

T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**ENKAPSÜLE EDİLMİŞ MİR-3670, MİR-8078 TEMELLİ TEDAVİ  
YAKLAŞIMININ MEME KANSERİNİN İMMÜNOTERAPİSİNDEKİ  
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Sedat KÖSTEKÇİ  
Danışman: Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE

VAN – 2024



T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**ENKAPSÜLE EDİLMİŞ MİR-3670, MİR-8078 TEMELLİ TEDAVİ  
YAKLAŞIMININ MEME KANSERİNİN İMMÜNOTERAPİSİNDEKİ  
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Sedat KÖSTEKÇİ

Bu çalışma Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından  
FDK-2021-9581 no'lu proje ile desteklenmiştir.

VAN – 2024



## KABUL VE ONAY SAYFASI

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Yasin Tülüce danışmanlığında, Sedat Köstekci tarafından sunulan “**Enkapsüle Edilmiş miR-3670, miR-8078 Temelli Tedavi Yaklaşımının Meme Kanserinin İmmünoterapisindeki Etkinliğinin Araştırılması**” başlıklı bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 21 /02 /2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve **Doktora tezi** olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. İsmail ÇELİK

İmza:

Üye: Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE

İmza:

Üye: Prof. Dr. Musa TÜRKER

İmza:

Üye: Prof. Dr. Hüseyin SÜZEK

İmza:

Üye: Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 12/03/2024 tarih ve 2024/14-1 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

.....

Enstitü Müdürü



## ETİK BEYAN

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

İmza

Sedat KÖSTEKCİ





## ÖZET

### ENKAPSÜLE EDİLMİŞ MİR-3670, MİR-8078 TEMELLİ TEDAVİ YAKLAŞIMININ MEME KANSERİNİN İMMÜNOTERAPİSİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

KÖSTEKÇİ, Sedat

Doktora Tezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yasin TÖLÜCE

2024, 188 sayfa

Bu çalışmada amaç, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde aşırı eksprese edilen bir immün kontrol noktası olan PD-L1'in ekspresyonunu mikroRNA-3670 (miR-3670) ve mikroRNA-8078 (miR-8078) kullanarak inhibe etmek ve meme kanserindeki immünoterapötik özelliklerini araştırmaktır.

Biyoinformatik analizlerimiz sonucunda miR-3670'in PD-L1 mRNA'nın iki farklı bölgesine yüksek bağlanma skorlarıyla (82.15 ve 87.35) bağlanabildiği, PD-L1 ligand sentez yollarını ve kanser hücrelerinin temel düzenleyici yollarını önemli ölçüde hedef aldığı ve meme kanserinde PD-L1 ekspresyonunu etkili bir şekilde baskıladığı tespit edilmiştir. Sitotoksikite analizi, her iki miRNA'nın 1nM dozunun MCF-7 hücre hattında yüksek toksisite sergilerken, sağlıklı bir meme dokusu hücre hattı olan HME1'de daha az toksik olduğunu tespit edilmiştir. Total RNA analizleri, toplam RNA konsantrasyonları ile sitotoksikite seviyeleri arasında anlamlı bir korelasyon olduğunu belirlemiştir. Yüksek sitotoksik dozlarda toplam RNA miktarında bir azalma gözlenirken, düşük sitotoksik dozlarda bir artış belirlenmiştir.

RT-PCR ve ELISA analizlerimize dayanarak, miRNA-3670 ve miRNA-8078 mimiklerinin 1 nM dozlarının MCF-7 hücrelerinde hem PD-L1 gen ifadesini hem de sPD-L1 protein seviyelerini azalttığı tespit edilmiştir. Ancak, HME1 hücreleri üzerinde anlamlı bir etki tespit edilememiştir. MCF-7 hücrelerinde, miR-3670 ve miR-8078 hücre sağkalımını azaltıp apoptozu tetiklerken, HME1 hücrelerinde anlamlı bir farka neden olmamıştır. Hücre göçü analizimize göre, miRNA'lar MCF-7 hücrelerinde hücre göçü üzerinde güçlü bir inhibitör etkiye sahipti (sırasıyla %81.47 ve %99.8) ve anti-metastatik özellik sergilemiştir. Tersine, HME1 hücrelerinde hücre göçünü inhibe edemediği (sırasıyla %22.8 ve %6.2) tespit edilmiştir.

Morfoloji ve biyoinformatik analizlere (KEGG ve GO) dayanarak, her iki miRNA da lamellipodia varlığında önemli bir düşüşe yol açarak MCF-7 hücrelerinde EMT'den MET'e geçişe neden olduğu tespit edilmiştir. Ancak, HME1 hücrelerinde görünür morfolojik değişiklikler gözlenmemiştir.

Metastazla ilişkili parametreler üzerinde yapılan ELISA analizlerine göre, MCF-7 ve HME1 hücrelerinde miR-3670 ile miR-8078'in 1nM dozu serbest e-kaderin antijen seviyelerini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 ve HME1 hücrelerinde sVEGF-A seviyesinde ve sTINAGL-1 antijen seviyesinde azalmaya neden olduğu bulunmuştur.

miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 hücrelerinde koloni oluşumunu sırasıyla %17.7 ve %78.2'lik bir azalma ile önemli ölçüde engellediği belirlenmiştir. MCF-7 hücre hattında 3D sferoid oluşumunu %90 oranında engellediği ve tipik olarak elipsoid şekilli 3D sferoidlerin aksine amorf sferoidlerin (sırasıyla %13 ve %22) gelişmesine neden olduğu tespit edilmiştir. Oluşturulan 3D sferoidlerin boyutunun 100 µm'nin

altında kaldığı ve hacimlerinin 1 mm<sup>3</sup> ten az olduğu tespit edilmiştir. HME1 hücre hattında 3D sferoid yapı gözlenmemiştir.

Sonuç olarak; miRNA'ların (miR-3670, miR-8078), meme kanseri hücrelerinde bağışıklık tepkilerinin yeniden yönlendirilmesi yoluyla kanser immünoterapisi için potansiyele sahip olabileceğini göstermiştir. Özellikle mevcut kanser tedavisi yaklaşımlarında giderek daha önemli hale gelen kişiselleştirilmiş kanser immünoterapisi de ve hedefe yönelik tedaviye ilişkin gelecekteki araştırmalar için bir temel sağlayabilir.

**Anahtar kelimeler:** Meme kanseri, Ko-kültür, MCF-7, İmmünoterapi, miR-3670, miR-8078, PD-L1, 3D sferoid



## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE EFFICIENCY OF ENCAPSULATED MIR-3670, MIR-8078-BASED THERAPY APPROACH IN IMMUNOTHERAPY OF BREAST CANCER

KÖSTEKÇİ, Sedat

Ph.D. Thesis, Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE

2024, 188 pages

The aim of this study is to inhibit the expression of PD-L1, an immune checkpoint overexpressed in MCF-7 breast cancer cells, using microRNA-3670 (miR-3670) and microRNA-8078 (miR-8078) and to investigate its immunotherapeutic properties in breast cancer.

As a result of our bioinformatic analysis, it was determined that miR-3670 could bind to two different regions of PD-L1 mRNA with high binding scores (82.15 and 87.35). It has been found to significantly target PD-L1 ligand synthesis pathways and key regulatory pathways of cancer cells and effectively suppress PD-L1 expression in breast cancer.

Cytotoxicity analysis determined that the 1nM dose of both miRNAs exhibited high toxicity in the MCF-7 cell line, while being less toxic in HME1, a healthy breast tissue cell line. Total RNA analyzes determined that there was a significant correlation between total RNA concentrations and cytotoxicity levels. While a decrease in the amount of total RNA was observed at high cytotoxic doses, an increase was determined at low cytotoxic doses.

Based on our RT-PCR and ELISA analyses, 1 nM doses of miRNA-3670 and miRNA-8078 mimics were found to reduce both PD-L1 gene expression and sPD-L1 protein levels in MCF-7 cells. However, no significant effect on HME1 cells was detected.

In MCF-7 cells, miR-3670 and miR-8078 reduced cell survival and triggered apoptosis, while it did not cause a significant difference in HME1 cells. According to our cell migration analysis, miRNAs had a strong inhibitory effect on cell migration in MCF-7 cells (81.47% and 99.8%, respectively) and exhibited anti-metastatic property. Conversely, it was found to be unable to inhibit cell migration in HME1 cells (22.8% and 6.2%, respectively).

Based on morphology and bioinformatics analyzes (KEGG and GO), both miRNAs were identified to cause a significant decrease in the presence of lamellipodia, causing the transition from EMT to MET in MCF-7 cells. However, no visible morphological changes were observed in HME1 cells.

According to ELISA analyzes on metastasis-related parameters, it was determined that 1nM doses of miR-3670 and miR-8078 significantly reduced free e-cadherin antigen levels in MCF-7 and HME1 cells. Additionally, miR-3670 and miR-8078 were found to cause a decrease in the sVEGF-A level and sTINAGL-1 antigen level in MCF-7 and HME1 cells.

It was determined that miR-3670 and miR-8078 significantly inhibited colony formation in MCF-7 cells, with a decrease of 17.7% and 78.2%, respectively. It was found to inhibit 3D spheroid formation in the MCF-7 cell line by 90% and cause the

development of amorphous spheroids (13% and 22%, respectively), as opposed to the typically ellipsoid-shaped 3D spheroids. It was determined that the size of the 3D spheroids created was below 100  $\mu\text{m}$  and their volume was less than 1  $\text{mm}^3$ . 3D spheroid structure was not observed in the HME1 cell line.

In conclusion; demonstrated that miRNAs (miR-3670, miR-8078) may have potential for cancer immunotherapy through redirection of immune responses in breast cancer cells. It may also provide a basis for future research into personalized cancer immunotherapy and targeted therapy, which is becoming increasingly important in current cancer treatment approaches in particular.

**Keywords:** Breast cancer, Co-culture, MCF-7, Immunotherapy, miR-3670, miR-8078, PD-L1, 3D spheroid



## TEŞEKKÜR

Bilim dünyasının mirasına küçük bir katkı olmasını, yazıldığı zamanın ötesindeki muhataplarına ulaşıp, hayata katma değer sunmasını umduğum bu tezin hazırlanma sürecinin her aşamasında değerli bilgilerini ve zamanını benden esirgemeyerek her fırsatta çalışmamla yakından ilgilenen, bilimde zor sorular sorarak, bilgimin sınırlarını zorlamam için bana ilham veren akademik danışmanım sayın Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE'ye en içten şükranlarımı sunuyorum.

Değerli katkılarından dolayı Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Prof. Dr. İsmail ÇELİK'e, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Muhammed ARABACI'ya, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın Doç. Dr. Abdurrahman EKİCİ ve Arş. Gör. Dr. Selahattin AYDEMİR'e, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Ayşe ŞEKER'e, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Temel Bilimleri, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN'a, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Halil ÖZKOL'a ve Dr. Öğr. Üyesi Gülşah EVYAPAN'a çok teşekkür ederim.

Tez sürecimin her aşamasında desteklerini esirgemeyen sayın Arş. Gör. Dr. Merve TUNÇYÜREKLİ, Doktorant Ahmet Yasin KELEŞ, Dr. Öğr. Üyesi. Fuat KARAKUŞ'a çok teşekkür ediyorum. Ayrıca çalışmalarım sürecince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen biricik kıymetli aileme destekleri için teşekkür ederim. Çalışmanın yürütülmesinde FDK-2021-9581nolu proje ile finansal desteklerinden dolayı Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkür ederim. Bu tezi hayatıma anlam kazandıran canım ANNEM ve merhum BABAM'a ithaf ediyorum.

2024

Sedat KÖSTEKCİ



## İÇİNDEKİLER

|                                                                               | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET .....                                                                    | i     |
| ABSTRACT .....                                                                | iii   |
| TEŞEKKÜR .....                                                                | v     |
| İÇİNDEKİLER.....                                                              | vii   |
| ÇİZELGELER LİSTESİ .....                                                      | xi    |
| ŞEKİLLER LİSTESİ.....                                                         | xiii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                                                 | xix   |
| 1 GİRİŞ.....                                                                  | 1     |
| 2 GENEL BİLGİLER .....                                                        | 5     |
| 2.1 Kanser.....                                                               | 5     |
| 2.2 Meme Kanseri .....                                                        | 7     |
| 2.2.1 Meme Kanserinin Tanımı, İnsidansı ve Epidemiyolojisi.....               | 7     |
| 2.3 <i>In Vitro</i> Meme Kanseri Çalışmalarında Kullanılan Hücre Hatları..... | 8     |
| 2.3.1 MCF-7 Hücre Hattı .....                                                 | 8     |
| 2.3.2 hTERT-HME1(CRL-4010) Hücre Hattı.....                                   | 9     |
| 2.4 Ko-Kültür (Hücre Ortak Kültürü) .....                                     | 10    |
| 2.5 Meme Kanserinde Tedavi Yöntemleri .....                                   | 11    |
| 2.6 Enkapsülasyon ve Transfeksiyon Verimliği Üzerine Etkisi.....              | 13    |
| 2.7 İmmün Gözetim ve Tarihçesi .....                                          | 14    |
| 2.8 Bağışıklık Sisteminin Organizasyon Yapısı ve Hücreleri.....               | 15    |
| 2.8.1 Doğuştan Gelen Bağışıklık .....                                         | 17    |
| 2.8.2 Adaptif Bağışıklık .....                                                | 17    |
| 2.8.3 T Lenfositleri.....                                                     | 18    |
| 2.8.4 T Hücrelerinin Antijen Tanıma Mekanizması .....                         | 22    |
| 2.9 Tümöre Karşı Bağışıklık Tepkisinin Oluşum Mekanizması.....                | 23    |
| 2.10 Meme Kanserinde İmmünoterapik Temelli Tedavi Yaklaşımları.....           | 23    |
| 2.11 Kontrol Noktası İnhibitörleri.....                                       | 25    |
| 2.11.1 PD-1 Reseptörü ve PD-L1 Ligandının Yapısı .....                        | 27    |
| 2.12 PD-1/PD-L1 Sinyalizasyon Mekanizması.....                                | 30    |
| 2.13 Meme Karsinogenezinde PD-L1 Üzerine Güncel Çalışmalar .....              | 32    |
| 2.14 miRNA'ların Keşfi .....                                                  | 33    |
| 2.15 miRNA'ların Biyogenezi .....                                             | 34    |
| 2.16 Meme Kanseri Tedavisinde miRNA'ların Kullanımı .....                     | 37    |
| 2.17 Hsa-miR-3670 Ailesi.....                                                 | 38    |
| 2.18 Hsa-miR-8078 Ailesi.....                                                 | 40    |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM.....                                                    | 43    |

|       |                                                                           |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1   | Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar .....                                  | 44 |
| 3.2   | Solüsyonlar ve Hazırlanışı.....                                           | 45 |
| 3.2.1 | Kristal Viole Solüsyonu .....                                             | 45 |
| 3.2.2 | Tripan Mavisi Solüsyonu .....                                             | 45 |
| 3.2.3 | Tripsin Solüsyonu .....                                                   | 45 |
| 3.2.4 | Akridin Turuncusu / Etidyum Bromür (AO/EB) Solüsyonu .....                | 45 |
| 3.2.5 | MTT Solüsyonu .....                                                       | 45 |
| 3.2.6 | Stok Alma Solüsyonu.....                                                  | 46 |
| 3.2.7 | T Hücre Stok Alma Solüsyonu .....                                         | 46 |
| 3.2.8 | 1X miRNA Tamponu.....                                                     | 46 |
| 3.2.9 | 1X PBS Tampon Hazırlanışı Solüsyonu.....                                  | 46 |
| 3.3   | Hücre Hatları ve Kullanılan Besiyerleri .....                             | 46 |
| 3.4   | Biyoinformatik Analizler .....                                            | 47 |
| 3.5   | Hücre Kültürüne Dayalı Yöntemler .....                                    | 48 |
| 3.5.1 | Hücrelerin Çözdürülmesi .....                                             | 49 |
| 3.5.2 | Hücre Pasajlanması .....                                                  | 49 |
| 3.5.3 | Hücre Dondurulması .....                                                  | 50 |
| 3.5.4 | Hücre Sayımı.....                                                         | 50 |
| 3.6   | miR-3670 ve miR-8078'nin Transfeksiyon ve Validasyonu .....               | 51 |
| 3.6.1 | miRNA'nın Hazırlanması .....                                              | 51 |
| 3.6.2 | miRNA'ların Spektrofotometrik Kontrolü.....                               | 52 |
| 3.6.3 | miRNA Mimiklerinin Transfeksiyonu.....                                    | 52 |
| 3.6.4 | miRNA'ların Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması .....                    | 53 |
| 3.6.5 | IC <sub>50</sub> Değeri .....                                             | 54 |
| 3.7   | Gerçek Zamanlı PCR'a Dayalı Yöntemler.....                                | 55 |
| 3.7.1 | Total RNA izolasyonu .....                                                | 55 |
| 3.7.2 | RNA'ların Miktar ve Safılık Tayini .....                                  | 56 |
| 3.7.3 | cDNA Sentezi .....                                                        | 57 |
| 3.7.4 | PD-L1 İfadesinin Gerçek Zamanlı PCR ile Analizi.....                      | 58 |
| 3.7.5 | RT-PCR Datalarının Analizi.....                                           | 59 |
| 3.7.6 | Serbest PD-L1 Analizi .....                                               | 60 |
| 3.8   | Ko-Kültüre Dayalı Çalışmalar.....                                         | 61 |
| 3.8.1 | PBMC Hücrelerinin Çözdürülmesi .....                                      | 62 |
| 3.8.2 | PBMC Hücrelerinin Stoklanması.....                                        | 62 |
| 3.8.3 | T Hücrelerinin Manyetik Ayrımı .....                                      | 63 |
| 3.8.4 | CD8 <sup>+</sup> T Hücrelerinin Pasajlanması .....                        | 65 |
| 3.8.5 | Kanser Hücre Hatları ile CD8 <sup>+</sup> T Hücrelerinin Ko-Kültürü ..... | 65 |
| 3.9   | Hücre Göçü Analizi.....                                                   | 65 |
| 3.10  | Apotoz ve Nekroz Analizi .....                                            | 66 |
| 3.11  | Koloni Oluşum Analizi .....                                               | 67 |

