelişiminde ifadelerinin arttığı, kontrol ve remisyon gösteren grupta ise ifadelerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. miRNA hedef genleri ve zenginleştikleri yollar incelenerek özellikle BCL-2 ve BCL-XL anti-apoptotik genleri üzerinden CD8⁺ T lenfositlerin apoptoz sürecini regüle ettiği bulunmuştur. Eş zamanlı PZR ve Annexin-V deneyi sonucunda miRNA hedef genleri BCL-2 ve BCL-XL'nin tümör oluşumunda CD8⁺ T hücrelerde ifadelerinin azaldığı ve erken evre tümör oluşum grubunda CD8⁺ T hücrelerin apoptoz ile ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir. Ek olarak, ortak 3 miRNA'nın ifadelerinin azaldığı tümörün kaybolduğu remisyon grubunda ise hedef genlerin ifadelerinin artarak apoptoz sürecinin baskılandığı bulunmuştur. Sonuç olarak, üçlü negatif meme kanseri oluşumunda, mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b ve mmu-miR-30b-3p, tümör hücrelerinin immün sistem baskısından kaçışında tümör hücrelerine karşı CD8⁺ T hücre cevabını apoptoz üzerinden regüle ederek immünolojik biyobelirteç olma potansiyeline sahiptir.

Anahtar Sözcükler: Üçlü negatif meme kanseri, Adaptif immün sistem, CD8⁺ T lenfosit, miRNA, mikrodizin

SUMMARY

Investigation of Molecular Changes Occurring in Adaptive Immune System in Breast Tumors at miRNA Level

Breast cancer, the most common type of cancer in women worldwide, is a complex and heterogeneous disease. The triple-negative breast cancer subtype accounts for approximately 15% of breast cancers and is still the most aggressive and poorly prognostic breast cancer subtype, despite the availability of systemic treatment options such as chemotherapy, PARP inhibitors, and immune checkpoint inhibitors. Recent studies on the relation between breast cancer and the immune system have indicated that breast cancer is not an immunologically silent cancer type and can be defined immunologically on the basis of subtypes. It is emphasized that the immune response against the tumor arises but is suppressed by various mechanisms in the triple negative breast cancer subtype. Non-coding small RNA molecules (microRNA or miRNA) play a regulatory role in various cellular pathways through the regulation of multiple target genes in the immune system cells. Although there are various studies on the relation between solid tumors, including breast cancer, and the immune system, miRNA profiling studies in breast cancer immunology in terms of immune cells are very limited. In this study, miRNA profiles of CD8⁺ T lymphocytes, which are the most effective immune system cell group in destroying tumor cells, were determined by microarray analysis to examine the changes in the immune system during the formation and development of triple negative breast cancer in a mouse model. The miRNA expression profiles were determined in four groups consisting of control, TNBC formation (primary tumor), regression and recurrence. It was found that mmu-miR-93-3p, mmu-miR-3470b, and mmu-miR-30b-3p were common significant differential expressed miRNAs. After the validation of these miRNAs by qPCR analysis, it was confirmed that their expressions increased especially in primary tumor and relapse groups while their expressions were low in the control and remission groups. miRNA target genes and enrichment analysis indicated that CD8⁺ T lymphocytes regulate the apoptosis, especially through targeting BCL-2 and BCL-XL anti-apoptotic genes. As a result of qPCR and Annexin-V experiments, the miRNA target genes BCL-2 and BCL-XL were decreased in CD8⁺ T cells in primary tumor group, and CD8⁺ T cells were removed by apoptosis in primary tumor group. In addition, it was shown that the expression of target genes increased, and the apoptosis process was suppressed in the remission group. In conclusion, mmu-miR-93 3p, mmu-miR-3470b and mmu-miR-30b-3p may play a role in the immune escape of tumor cells in the early and advanced stages of triple negative breast cancer through apoptosis and have the potential to be immunological biomarkers for CD8⁺ T cell response against tumor cells.

Keywords: Triple negative breast cancer, Adaptive immune system, CD8⁺ T lymphocyte, miRNA, microarray

KAYNAKLAR

- ADAMS S, GRAY R J, DEMARIA S, GOLDSTEIN L, PEREZ EA, SHULMAN LN, MARTINO S, WANG M, JONES VE, SAPHNER TJ, WOLFF AC, WOOD WC, DAVIDSON NE, SLEDGE GW, SPARANO JA, BADVE SS (2014). Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two Phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *Journal of Clinical Oncology*, **32**: 2959-2966.
- AHMADZADEH M, JOHNSON LA, HEEMSKERK B, WUNDERLICH JR, DUDLEY ME, WHITE DE, ROSENBERG SA (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*, **114**: 1537-1544.
- ALEXANDROV LB, NIK-ZAINAL S, WEDGE DC, APARICIO SAJR, BEHJATI S, BIANKIN A, BIGNELL GR, BOLLI N, BORG A, BØRRESEN-DALE AL, BOYAULT S, BURKHARDT B, BUTLER AP, CALDAS C, DAVIES HR, DESMEDT C, EILS R, EYFJÖRD, JE, FOEKENS JA, GREAVES M, HOSODA F, HUTTER B, ILICIC T, IMBEAUD S, IMIELINSK M, JÄGER N, JONES DTW, JONAS D, KNAPPSKOG S, KOO M, LAKHANI SR, LÓPEZ-OTÍN C, MARTIN S, MUNSHI N C, NAKAMURA H, NORTHCOTT PA, PAJIC M, PAPAEMMANUIL E, PARADISO A, PEARSON J, PUENTE XS, RAINE K, RAMAKRISHNA M, RICHARDSON AL, RICHTER J, ROSENSTIEL P, SCHLESNER M, SCHUMACHER TN, SPAN PN, TEAGUE JW, TOTOKI Y TUTT ANJ, VALDÉS-MAS R, BUUREN MM, VEER L, VINCENT-SALOMON A, WADDELL N, YATES LR, ZUCMAN-ROSSI J, ANDREW FUTREAL P, MCDERMOTT U, LICHTER P, MEYERSON,M, GRIMMOND SM, SIEBERT R, CAMPO E, SHIBATA T, PFISTER SM, CAMPBELL PJ, STRATTON MR (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, **500**: 415-421.
- ANNESE T, TAMMA R, GIORGIS M, RIBATTI D (2020). MicroRNAs biogenesis, functions and role in tumor angiogenesis. *Frontiers in Oncology*, **10**: 581007.
- ARNOLD M, MORGAN E, RUMGAY H, MAFRA A, SINGH D, LAVERSANNE M, VIGNAT J, GRALOW JR, CARDOSO F, SIESLING S, SOERJOMATARAM I (2022). Current and future burden of breast cancer: global statistics for 2020 and 2040. *Breast*, **66**: 15–23.
- AZIMIAN H, DAYYANI M, BAHREYNI TOOSI MT, MAHMOUDI M (2018). Bax/Bcl-2 expression ratio in prediction of response to breast cancer radiotherapy. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, **21**: 325.
- BALTIMORE D, BOLDIN MP, O'CONNELL RM, RAO DS, TAGANOV KD (2008). MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nature Immunology*, **9**: 839-845.
- BAR I, THEATE I, HAUSSY S, BENIUGA G, CARRASCO J, CANON JL, DELRÉE P, MERHI A (2020). MiR-210 is overexpressed in tumor-infiltrating plasma cells in triple-negative breast cancer. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **68**: 25-32.
- BARRIGA V, KUOL N, NURGALI K, APOSTOLOPOULOS V (2019). The complex interaction between the tumor micro-environment and immune checkpoints in breast cancer. *Cancers*, **11**: 1205.

- BASTIE, RR, RODRÍGUEZ-LESCURE Á, EBBERT MT, PRAT A, MUNÁRRIZ B, ROWE L, MILLER P, RUIZ-BORREGO M, ANDERSON D, LYONS B, ÁLVAREZ I, DOWELL T, WALL D, SEGUÍ MÁ, BARLEY L, BOUCHER KM, ALBA E, PAPPAS L, DAVIS CA, ARANDA I, FAURON C, STIJLEMAN IJ, PALACIOS J, ANTÁN A, CARRASCO E, CABALLERO R, ELLIS MJ, NIELSEN TO, PEROU CM, ASTILL M, BERNARD PS, MARTÍN M (2012). PAM50 breast cancer subtyping by RT-QPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC Medical Genomics*, **5**: 1-12.
- BASU R, WHITLOCK BM, HUSSON J, FLOCH A, JIN W, OYLER-YANIV A, DOTIWALA F, GIANNONE G, HIVROZ C, BIAIS N, LIEBERMAN J, KAM LC, HUSE M (2016). Cytotoxic T cells use mechanical force to potentiate target cell killing. *Cell*, **165**: 100-110.
- BOISE LH, MINN AJ, NOEL PJ, JUNE CH, ACCAVITTI MA, LINDSTEN T, THOMPSON CB (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*, **3**: 87-98.
- BONILLA FA, OETTGEN HC (2010). Adaptive immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **125**: 33-40.
- BOUSSIOTIS VA (2016). Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway. *The New England Journal of Medicine*, **375**: 1767-1778.
- BRONTE V, PITTET MJ (2013). The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*, **39**: 806-818.
- BROWN GR, HEM V, KATZ KS, OVETSKY M, WALLIN C, ERMOLAEVA O, TOLSTOY I, TATUSOVA T, PRUITT KD, MAGLOTT DR, MURPHY TD (2015). Gene: a gene-centered information resource at NCBI. *Nucleic Acids Research*, **43**: 36-42.
- BURKE EE, KODUMUD, K, RAMAMOORTHY G, CZERNIECKI BJ (2019). Vaccine therapies for breast cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, **28**: 353-367.
- CANCER.NET. Erişim Adresi: [<https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer/statistics>]. Erişim Tarihi: 17.11.2022.
- CHAPLIN DD (2010). Overview of the immune response. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **125**: S3.
- CHARLES JANEWAY J, TRAVERS P, WALPORT M, SHLOMCHIK MJ (2001). T cell-mediated immunity. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, **5**: Bölüm 8.
- CHELOUFI S, SANTOS CO, CHONG MMW, HANNON GJ (2010). A Dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, **465**: 584-589.
- CH'EN IL, TSAU JS, MOKKENTIN JD, KOMATSU M, HEDRICK SM (2011). Mechanisms of necroptosis in T cells. *Journal of Experimental Medicine*, **208**: 633-641.
- CHEN PL, ROH W, REUBEN A, COOPER ZA, SPENCER CN, PRIETO PA, MILLER JP, BASSETT RL, GOPALAKRISHNAN V, WANI K, MACEDO MP, AUSTIN-BRENNEMAN JL, JIANG H, CHANG Q, REDDY SM, CHEN WS, TETZLAFF MT, BROADDUS RJ, DAVIES MA, GERSHENWALD JE, HAYDU L, LAZAR AJ, PATEL SP, HWU P, HWU WJ, DIAB A, GLITZA IC, WOODMAN SE, VENCE LM, WISTUBA II, AMARIA RN, KWONG LN, PRIETO V, ERIC DAVIS R, MA W, OVERWIJK WW, SHARPE AH, HU J, ANDREW FUTREAL P, BLANDO J, SHARMA P, ALLISON JP, CHIN L, WARGO JA (2016). Analysis of immune signatures in longitudinal tumor samples yields insight into biomarkers of response and mechanisms of resistance to immune checkpoint blockade. *Cancer Discovery*, **6**: 827-837.

- CHI SW, ZANG JB, MELE A, DARNELL RB (2009). Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature*, **460**: 479-486.
- CLINICALTRIALS.GOV. Erişim Adresi: [<https://clinicaltrials.gov/>]. Erişim Tarihi: 29-30.11.2022.
- COBB BS, HERTWECK A, SMITH J, O'CONNOR E, GRAF D, COOK T, SMALE ST, SAKAGUCHI S, LIVESEY FJ, FISHER AG, MERKENSCHLAGER M (2006). A role for Dicer in immune regulation. *The Journal of Experimental Medicine*, **203**: 2519-2527.
- COBB BS, NESTEROVA TB, THOMPSON E, HERTWECK A, O'CONNOR E, GODWIN J, WILSON CB, BROCKDORFF N, FISHER AG, SMALE ST, MERKENSCHLAGER M (2005). T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *The Journal of Experimental Medicine*, **201**: 1367-1373.
- COILLIE S, WIERNICKI B, XU J (2020). Molecular and cellular functions of CTLA-4. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1248**: 7-32.
- COLANGELO T, POLCARO G, ZICCARDI P, PUCCI B, MUCCILLO L, GALGANI M, FUCCI A, MILONE MR, BUDILLON A, SANTOPAULO M, VOTINO C, PANCIONE M, PIEPOLI A, MAZZOCCOLI G, BINASCHI M, BIGIONI M, MAGGI CA, FASSAN M, LAUDANNA C, MATARESE G, SABATINO L, COLANTUONI V (2016). Proteomic screening identifies calreticulin as a miR-27a direct target repressing MHC Class I cell surface exposure in colorectal cancer. *Cell Death & Disease*, **7**: e2120.
- CORTES J, CESCONE DW, RUGO HS, NOWECKI Z, IM SA, YUSOF MM, GALLARDO C, LIPATOV O, BARRIOS CH, HOLGADO E, IWATA H, MASUDA N, OTERO MT, GOKMEN E, LOI S, GUO Z, ZHAO J, AKTAN G, KARANTZA V, SCHMID P (2020). Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet*, **396**: 1817-1828.
- COUTURE A, GARNIER A, DOCAGNE F, BOYER O, VIVIEN D, LE-MAUFF B, LATOUCHE JB, TOUTIRAIS O (2019). HLA-Class II artificial antigen presenting cells in CD4⁺ T cell-based immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, **10**: 1081.
- CUI W, KAECH SM (2010). Generation of effector CD8⁺ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunological Reviews*, **236**: 151-166.
- DAMIANO V, BRISOTTO G, BORGNA S, GENNARO A, ARMELLIN M, PERIN T, GUARDASCIONE M, MAESTRO R, SANTAROSA M (2017). Epigenetic silencing of miR-200c in breast cancer is associated with aggressiveness and is modulated by ZEB1. *Genes, Chromosomes & Cancer*, **56**: 147-158.
- DEES S, GANESAN R, SINGH S, GREWAL IS (2020). Emerging CAR-T cell therapy for the treatment of triple-negative breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, **19**: 2409-2421.
- DENG L, LU D, BAI Y, WANG Y, BU H, ZHENG H (2019). Immune profiles of tumor microenvironment and clinical prognosis among women with triple-negative breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, **28**: 1977-1985.

- DENT R, TRUDEAU M, PRITCHARD KI, HANNA WM, KAHN HK, SAWKA CA, LICKLEY LA, RAWLINSON E, SUN P, NAROD SA (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*, **13**: 4429-4434.
- DU Y, WEI N, MA R, JIANG S, SONG D (2020). A miR-210-3p regulon that controls the Warburg Effect by modulating HIF-1 α and P53 activity in triple-negative breast cancer. *Cell Death & Disease*, **11**: 731.
- DUNN GP, OLD LJ, SCHREIBER RD (2004). The three es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*, **22**: 329-360.
- DUPRE SA, HUNTER KW (2007). Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Experimental and Molecular Pathology*, **82**: 12-24.
- DUSTIN ML (2010). The immunological synapse. *Handbook of Cell Signaling*, **2**: 71-75.
- EDRY E, MELAMED D (2004). Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *The Journal of Immunology*, **173**: 4265-4271.
- EMAMGOLIZADEH-GURT-TAPEH B, MOSAYYEBI B, SAMEI M, BEYRAMPOUR-BASMENJ H, MOHAMMADI A, ALIVAND MR, HASSANPOUR P, SOLALI S (2020). MicroRNAs involved in T-cell development, selection, activation, and hemostasis. *Journal of Cellular Physiology*, **235**: 8461-8471.
- ENDO Y, TOYAMA T, TAKAHASHI S, YOSHIMOTO N, IWASA M, ASANO T, FUJII Y, YAMASHITA H (2013). miR-1290 and its potential targets are associated with characteristics of estrogen receptor α -positive breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, **20**: 91-102.
- FAMILI F, WIEKMEIJER AS, STAAL FJ (2017). The development of T cells from stem cells in mice and humans. *Future Science OA*, **3**.
- FELLNE C (2012). Ipilimumab (Yervoy) prolongs survival in advanced melanoma: serious side effects and a hefty price tag may limit its use. *Pharmacy and Therapeutics*, **37**: 503.
- FERRANDO-DÍEZ A, FELIP E, POUS A, SIRVEN MB, MARGELÍ M (2022). Targeted therapeutic options and future perspectives for HER2-positive breast cancer. *Cancers*, **14**: 3305.
- FRAGOMENI SM, SCIALIS A, JERUSS JS (2018). Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, **27**: 95-120.
- FU Q, FU TM, CRUZ AC, SENGUPTA P, THOMAS SK, WANG S, SIEGEL RM, WU H, CHOU JJ (2016). Structural basis and functional role of intramembrane trimerization of the Fas/CD95 death receptor. *Molecular Cell*, **61**: 602-613.
- FUCHS YF, SHARMA V, EUGSTER A, KRAUS G, MORGENSTERN R, DAHL A, REINHARDT S, PETZOLD A, LINDNER A, LÖBEL D, BONIFACIO E (2019). Gene expression-based identification of antigen-responsive CD8⁺ T cells on a single-cell level. *Frontiers in Immunology*, **10**: 2568.
- GAGNON JD, ANSEL KM (2019). MicroRNA regulation of CD8⁺ T cell responses. *Non-Coding RNA Investigation*, **3**: 24-24.