|                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.12 Morfoloji Analizi.....                                                              | 67  |
| 3.13 3D Sferoid Oluşum Analizi.....                                                      | 67  |
| 3.14 E-Kaderin Analizi.....                                                              | 68  |
| 3.15 VEGF Analizi.....                                                                   | 69  |
| 3.16 TINAGL-1 Analizi.....                                                               | 70  |
| 3.17 İstatistiki Analiz.....                                                             | 71  |
| 4. BULGULAR.....                                                                         | 73  |
| 4.1 Biyoinformatik Analizlere Ait Bulgular.....                                          | 73  |
| 4.1.1 miRNA'ların Validasyonu ve Hedef Genlerinin Belirlenmesi.....                      | 73  |
| 4.1.2 mRNA Hedefleme Analizine Ait Bulgular.....                                         | 77  |
| 4.1.3 Biyolojik Yolak Analizine Ait Bulgular.....                                        | 78  |
| 4.1.4 Yolak Zenginleştirme Analizlerine Ait Bulgular.....                                | 80  |
| 4.2 miRNA'ların Sitotoksik Aktivitesi ve IC <sub>50</sub> Değerine İlişkin Bulgular..... | 90  |
| 4.3 Total RNA İzolasyonuna Ait Bulgular.....                                             | 92  |
| 4.4 Real Time PCR ile PD-L1'in İfadesinin Analizine Ait Bulgular.....                    | 94  |
| 4.5 Serbest PD-L1 Analizine Ait Bulgular.....                                            | 97  |
| 4.6 Kansere Hücre Hattı ile CD8 <sup>+</sup> T Hücrelerinin Ko-Kültürü.....              | 100 |
| 4.7 Hücre Göçü Analizi Bulguları.....                                                    | 103 |
| 4.8 Apoptoz ve Nekroz Analiz Bulguları.....                                              | 105 |
| 4.9 Koloni Oluşum Analizi Bulguları.....                                                 | 109 |
| 4.10 Morfolojik Analiz Bulguları.....                                                    | 112 |
| 4.11 3D Sferoid Oluşum Analizi Bulguları.....                                            | 114 |
| 4.12 E-kaderin Analizinin Bulguları.....                                                 | 120 |
| 4.13 VEGF Analizinin Bulguları.....                                                      | 122 |
| 4.14 TINAGL-1 Analizinin Bulguları.....                                                  | 125 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....                                                                | 127 |
| KAYNAKLAR.....                                                                           | 153 |
| ÖZ GEÇMİŞ.....                                                                           | 195 |



## ÇİZELGELER LİSTESİ

|                                                                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Çizelge 2.1 MCF-7 ve HME1 hücre hatlarının temel özellikleri .....                                                      | 9   |
| Çizelge 2.2 T-Lenfositlerinin fonksiyonları .....                                                                       | 20  |
| Çizelge 3.1 Tez çalışmasının iş akış şeması.....                                                                        | 43  |
| Çizelge 3.2 Kullanılan cihazlar. ....                                                                                   | 44  |
| Çizelge 3.3 Kullanılan kimyasallar. ....                                                                                | 44  |
| Çizelge 3.4 Hücre hatları, katalog numaraları ve besiyeri içerikleri. ....                                              | 47  |
| Çizelge 3.5 Total RNA çözeltisi içindeki DNA'nın ayrılması. ....                                                        | 57  |
| Çizelge 3.6 Ters transkripsiyon için reaksiyon çözeltisinin hazırlanışı. ....                                           | 57  |
| Çizelge 3.7 Tamamlayıcı mix hazırlanışı. ....                                                                           | 58  |
| Çizelge 3.8 PD-L1 ifadesinin analizi için kullanılan primerler.....                                                     | 58  |
| Çizelge 3.9 RT-PCR amplifikasyon prosedürü. ....                                                                        | 59  |
| Çizelge 4.1 miRNA-3670 ve miRNA-8078'in kimliklendirme bilgileri. ....                                                  | 73  |
| Çizelge 4.2 hsa-miRNA-3670 mimiğine ait mRNA hedefleme analizi sonuçları. ....                                          | 78  |
| Çizelge 4.3 miR-3670 ve miR-8078'in IC <sub>50</sub> değerleri. ....                                                    | 92  |
| Çizelge 4.4 MCF-7 hücre hattında PD-L1'in mRNA gen ifade düzeyi .....                                                   | 95  |
| Çizelge 4.5 HME1 hücre hattında PD-L1 mRNA gen ifade düzeyi .....                                                       | 96  |
| Çizelge 4.6. miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 ve HME1 hücre hatlarına ait yara<br>iyileşmesi analizi görüntüsü..... | 104 |



## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1 Kanser oluşumu ve metastaz safhaları .....                                                       | 5  |
| Şekil 2.2 Türkiye'de kadınlarda teşhis edilen kanserlerin dağılımı .....                                   | 6  |
| Şekil 2.3 2020'de dünya genelinde kadınlarda tespit edilen yeni kanser vakaları.....                       | 7  |
| Şekil 2.4 Türkiye'de kanser türleri ve kadınlar arasındaki dağılımı .....                                  | 8  |
| Şekil 2.5 Hücre hatlarının inverted mikroskop görüntüsü.....                                               | 10 |
| Şekil 2.6 Kullanılan standart ko-kültür modelleri .....                                                    | 11 |
| Şekil 2.7 Kanser tedavisinde güncel yöntemler.....                                                         | 12 |
| Şekil 2.8 Kanser immünoterapisinin tarihindeki kilometre taşları .....                                     | 15 |
| Şekil 2.9 Lenfatik sistem ve bağışıklık sisteminin unsurları .....                                         | 16 |
| Şekil 2.10 Bağışıklık sistemi çeşitleri ve hücreleri.....                                                  | 17 |
| Şekil 2.11 Hematopoetik kök hücrelerden CD8 <sup>+</sup> ve CD4 <sup>+</sup> T hücrelerinin üretilmesi.... | 18 |
| Şekil 2.12 CD8 <sup>+</sup> T hücresinin aktivasyonu ve sitotoksik etki mekanizması .....                  | 20 |
| Şekil 2.13 CD4 <sup>+</sup> hücrelerinin aktivasyonu ve dönüşümü.....                                      | 21 |
| Şekil 2.14 T lenfositlerinin antijen tanıma mekanizması .....                                              | 23 |
| Şekil 2.15 Kanser tedavisinde kullanılan immünoterapi çeşitleri .....                                      | 24 |
| Şekil 2.16 PD-L1 ifadesinin düzenleyici mekanizması.....                                                   | 28 |
| Şekil 2.17 PD-1 reseptörünün protein yapısı.....                                                           | 29 |
| Şekil 2.18 PD-L1 ligandının protein yapısı .....                                                           | 30 |
| Şekil 2.19 PD-1 yolu üzerinden sinyal iletiminin engellenmesi .....                                        | 31 |
| Şekil 2.20 miRNA biyogenezinin kanonik ve kanonik olmayan yolları.....                                     | 34 |
| Şekil 2.21 miRNA'ların biyogenezi ve etki mekanizması .....                                                | 36 |
| Şekil 2.22 miRNA üreten genomik lokusların çeşitliliği .....                                               | 37 |
| Şekil 2.23 Prekürsör ve olgun hsa-miR-3670'in genom konumu .....                                           | 39 |
| Şekil 2.24 Prekürsör ve olgun hsa-miR-8078'in genom konumu .....                                           | 41 |
| Şekil 3.1 miRBase veri tabanı web ekran görünümü .....                                                     | 47 |
| Şekil 3.2 Biyoinformatik analiz için takip edilen akış şeması.....                                         | 48 |
| Şekil 3.3 Thoma lamı ile hücre sayımı .....                                                                | 51 |
| Şekil 3.4 miRNA mimiklerinin transfeksiyon süreç şeması .....                                              | 53 |
| Şekil 3.5 miRNA 3670 ve 8078'in MCF-7 ve HME1 üzerindeki sitotoksik etkisi .....                           | 54 |
| Şekil 3.6 İzole edilen RNA'ların miktarın ve saflığının Nanodrop ile tayini .....                          | 56 |
| Şekil 3.7 cDNA'ların miktar ve saflığının Nanodrop ile tayini .....                                        | 58 |

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 3.8 PD-L1 ifadesinin gerçek zamanlı PCR ile analizi.....                                                | 59 |
| Şekil 3.9 Süpernatantta çözünen PD-L1 antijen miktarının PD-L1 elisa kiti ile tayini .                        | 61 |
| Şekil 3.10 Ko-kültüre dayalı yöntemlerde iş akış şeması.....                                                  | 61 |
| Şekil 3.11 Stok PBMC hücrelerinin çözülme işlemi.....                                                         | 62 |
| Şekil 3.12 Stok PBMC hücrelerinden T hücrelerinin manyetik ayırım işlemi.....                                 | 64 |
| Şekil 3.13 İzole edilen CD8 <sup>+</sup> hücrelerinin 96 kuyucuklu plakaya ekim işlemi.....                   | 64 |
| Şekil 3.14 Süpernatantta e-kaderin miktarının elisa kiti ile tayini .....                                     | 69 |
| Şekil 3.15 Süpernatanttaki VEGF miktarının elisa kiti ile tayini.....                                         | 70 |
| Şekil 3.16 Süpernatantta TINAGL-1 miktarının elisa kiti ile tayini .....                                      | 71 |
| Şekil 4.1 miR-3670'in ortak ve örtüşen hedef genlerinin Venn diyagram gösterimi .....                         | 74 |
| Şekil 4.2 miR-8078'in ortak ve örtüşen hedef genlerinin Venn diyagram gösterimi .....                         | 75 |
| Şekil 4.3 miR-3670 mimik miRNA'sına ait gen-etkileşim grafiği .....                                           | 76 |
| Şekil 4.4 miR-8078 mimik miRNA'sına ait gen-etkileşim grafiği .....                                           | 77 |
| Şekil 4.5 miR-3670 mimik miRNA'nın biyolojik sinyal yolağı-etkileşim grafiği.....                             | 79 |
| Şekil 4.6 miR-8078 ile ilişkili biyolojik sinyal yolağı-etkileşim grafiği.....                                | 79 |
| Şekil 4.7 PD-L1 yolağını gösteren KEGG figürü .....                                                           | 81 |
| Şekil 4.8 miRNA-3670 ile ilgili önemli genler için KEGG yolak analizinin sonuçları .                          | 82 |
| Şekil 4.9 miRNA-3670 ile ilişkili önemli genlerin biyolojik proses (BP) analizi<br>sonuçları .....            | 83 |
| Şekil 4.10 miRNA-3670 ile ilişkili önemli genlerin moleküler fonksiyon (MF) analizinin<br>sonuçları .....     | 84 |
| Şekil 4.11 miRNA-3670 ile ilişkili önemli genlerin hücresel komponent (CC) analizi<br>sonuçları .....         | 85 |
| Şekil 4.12 miRNA-8078 ile ilişkili önemli genlerin KEGG yolak analizi sonuçları .....                         | 86 |
| Şekil 4.13 miRNA-8078 ile ilişkili önemli genlerin biyolojik proses (BP) analizi<br>sonuçları .....           | 87 |
| Şekil 4.14 miRNA-8078 ile ilişkili önemli genlerin moleküler fonksiyon (MF) analizi<br>sonuçları .....        | 88 |
| Şekil 4.15 miRNA-8078 ile ilişkili önemli genlerin hücresel komponent (CC) analizi<br>sonuçları .....         | 89 |
| Şekil 4.16 miRNA-3670'in MCF-7 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki doza bağlı<br>sitotoksik etkisi..... | 90 |

|                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 4.17 miRNA-8078'in MCF-7 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki doza bağlı sitotoksik etkisi.....                                            | 91  |
| Şekil 4.18 miRNA-3670'in HME1 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki doza bağlı sitotoksik etkisi.....                                             | 91  |
| Şekil 4.19 miRNA-8078'in HME1 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki doza bağlı sitotoksik etkisi.....                                             | 92  |
| Şekil 4.20 MCF-7 hücre hattının miR-3670 ve miR-8078 ile uygulanmasından sonra izole edilen total RNA konsantrasyonlarının doza bağlı değerleri.....  | 93  |
| Şekil 4.21 HME1 hücre hattının miR-3670 ve miR-8078 ile uygulanmasından sonra izole edilen total RNA konsantrasyonlarının doza bağlı değerleri.....   | 93  |
| Şekil 4.22 Farklı dozlarda miR-3670 ve miR-8078 ile transfekte edilen MCF-7 hücre hattında PD-L1 gen ekspresyon seviyesinin grafiksel gösterimi ..... | 94  |
| Şekil 4.23 Farklı dozlarda miR-3670 ve miR-8078 ile transfekte edilen HME1 hücre hattında PD-L1 geninin ifade düzeyinin grafiksel gösterimi.....      | 95  |
| Şekil 4.24 PD-L1 ve GAPDH genlerinin erime eğrisi grafiği.....                                                                                        | 96  |
| Şekil 4.25 PD-L1 ve GAPDH genleri için döngü başına floresan emisyonu birikimini gösteren amplifikasyon eğrisi grafiği .....                          | 97  |
| Şekil 4.26 miR-3670 uygulanan MCF-7 hücre hattında doza bağlı serbest PD-L1 antijen miktarları .....                                                  | 98  |
| Şekil 4.27 miR-8078 uygulanan MCF-7 hücre hattında doza bağlı serbest PD-L1 antijen miktarları .....                                                  | 99  |
| Şekil 4.28 miR-3670 uygulanan HME1 hücre hattında doza bağlı serbest PD-L1 antijen miktarları.....                                                    | 99  |
| Şekil 4.29 miR-8078 uygulanan HME1 hücre hattında doza bağlı serbest PD-L1 antijen miktarları.....                                                    | 100 |
| Şekil 4.30 İzolasyonu gerçekleştirilen CD8 <sup>+</sup> T hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü .....                                             | 101 |
| Şekil 4.31 CD8 <sup>+</sup> T hücrelerinin PHA (Fitohemaglutinin) ile aktivasyon sonrası inverted mikroskop görüntüsü .....                           | 101 |
| Şekil 4.32 Ko kültür (CD8 <sup>+</sup> T/MCF-7, CD8 <sup>+</sup> T/HME1) sonrası yapılan MTT analizine ait multiplate görüntüsü.....                  | 102 |

|                                                                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 4.33 miRNA uygulanan MCF-7 ve HME1 hücreleri ile CD8 <sup>+</sup> T hücrelerinin ortak kültürü sonrası canlılık grafikleri .....                           | 102 |
| Şekil 4.34 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücre hattında grubuna ait yara iyileşmesi yüzde grafiği.....                                                    | 103 |
| Şekil 4.35 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan HME1 hücre hattında grubuna ait yara iyileşmesi yüzde grafiği.....                                                     | 104 |
| Şekil 4.36 MCF-7 hücrelerinin 48 saat boyunca miR-3670 ve miR-8078 ile muamelesinden sonra apoptotik ve nekrotik hücre seviyelerini gösteren yüzde grafiği ..... | 106 |
| Şekil 4.37 miR-3670 ve miR-8078 ile 48 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin AO-EtBr boyama yöntemiyle apoptozun tespiti .....                          | 107 |
| Şekil 4.38 HME1 hücrelerinin 48 saat boyunca miR-3670 ve miR-8078 ile muamelesinden sonra apoptotik ve nekrotik hücre seviyelerini gösteren yüzde grafiği .....  | 108 |
| Şekil 4.39 miR-3670 ve miR-8078 ile 48 saat boyunca muamele edilen HME1 hücrelerinin AO-EtBr boyama yöntemiyle apoptozun tespiti .....                           | 109 |
| Şekil 4.40 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinin koloni oluşum grafiği .....                                                                         | 110 |
| Şekil 4.41 miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 hücrelerinde koloni oluşumu üzerindeki etkisi .....                                                                     | 111 |
| Şekil 4.42 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan HME1 hücrelerinin koloni oluşum grafiği.....                                                                           | 111 |
| Şekil 4.43 miR-3670 ve miR-8078'in HME1 hücrelerinde koloni oluşumu üzerindeki etkisi .....                                                                      | 112 |
| Şekil 4.44 miR-3670 ve miR-8078 mimikleri ile transfekte edilen MCF-7 hücrelerinin transfeksiyon sonrası morfolojisinin gözlenmesi .....                         | 113 |
| Şekil 4.45 miR-3670 ve miR-8078 mimikleri ile transfekte edilen HME1 hücrelerinin transfeksiyon sonrası morfolojisinin gözlenmesi .....                          | 113 |
| Şekil 4.46 miRNA uygulanmış MCF-7 hücrelerinin oluşturduğu 3D tümör sferoid ve şematik diyagramı .....                                                           | 114 |
| Şekil 4.47 MCF-7 hücrelerinin 15 ve 30. gün sonunda oluşan 3D sferoid yapıları .....                                                                             | 115 |

|                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 4.48 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinde 3D sferoid yüzdesini gösteren grafik .....                                       | 115 |
| Şekil 4.49 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinde 3D sferoid oluşumu.....                                                          | 116 |
| Şekil 4.50 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan HME1 hücrelerinde 3D sferoid oluşum yüzdesini gösteren grafik.....                                  | 116 |
| Şekil 4.51 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan HME1 hücrelerinin 30. gün sonunda görüntüsü .....                                                   | 117 |
| Şekil 4.52 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinde amorf 3D sferoidlerin gelişimini gösteren yüzde grafiği .....                    | 117 |
| Şekil 4.53 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinde 30. gün sonunda oluşan non-regüler 3D sferoidler .....                           | 118 |
| Şekil 4.54 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücreleri tarafından oluşturulan 3D sferoidlerin çap dağılım grafiği .....                    | 118 |
| Şekil 4.55 miRNA uygulanmış MCF-7 hücreleri tarafından oluşturulan 3D sferoidlerin hacim dağılım grafiği .....                                | 119 |
| Şekil 4.56 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinde anjiyojenik sınırı aşan 3D sferoid sayısının gruplara göre dağılım grafiği ..... | 120 |
| Şekil 4.57 miR-3670 uygulanan MCF-7 hücrelerinde serbest e-kaderin antijen seviyesinin grafiği .....                                          | 121 |
| Şekil 4.58 miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinde serbest e-kaderin antijen seviyesinin grafiği .....                                          | 121 |
| Şekil 4.59 miR-3670 uygulanan HME1 hücrelerinde serbest e-kaderin antijen seviyesinin grafiği .....                                           | 122 |
| Şekil 4.60 miR-8078 uygulanan HME1 hücrelerinde serbest e-kaderin antijen seviyesinin grafiği .....                                           | 122 |
| Şekil 4.61 miR-3670 uygulanan MCF-7 hücrelerindeki serbest VEGF-A antijen seviyesinin grafiği .....                                           | 123 |
| Şekil 4.62 miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerindeki serbest VEGF-A antijen seviyesinin grafiği .....                                           | 123 |
| Şekil 4.63 miR-3670 uygulanan HME1 hücrelerindeki serbest VEGF-A antijen seviyesinin grafiği .....                                            | 124 |

|                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 4.64 miR-8078 uygulanan HME1 hücrelerindeki serbest VEGF-A antijen    |     |
| seviyesinin grafiği .....                                                   | 124 |
| Şekil 4.65 miR-3670 uygulanan MCF-7 hücrelerindeki serbest TINAGL-1 antijen |     |
| seviyesinin grafiği .....                                                   | 125 |
| Şekil 4.66 miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerindeki serbest TINAGL-1 antijen |     |
| seviyesinin grafiği .....                                                   | 125 |
| Şekil 4.67 miR-3670 uygulanan HME1 hücrelerindeki serbest TINAGL-1 antijen  |     |
| seviyesinin grafiği .....                                                   | 126 |
| Şekil 4.68 miR-8078 uygulanan HME1 hücrelerindeki serbest TINAGL-1 antijen  |     |
| seviyesinin grafiği .....                                                   | 126 |



## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamalarıyla aşağıda sunulmuştur.

| Simgeler          | Açıklama           |
|-------------------|--------------------|
| %                 | Yüzde              |
| °C                | Santigrat derece   |
| $\Delta\Delta Ct$ | Karşılaştırmalı Ct |
| bp                | Baz çifti          |
| $\beta$           | Beta               |
| Dk                | Dakika             |
| rpm               | Devir/dakika       |
| g                 | Gram               |
| L                 | Litre              |
| $\mu$             | Mikro              |
| $\mu L$           | Mikrolitre         |
| mg                | Miligram           |
| mL                | Mililitre          |
| M                 | Molar              |
| nmol              | Nanomol            |
| nM                | Nanomolar          |
| pg                | Pikogram           |
| sn                | Saniye             |
| U                 | Ünite              |

| <b>Kısaltmalar</b>              | <b>Açıklama</b>                              |
|---------------------------------|----------------------------------------------|
| <b>AKT</b>                      | Protein Kinaz B                              |
| <b>APC</b>                      | Antijen Sunucu Hücreler                      |
| <b>CBX4</b>                     | Polycomb Kromoboks 4                         |
| <b>cDNA</b>                     | Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit           |
| <b>CKAP</b>                     | Hücre İskeleti ile İlişkili Protein          |
| <b>Ct</b>                       | Döngü eşiği                                  |
| <b>CTLA-4</b>                   | Sitotoksik T-Lenfosit İlişkili Antijen-4     |
| <b>DC</b>                       | Dendritik Hücreler                           |
| <b>DSÖ</b>                      | Dünya Sağlık Örgütü                          |
| <b>DGCR8</b>                    | DiGeorge Sendromu Kritik Sendrom Bölgesi 8   |
| <b>DNA</b>                      | Deoksiribonükleik Asit                       |
| <b>Drosha</b>                   | Ribonükleaz III Enzimi                       |
| <b>ER</b>                       | Östrojen Reseptörleri                        |
| <b>Fas-L</b>                    | Fas Ligand                                   |
| <b>FDA</b>                      | Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi                |
| <b>FZD4</b>                     | Frizzled Sınıfı Reseptör 4                   |
| <b>GAPDH</b>                    | Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz          |
| <b>GREB1</b>                    | Büyüme Düzenleyici Östrojen Reseptörü 1      |
| <b>HECTD3</b>                   | HECT domain E3 Ubikuitin Protein Ligaz 3     |
| <b>HIF-1<math>\alpha</math></b> | Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör            |
| <b>HNF1A</b>                    | Hepatosit Nükleer Faktör 1 Homeoboks A       |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b>  | İnterferon-Gama                              |
| <b>IKB</b>                      | İmmün Kontrol Noktası Blokajı                |
| <b>IL</b>                       | İnterlökin                                   |
| <b>ITIM</b>                     | İmmünoresptör Tirozin Bazlı İnhibitör Motifi |
| <b>ITSM</b>                     | İmmünoresptör Tirozin Bazlı Anahtar Motifi   |
| <b>MAPK</b>                     | Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz          |
| <b>MHC</b>                      | Majör Histokompatibilite Kompleks            |
| <b>MikroRNA (miRNA)</b>         | Mikro Ribonükleik Asit                       |

**Kısaltmalar (devamı)****Açıklama****MCF-7**

Michigan Kanseri Vakfı-7

**mTOR**

Rapamisin'in Memeli Hedefi Kinazı

**NF- $\kappa$ B**

Nükleer Faktör Kappa B

**NK**

Doğal Öldürücü

**PBMC**

Periferik Kan Mononükleer Hücre

**PBS**

Fosfat Tampon Çözeltisi

**PD-1**

Programlanmış Hücre Ölümü Protein 1

**PD-L1**

Programlanmış Ölüm Ligand 1

**PD-L2**

Programlanmış Ölüm Ligand 2

**PHA**

Fitohemaglutinin

**PI3K**

Fosfoinositid 3-Kinaz

**Pre-miRNA**

Prekürsör Mikro RNA

**RISC**

RNA Kaynaklı Susturma Kompleksi

**RNA**

Ribonükleik Asit

**RT-PCR**

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**SNIP1**

Smad Nükleer Etkileşen Protein 1

**sPD-L1**

Çözünür Programlanmış Ölüm Ligand 1

**STAT-3**

Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü 3

**TCR**

T Hücre Reseptörleri

**Th**

Yardımcı T Hücre

**TLR**

Toll-Benzeri Reseptörler

**TNF-  $\alpha$** 

Tümör Nekroz Faktörü-Alfa

**TRIB1**

Tribbles Homolog 1 Protein

**UTR**

mRNA'da Tercüme Edilmemiş Bölge

**VEGF**

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

**WNT**

Wingless (Kanatlı) Sinyal Protein



## 1. GİRİŞ

Kanser, bölünme kontrolünü kaybetmiş, fizyolojik sınırların ötesinde hızla büyüeyebilen ve komşu doku ve organlara yayılabilen dönüşmüş hücrelerin neden olduğu bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Dünya genelinde gerçekleşen ölümlerin sebepleri arasında kanser ikinci sırada yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, kanser 2020 yılında yaklaşık 10 milyon kişinin ölümüne neden olmuştur; bir başka deyişle, yaklaşık her altı ölümden biri kanserden kaynaklanmaktadır (Ferlay vd.,2020; de Martel vd., 2020; Anonim, 2020b). Son araştırmalar, 2019 yılı itibari ile görülmeye başlanan ve tüm dünyayı etkisi altına alan COVID 19 salgını nedeniyle güncel kanser verilerinin toplanmasının mümkün olmadığını bildirmiştir. Aynı raporlar, pandeminin ikincil etkileri sonucu kanser teşhis ve tedavisinde yaşanan gecikmeler nedeniyle yeni kanser vakaları ve ölüm sayılarında ciddi bir artış olabileceğini belirtmektedir (Yabroff vd., 2022). En yaygın görülen kanserler meme, akciğer, kolorektal ve prostattır (Anonim, 2020b). Kadın sağlığını ciddi anlamda tehdit eden ve bu cinsiyette en sık görülen meme kanseri, kansere bağlı ölümlerin büyük bir kısmını oluşturmaktadır (Siegel vd., 2021). Hücrelerdeki onkogenlerin anormal ekspresyonunun kaçınılmaz olarak tümörigenez ve kanser gelişimi ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Kanser tedavisi için miRNA bazlı tedaviler, bu genlerin mRNA'larını transkripsiyondan önce veya sonra susturmak için potansiyel adaylar olarak kabul edilmiştir (Han vd., 2019; Han vd., 2020; Rupaimoole ve Slack, 2017).

miRNA'lar yaklaşık 21-23 nükleotid uzunluğunda tek iplikli RNA molekülleridir (Lee vd., 1993). miRNA'lar kodlamayan RNA sınıfına ait olup mRNA'nın ekspresyonunun ve transkripsiyonel kontrolünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Beavers vd., 2015). miRNA'lar, immün kontrol noktası reseptörlerinin programlanmış hücre ölümü proteini (PD-1) ve T-lenfosit ilişkili protein 4 (CTLA-4) mRNA'sını hedefleyebildikleri için immün kontrol noktası blokerleri (IKB) olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Bu özellikler, kanser immünoterapisinde yeni bir stratejik anlayışa yol açmıştır. Terapötik miRNA, mimik miRNA ve antimiR'ler (miRNA'ların inhibitörleri) olarak ikiye ayrılır (Rupaimoole ve Slack, 2017). Mimik miRNA'lar gen susturma için kullanılan doğal olmayan, çift sarmallı RNA parçalarıdır ve gene özgü bir şekilde hareket ederler (Wang, 2011). Mimik miRNA'lar, "miRNA

hedefleme" veya "miRNA işlev kazanımı" stratejisi yoluyla kanser gibi hastalıklarda hücrede kaybolan veya azalan miRNA ifadesini düzenlemek için kullanılır (Rupaimoole ve Slack, 2017; Wang, 2011). Anti-miRNA'lar, transfeksiyondan sonra miRNA fonksiyonunu spesifik olarak inhibe etmek (onkojenik mikroRNA'ların ekspresyonunu bloke etmek) için kullanılan tek sarmallı, modifiye edilmiş RNA'lardır (Ling vd., 2013; Tang vd., 2017). Programlanmış hücre ölümü ligand-1'i (PD-L1) aşırı eksprese eden kanserlerde miRNA'ları manipüle ederek PD-L1 blokajının anti-tümör etkinliği ve kişiselleştirilmiş tedavi planlaması için önemli olduğu bildirilmiştir (Zhang vd., 2023). İmmün yanıtı engelleyici bir ligand olan PD-L1'in kanser hücrelerinde, bu ligandın reseptörü olan PD-1'in ise immün hücrelerde ifade edildiği bilinmektedir (Dua ve Tan, 2017; Sun vd., 2016). PD-1/PD-L1 eşleşmesi, tümörlerin ve virüsle enfekte olmuş hücrelerin bağışıklık sistemi gözetiminden kaçmasını sağlayan önemli bir bağışıklık sistemi mekanizmasıdır (McArthur, 2016). Kısaca, tümör veya enfekte hücrelerin yüzeyindeki PD-L1 ligandının T hücrelerinin yüzeyindeki PD-1 reseptörüyle birleşmesi, T hücresinde PI3K/AKT ve Ras aktivasyonunu engelleyerek bu hücrelerin sitotoksik aktivitesini bozar ve bu da tümör ve virüsle enfekte hücrelerin hayatta kalmasını sağlar (Zhang vd., 2023; Quan vd., 2022). Çalışmalar, PD-1/PD-L1'in monoklonal antikorlar veya küçük molekülü ilaçlarla bloke edilmesinin bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu ve sitotoksik aktivitesini artırdığını göstermiştir (Liu vd., 2021). Meme kanserini tedavi etmek için dünya çapında büyük çabalar sarf edilmekte ve yeni tedaviler geliştirilmektedir. Son yıllarda, umut verici ve yaygın olarak çalışılan tedavilerden biri immün kontrol noktası engelleyici (IKB) tedavisidir (Rotte, 2019; Qureshi vd., 2022). Klinik kanser tedavisinde, çeşitli ilaçlar ve antikorlar IKB inhibitörleri olarak bir tedavi seçeneği haline gelmiştir (Aksu ve Şengül, 2019). Bununla birlikte, kalıcı ve ideal bir klinik fayda henüz elde edilememiştir, bu nedenle bir IKB tedavisinin geliştirilmesi gereklidir. Kimyasal ilaçlar ve antikor bazlı ilaçların yanı sıra miRNA'lar da IKB tedavisinde yeni bir araştırma alanı olarak önem kazanmıştır (Zhou vd., 2023).

Tez projemiz kapsamında; meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) aşırı eksprese edilen bir immün kontrol noktası olan PD-L1'in ekspresyonunu miR-3670, miR-8078'ile bloke edilmesi ve meme kanserindeki immünoterapötik rolünün belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca miR-3670, miR-8078'in MCF-7 kanser hücrelerindeki terapötik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamız sonucunda elde edeceğimiz

bilgiler miR-3670, miR-8078'in meme kanseri immünoterapisi üzerindeki moleküler etkilerinin aydınlatılması açısından ön veri niteliğinde olmasının yanı sıra ileride moleküler ve klinik bazlı çalışmalara temel oluşturacaktır.

Çalışmamızın Özgün Değeri;

- Literatür araştırmamız, **ilk kez** bu çalışmada kullanılması dışında, miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 ve HME1 hücre hatlarındaki immünoterapötik etkinliği veya PD-L1 için immün kontrol noktası blokerleri (IKB) olarak kullanımı konusunda herhangi bir çalışma yapılmadığını ortaya koymuştur.
- Bu çalışmada, miR-3670 ve miR-8078 transfekte edilmiş MCF-7 hücreleri **ilk kez** *in vitro* ortamda CD8<sup>+</sup> hücreleri ile birlikte kültüre edilmiş ve immün kontrol noktası üzerindeki etkisi araştırılmıştır.
- miR-3670 ve miR-8078'in *in vitro* ortamda meme kanserindeki antiproliferatif, anti-metastatik ve apoptotik aktivitesi **ilk kez** bu çalışmada test edilmiştir.
- Literatürde ilk kez miR-3670 ve miR-8078 mimikleri iki hücre hattında (MCF-7 ve HME1) 6 farklı dozda (1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM) uygulanmıştır.
- Tez projemiz, miR-3670, miR-8078 mimiklerinin *in vitro* olarak iki hücre hattı (MCF-7 ve HME1) tarafından oluşturulan 3D sferoidler üzerindeki etkilerini araştıran ilk projedir. Tüm bunlar çalışmamızın özgün niteliğini oluşturmaktadır.