- GAO D, ZHOU Z, HUANG H (2019). miR-30b-3p Inhibits proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells via suppressing PI3K/Akt pathway. *Frontiers in Genetics*, **10**: 1274.
- GARRIDO-CASTRO AC, LIN NU, POLYAK K (2019). Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment. *Cancer Discovery*, **9**: 176-198.
- GASPARINI P, CASCIONE L, FASSAN M, LOVAT F, GULER G, BALCI S, IRKKAN C, MORRISON C, CROCE CM, SHAPIRO CL, HUEBNER K (2014). MicroRNA expression profiling identifies a four microRNA signature as a novel diagnostic and prognostic biomarker in triple negative breast cancers. *Oncotarget*, **5**: 1174-1184.
- GATTI-MAYS ME, BALKO JM, GAMEIRO SR, BEAR HD, PRABHAKARAN S, FUKUI J, DISIS ML, NANDA R, GULLEY JL, KALINSKY K, ABDUL-SATER H, SPARANO JA, CESCONE D, PAGE DB, MCARTHUR H, ADAMS S, MITTENDORF EA (2019). If we build it they will come: targeting the immune response to breast cancer. *NPJ. Breast Cancer*, **5**: 1-13.
- GAZIEL-SOVRAN A, SEGURA MF, MICCO R, COLLINS MK, HANNIFORD D, VEGA-SAENZ DE MIERA E, RAKUS JF, DANKERT JF, SHANG S, KERBEL RS, BHARDWAJ N, SHAO Y, DARVISHIAN F, ZAVADIL J, ERLEBACHER A, MAHAL LK, OSMAN I, HERNANDO E (2011). miR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis. *Cancer Cell*, **20**: 104-118.
- GLUZ O, LIEDTKE C, GOTTSCHALK N, PUSZTAI L, NITZ U, HARBECK N (2009). Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Annals of Oncology*, **20**: 1913-1927.
- GORDY C, HE YW (2012). Endocytosis by target cells: an essential means for Perforin- and Granzyme-mediated killing. *Cellular & Molecular Immunology*, **9**: 5-6.
- GRACIAS DT, STELEKATI E, HOPE JL, BOESTEANU AC, DOERING TA, NORTON J, MUELLER YM, FRAIETTA JA, WHERRY EJ, TURNER M, KATSIKIS PD (2013). The microRNA miR-155 controls CD8⁺ T cell responses by regulating interferon signaling. *Nature Immunology*, **14**: 593-602.
- GRIGORYEV YA, KURIAN SM, HART T, NAKORCHEVSKY AA, CHEN C, CAMPBELL D, HEAD SR, JOHN-YATES I, SALOMON-DANIEL R (2011). MicroRNA regulation of molecular networks mapped by global microRNA, mRNA, and protein expression in activated T-lymphocytes. *Journal of Immunology*, **187**: 2233.
- GUO D, LI J, LIU Z, TANG K, SONG H, BI H (2015). Characterization of microRNA expression profiling in peripheral blood lymphocytes in rats with experimental autoimmune uveitis. *Inflammation Research*, **64**: 683-696.
- HA M, KIM VN (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **15**: 509-524.
- HALKIAS J, MELICHAR HJ, TAYLOR KT, ROBEY EA (2014). Tracking migration during human T cell development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **71**: 3101-3117.
- HAMMERL D, MASSINK MPG, SMID M, DEURZEN CHM, MEIJERS-HEIJBOER HEJ, WAISFISZ Q, DEBETS R, MARTENS JWM (2020). Clonality, antigen recognition, and

- suppression of CD8+ T cells differentially affect prognosis of breast cancer subtypes. *Clinical Cancer Research*, **26**: 505-517.
- HAN Z, ROSEN ST, QUERFELD C (2020). Targeting miRNA in hematologic malignancies. *Current Opinion in Oncology*, **32**: 535.
- HANAHAHAN D (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*, **12**: 31-46.
- HANAHAHAN D, WEINBERG RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**: 646-674.
- HASSON SP, MENES T, SONNENBLICK A (2020). Comparison of patient susceptibility genes across breast cancer: implications for prognosis and therapeutic outcomes. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, **13**: 227-238.
- HAYDEN MS, WEST AP, GHOSH S (2006). NF-KB and the immune response. *Oncogene*, **25**: 6758-6780.
- HEESTERS BA, POEL CE, DAS A, CARROLL MC (2016). Antigen presentation to B cells. *Trends in Immunology*, **37**: 844-854.
- HEITZ F, HARTER P, LUECK HJ, FISSLER-ECKHOFF A, LORENZ-SALEHI F, SCHEIL-BERTRAM S, TRAUT A, BOIS A (2009). Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases. *European Journal of Cancer*, **45**: 2792-2798.
- HSU JY, CHANG CJ, CHENG JS (2022). Survival, treatment regimens and medical costs of women newly diagnosed with metastatic triple-negative breast cancer. *Scientific Reports*, **12**: 1-8.
- HU L, XU H, LU J, ZHOU Y, CHU F, ZHENG W, LEI L, ZHAO J, WANG H, GUO M, CHEN C, XU L (2018). MicroRNA-126 deficiency affects the development of thymus CD4+ single-positive cells through elevating IRS-1. *International Archives of Allergy and Immunology*, **177**: 207-218.
- HUANG Y, MA C, ZHANG Q, YE J, WANG F, ZHANG Y, HUNBORG P, VARVARES MA, HOFT DF, HSUEH EC, PENG G (2015). CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget*, **6**: 17462.
- HUTCHINSON KE, YOST SE, CHANG CW, JOHNSON RM, CARR AR, MCADAM PR, HALLIGAN DL, CHANG CC, SCHMOLZE D, LIANG J, YUAN Y (2020). Comprehensive profiling of poor-risk paired primary and recurrent triple-negative breast cancers reveals immune phenotype shifts. *Clinical Cancer Research*, **26**: 657-668.
- HWANG JR, BYEON Y, KIM D, PARK SG (2020). Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Experimental & Molecular Medicine*, **52**: 750-761.
- IPSARO JJ, JOSHUA-TOR L (2015). From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nature Structural & Molecular Biology*, **22**: 20-28.
- JÉZÉQUEL P, LOUSSOUARN D, GUÉRIN-CHARBONNEL C, CAMPION L, VANIER A, GOURAUD W, LASLA H, GUETTE C, VALO I, VERRIÈLE V, CAMPONE M (2015). Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast Cancer Research*, **17**: 43.

- JINDRA PT, BAGLEY J, GODWIN JG, IACOMINI J (2010). Costimulation dependent expression of miR-214 increases the ability of T cells to proliferate by targeting Pten. *Journal of Immunology*, **185**: 990.
- JO MH, SHIN S, JUNG SR, KIM E, SONG JJ, HOHNG S (2015). Human Argonaute 2 has diverse reaction pathways on target RNAs. *Molecular Cell*, **59**: 117-124.
- JONES EY, FUGGER L, STROMINGER JL, SIEBOLD C (2006). MHC Class II proteins and disease: a structural perspective. *Nature Reviews Immunology*, **6**: 271-282.
- JOSHI NS, CUI W, CHANDELE A, LEE HK, URSO DR, HAGMAN J, GAPIN L, KAECH SM (2007). Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-Bet transcription factor. *Immunity*, **27**: 281-295.
- JUNE CH, LEDBETTER JA, GILLESPIE MM, LINDSTEN T, THOMPSON CB (1987). T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, **7**: 4472.
- KABELITZ D, MEDZHITOV R (2007). Innate immunity cross talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Current Opinion in Immunology*, **19**: 1-3.
- KAECH SM, WHERRY EJ (2007). Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity*, **27**: 393-405.
- KANEHISA M, GOTO S (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, **28**: 27-30.
- KATSUTA E, DEMASI SC, TERRACINA KP, SPIEGEL S, PHAN GQ, BEAR HD, TAKABE K (2016). Modified breast cancer model for preclinical immunotherapy studies. *The Journal of Surgical Research*, **204**: 467-474.
- KUDELA E, SAMEC M, KOKLESOVA L, LSKOVA A, KUBATKA P, KOZUBIK E, ROKOS T, PRIBULOVA T, GABONOVA E, SMOLAR M, BIRINGER K (2020). miRNA expression profiles in Luminal A breast cancer—implications in biology, prognosis, and prediction of response to hormonal treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**: 7691.
- KUMAR-TYAGI N, DHESY-THIND S (2018). Clinical practice guidelines in breast cancer. *Current Oncology*, **25**: S151-S160.
- LEE KH, HOLDORF AD, DUSTIN ML, CHAN AC, ALLEN PM, SHAW AS (2002). T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science*, **295**: 1539-1542.
- LEHMANN BD, BAUER JA, CHEN X, SANDERS ME, CHAKRAVARTHY AB, SHYR Y, PIETENPOL JA (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, **121**: 2750-2767.
- LEUN AM, THOMMEN DS, SCHUMACHER TN (2020). CD8+ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. *Nature Reviews Cancer*, **20**: 218.
- LEWIS SM, WILLIAMS A, EISENBARTH SC (2019). Structure-function of the immune system in the spleen. *Science Immunology*, **4**: 6085.