Çalışmamızdan Beklenen Sonuçlar;

- Projemiz, miR-3670 ve miR-8078 mimiklerinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunu inhibe ettiğini ve sonuç olarak hücre zarında protein formundaki varlığını azalttığını göstermeyi amaçlarken, HME1 sağlıklı meme hücrelerinde bu aktivitenin tolere edilebilir bir tablosunu oluşturmayı hedeflemektedir.
- Mevcut projemizde, miR-3670 ve miR-8078 mimiklerinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde transfeksiyon yoluyla kanserle ilişkili genlerin ekspresyonunu inhibe ederek sitotoksik, antiproliferatif, apoptotik ve anti-metastatik etkilere sahip olabileceği varsayılmıştır.

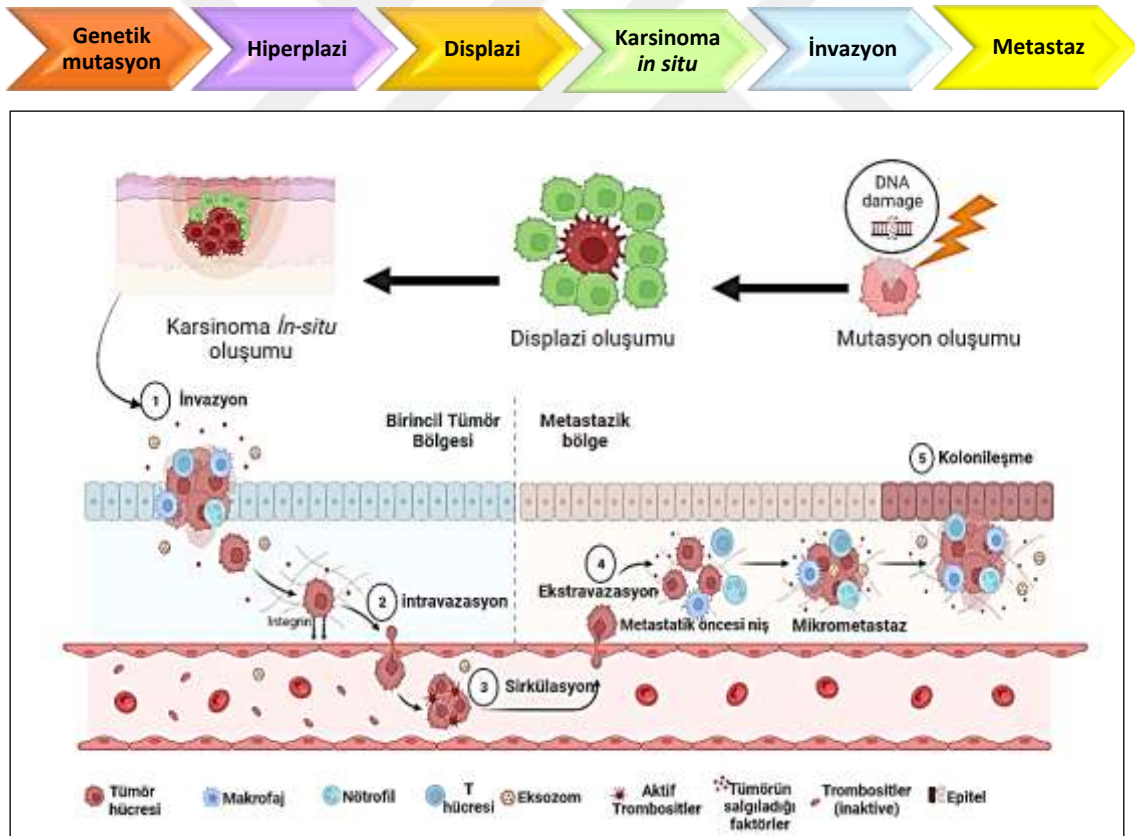
- Ayrıca, literatürde ilk kez, yukarıdaki miRNA'ların meme kanseri hücrelerinin *in vitro* ortamda oluşturduğu 3D sferoid yapılar üzerindeki etkisi araştırılmıştır ve bu bağlamda, biyoinformatik araştırmamızla uyumlu olarak bu miRNA'ların 3D sferoid oluşumunu engellemesi beklenmektedir.
- MCF-7 hücrelerine miR-3670 ve miR-8078 mimiklerinin uygulanmasını takiben, PD-L1 ekspresyonunun inhibisyonu ve hücre zarında PD-L1 ekspresyonunun kaybolması/remisyonu sonrasında MCF-7 hücrelerinin *in vitro* koşullarda ko-kültür ortamında bağışıklık sisteminden kaçamadığının gösterilmesi hedeflenmektedir.



## 2. GENEL BİLGİLER

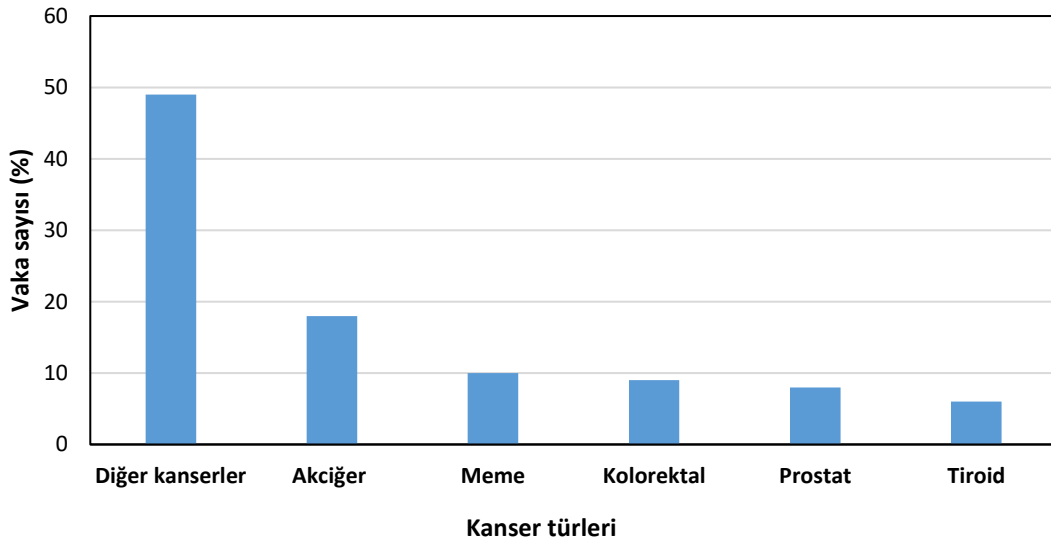
### 2.1 Kanser

Kanser, dünya genelinde başlıca ölüm nedenlerinden olup artan yaşam beklentisinin önündeki önemli engeldir ve son zamanların en ölümcül hastalıkları içinde yer almaktadır (Chhikara vd., 2022; Anonim, 2020a). Dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedeni olan kanserin, sağlıklı hücrelerin büyümesini ve hayatta kalmasını düzenleyen genetik/epigenetik mekanizmalardaki bir dizi değişiklikten kaynaklandığı bilinmektedir (Kanwal vd., 2013; LaMorte, 2016, Şekil 2.1). Kanser hücrelerinin karakteristik özellikleri arasında apoptoza direnç, kontrolsüz çoğalma, invazyon ve metastaz yer almaktadır (Balacescu vd., 2019).



Şekil 2.1 Kanser oluşumu ve metastaz safhaları

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2020 yılında yayınladığı ve 112 ülkeyi kapsayan raporunda, kanserin 70 yaşından önceki ölümlerin önde gelen nedeni olduğu belirtilmektedir (Anonim, 2020a). Görülme sıklığı her yıl artan kanser, ciddi bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Küresel kanser vakası sayısının %47 artışla 2040 yılında 28.4 milyon olacağını tahmin edilmektedir (Sung vd., 2021). Küreselleşme ve büyüyen ekonomiye bağlı risk faktörleri arttıkça bu vaka sayısının da artması beklenmektedir (Sung vd., 2020). HSG (Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü), tarafından 2019 yılında yayımlanan Türkiye kanser istatistiklerine göre, kanser Türkiye'de ikinci önde gelen ölüm nedenidir. Ülkemizdeki kanser vakalarının sayısı aynı hızla artmaya devam ederse, 2030 yılında 22 milyon yeni vaka beklenmektedir ki bu da yeni vakalarda %75'lik bir artış anlamına gelmektedir (Anonim, 2019). Ülkemizdeki kanser vaka sayılarının dağılımı Şekil 2.2'de gösterilmektedir.



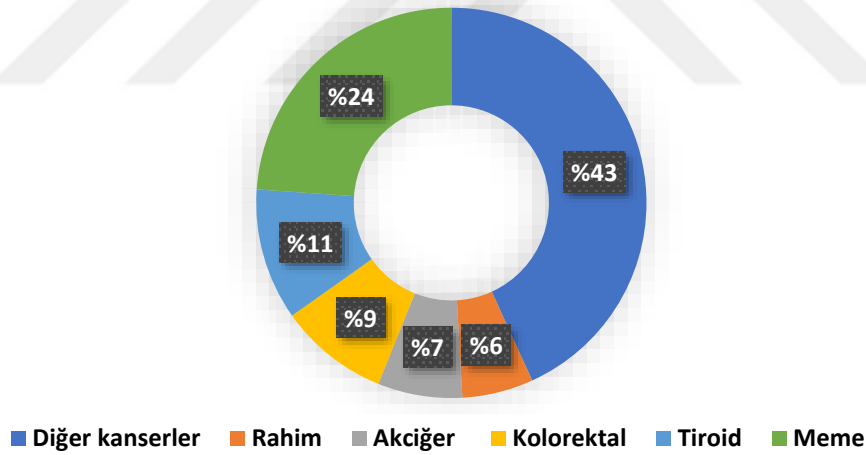
Şekil 2.2 Türkiye'de kadınlarda teşhis edilen kanserlerin dağılımı (Anonim, 2017)

Kanserin tedavisi ve görülme sıklığı, hastalarındaki genetik varyasyonlar ve sosyo-ekonomik faktörlerden etkilenmektedir. Kanser konusundaki bilimsel bilgi birikimi ve teknolojik ilerlemeler, yeni teşhis, tedavi ve etkili ilaçların keşfedilmesini sağlamış ve hastalık bir ölçüde iyileştirilmiştir. Tüm bu gelişme ve ilerlemelere rağmen kanser tedavisinde hala %100 kür sağlanamamıştır. Bu nedenle yeni teşhis ve tedavi stratejilerine olan ihtiyaç artarak devam etmektedir (Chhikara vd., 2022).

## 2.2 Meme Kanseri

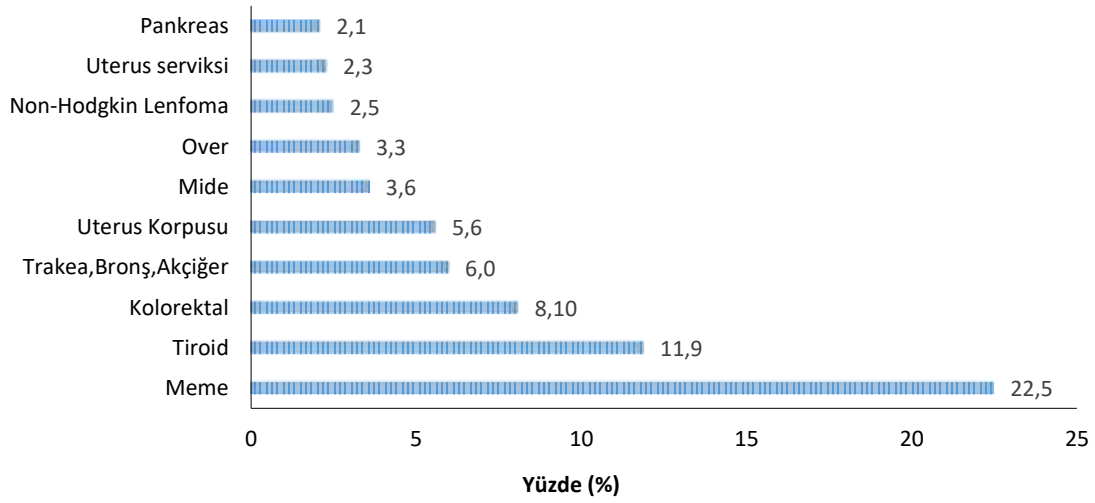
### 2.2.1 Meme Kanserinin Tanımı, İnsidansı ve Epidemiyolojisi

Meme kanseri, meme dokusundaki hücrelerin genetik veya çevresel faktörlere bağlı olarak anormal ve kontrolsüz bir şekilde bölündüğü ve çevre dokuda metastazlar oluşturduğu bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Meme kanseri, dünya genelindeki tüm kanser vakalarının yüzde 11.7'sini oluşturmaktadır. Meme kanseri, yüksek insidans oranı (yılda 2.3 milyon yeni vaka) ve yüksek mortalite oranı (685.000 ölüm/yılda) ile dünya çapında kanser ölümlerinin beşinci önde gelen nedenidir. Dünya genelinde kadınlarda teşhis edilen her dört kanser vakasından birinin meme kanseri olduğu ve kansere bağlı her altı ölümden birinin meme kanserinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Anonim, 2020a) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 2020'de dünya genelinde kadınlarda tespit edilen yeni kanser vakaları (Sung vd., 2021'den değiştirilerek alınmıştır)

Ülkemizdeki cinsiyete göre sınıflandırılmış kanser verilerine bakıldığında kadınlarda meme kanseri ilk sırada yer almakta ve teşhis edilen her 4 kanserden 1'inin meme kanseri olduğu bildirilmektedir (Anonim, 2017), (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Türkiye'de kanser türleri ve kadınlar arasındaki dağılımı (Anonim, 2017)

## 2.3 *In Vitro* Meme Kanseri Çalışmalarında Kullanılan Hücre Hatları

### 2.3.1 MCF-7 Hücre Hattı

MCF-7 meme kanseri hücre hattı 1970 yılında 69 yaşında meme kanseri olan beyaz ırktan bir kadından izole edilmiştir (American Type Culture Collection (ATCC), 2023, <https://www.atcc.org/products/htb-22>). 1973 yılında bu hücre hattına, Herbert Soule ve diğerleri tarafından Detroit'te kurulan enstitüye atfen Michigan Kanseri Vakfı-7'nin kısaltması olan MCF-7 adı verilmiştir (Soule vd., 1973). Bu hücre hattı elde edilmeden önce, kanser araştırmacılarının mevcut kanser hücrelerini hücre kültürü koşullarında sadece birkaç ay canlı tutabildikleri bilinmektedir (Glodek vd., 1990). Bu hücre hattı üzerinde elde edilen veriler sayesinde hücreler artık *in vitro* ortamda uzun bir süre boyunca rahatlıkla kullanılabilir. Bu hücrelerin morfolojisi doğası gereği epitelyaldir. Meme karsinomu olarak yaygın bir şekilde çalışılan MCF-7'nin farklılaşmış meme epiteli özelliklerine sahip olduğu ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinler sentezlediği bilinmektedir (Hass ve Bertram, 2009). MCF-7 hücrelerinin sitoplazmadaki östrojen reseptörleri (ER) aracılığıyla östrojeni östradiole dönüştürdüğü ve östrojen ile ilişkili proliferasyon olduğu bildirilmiştir (Sflomos vd., 2016). Bu nedenle ER pozitif bir

kontrol hücre hattıdır MCF-7 hücreleri sadece östrojene duyarlı değil, aynı zamanda progesteron reseptörleri (PR) için de pozitifdir (Booms vd., 2019).

*In vitro* ortamda çoğaltıldığında hücreler kubbe şeklindedir ve epitel hücreleri tek bir tabaka halinde büyür. MCF-7 hücrelerinin büyümesi *in vitro* ortamda yavaş olsa da, bu popülasyon kolayca çoğaltılabilmektedir (Comşa vd., 2015). MCF-7 hücrelerinin logaritmik ikiye katlanma süresi genellikle 30 ila 40 saat arasındadır. Hücre boyutu 20-25 mikrometre olan MCF-7 hücreleri büyük, yapışık hücreler olarak karakterize edilir.

MCF-7 hücrelerinde epidermal büyüme faktöründen (EGF) bağımsız proliferasyon, Her2/Neu/cErbB2 ekspresyonunda aşırı artış, N-Ras ve Rb proteinlerinin hızlı fosforilasyonu, siklin D1'de mutasyonlar ve onkogen WNT-7B ekspresyonu gözlemlendiği bildirilmiştir (Booms vd., 2019). MCF-7 hücreleri, meme epiteline özgü çeşitli özelliklere sahip olduklarından meme kanserinin *in vitro* çalışmaları için idealdir ve bu nedenle kanser hücresi çalışmalarında model hücreler olarak kabul edilirler (Demirel vd., 2009). Çizelge 2.1'de MCF-7 hücrelerinin yanı sıra CRL-4010 hücre hatlarının temel özellikleri ve Şekil 2.5'te hücre hatlarının inverted mikroskop görüntüsü gösterilmektedir.

### 2.3.2 hTERT-HME1(CRL-4010) Hücre Hattı

İnsan meme epitel hücre hattı CRL-4010 (hTERT-HME1), meme kanseri öyküsü olmayan 53 yaşındaki bir mammaplasti hastasından elde edilmiştir. hTERT-HME1(CRL-4010) hücreleri retrovirüs pBabepuro+hTERT vektörü ile immortalizasyon yoluyla elde edilmiş ve stabil klonlar seçilene kadar puromisinli tam büyüme ortamında kültürlenmiştir. Bu hücreler, hücre kültüründe telomeraz geninin (1-5) eksojen ekspresyonu nedeniyle sınırsız büyüme yeteneğine sahiptir. Yapışık hücreler olarak karakterize edilirler (ATCC, 2023).

Çizelge 2.1 MCF-7 ve HME1 hücre hatlarının temel özellikleri

| Hücre hattı | Hücre orijini                 | Östrojen (ER) | Progesteron (PR) | Her2 | Tümörojenite |
|-------------|-------------------------------|---------------|------------------|------|--------------|
| MCF-7       | Metastaz (plevral efüzyon)    | (+)           | (+)              | (+)  | (+)          |
| HME1        | Meme epiteli (non-metastatik) | (-)           | (-)              | (-)  | (-)          |

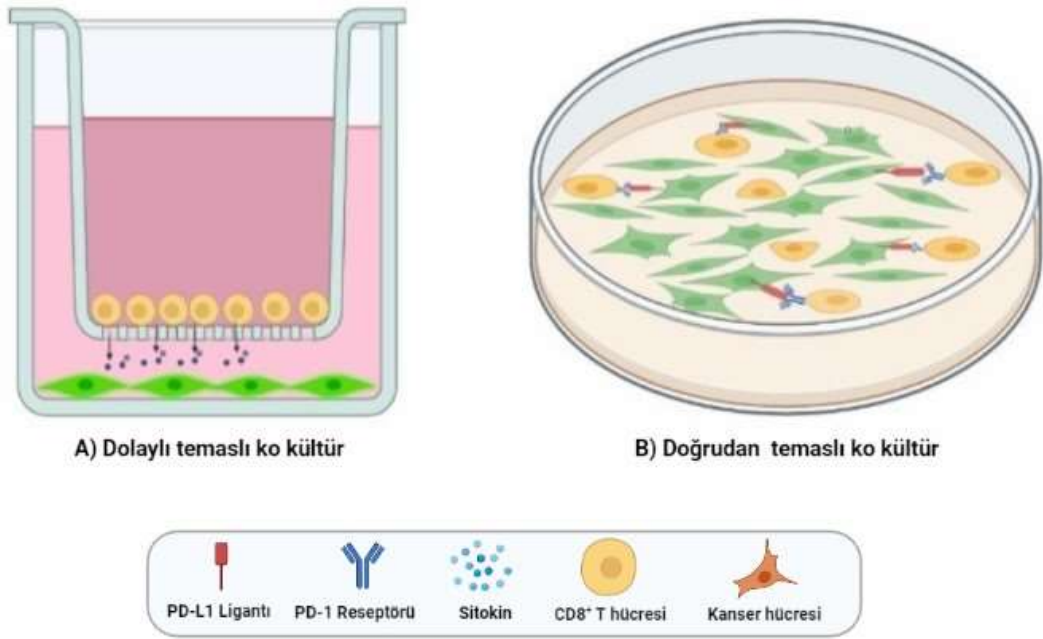
<sup>1</sup> (-): var (+): yok



Şekil 2.5 Hücre hatlarının inverted mikroskop görüntüsü (**A**: MCF-7 hücre hattı, **B**: HME1 hücre hattı (Olympos CKX31’da 10x büyütme, Prof. Dr. Yasin Tülüce’nin arşivinden izni alınarak kullanılmıştır)

#### 2.4 Ko-Kültür (Hücre Ortak Kültürü)

Ko-kültür, ikiden fazla farklı hücre tipinin aynı ortamda çoğaltılması olarak tanımlanabilir. Geleneksel olarak, ko-kültürün iki farklı uygulama modeli vardır (Şekil 2.6). Birincisi, farklı hücre tiplerinin doğrudan temas halinde olduğu ko-kültür modelidir. Bu modelde yüzey reseptörleri, hücreler arasındaki bağlantılar aracılığıyla karşılıklı hücresel uyarım sağlayarak gen yollarını açıp kapatabilir veya hücre farklılaşması gibi etkilere neden olabilir. İkinci model ise, bir transwell sistemi veya yarı geçirgen zar hücre ile fiziksel bir ayırım oluşturulmuş hücrelerin dolaylı temasından oluşan ko-kültür modelidir. Bu modeller arasındaki temel fark, kültürlenmiş hücrelerin birbirleriyle doğrudan veya dolaylı temasıdır (Vis vd., 2020).



Şekil 2.6 Kullanılan standart ko-kültür modelleri (A: dolaylı temaslı ko-kültür modeli, B: doğrudan temaslı ko-kültür modeli)

## 2.5 Meme Kanserinde Tedavi Yöntemleri

Günümüzde modern tıp ilerleme kaydetmiş olsa da hala kanseri tedavi edebilecek ve hastanın yaşam süresini önemli ölçüde uzatabilecek bir terapi/tedavilere henüz ulaşamamıştır. Günümüzde çeşitli kanser tedavileri bulunmaktadır (Şekil 2.7). Kanser tedavisinde cerrahi, radyasyon ve kemoterapi gibi tedaviler kanser kitlesini azaltabilir, bu da kanserin ilerlemesine veya durmasına yol açabilir (Maqbool vd., 2022). Mevcut bu tedavilerin seçiminde en önemli faktör hastanın kanser evresi, metastaz durumu ve fiziksel durumudur (Baykara, 2016). Hastanın ve hastalığın durumuna bağlı olarak bu tedavilerden biri veya bunların kombinasyonu kullanılabilir (Chang-Qing vd., 2020). Kanser tedavisinin temel amacı, mevcut kanseri ortadan kaldırmak veya tümörün büyümesini yavaşlatmak ve hastanın mümkün olduğunca uzun süre normal ve semptomsuz bir yaşam sürmesini sağlamaktır (Chang-Qing vd., 2020; Maqbool vd., 2022).

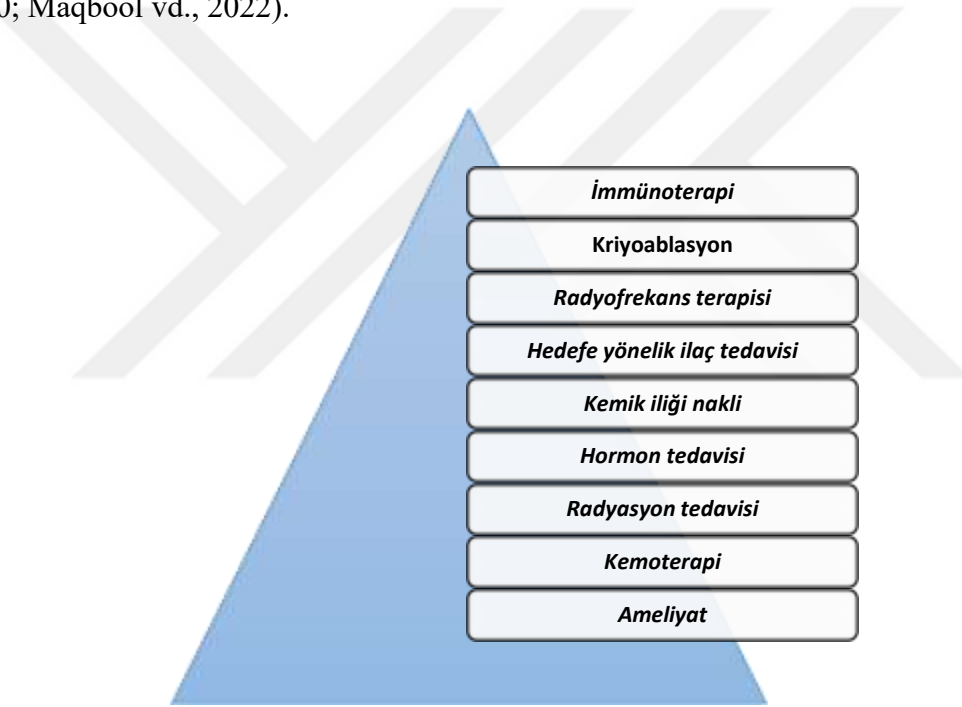
Kanser tedavileri, amaçlarına bağılı olarak üç şekilde kullanılmaktadır (Maqbool vd., 2022);

**Birincil tedavi;** bu tedavinin temel amacı, kanseri vücuttan tamamen uzaklaştırmak veya tüm kanser hücrelerini öldürmektir.

**Adjuvan tedavi;** birincil tedavi sonrası kanserin geri gelme olasılığını minimuma indirmek ve kalan kanser hücrelerini ortadan kaldırmayı amaçlayan bir tedavi şeklidir.

**Palyatif tedavi;** palyatif tedavi, tedavinin yan etkilerini ve kanserin neden olduğu belirti ve semptomları azaltmaya yardımcı olan tedavi şeklidir.

Günümüzde kullanılan kanser tedavi yöntemleri 9 kategoriye ayrılabilir (Doroshov, 2020; Maqbool vd., 2022).



Şekil 2.7 Kanser tedavisinde güncel yöntemler (Kullanım yaygınlığına göre sıralanmıştır)

İmmünoterapi, bağışıklık hücrelerinin sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerini doğrudan tanımasını ve ortadan kaldırmasını sağlar. Bu tedavinin hassas ve seçici olması immünoterapiye olan ilgiyi her geçen gün artırmaktadır. İlk olarak 18. yüzyılda keşfedilen ve 19. yüzyılda kullanılan bu tedavi günümüzde de çeşitli şekillerde (monoklonal antikorlar, adoptif immünoterapi, aşılar, sitokinler vb) kullanılmaktadır (Barbaros ve Dikmen, 2015).

## 2.6 Enkapsülasyon ve Transfeksiyon Verimliliği Üzerine Etkisi

Düşük moleköl ağırlıklı hidrofobik maddeler basit difüzyonla hücre zarından geçebilmelerine karşın, kanser tedavisinde kullanılan ilaçların taşıyıcı proteinler aracılığı ile hücre içerisine taşınmasına büyük ihtiyaç duyulmaktadır (Zare vd., 2022). Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar, çeşitli taşıyıcılar aracılığı ile hedef hücre ve dokulara iletilebilmektedir. Böylece enkapsüle edilmiş veya taşıyıcı ajana yüklenmiş ilaçlarla daha güvenli, etkili ve tedavide başarı oranı yüksek yanıtlar elde edildiği bilinmektedir (Grixti vd., 2021). Günümüzde yaygın şekilde kullanılan ilaç taşınımında sistemleri;

1. Viral tabanlı dağıtım sistemleri
2. Viral tabanlı olmayan dağıtım sistemleri
  - Polimer nanopartikülleri
  - İnorganik nanopartiküller
  - Lipid bazlı araçlar
  - Folat-miRNA konjugatları
  - Eksozomlar olarak sınıflandırılmaktadır. Başta miRNA'lar olmak üzere ilaç taşınımında immünojenik olmayan polimerlerden oluşan nanopartiküller çok yaygın kullanılmaktadır (Devulapally vd., 2016).

Geleneksel ilaçlara kıyaslandığında enkapsüle edilmiş ilaçlar düşük toksisite ve yüksek ilaç verimi gibi avantajlara sahiptir. Geleneksel yöntemlere kıyasla biyobozunur polimerlerden oluşan taşıyıcı sistemlerin biyolojik uyumu, içerisinde taşıdığı ilacın, terapötik indeksini arttırması, toksisitesini ve yan etkisini azaltması, stabilitesini arttırması, sürekli kontrollü ilaç salımını gibi üstün yönlerinden dolayı yeni nesil kanser tedavi ilaçları içerisinde sıkça kullanılmaya başlanmıştır (Yaman vd., 2019). Kanser tedavisinde, enkapsüle edilmemiş miRNA'ların düşük stabilitesi ve hızlı bozulmasından dolayı, miRNA'ların hücre içerisine etkili ve güvenli bir şekilde transfeksiyonu için enkapsülasyon önem arz etmektedir. miRNA'ların enkapsüle edilmesi miRNA'ları denatüre edici ajanlara karşı koruyarak optimize edilmiş verimlilikle sağlamakta ve taşıyıcı ajanın biyobozunur özellikleri nedeniyle hücre içerisine transferini kolaylaştırdığı bilinmektedir (Hanafy vd., 2021).

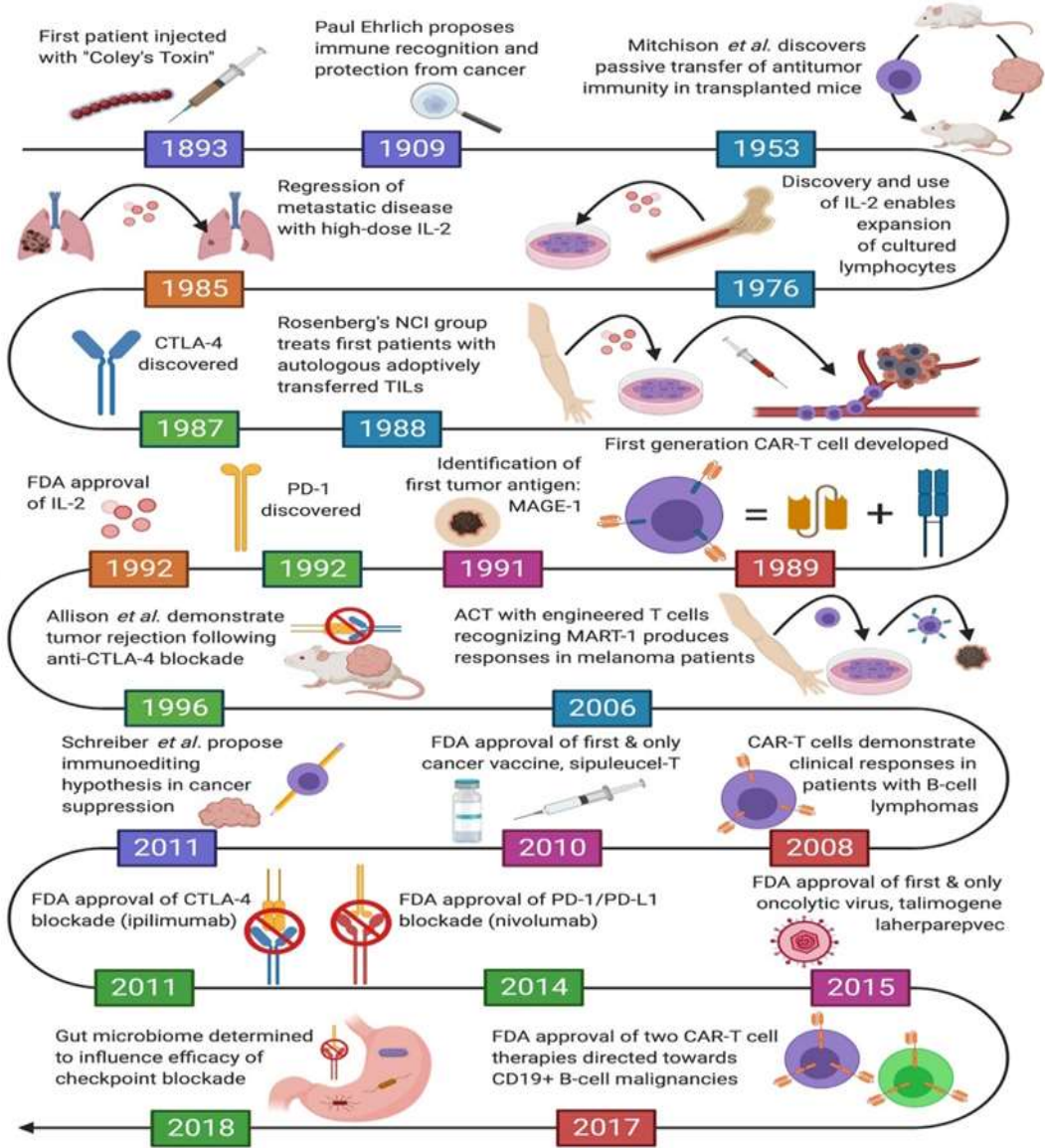
## 2.7 İmmün Gözetim ve Tarihçesi

İmmün gözetim ve kanser immünoterapisi ile ilgili ilk çalışmalar 1893 yılında yapılmış ve o zamandan bu yana çok ilerleme kaydedilmiştir (Şekil 2.8). Tümörlere karşı immün gözetim hipotezi ilk olarak Burnett (1973) ve daha sonra Thomas (1982) tarafından öne sürülmüştür (John, 2020). 1890'ların başında William Coley bu hipotezi deneysel olarak test etmiştir. Coley, yaptığı çalışma sonucunda aktive olmuş bağışıklık hücrelerinin tümörle mücadele ettiğini ve büyük tümörlerin geriletilmesinde başarı sağladığını bulmuştur (Atkins vd., 1999; Kolb vd., 1990).