- LI HY, LIANG JL, KUO YL, LEE HH, CALKINS MJ, CHANG HT, LIN FC, CHEN YC, HSU TI, HSIAO M, GER LP, LU PJ (2017a). miR-105/93-3p promotes chemoresistance and circulating miR-105/93-3p acts as a diagnostic biomarker for triple negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, **19**: 133.
- LI L, LU S, LIANG X, CAO B, WANG S, JIANG J, LUO H, HE S, LANG J, ZHU G (2019). ΓδTDEs: An efficient delivery system for miR-138 with anti-tumoral and immunostimulatory roles on oral squamous cell carcinoma. *Molecular therapy. Nucleic Acids*, **14**: 101-113.
- LI Q, JOHNSTON N, ZHENG X, WANG H, ZHANG X, GAO D, MIN W, LI Q, JOHNSTON N, ZHENG X, WANG H, ZHANG X, GAO D, MIN W (2016). miR-28 modulates exhaustive differentiation of T cells through silencing programmed cell death-1 and regulating cytokine secretion. *Oncotarget*, **7**: 53735-53750.
- LIANG Y, PAN HF, YE DQ (2015). MicroRNAs function in CD8+T cell biology. *Journal of Leukocyte Biology*, **97**: 487.
- LIAO Y, WANG J, JAEHNIG EJ, SHI Z, ZHANG B (2019). WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Research*, **47**: W199-W205.
- LIN KR, PANG DM, JIN Y, HU Q, PAN YM, CUI JH, CHEN XP, LIN YX, MAO XF, DUAN HB, LUO W (2018). Circulating CD8+ T-cell repertoires reveal the biological characteristics of tumors and clinical responses to chemotherapy in breast cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **67**: 1743-1752.
- LIN X, CHEN H, XIE Y, ZHOU X, WANG Y, ZHOU J, LONG S, HU Z, ZHANG S, QIU W, ZENG Z, LIU L (2022). Combination of CTLA-4 blockade with MUC1 mRNA nanovaccine induces enhanced anti-tumor CTL activity by modulating tumor microenvironment of triple negative breast cancer. *Translational Oncology*, **15**: 101298.
- LIND EF, ELFORD AR, OHASHI PS (2013). Micro-RNA 155 is required for optimal CD8+ T cell responses to acute viral and intracellular bacterial challenges. *The Journal of Immunology*, **190**: 1210-1216.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, **25**: 402-408.
- LOI S, MICHIELS S, SALGADO R, SIRTAIN N, JOSE V, FUMAGALLI D, KELLOKUMPU-LEHTINEN PL, BONO P, KATAJA V, DESMEDT C, PICCART MJ, LOIBL S, DENKERT C, SMYTH MJ, JOENSUU H, SOTIRIOU C (2014). Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for Trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Annals of Oncology*, **25**: 1544-1550.
- LOI S, SIRTAIN N, PIETTE F, SALGADO R, VIALE G, EENOO F, ROUAS G, FRANCIS P, CROWN JPA, HITRE E, AZAMBUJA E, QUINAUX E, LEO A, MICHIELS S, PICCART MJ, SOTIRIOU C (2013). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of Docetaxel to Doxorubicin with Doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *Journal of Clinical Oncology*, **31**: 860-867.
- LOU Q, LIU R, YANG X, LI W, HUANG L, WEI L, TAN H, XIANG N, CHA, K, CHEN J, LIU H (2019b). miR-448 targets IDO1 and regulates CD8+ T cell response in human colon cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, **7**: 1-14.

- LOWERY AJ, MILLER N, DEVANEY A, MCNEILL RE, DAVOREN PA, LEMETRE C, BENES V, SCHMIDT S, BLAKE J, BALL G, KERIN MJ (2009). MicroRNA signatures predict estrogen receptor, progesterone receptor and HER2/Neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Research*, **11**: R27.
- LU L, MAO X, SHI P, HE B, XU K, ZHANG S, WANG J (2017). MicroRNAs in the prognosis of triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Medicine*, **96**: e7085.
- LUCKHEERAM RV, ZHOU R, VERMA AD, XIA B (2012). CD4+T cells: differentiation and functions. *Clinical and Developmental Immunology*, **2012**: 12.
- LUO L, YANG F, DING J, YAN D, WANG D, YANG S, DING L, LI J, CHEN D, MA R, WU J, TANG J (2016). miR-31 inhibits migration and invasion by targeting SATB2 in triple negative breast cancer. *Gene*, **594**: 47-58.
- MA F, XU S, LIU X, ZHANG Q, XU X, LIU M, HUA M, LI N, YAO H, CAO X (2011). The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ . *Nature Immunology*, **12**: 861–869.
- MALHOTRA GK, ZHAO X, BAND H, BAND V (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*, **10**: 955.
- MAO Y, QU Q, ZHANG Y, LIU J, CHEN X, SHEN K (2014). The value of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS One*, **9**: e115103.
- MARTÍNEZ-LOSTAO L, ANEL A, PARDO J (2015). How do cytotoxic lymphocytes kill cancer cells? *Clinical Cancer Research*, **21**: 5047-5056.
- MARTÍNEZ-SÁEZ O, PRAT A (2021). Current and future management of HER2-positive metastatic breast cancer. *JCO Oncology Practice*, **17**: 594-604.
- MAZGAEEEN L, GURUNG P (2020). Recent advances in lipopolysaccharide recognition systems. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**: 379.
- MEIJER HA, SMITH EM, BUSHELL M (2014). Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochemical Society Transactions*, **42**: 1135-1140.
- MENON A, ABD-AZIZ N, KHALID K, POH CL, NAIDU R (2022). miRNA: a promising therapeutic target in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**: 11502.
- MESCHER MF, CURTSINGER JM, AGARWAL P, CASEY KA, GERNER M, HAMMERBECK CD, POPESCU F, XIAO Z (2006). Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunological Reviews*, **211**: 81-92.
- MESTDAGH P, VLIERBERGHE P, WEER A, MUTH D, WESTERMANN F, SPELEMAN F, VANDESOMPELE J (2009). A novel and universal method for microRNA RT-QPCR data normalization. *Genome Biology*, **10**: 1-10.
- MILES D, GLIGOROV J, ANDRÉ F, CAMERON D, SCHNEEWEISS A, BARRIOS C, XU B, WARDLEY A, KAEN D, ANDRADE L, SEMIGLAZOV V, REINISCH M, PATEL S, PATRE M, MORALES L, PATEL SL, KAUL M, BARATA T, O'SHAUGHNESSY J (2021). Primary results from IMpassion131, a double-blind, placebo-controlled, randomised phase III trial of first-line Paclitaxel with or without Atezolizumab for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology*, **32**: 994-1004.
- MILLER JFAP (1961). Immunological function of the thymus. *The Lancet*, **278**: 748-749.

- MILLER S, JONES LE, GIOVANNITTI K, PIPER D, SERRA MJ (2008). Thermodynamic analysis of 5' and 3' single- and 3' double-nucleotide overhangs neighboring Wobble terminal base pairs. *Nucleic Acids Research*, **36**: 5652-5659.
- MITTENDORF EA, PHILIPS A, MERIC-BERNSTAM F, QIAO N, WU Y, HARRINGTON S, SU X, WANG Y, GONZALEZ-ANGULO AM, AKCAKANAT A, CHAWLA A, CURRAN M, HWU P, SHARMA P, LITTON JK, MOLLDREM JJ, ALATRASH G (2014). PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunology Research*, **2**: 361-370.
- MOFFETT HF, CARTWRIGHT ANR, KIM HJ, GODEC J, PYRDOL J, ÅIJÖ T, MARTINEZ GJ, RAO A, LU J, GOLUB TR, CANTOR H, SHARPE AH, NOVINA CD, WUCHERPFENNIG KW (2017). The microRNA miR-31 inhibits CD8⁺ T cell function in chronic viral infection. *Nature Immunology*, **18**: 791-799.
- MONROE JG (2006). ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nature Reviews Immunology*, **6**: 283-294.
- MØRCH AM, BÁLINT Š, SANTOS AM, DAVIS SJ, DUSTIN ML (2020). Coreceptors and TCR signaling – the strong and the weak of it. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **8**: 1147.
- MORISADA M, CLAVIJO PE, MOORE E, SUN L, CHAMBERLIN M, WAES C, HODGE JW, MITCHELL JB, FRIEDMAN J, ALLEN CT (2017). PD-1 blockade reverses adaptive immune resistance induced by high-dose hypofractionated but not low-dose daily fractionated radiation. *Oncoimmunology*, **7**: e1395996.
- MULJO SA, MARK-ANSEL K, KANELLOPOULOU C, LIVINGSTON DM, RAO A, RAJEWSKY K (2005a). Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *The Journal of Experimental Medicine*, **202**: 261-269.
- MURALI AK, MEHROTRA S (2011). Apoptosis – an ubiquitous T cell immunomodulator. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, **S3**: 2.
- NAQVI AR, FORDHAM JB, GANESH B, NARES S (2016). miR-24, miR-30b and miR-142-3p interfere with antigen processing and presentation by primary macrophages and dendritic cells. *Scientific Reports*, **6**: 1-12.
- NEILSON JR, ZHENG GXY, BURGE CB, SHARP PA (2007). Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes & Development*, **21**: 578-589.
- NGUYEN MHT, LUO YH, LI AL, TSAI JC, WU KL, CHUNG PJ, MA N (2021). miRNA as a modulator of immunotherapy and immune response in melanoma. *Biomolecules*, **11**: 1648.
- NOYAN S, ANDAC-OZKETEN A, GURDAL H, GUR-DEDEOGLU B (2021). miR-770-5p regulates EMT and invasion in TNBC cells by targeting DNMT3A. *Cellular Signalling*, **83**: 109996.
- O'CONNELL RM, RAO DS, CHAUDHURI AA, BALTIMORE D (2010). Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, **10**: 111-122.
- OLENA AF, PATTON JG (2010). Genomic organization of microRNAs. *Journal of Cellular Physiology*, **222**: 540-545.