Bu teoride eliminasyon safhasında, tümörlerin doğuştan veya edinilmiş bağışıklık sistemi tarafından başarılı bir şekilde tespit edilip ortadan kaldırılmasını içerir. Paul Erlich 1909 yılında, üç aşamadan oluşan bir bağışıklık düzenleme teorisi önermiştir: eliminasyon, denge ve kaçış.

Bu teoride, eliminasyon aşaması, doğuştan gelen veya edinilmiş bağışıklık sistemi tarafından tümörlerin başarılı bir şekilde tanınmasını ve ortadan kaldırılmasını içerir. Denge safhasında, tümör hücreleri tamamen yok edilmezse, hücreler bağışıklık sisteminin tümör büyümesini kontrol ettiği ve hücrenin durgunluk durumuna ulaştığı bir denge durumuna girebilir. Kaçış aşaması ise tümör hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçtığı (metastaz) aşamadır (Muenst vd., 2016; Ribatti, 2017; Abbott ve Ustoyev, 2019). Bu hipotez yirminci yüzyılda çokça tartışılmıştır (Beverley, 2005). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, sağlıklı bağışıklık sistemi işlevinin kanser gelişimini önlediğini doğrulamıştır (Dunn vd., 2002; Mergener vd., 2022). Kanser hücrelerinin, T-hücre aktivasyonu ve tolerans gibi araçlarla bağışıklık hücrelerinin sitotoksik etkisinden kaçabildiği bilinmektedir. Mergener ve diğerleri tarafından yapılan çalışma sonucunda, bağışıklık hücrelerinin tümörlerdeki aşırı eksprese edilmiş ancak değişmemiş antijenleri yabancı olarak tanıyarak tümörlere karşı bağışıklık kazanabildiği bildirilmiştir (Mergener vd., 2022).

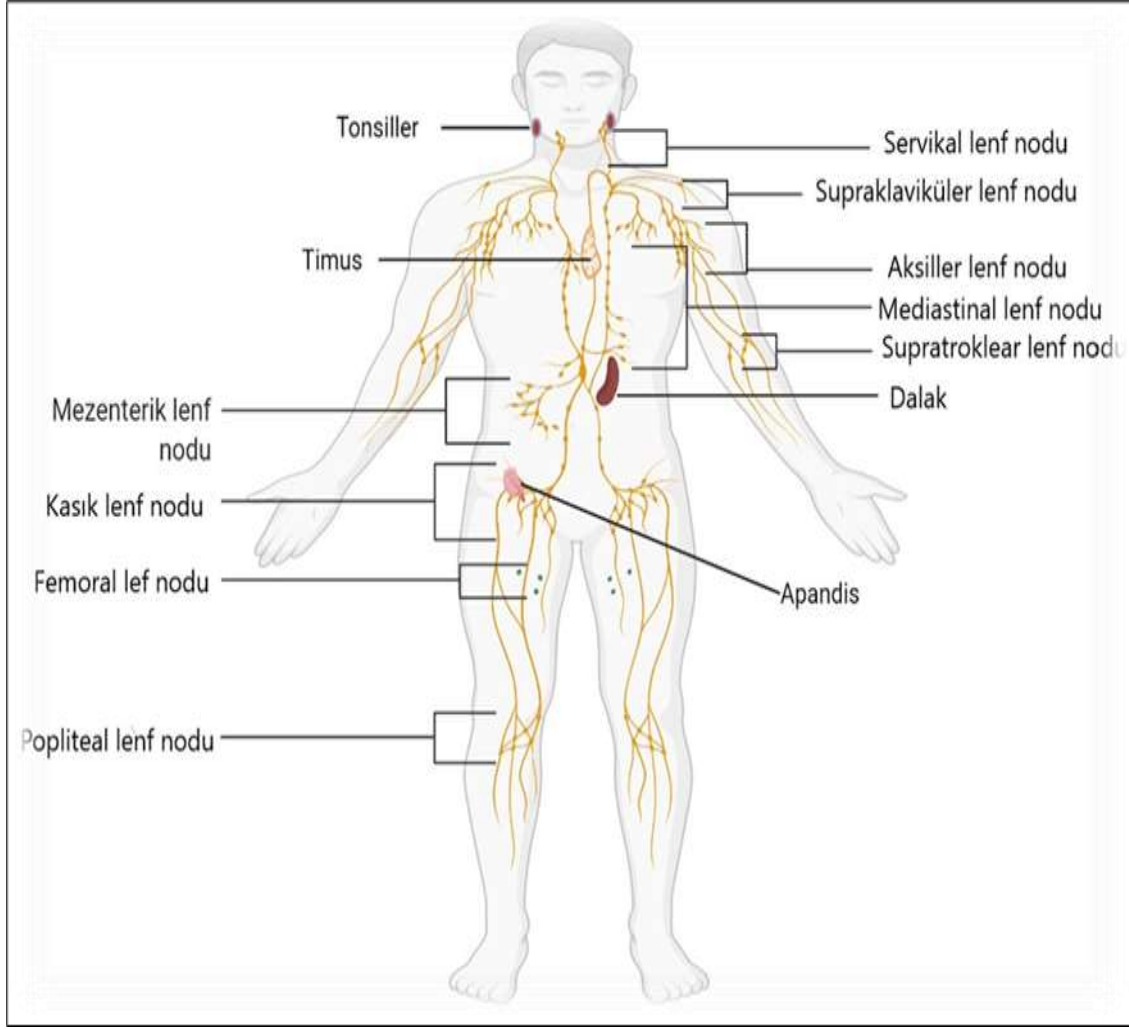
Son zamanlarda, temel bağışıklık kontrol noktalarını (CTLA-4, PD-1 vb.) bloke yöntemlerine odaklanılmıştır. Bu bağışıklık kontrol noktalarına yönelik inhibitörlerin kullanımının kanser tedavisinde başarılı olduğu kanıtlanmıştır (Topalian vd., 2015; Mergener vd., 2022).



Şekil 2.8 Kanser immünoterapisinin tarihindeki kilometre taşları (Carlson vd., 2020)

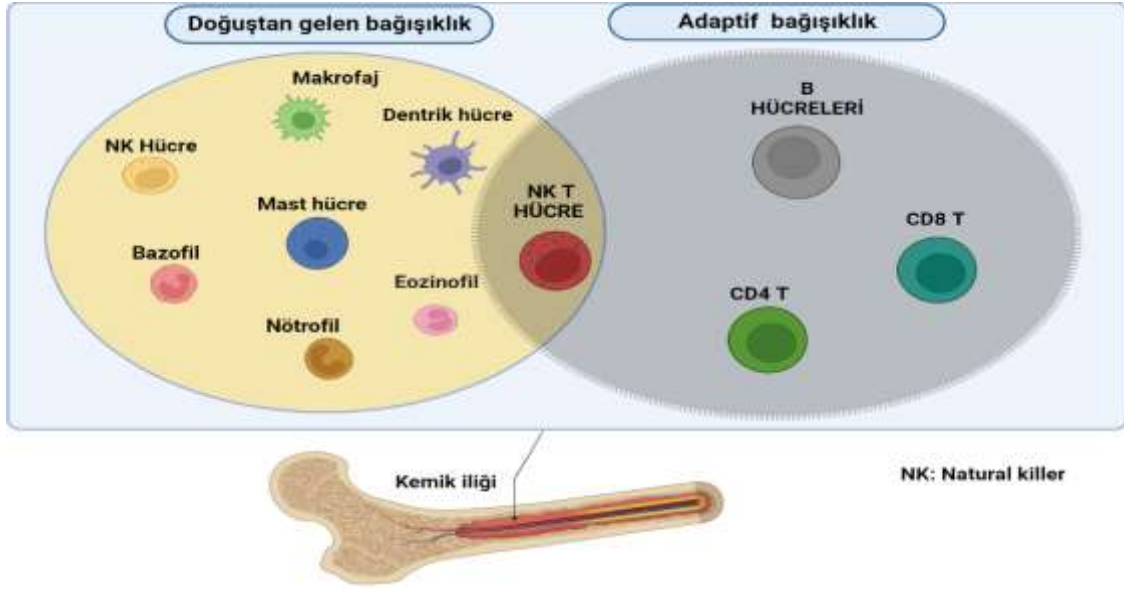
## 2.8 Bağışıklık Sisteminin Organizasyon Yapısı ve Hücreleri

Bağışıklık sisteminin tüm hücreleri kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerden köken alır. Bağışıklık sistemi hücreleri (beyaz kan hücreleri veya lökositler) kan ve lenf dolaşımı yoluyla iltihap bölgelerine taşınır ve orada savunma işlevlerini üstlenir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Lenfatik sistem ve bağışıklık sisteminin unsurları (Beverley, 2005’ten Türkçeleştirilip, değiştirilerek alınmıştır)

Lökositler timus, dalak, lenf düğümleri, kemik iliğinde bulunur ve uzun ömürlü olup, immünolojik hafızadan ve adaptif bağışıklıktan sorumludur (Beverley, 2005; Bek, 2022). Morfolojilerine göre; Lenfositler (B ve T hücreleri), Monositler ve Granülositler (nötrofiller, eozinofiller ve bazofiller) olarak sınıflandırılırlar (Beverley, 2005; Bek, 2022). Bağışıklık sistemi iki kısımdan (doğal, adaptif bağışıklık) oluşur (Şekil 2.10). Bu iki bağışıklık sistemi arasındaki temel fark, bağışıklık için kullanılan hücreler ve bağışıklık sistemini aktive etmek için kullanılan yollarıdır.



Şekil 2.10 Bağışıklık sistemi çeşitleri ve hücreleri (Zhang ve Chen, 2018'den değiştirilip düzenlenerek alınmıştır)

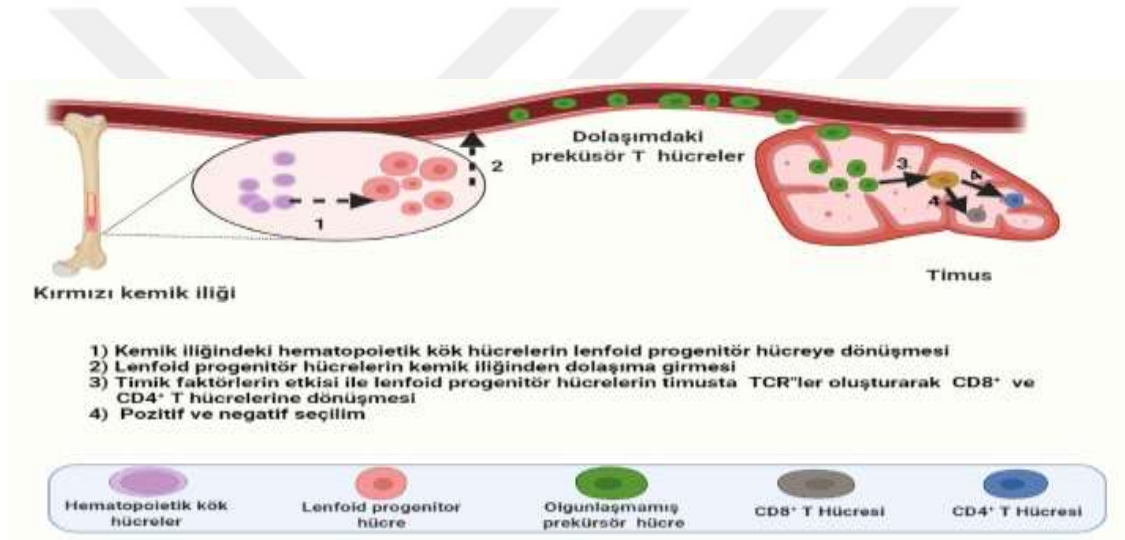
### 2.8.1 Doğuştan Gelen Bağışıklık

Savunma sisteminin ilk ön cephesidir. Sistemin yapısal unsurları hücreler ve sitokinlerden oluşur. Bu sistem, mikroorganizmaların korunan antijenik moleküler yapılarını tanıyarak sitokinler üretir. Bu sitokinler, makrofajlar ve dentriküler hücreler (DC) veya Toll benzeri reseptörler (TLR) gibi örüntü tanıma reseptörleri aracılığıyla diğer bağışıklık hücrelerini hedeflerine (enfeksiyon/inflamasyon) yönlendirir. Ayrıca aktive olmuş makrofajlar, DC, TLR hücreleri, T ve B lenfositlerin aracılığı ile adaptif bağışıklığın aktivasyonunu sağlar. Bu bağışıklık sayesinde organ, doku, kan ve lenfteki ölü hücreler, antikor kompleksleri ve yabancı maddeler uzaklaştırılır (Murphy vd., 2007; Turvey ve Broide, 2010; Bonilla ve Oettgen, 2010).

### 2.8.2 Adaptif Bağışıklık

Adaptif bağışıklık, doğuştan gelen bağışıklık yetersiz kaldığında ve bir enfeksiyon meydana geldiğinde aktive olur. Bu bağışıklık, patojenleri hızlı ve etkili bir şekilde ortadan kaldıran immünolojik bir hafızanın oluşmasını sağlar (Bonilla ve Oettgen, 2010; Warrington vd., 2011). Adaptif bağışıklık sistemi, T hücreleri ve B hücrelerinden oluşur ve

antijen sunan hücreler (APC) tarafından aktive edilir. B lenfositleri kemik iliğinde olgunlaşarak antijenlere yanıt vermeye hazır olduktan sonra, dalak ve lenf düğümlerine göç eder (Şekil 2.11). T lenfositler ise kemik iliğinden timusa göç ederek burada olgunlaşır sonrasında dalak ve lenf düğümleri yerleşir. B ve T lenfositleri morfolojik olarak çok benzer olmalarına rağmen, farklı hücre yüzeyi fenotipleri ile kolayca ayırt edilebilirler. T ve B lenfositlerinin ortak özellikleri klonal olarak dağılmış özgüllük, somatik olarak düzenlenmiş reseptörler ve immünolojik hafızadır. Üçüncü bir lenfosit türü olan doğal öldürücü (NK) hücreler, klonal olarak dağılmış reseptörlere ve immünolojik hafızaya sahip değildir ve bu nedenle doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçası olarak kabul edilir (Bonilla ve Oettgen, 2010; Warrington vd., 2011).



Şekil 2.11 Hematopoetik kök hücrelerden CD8<sup>+</sup> ve CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin üretilmesi

### 2.8.3 T Lenfositleri

T lenfositler üç temel gruba ayrılır: CD4<sup>+</sup> (yardımcı hücreler), CD8<sup>+</sup> (sitotoksik hücreler) ve Treg (düzenleyici hücreler) (Jabri ve Sollid, 2017). Bir antijenle karşılaşan T lenfositleri klonal proliferasyona uğrar ve antijene özgü T hücrelerinin sayısını logaritmik olarak artırır (Huang vd., 2019). Logaritmik artış sırasında üretilen tüm yeni T lenfositleri antijen tanıma hafızasına sahiptir. B lenfositlerinin aksine, T lenfositleri işlevlerini ara basamaklar aracılığıyla yerine getirir (Beverley, 2005) (Çizelge 2.2).

CD8<sup>+</sup> T hücreleri CD8<sup>+</sup> adı verilen bir reseptöre sahiptir ve timusta üretilir. Genellikle sitotoksik T lenfositleri (CTL) olarak adlandırılırlar. Bu hücreler, tüm çekirdekli

hücrelerde bulunan MHC-I molekülleri tarafından sunulan peptitleri tanır (Abadie vd., 2012; Jabri ve Sollid, 2017; Raskov vd., 2021; Poncette vd., 2022) (Şekil 2.12a).  $CD8^+$  T hücreleri, hücre içi patojenlere (virüsler, bakteriler) karşı ve tümörlerin immün gözetiminde çok önemlidir.  $CD8^+$  sitotoksik hücreler sitotoksik aktivitelerini virüsle enfekte olmuş hücrelerin hücre duvarında oluşan peptid-MHC komplekslerini tanıyarak gösterirken, aynı süreci tümörlerdeki peptid-MHC komplekslerini tanıyarak tümörlerin ortadan kaldırılmasında da kullandıkları bilinmektedir (Beverley, 2005).

Aktive olmuş bir  $CD8^+$  T hücresi, enfekte veya kanserli hücreleri ortadan kaldırmak için üç ana mekanizma kullanır (Abadie vd., 2012; Jabri ve Sollid, 2017; Raskov vd., 2021; Poncette vd., 2022).

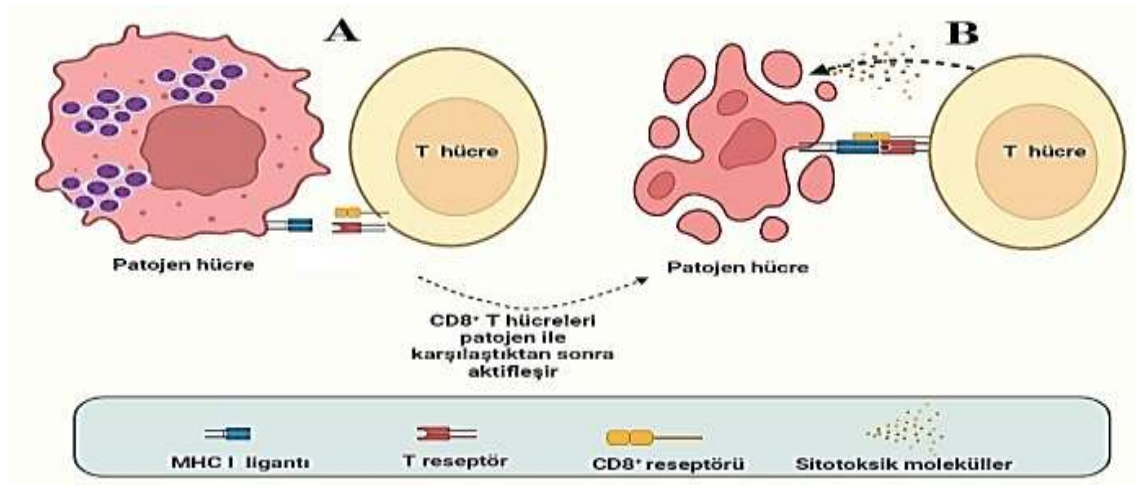
Birinci ana mekanizma; anti-tümör ve anti-viral mikrobiyal etkileri olan TNF- $\alpha$  ve interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) gibi sitokinlerin salgılanmasıdır (Abadie vd., 2012; Jabri ve Sollid, 2017; Raskov vd., 2021; Poncette vd., 2022).

İkinci ana mekanizma, sitotoksik granüllerin üretilmesi ve salınmasıdır. Bu granüller, granzimler ve perforin olmak üzere iki protein ailesi içerir. Granzimler, hedef hücrenin apoptozuna yol açan serin proteazlardır. Perforin, hedef hücrenin (enfekte ya da kanserli hücre) zarında bir gözenek oluşturarak, granzimlerin girmesini kolaylaştırır. Sitotoksik granüller, çevredeki sağlıklı dokuya zarar gelmesini önlemek için bağışıklık sinapsı boyunca hizalanmış hedef hücreye doğru salınır (Abadie vd., 2012; Jabri ve Sollid, 2017; Raskov vd., 2021; Poncette vd., 2022) (Şekil 2.12b).

Üçüncü ana mekanizma,  $CD8^+$  T hücresinin enfekte veya kanserli hücreleri yok ettiği mekanizma olan Fas/Fas-L etkileşimidir. Aktive olmuş  $CD8^+$  T hücreleri hücre yüzeyindeki Fas-L reseptörüne ve hedef hücrenin yüzeyindeki Fas reseptörüne bağlanarak hedef hücrenin apoptozunu tetikler (Abadie vd., 2012; Jabri ve Sollid, 2017; Raskov vd., 2021). Virüs, hücre içi bakteriler ve tümörlere karşı bağışıklık savunmasında bu 3 mekanizma önem arz etmektedir.

Çizelge 2.2 T-Lenfositlerinin fonksiyonları (Beverley, 2005’den Türkçeleştirilerek alınmıştır)

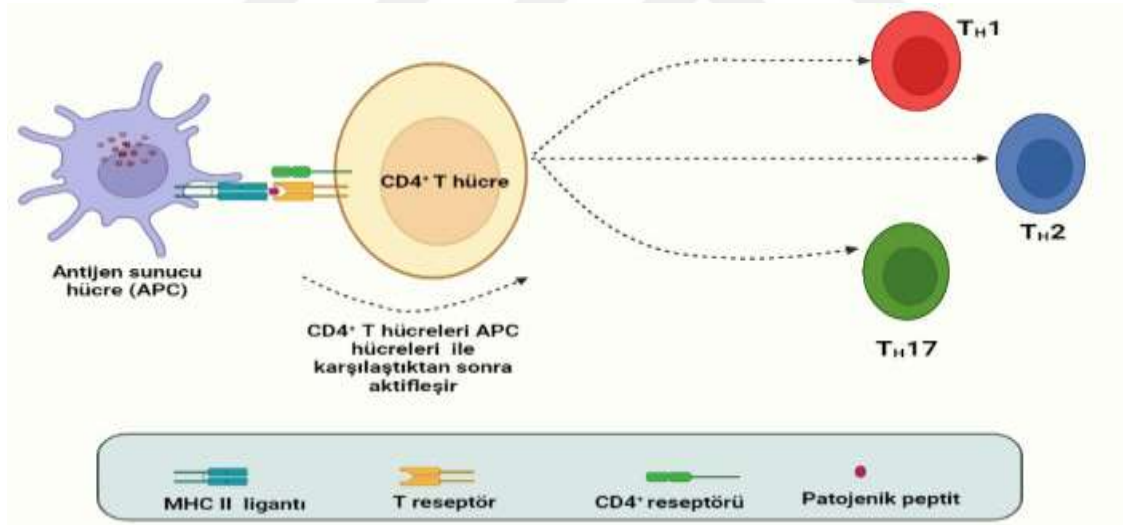
|                                            | İlgili Hücre |     |
|--------------------------------------------|--------------|-----|
|                                            | CD4          | CD8 |
| <i>İn vivo</i>                             |              |     |
| Doku reddi                                 | ++           | ++  |
| Tümör reddi                                | ++           | ++  |
| Viral ve mantar enfeksiyonuna karşı koruma | ++           | ++  |
| Bakteri enfeksiyonuna karşı koruma         | ++           | +   |
| <i>İn vitro</i>                            |              |     |
| Antijen bağlanması (tetramers)             | +/-          | ++  |
| Karışık lenfosit cevabı                    | ++           | ++  |
| Proliferasyon                              | ++           | +   |
| Sitotoksisite                              | +/-          | ++  |
| Mitojenlere karşı çoğalma                  | ++           | ++  |
| Çözünür antijenlere karşı çoğalma          | ++           | -   |
| Spesifik antijenlere karşı sitotoksisite   | +/-          | ++  |
| Sitokin üretimi                            | ++           | +   |



Şekil 2.12 CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin aktivasyonu ve sitotoksik etki mekanizması. (A: CD8<sup>+</sup> T hücre zarında bulunan T hücre reseptörü enfekte olan hücrenin zarındaki MHC I ile gösterilen patojen peptidi hatırlar ve enfekte hücreye ligand reseptör aracılığı ile bağlanarak aktifleşir. B: Aktifleşen CD8<sup>+</sup> T hücresi enfekte hücreyi öldürmek için sitotoksik molekülleri enfekte hücre yönünde göndererek enfekte hücreyi ortadan kaldırır)

CD4<sup>+</sup> yardımcı T hücreleri (T<sub>h</sub> / T helper), hücre yüzeylerinde CD4<sup>+</sup> adı verilen bir reseptöre sahiptir ve timusta üretilir. Bu hücreler, APC'ler üzerindeki MHC-II molekülleri üzerinde sunulan peptitleri tanıyarak aktive olurlar (Şekil 2.13). Sitokin adı verilen molekülleri üreterek adaptif bağışıklık tepkilerini başlatırlar. CD4<sup>+</sup> T lenfositler çok sayıda alt tiplere (Th1, Th2, Th17 vb.) sahiptirler. Her bir alt tipin, T yardımcı hücresi tarafından tanınan patojen tipine bağlı olarak spesifik bir sitokin kombinasyonu ürettiği bilinmektedir (Abadie vd., 2012; Jabri ve Sollid, 2017; Poncette vd., 2022).

Düzenleyici T hücreleri (Treg) bağışıklık sistemini aktive etmez, bunun yerine artık ihtiyaç duyulmadığında bağışıklık tepkisini baskılayarak koruyucu bir rol oynar, vücuttaki normal hücreyle dokulara aşırı zarar verilmesini önler ve lökositlerin dokulara ile lenfoid organlara göçünü kontrol ederler (Beverley, 2005). T hücreleri, epitel hücreleri, makrofajlar, DC'ler ve lenfositler kemokin reseptörüne bağlanan kemokinleri üretir ve bunlara yanıt verir (Hughes ve Nibbs, 2018).



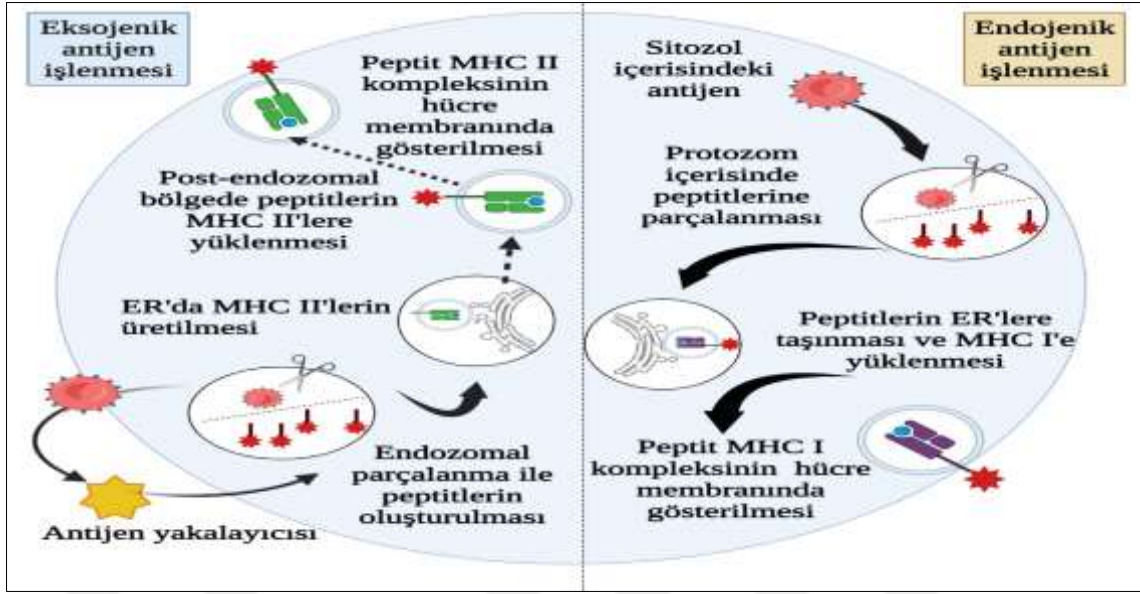
Şekil 2.13 CD4<sup>+</sup> hücrelerinin aktivasyonu ve dönüşümü (Hücre zarında CD4<sup>+</sup>T reseptörü bulunan T hücresi APC (antijen sunan hücre) hücresinin zarındaki MHC II ile gösterilen patojen peptiti hatırlar ve APC hücrelerine ligand-reseptör aracılığı ile bağlanarak aktifleşir. CD4<sup>+</sup>T aktifleştikten sonra bölünerek hatırlanan patojene göre farklı T yardımcı hücrelere (Thelper) dönüşür. Th 1 makrofajları ve sitotoksik hücreleri aktive eder. Th 2 B hücrelerini aktive eder. Th 17 enflamasyon alanına nötrofil ve makrofajların gelmesini sağlar)

#### 2.8.4 T Hücrelerinin Antijen Tanıma Mekanizması

T-hücresi antijen reseptörü (TCR), immünoglobulin hafif zincirlerine benzer iki protein zincirinden oluşur (Davis ve Bjorkman, 1988). Çözünebilir antijenler yüzey immünoglobulinlerine bağlanarak B hücrelerini uyarır, ancak aynı antijenler T hücrelerini aynı mekanizma ile uyaramaz. T hücreleri genomun majör histo-uyumluluk kompleksi (MHC-I) adı verilen bir bölgesinde kodlanan membran glikoproteinleri aracılığıyla antijenleri tanıdıkları bilinmektedir antijenleri. Bu nedenle, MHC-I'ler hem yabancı patojenlere hem de doku greftlerine karşı yanıtta kullanılır (Bjorkman vd., 1987; Warrington vd., 2011). T hücreleri sadece küçük antijen parçalarını tanır, büyük antijen moleküllerinin tanınması için hücre içinde parçalanması (işlenmesi) gerekir. T lenfositlerinin iki farklı antijen işleme yolu vardır (Warrington vd., 2011) (Şekil 2.14).

İlk işleme yolunun (endojen işleme) tüm çekirdekli hücrelerde meydana geldiği bilinmektedir ve hücre içinde üretilen antijenik proteinler proteazom adı verilen proteolitik bir enzim kompleksi tarafından peptitlere parçalanır. Bunlar daha sonra yeni sentezlenen MHC-I molekülleriyle birleştirilmek üzere endoplazmik retikuluma taşınır, burada parçalanmış peptit parçaları ve MHC-I bir kompleks oluşturur ve hücre yüzeyine taşınır; buna endojen işleme denir (Warrington vd., 2011). MHC-I moleküllerine bağlanan peptitler, MHC-I'e bağlanan yardımcı bir reseptör molekül ile  $CD8^+$  glikoproteini taşıyan sitotoksik T hücrelerini uyarır (Warrington vd., 2011, Blum vd., 2013) (Şekil 2.14).

İkinci tip antijen işleme APC hücreleri (DC'ler, makrofajlar, B hücreleri) tarafından gerçekleştirilir. Antijenler bu fagositik hücreler tarafından alınır ve endozomlarda peptitlere ayrılır (eksojen işleme). Bu peptitler endozom sonrası özel bir bölmede MHC-II moleküllerine bağlanır ve kompleksler hücre yüzeyine taşınır. MHC-II molekülleri tarafından sunulan peptitler, yüzeylerinde yardımcı reseptör görevi gören ve MHC-II'ye bağlanan  $CD4^+$  glikoproteini taşıyan yardımcı hücreler (Thelper/Th) tarafından tanınır (Warrington vd., 2011; Blum vd., 2013).



Şekil 2.14 T lenfositlerinin antijen tanıma mekanizması

## 2.9 Tümöre Karşı Bağışıklık Tepkisinin Oluşum Mekanizması

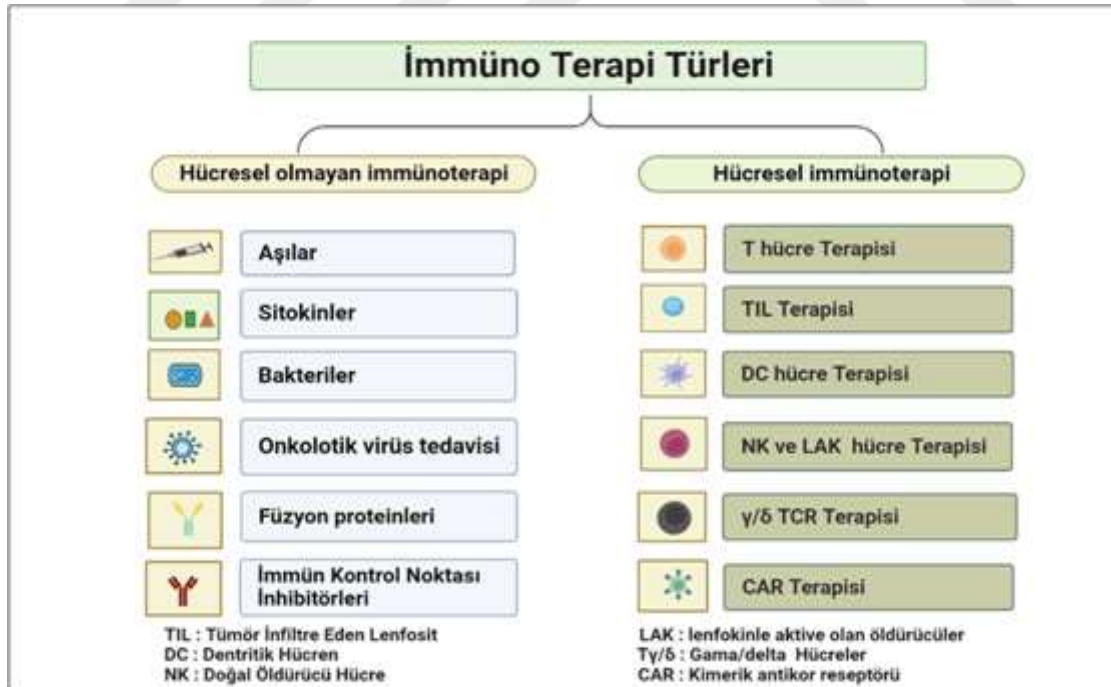
Tümörlere karşı verilen bağışıklık yanıtı mikroorganizmalara karşı verilen yanıtın farklıdır (Krogsgaard vd., 2005; Kummerow vd., 2009; Warrington vd., 2011). Tümör oluşumunun başlangıcında hiçbir "tehlike sinyali" üretilmemesinin sebepleri arasında; Tümörde az sayıda hücre ölmesi, APC'lere çok az antijen bağlanması, tümöre giren ve doğrudan tümör hücrelerini hedef alan lenfosit ve yardımcı uyarıcı eksikliği, potansiyel olarak yanıt veren T hücrelerinin sıklığı ve afinitesi, timik seçimin düşük olması gibi nedenler sayılabilir (Salmond vd., 2009; Sharpe, 2009; Warrington vd., 2011).