- OLIVEROS JC (2007-2015) Venny: An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
- PARISH IA, KAECH SM (2009). Diversity in CD8(+) T cell differentiation. *Current Opinion in Immunology*, **21**: 291-297.
- PAUL S, LAL G (2017). The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, **8**: 1124.
- PELANDA R, TORRES RM (2012). Central B-cell tolerance: where selection begins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **4**: a007146.
- PENG J, HAMANISHI J, MATSUMURA N, ABIKO K, MURAT K, BABA T, YAMAGUCHI K, HORIKAWA N, HOSOE Y, MURPHY SK, KONISHI I, MANDAI M (2015). Chemotherapy induces programmed cell death-ligand 1 overexpression via the nuclear factor- κ B to foster an immunosuppressive tumor microenvironment in ovarian cancer. *Cancer Research*, **75**: 5034-5045.
- PENG Z, SU P, YANG Y, YAO X, ZHANG Y, JIN F, YANG B (2020). Identification of CTLA-4 associated with tumor microenvironment and competing interactions in triple negative breast cancer by co-expression network analysis. *Journal of Cancer*, **11**: 6365.
- PEROU CM, SØRILE T, EISEN MB, RIJN M, JEFFREY SS, RESS CA, POLLACK JR, ROSS DT, JOHNSEN H, AKSLEN LA, FLUGE Ø, PERGAMMENSCHLKV A, WILLIAMS C, ZHU SX, LØNNING PE, BØRRESEN-DALE AL, BROWN PO, BOTSTEIN D (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, **406**: 747-752.
- PERSSON H, KVIST A, REGO N, STAAF J, VALLON-CHRISTERSSON J, LUTS L, LOMAN N, JONSSON G, NAYA H, HOGLUND M, BORG A, ROVIRA C (2011). Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene. *Cancer Research*, **71**: 78-86.
- PISARELLO MJL, LOARCA L, IVANICS T, MORTON L, LARUSSO N (2015). MicroRNAs in the cholangiopathies: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Clinical Medicine*, **4**: 1688-1712.
- POPI AF, LONGO-MAUGÉRI IM, MARIANO M (2016). An overview of B-1 cells as antigen-presenting cells. *Frontiers in Immunology*, **7**: 138.
- PULASKI BA, OSTRAND-ROSENBERG S (2000). Mouse 4T1 breast tumor model. *Current Protocols in Immunology*, **39**: 20.2.1-20.2.16.
- QIN A, WEN Z, ZHOU Y, LI Y, LI Y, LUO J, REN T, XU L (2013). MicroRNA-126 regulates the induction and function of CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells through PI3K/AKT pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **17**: 252.
- RACHH M, DESAI P (2017). MicroRNAs specific primer design using miRNA design tool. *Int. Res. J. Biological Sci.*, **6**: 44-46.
- RANI V, SENGAR RS (2022). Biogenesis and mechanisms of microRNA-mediated gene regulation. *Biotechnology and Bioengineering*, **119**: 685-692.
- RASHIDIAN M, INGRAM JR, DOUGAN M, DONGRE A, WHANG KA, LEGALL C, CRAGNOLINI JJ, BIERIE B, GOSTISSA M, GORMAN J, GROTENBREG GM, BHAN A, WEINBERG RA, PLOEGH HL (2017). Predicting the response to CTLA-4 blockade by longitudinal noninvasive monitoring of CD8 T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, **214**: 2243-2255.

- REIS-FILHO JS, PUSZTAI L (2011a). Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet*, **378**: 1812-1823.
- RODRIGUES V, CORDEIRO-DA-SILVA A, LAFORGE M, OUAISSI A, AKHARID K, SILVESTRE R, ESTAQUIER J (2014). Impairment of T cell function in parasitic infections. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **8**: e2567.
- RODRÍGUEZ-GALÁN A, DOSIL SG, GÓMEZ MJ, FERNÁNDEZ-DELGADO I, FERNÁNDEZ-MESSINA L, SÁNCHEZ-CABO F, SÁNCHEZ-MADRID F (2021). MiRNA post-transcriptional modification dynamics in T cell activation. *iScience*, **24**: 102530.
- ROLINK AG, SCHANIEL C, ANDERSSON J, MELCHERS F (2001). Selection events operating at various stages in B cell development. *Current Opinion in Immunology*, **13**: 202-207.
- RUBY JG, JAN CH, BARTEL DP (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, **448**: 83-86.
- SAFAVI A, KEFAYAT A, MAHDEVAR E, GHAHREMANI F, NEZAFAT N, MODARRESSI MH (2020). Efficacy of co-immunization with the DNA and peptide vaccines containing SYCP1 and ACRBP epitopes in a murine triple-negative breast cancer model. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, **17**: 22-34.
- SCHMID P, ADAMS S, RUGO HS, SCHNEEWEISS A, BARRIOS CH, IWATA H, DIÉRAS V, HEGG R, IM SA, SHAW-WRIGHT G, HENSCHER V, MOLINERO L, CHUI SY, FUNKE R, HUSAIN A, WINER EP, LOI S, EMENS LA (2018). Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine*, **379**: 2108-2121.
- SCHMIDT M, WEYER-ELBERICH V, HENGSTLER JG, HEIMES AS, ALMSTEDT K, GERHOLD-AY A, LEBRECHT A, BATTISTA MJ, HASENBURG A, SAHIN U, KALOGERAS KT, KELLOKUMPU-LEHTINEN PL, FOUNTZILAS G, WIRTZ RM, JOENSUU H (2018). Prognostic impact of CD4-positive T cell subsets in early breast cancer: a study based on the FinHer trial patient population. *Breast Cancer Research*, **20**: 1-10.
- SCHNELL A, BOD L, MADI A, KUCHROO VK (2020). The yin and yang of co-inhibitory receptors: toward anti-tumor immunity without autoimmunity. *Cell Research*, **30**: 285.
- SEO AN, LEE HJ, KIM EJ, KIM HJ, JANG MH, LEE HE, KIM YJ, KIM JH, PARK SY (2013). Tumour-infiltrating CD8⁺ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *British Journal of Cancer*, **109**: 2705-2713.
- SHARPE AH, WHERRY EJ, AHMED R, FREEMAN GJ (2007). The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology*, **8**: 239-245.
- SHUAI K, LIU B (2003). Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, **3**: 900-911.
- SILVA MT, CORREIA-NEVES M (2012). Neutrophils and macrophages: The main partners of phagocyte cell systems. *Frontiers in Immunology*, **3**: 174.

- SIMMONS CE, BREZDEN-MASLEY C, MCCARTHY J, MCLEOD D, JOY AA (2020). Positive progress: current and evolving role of immune checkpoint inhibitors in metastatic triple-negative breast cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, **12**: 1758835920909091.
- SIMON R, LAM A, LI MC, NGAN M, MENENZES S, ZHAO Y (2007). Analysis of gene expression data using BRB-array tools. *Cancer Informatics*, **3**: 11-17.
- SONG L, DONG G, GUO L, GRAVES DT (2018). The function of dendritic cells in modulating the host response. *Molecular Oral Microbiology*, **33**: 13-21.
- SONG Y, WANG N, CHEN L, FANG L (2021). Tr1 cells as a key regulator for maintaining immune homeostasis in transplantation. *Frontiers in Immunology*, **12**: 671579.
- SØRLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R, AAS T, GEISLER S, JOHNSEN H, HASTIE T, EISEN MB, RIJN M, JEFFREY SS, THORSEN T, QUIST H, MATESE JC, BROWN PO, BOTSTEIN D, LØNNING PE, BØRRESEN-DALE AL (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**: 10869-10874.
- SOUSA IG, ALMO MM, SIMI KCR, BEZERRA MAG, ANDRADE RV, MARANHÃO AQ, BRIGIDO MM (2017). MicroRNA expression profiles in human CD3+ T cells following stimulation with anti-human CD3 antibodies. *BMC*, **10**: 124.
- SOUSA IG, SIMI KCR, ALMO MM, BEZERRA MAG, DOOSE G, RAIOL T, STADLER PF, HOFFMANN S, MARANHÃO AQ, BRIGIDO MM (2019). Gene expression profile of human T cells following a single stimulation of peripheral blood mononuclear cells with anti-CD3 antibodies. *BMC Genomics*, **20**: 1-14.
- STANTON SE, DISIS ML (2016). Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, **4**: 59.
- STERLE HA, NICOUD MB, MASSARI NA, TÁQUEZ-DELGADO MA, HERRERO-DUCLOUX M, CREMASCHI GA, MEDINA VA (2018). Immunomodulatory role of histamine H4 receptor in breast cancer. *British Journal of Cancer*, **120**: 128-138.
- STICHT C, LA-TORRE C, PARVEEN A, GRETZ N (2018). MiRWalk: an online resource for prediction of microRNA binding sites. *PloS One*, **13**: e0206239.
- STITTRICH AB, HAFTMANN C, SGOUROUDIS E, KÜHL AA, HEGAZY AN, PANSE I, RIEDEL R, FLOSSDORF M, DONG J, FUHRMANN F, HEINZ GA, FANG Z, LI N, BISSELS U, HATAM F, JAHN A, HAMMOUD B, MATZ M, SCHULZE FM, BAUMGRASS R, BOSIO A, MOLLENKOPF HJ, GRÜN J, THIEL A, CHEN W, HÖFER T, LODDENKEMPER C, LÖHNING M, CHANG HD, RAJEWSKY N, RADBRUCH A, MASHREGHI MF (2010). The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes. *Nature Immunology*, **11**: 1057-1062.
- STONE KD, PRUSSIN C, METCALFE DD (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **125**: S73.
- SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, BRAY F (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A Cancer Journal for Clinicians*, **71**: 209-249.

- SWANN JB, SMYTH MJ (2007). Immune surveillance of tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, **117**: 1137-1146.
- SZEKELY B, BOSSUYT V, LI X, WALI VB, PATWARDHAN GA, FREDERICK C, SILBER A, PARK T, HARIGOPAL M, PELEKANOU V, ZHANG M, YAN Q, RIMM DL, BIANCHINI G, HATZIS C, PUSZTAI L (2018). Immunological differences between primary and metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, **29**: 2232-2239.
- TAO K, FANG M, ALROY J, GARY GG (2008). Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer*, **8**: 1-19.
- TAVERA-MENDOZA LE, BROWN M (2017). A less invasive method for orthotopic injection of breast cancer cells into the mouse mammary gland. *Laboratory Animals*, **51**: 85-88.
- TETELOSHVILI N, SMIGIELSKA-CZEPIEL K, KROESEN BJ, BROUWER E, KLUIVER J, BOOTS A, BERG A (2015). T-cell activation induces dynamic changes in miRNA expression patterns in CD4 and CD8 T-cell subsets. *MicroRNA*, **4**: 117-122.
- THOMOPOULOU K, PAPADAKI C, MONASTIRIOTI A, KORONAKIS G, MALA A, KALAPANIDA D, MAVROUDIS D, AGELAKI S (2021). MicroRNAs regulating tumor immune response in the prediction of the outcome in patients with breast cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*, **8**: 549.
- THORSSON V, GIBBS DL, BROWN SD, WOLF D, BORTONE DS, OU-YANG TH, PORTA-PARDO E, GAO GF, PLAISIER CL, EDDY JA, ZIV E, CULHANE AC, PAULL EO, SIVAKUMAR IKA, GENTLES AJ, MALHOTRA R, FARSHIDFAR F, COLAPRICO A, PARKER JS, MOSE LE, VO NS, LIU J, LIU Y, RADER J, DHANKANI V, REYNOLDS SM, BOWLBY R, CALIFANO A, CHERNIACK AD, ANASTASSIOU D, BEDOGNETTI D, MOKRAB Y, NEWMAN AM, RAO A, CHEN K, KRASNITZ A, HU H, MALTA TM, NOUSHMEHR H, PEDAMALLU CS, BULLMAN S, OJESINA AI, LAMB A, ZHOU W, SHEN H, CHOUEIRI TK, WEINSTEIN JN, GUINNEY J, SALTZ J, HOLT RA, RABKIN CS (2018). The Immune landscape of cancer. *Immunity*, **48**: 812 830.e14.
- TIMOTIJEVIĆ GS, MILISAVLJEVIĆ MD, NIKOLIĆ DB, MILOVANOVIĆ BM, NIKOLIĆ DS, NIKOLIC M, SAMARDŽIĆ JT (2015). Establishment and in-house validation of stem-loop RT PCR method for microRNA398 expression analysis. *Genetika*, **47**: 405-416.
- TORMO E, BALLESTER S, ADAM-ARTIGUES A, BURGUÉS O, ALONSO E, BERMEJO B, MENÉNDEZ S, ZAZO S, MADOZ-GÚRPIDE J, ROVIRA A, ALBANELL J, ROJO F, LLUCH A, EROLES P (2019). The miRNA-449 family mediates Doxorubicin resistance in triple-negative breast cancer by regulating cell cycle factors. *Scientific Reports*, **9**: 5316.
- TSANG JYS, TSE GM (2020). Molecular classification of breast cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, **27**: 27-35.
- TSENG SY, WAITE JC, LIU M, VARDHANA S, DUSTIN ML (2008). T cell-dendritic cell immunological synapses contain TCR-dependent CD28-CD80 clusters that recruit protein kinase c theta. *Journal of Immunology*, **181**: 4852-4863.
- TSUDA H, TSUGAWA K, AKIYAMA F, HORII R, KUROSUMI M, MORIYA T, TAKANO T, TAKEI H, NAKAYAMA T, MIYAGI Y, YAMAUCHI C, YAMASHITA T, AOGI K, MUKAI H, SUGIE T, IWATA H, MASUDA S (2020). Histological classification of breast

tumors in the general rules for clinical and pathological recording of breast cancer. *Breast Cancer*, **27**: 309-321.

URENA F, MA C, HOFFMANN FKW, NUNES LGA, RSCHITZ J, MOISYADI S, KHADKA VS, DENG Y, HOFFMANN PR (2022). T-cell activation decreases miRNA-15a/16 levels to promote MEK1-ERK1/2-Elk1 signaling and proliferative capacity. *The Journal of Biological Chemistry*, **298**: 101634.

VIALE G (2012). The current state of breast cancer classification. *Annals of Oncology*, **23**: x207–x210.

VIGNARD V, LABBE M, MAREC N, ANDRE-GREGOIRE G, JOUAND N, FONTENEAU JF, LABARRIERE N, FRADIN D (2020). MicroRNAs in tumor exosomes drive immune escape in melanoma. *Cancer Immunology Research*, **8**: 255-267.

VIHERVUORI H, AUTERE TA, REPO H, KURKI S, KALLIO L, LINTUNEN MM, TALVINEN K, KRONQVIST P (2019). Tumor-infiltrating lymphocytes and CD8+ T cells predict survival of triple-negative breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **145**: 3105-3114.

VINAY DS, RYAN EP, PAWELEC G, TALIB WH, STAGG J, ELKORD E, LICHTOR T, DECKER WK, WHELAN RL, KUMARA HMCS, SIGNORI E, HONOKI K, GEORGAKILAS AG, AMIN A, HELFERICH WG, BOOSANI CS, GUHA G, CIRIOLO MR, CHEN S, MOHAMMED SI, AZMI AS, KEITH WN, BILSLAND A, BHAKTA D, HALICKA D, FUJII H, AQUILANO K, ASHRAF SS, NOWSHEEN S, YANG X, CHOI BK, KWON BS (2015). Immune evasion in cancer: mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, **35**: S185-S198.

VRANIC S, FELDMAN R, GATALICA Z (2017). Apocrine carcinoma of the breast: a brief update on the molecular features and targetable biomarkers. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, **17**: 9-11.

VYAS JM, VEEN AG, PLOEGH HL (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*, **8**: 607-618.

WANG J, WANG Q, GUAN Y, SUN Y, WANG X, LIVELY K, WANG Y, LUO M, KIM JA, MURPHY EA, YAO Y, CAI G, FAN D (2022). Breast cancer cell-derived microRNA-155 suppresses tumor progression via enhancing immune cell recruitment and antitumor function. *The Journal of Clinical Investigation*, **132**: e157248.

WANG L, YANG G, ZHU X, WANG Z, WANG H, BAI Y, SUN P, PENG L, WEI W, CHEN G, LI G, JR AAZ, GLYBOCHKO P, XU W, WANG L, YANG G, ZHU X, WANG Z, WANG H, BAI Y, SUN P, PENG L, WEI W, CHEN G, LI G, ZAMYATNIN AA, GLYBOCHKO P, XU W (2017). miR-93-3p inhibition suppresses clear cell renal cell carcinoma proliferation, metastasis and invasion. *Oncotarget*, **8**: 82824-82834.

WATTS TH (2010). Staying alive: T cell costimulation, CD28, and Bcl-XL. *Journal of Immunology*, **185**: 3785-3787.

WEI C, LI L, GUPTA S (2014). NF-KB-mediated miR-30b regulation in cardiomyocytes cell death by targeting Bcl-2. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **387**: 135-141.

WEI J, NDUOM EK, KONG LY, HASHIMOTO Y, XU S, GABRUSIEWICZ K, LING X, HUANG N, QIAO W, ZHOU S, IVAN C, FULLER GN, GILBERT MR, OVERWIJK W, CALIN GA,

- HEIMBERGER AB (2016). miR-138 exerts anti-glioma efficacy by targeting immune checkpoints. *Neuro-Oncology*, **18**: 639-648.
- WELLS AC, DANIELS KA, ANGELOU CC, FAGERBERG E, BURNSIDE AS, MARKSTEIN M, ALFANDARI D, WELSH RM, POBEZINSKAYA EL, POBEZINSKY LA (2017). Modulation of Let-7 miRNAs controls the differentiation of effector CD8 T cells. *eLife*, **6**: e26398.
- WHERRY EJ, HA SJ, KAECH SM, HAINING WN, SARKAR S, KALIA V, SUBRAMANIAM S, BLATTMAN JN, BARBER DL, AHMED R (2007). Molecular signature of CD8⁺ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*, **27**: 670-684.
- WILCZYNSKA A, BUSHELL M (2015). The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death and Differentiation*, **22**: 22.
- WILLIAMS MA, BEVAN MJ (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annual Review of Immunology*, **25**: 171-192.
- WING K, ONISHI Y, PRIETO-MARTIN P, YAMAGUCHI T, MIYARA M, FEHERVARI Z, NOMURA T, SAKAGUCHI S (2008). CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science*, **322**: 271-275.
- WU H, NEILSON JR, KUMAR P, MANOCHA M, SHANKAR P, SHARP PA, MANJUNATH N (2007). miRNA profiling of naïve, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One*, **2**: 1020.
- WYKES MN, LEWIN SR (2017). Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nature Reviews Immunology*, **18**: 91-104.
- XIAO Y, LI Y, TAO H, HUMPHRIES B, LI A, JIANG Y, YANG C, LUO R, WANG Z (2018). Integrin A5 down-regulation by miR-205 suppresses triple negative breast cancer stemness and metastasis by inhibiting the Src/Vav2/Rac1 pathway. *Cancer Letters*, **433**: 199-209.
- XIE M, LI M, VILBORG A, LEE N, SHU M, YARTSEVA V, ŠESTAN N, STEITZ JA (2013). Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell*, **155**: 1568-1580.
- XU W, LUCAS AS, WANG Z, LIU Y (2014). Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC Bioinformatics*, **15**: 1-11.
- XU X, ARAKI K, LI S, HAN JH, YE L, TAN WG, KONIECZNY BT, BRUINSMA MW, MARTINEZ J, PEARCE EL, GREEN DR, JONES DP, VIRGIN HW, AHMED R (2014). Autophagy is essential for effector CD8⁺ T cell survival and memory formation. *Nature Immunology*, **15**: 1152-1161.
- YAM C, MANI SA, MOULDER SL (2017). Targeting the molecular subtypes of triple negative breast cancer: understanding the diversity to progress the field. *The Oncologist*, **22**: 1086-1093.
- YANG J, LIU R, DENG Y, QIAN J, LU Z, WANG Y, ZHANG D, LUO F, CHU Y (2017). miR-15a/16 deficiency enhances anti-tumor immunity of glioma-infiltrating CD8⁺ T cells through targeting mTOR. *International Journal of Cancer*, **141**: 2082-2092.

- YANG L, BOLDIN MP, YU Y, LIU CS, EA CK, RAMAKRISHNAN P, TAGANOV KD, ZHAO JL, BALTIMORE D (2012). miR-146a controls the resolution of T cell responses in mice. *Journal of Experimental Medicine*, **209**: 1655-1670.
- YANG L, CAI Y, ZHANG D, SUN J, XU C, ZHAO W, JIANG W, PAN C (2018). miR-195/miR-497 regulate CD274 expression of immune regulatory ligands in triple-negative breast cancer. *Journal of Breast Cancer*, **21**: 371.
- YANG P, LI QJ, FENG Y, ZHANG Y, MARKOWITZ GJ, NING S, DENG Y, ZHAO J, JIANG S, YUAN Y, WANG HY, CHENG SQ, XIE D, WANG XF (2012). TGF- β -miR-34a-CCL22 signaling-induced Treg cell recruitment promotes venous metastases of HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*, **22**: 291-303.
- YE J, COULOURIS G, ZARETSKAYA I, CUTCUTACHE I, ROZEN S, MADDEN TL (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, **13**: 134.
- YE LL, WEI XS, ZHANG M, NIU YR, ZHOU Q (2018). The significance of tumor necrosis factor receptor type II in CD8⁺ regulatory T cells and CD8⁺ effector T cells. *Frontiers in Immunology*, **8**: 583.
- YEONG J, LIM JCT, LEE B, LI H, ONG CCH, THIKE AA, YEAP WH, YANG Y, LIM AYH, TAY TKY, LIU J, WONG SC, CHEN J, LIM EH, IQBAL J, DENT R, NEWELL EW, TAN PH (2019). Prognostic value of CD8 + PD-1⁺ immune infiltrates and PDCD1 gene expression in triple negative breast cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, **7**: 1-13.
- YERSAL O, BARUTCA S (2014). Biological subtypes of breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *World Journal of Clinical Oncology*, **5**: 412.
- YU X, ZHANG Z, WANG Z, WU P, QIU F, HUANG J (2016). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clinical & Translational Oncology*, **18**: 497-506.
- YUSEFF MI, PIEROBON P, REVERSAT A, LENNON-DUMÉNIL AM (2013.) How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nature Reviews Immunology*, **13**: 475-486.
- ZHANG L, FANG C, XU X, LI A, CAI Q, LONG X (2015). Androgen receptor, EGFR, and BRCA1 as biomarkers in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *BioMed Research International*, **2015**: 357485
- ZHANG M, GAO D, SHI Y, WANG Y, JOSHI R, YU Q, LIU D, ALOTAIBI F, ZHANG Y, WANG H, LI Q, ZHANG ZX, KOROPATNICK J, MIN W (2019). miR-149-3p reverses CD8⁺ T-cell exhaustion by reducing inhibitory receptors and promoting cytokine secretion in breast cancer cells. *Open Biology*, **9**: 190061.
- ZHANG N, BEVAN MJ (2010). Dicer controls CD8⁺ T-cell activation, migration, and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**: 21629-21634.
- ZHANG N, HARTIG H, DZHAGALOV I, DRAPER D, HE YW (2005). The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Research*, **15**: 749-769.

- ZHAO P, ZHAO L, ZHANG T, WANG H, QIN C, YANG S, XIA X (2012). Changes in microRNA expression induced by rabies virus infection in mouse brains. *Microbial Pathogenesis*, **52**: 47-54.
- ZHENG J, YANG T, GAO S, CHENG M, SHAO Y, XI Y, GUO L, ZHANG D, GAO W, ZHANG G, YANG L, YANG T (2021). miR-148a-3p silences the CANX/MHC-I pathway and impairs CD8+ T cell-mediated immune attack in colorectal cancer. *The FASEB Journal*, **35**: e21776.
- ZHENG M, ZHU J (2022). Innate lymphoid cells and intestinal inflammatory disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**: 1856.
- ZUBAIR M, WANG S, ALI N (2021). Advanced approaches to breast cancer classification and diagnosis. *Frontiers in Pharmacology*, **11**: 2487.



EKLER

Ek-1 Etik Kurul Raporu



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

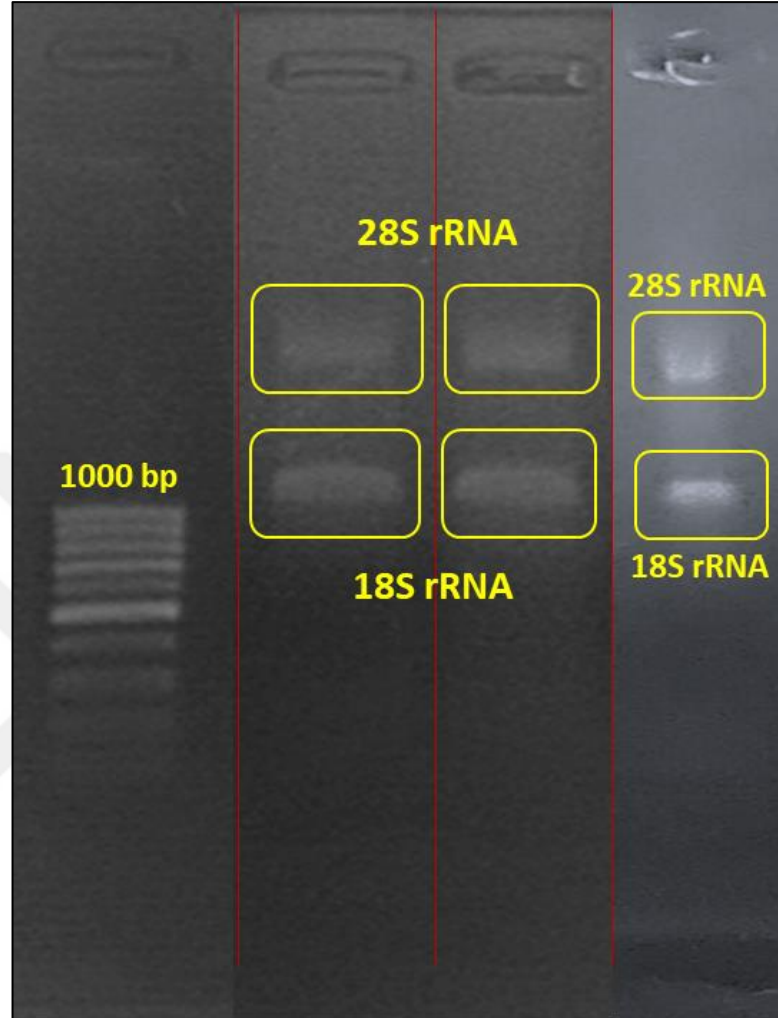
TOPLANTI TARİHİ : 03/06/2020
TOPLANTI NO : 2020-10
DOSYA NO : 2020-66
KARAR NO : 2020-10-81

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Biyoteknoloji Enstitüsü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU'nun yaptığı; araştırmacı olarak Prof. Dr. Hakan GÜRDAL ve Müge ÖÇAL DEMİRTAŞ'ın katıldığı "Meme Tümörlerinde Adaptif İmmün Sistemde Meydana Gelen Moleküler Değişikliklerin miRNA Düzeyinde Araştırılması" başlıklı çalışma Kurulumuzca değerlendirilmiş ve söz konusu çalışmanın Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" ne göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Fare
Hayvan Sayısı : 90
Geçerlilik Süresi : 15/06/2020-15/06/2022

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof. Dr. Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Doç. Dr. Halit KANCA (Üye)	Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Dr. Vet. Hek. Nigar YERLİKAYA (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	K	
Dr. Vet. Hek. Gürbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E	
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Uzm. Vet. Hek. Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	

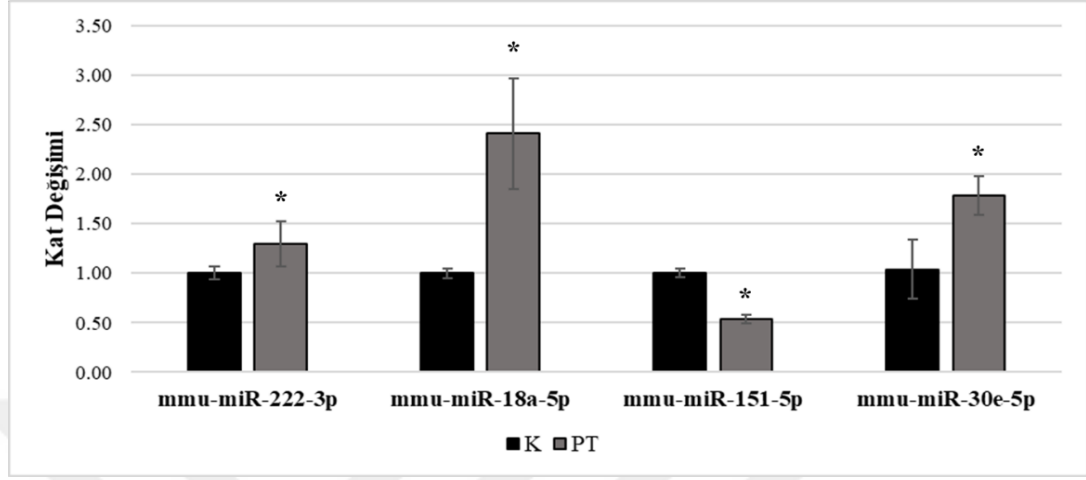
Ek-2 RNA Örnekleri Agaroz Jel Görüntüsü



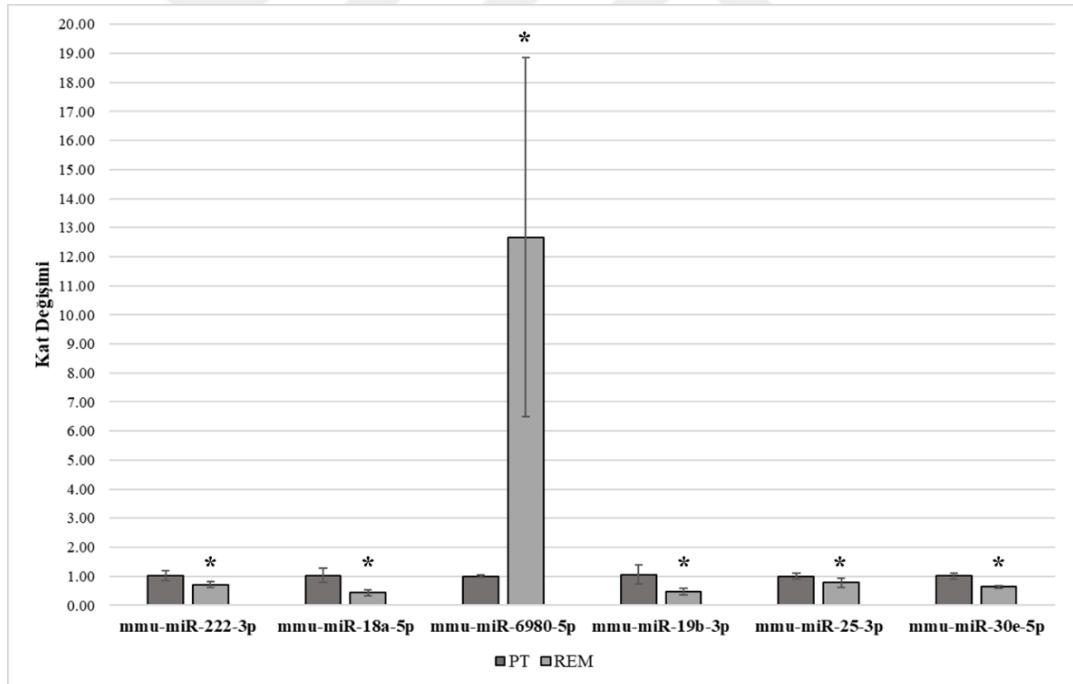
Ek-3 Mikrodizin %P Değerleri

Mikrodizin	%P Değeri
K-1	18.5
K-2	19.9
K-3	19.9
PT-1	20.7
PT-2	23.6
PT-3	25.7
IA-1	20.2
IA-2	26.3
IA-3	22.2

Ek-4 Gruplar Arası Anlamlı İfade Değişimi Gösteren miRNA'ların Eş Zamanlı PZR ile Doğrulanması

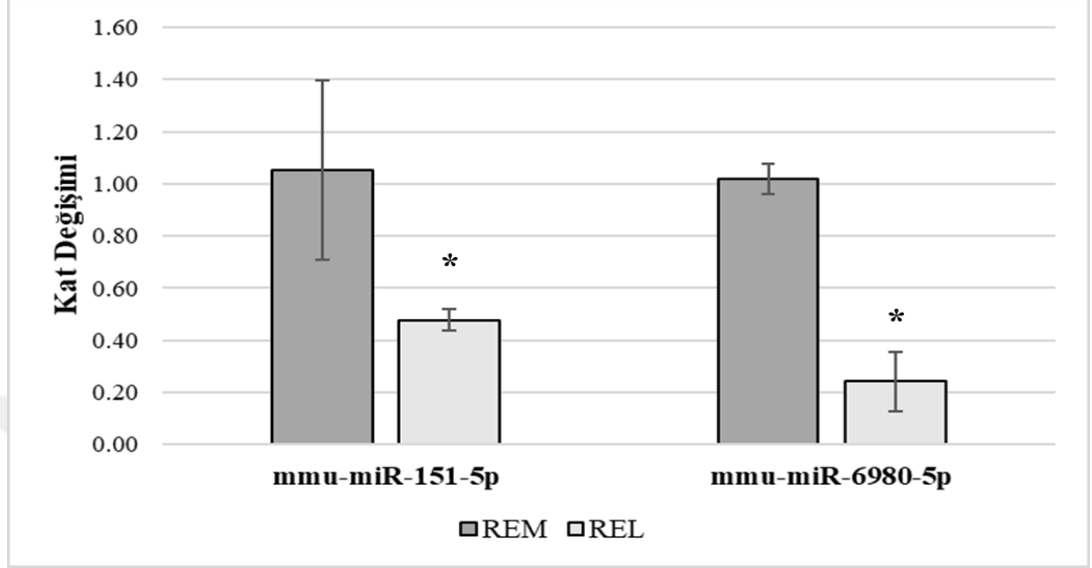


Mikrodizin verilerine göre K ve PT grubu arasında eş zamanlı PZR ile doğrulanan miRNA'lar



Mikrodizin verilerine göre PT ve REM grubu arasında eş zamanlı PZR ile doğrulanan miRNA'lar

Ek-4 Devam. Gruplar Arası Anlamli İfade Değişimi Gösteren miRNA'ların Eş Zamanlı PZR ile Doğrulanması



Mikrodizin verilerine göre REM ve REL grubu arasında eş zamanlı PZR ile doğrulanan miRNA'lar