Tümör bulunduğu yerde büyüdükçe, kan akışının azalmasıyla anoksi meydana gelir. Anoksi tümörde hücre ölümüne yol açar ve lokal enflamasyonu tetikler. Tümördeki hücre ölümü tarafından üretilen antijenler APC'lerin aktivasyonuna neden olur. Bu şekilde tümör bağışıklığı oluşturulur (Krogsgaard vd., 2005; Kummerow vd., 2009; Warrington vd., 2011).

## 2.10 Meme Kanseri İmmünoterapik Temelli Tedavi Yaklaşımları

Son yıllarda kanser tedavisinde immünoterapötik tedavilerde büyük ilerleme kaydedilmiştir. Bağışıklık sisteminin kanser tedavisinde önemli bir rol oynadığı uzun

zamandır bilinmektedir (Decker vd., 2017; Oiseth ve Aziz., 2017). İmmünoterapinin geleneksel tedavilere göre daha uzun ve daha kalıcı bir yanıt sağladığı gösterilmiştir (Kaufman vd., 2017; Lu vd., 2019). İmmünoterapilerin, hedefe yönelik tedavilerin başarısız olduğu tümörlerin ve metastatik kanserin tedavisinde etkili ve daha az toksik olduğu gösterilmiştir (Turcotte ve Rosenberg., 2011; Menon ve Shin, 2016; Marconcini vd., 2017). Kanser hücrelerinin bağışıklık gözetiminden nasıl kaçtığına dair artan bilgiler, IKB inhibitörleri ve antijene özgü adaptif hücre terapisi gibi etkili immünoterapilerin geliştirilmesine yol açmıştır (Vinay vd., 2015; Muenst vd., 2016). İmmünoterapiler; kanser aşılı, bakteriyel tedaviler, sitokinler, onkolitik viral tedaviler, füzyon proteinleri, IKB tedavileri, T-hücre tedavileri, TIL tedavileri (tümör infiltre eden lenfositler), DC tedavileri, NK ve LAK tedavileri (lenfosit aktive edilmiş öldürücü hücreler) ve CAR tedavileridir (kimerik antikor reseptörleri) (Varadé vd., 2021) (Şekil 2.15). ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) 2010 yılında ilk otolog kanser aşısını ve 2014 yılında ilk immün kontrol noktası blokajı (IKB) tedavisini onaylamıştır (Gardner vd., 2012; Muenst vd., 2016; Jardim vd., 2018).



Şekil 2.15 Kanser tedavisinde kullanılan immünoterapi çeşitleri

## 2.11 Kontrol Noktası İnhibitörleri

Son yıllarda bir dizi kontrol noktası tanımlanmıştır (Jung ve Choi., 2013; Tripathi ve Guleria, 2015). Bunlardan en iyi bilinenleri CTLA-4, PD-1, PD-L1/PD-L2, lenfosit aktivasyon geni-3 (LAG-3) ve T-hücresi immünoglobulin müsin-3 (TIM-3), ITIM alanlarına sahip T-hücresi immünoresptörü TIGIT (WUCAM, Vstm3, VSIG9) ve B-lenfosit ve T-lenfosit zayıflatıcıdır (BTLA). Bu reseptörler, negatif sinyalizasyon yoluyla bağışıklık yanıtında T hücrelerinin aktivasyonunu engeller (Stanczak ve Läubli, 2023). Kanseri hücrelerindeki mutasyonlar, hücrelerde yeni (*de novo*) antijenlerin sentezlenmesinde yol açar. Bu yeni antijenlere verilen bağışıklık yanıtı başlangıçta ya zayıf etkilidir ya da etkisizdir, bu durum “bağışıklıktan kaçış” olarak bilinir (Tang vd., 2020). Kanseri hücreleri, çeşitli bağışıklık bastırma yöntemlerini kullanarak antitümör bağışıklığına direnir ve bağışıklık hücrelerinin sitotoksik etkisinden kaçınırlar.

İmmünosupresyon yöntemlerinden biri PD-1/PD-L1 yolağının modifikasyonudur (Hamanishi ve Konishi, 2014). PD-1/PD-L1 yolu aşırı bağışıklık aktivasyonunu normalleştirmek için kullanılırken, tümör hücrelerinin bu yolu bağışıklık sisteminden kaçmak için kullanabildiği bildirilmiştir (Zielinski vd., 2013; Mahoney vd., 2015). PD1/PD-L1 yolağının diyabet (Wang vd., 2005; Schütz vd., 2017), kardiyomiyopati (Okazaki vd., 2003), insan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonu (Day vd., 2006; Schütz vd., 2017), lupus (Nishimura vd., 1999; Schütz vd., 2017) ve diğer otoimmün hastalıklarda (Chang vd., 1999; Schütz vd., 2017) önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir.

PD-1/PD-L1 yolağının aktivasyonunun, T hücresi toleransı, T hücresi apoptozu, T hücresi tükenmesi ve gelişmiş immünosupresif Treg hücre fonksiyonunu indükleyerek tümör immün kaçışını ve tümör hücresi büyümesini desteklediği gösterilmiştir (Freeman vd., 2000; Latchman vd., 2001; Rodig vd., 2003; Butte vd., 2007; Giancchetti vd., 2013; Zhang vd., 2015; Schütz vd., 2017). T hücreleri, TCR ve diğer yardımcı sinyallerle (immün reseptörler) birlikte başlangıçta MHC üzerinde sunulan yabancı antijenler tarafından aktive edilir (Ceeraz vd., 2013; Topalian vd., 2015a). PD-1, dolaşımdaki T-hücresinin aktivitesinin sınırlandırılması, toleransının sürdürülmesi ve enflamasyonun düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar (Parry vd., 2005; Fife ve Bluestone, 2008; Schütz vd., 2017). TCR'ler tarafından indüklendiğinde T hücreleri PD-1 eksprese eder ve patolojik antijen ortadan kaldırıldığında PD-1 ekspresyonunun azaldığı bildirilmektedir

(Vibhakar vd., 1997; Schütz vd., 2017). Monoklonal antikorlarla PD-1'in blokajının sitokin üretiminde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Zinselmeyer vd., 2013). PD-1'in immünosupresyondaki rolü küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), melanom, meme kanseri, renal hücreli karsinom (RCC) ve Hodgkin lenfoma çalışmalarında gösterilmiştir (Haghshenas vd., 2011; Tsai vd., 2014; Garon vd., 2015; Massari vd., 2015; Homet Moreno vd., 2015).

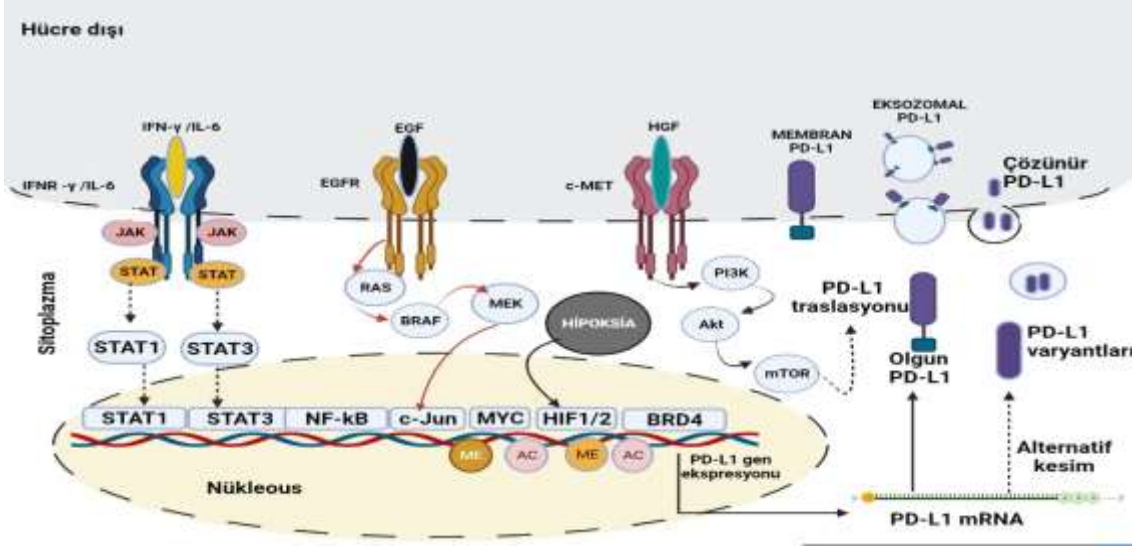
Önceki çalışmalarda, araştırmacılar PD-L1'in IL-10'u indükleyerek T hücreleri üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Dong vd., 1999; Wang vd., 2017). PD-L1 ligandı, APC'ler, aktif T ve B hücreleri, NK'ler, DC'ler, monositler ve makrofajlar, monositler ve epitel hücreleri gibi çok sayıdaki hücre tipinde yapısal olarak ifade edilir (Sharpe vd., 2007; Han vd., 2020). Ayrıca PD-L1, tümör hücreleri tarafından antitümör yanıtlardan (adaptif bir bağışıklık mekanizması) kaçmak için kullanılır ve bağışıklık toleransına neden olduğu bilinmektedir. Bununla beraber böbrek, yumurtalık, pankreas, mide, özofagus ve karaciğer gibi kanserlerde aşırı eksprese edildiği bulunmuştur (Zou ve Chen., 2008; Abiko vd., 2015; Ohaegbulam vd., 2015; Chen vd., 2016; Zhu ve Lang., 2017; Han vd., 2020). Tümör hücreleri üzerindeki PD-L1 ekspresyonu kanser progresyonu ile ilişkilidir ve tümörigenez için öngörücü bir biyobelirteç olarak kabul edilir (Dong vd., 2018; Nunes-Xavier vd., 2019).

Tümörlerde artmış PD-L1 ekspresyonunun östrojen reseptörü-negatif durumu ve HER2-pozitif durumu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Mittendorf vd., 2014; Sabatier vd., 2015). Ayrıca, PD-L1 ile kanser sağkalımı arasında ters bir korelasyon bulunmuştur. (Hamanishi vd., 2007; Matsuzaki vd., 2010; Muenst vd., 2013; Emens vd., 2015). PD-L1'in ayrıca tümör hücrelerini *in vivo* olarak spesifik CD8<sup>+</sup> T hücrelerine karşı daha az duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Iwai vd., 2002; Schütz vd., 2017). Kötü prognozlu mide, meme, böbrek ve yumurtalık kanserlerinde PD-1/PD-L1 blokajına olumlu yanıtlar bildirilmiştir (Abiko vd., 2015; Qing vd., 2015a; Qin vd., 2015b; Shin vd., 2015). İmmün yanıtı düzenleyen veya baskılanmasını azaltan immünoterapötikler kanser tedavisi için kritik öneme sahiptir (Kandalaft vd., 2012). Son zamanlarda yapılan birçok klinik çalışma, kontrol noktası blokajının konakçı bağışıklık sisteminin doğuştan gelen antitümör bağışıklığını geri kazanmasını sağladığını bildirmiştir (Postow vd., 2015; Topalian vd., 2015b). PD-1/PD-L1 immün kontrol noktası, tümör aracılı immün baskılamayı tersine çevirmek için umut verici bir immün kontrol noktası olduğu bildirilmiştir (Topalian vd.,

2012; Ge vd., 2013; McClanahan vd., 2015). Anti-PD-1/anti-PD-L1 gibi immün kontrol noktası inhibitörlerinin amacı T-hücreyi aktivasyonunu artırmaktır. Bugüne kadar birçok çalışma, anti-mPD-1/PD-L1 monoklonal antikolarının (mAb) immünosupresyonu tersine çevirebileceğini ve malignitelerle mücadelede umut verici bir klinik stratejiyi temsil ettiğini göstermiştir (Hamanishi vd., 2016; Schütz vd., 2017). *In vivo* olarak, PD-1/PD-L1 yolağının spesifik antikolarla bloklanması hücrel immünoterapilerle daha fazla tümör gerilemesine yol açtığı gösterilmiştir (Kodumudi vd., 2016).

### **2.11.1 PD-1 Reseptörü ve PD-L1 Ligandının Yapısı**

Tümör mikro ortamında immün toleransın indüklenmesini ve sürdürülmesini PD-1/PD-L1 yoluyla kontrol edilir. PD-1 iki liganda (PD-L1 ve PD-L2) sahiptir (Freeman vd., 2006; Zhu ve Lang., 2017). PD-L1, PD-1'in birincil ligandı olarak kabul edilmektedir (Youngnak vd., 2003). T hücrelerinin aktivasyonu, proliferasyonu ve sitotoksik sekresyonundan, anti-tümör immün yanıtlarda PD-1, PD-L1/L2'nin aktivitesi sorumludur. Çalışmalar, immün düzenlemede rol alan PD-1 ve PD-L1'in membrana bağlı veya çözünür formları (sPD-1/sPD-L1) olduğunu göstermiştir (Xing vd., 2012; Shi vd., 2013; Nagato vd., 2017; Zhu ve Lang., 2017) (Şekil 2.16). PD-1/PD-L1 yolağı moleküllerinin çözünür olmayan formu PD-1/PD-L1 (mPD-1/PD-L1) ve çözünür formu (sPD-1/PD-L1), tümörlere yönelik T-hücreyi immün yanıtında immünosupresif rol oynamaktadır (Park vd., 2015; Palucka vd., 2016).



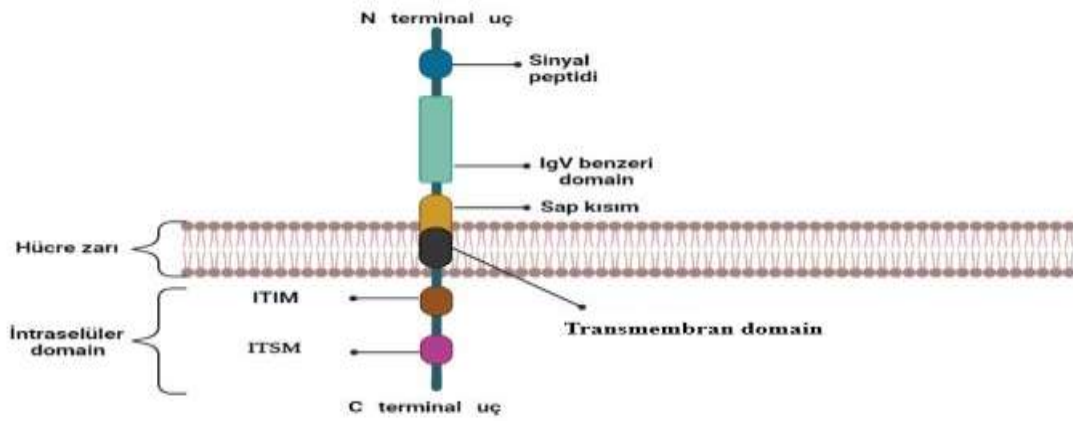
Şekil 2.16 PD-L1 ifadesinin düzenleyici mekanizması (PD-L1 ekspresyonunun düzenlenmesi, genomik değişiklik, transkripsiyonel düzenleme, transkripsiyon sonrası ve translasyon sonrası modifikasyonlar ve eksozomal taşımayı içerir. Me: metilasyon, AC: asetilasyon. Cha vd., 2019'dan değiştirilerek alınmıştır)

### ***PD-1 Reseptörünün Yapısı:***

CD279 olarak da bilinen PD-1 ilk olarak 1992 yılında LyD9 (murin hematopoetik progenitor hücreleri) ve 2B4-11 (murin T-hücreleri hibridoma) hücre hatlarında keşfedilmiştir (Han vd., 2020). Nishimura ve diğerleri 1999 yılında PD-1'in bağışıklık yanıtlarının negatif bir düzenleyicisi olduğunu bildirmiştir (Nishimura vd., 1999). T-hücre reseptörünün aktivasyonundan sonra kanser hücrelerinin ölümüne neden olduğu için programlanmış hücre ölümü-1 (PD-1) olarak adlandırılır (Ishida vd., 1992; Schütz vd., 2017). PD-1 doğrudan hücre ölümünü tetiklemez, fakat hücre büyüme faktörlerini ve hayatta kalma sinyallerini azaltarak programlanmış hücre ölümüne neden olur. PD-1 ayrıca hem adaptif hem de doğuştan gelen bağışıklık hücreleri, özellikle de tümöre özgü T hücreleri tarafından yüksek oranda ifade edilir (Zhu ve Lang., 2017; Sunn vd., 2018; Akinleye ve Rasool, 2019; Lucibello vd., 2021). PD-1 reseptör proteini, kromozom 2 üzerinde bulunan 5 ekzondan oluşan 55 kDa'lık bir DNA parçası üzerindeki PDCD1 geni tarafından kodlanır (Han vd., 2020). PD-1, CD28 protein reseptörleri ailesine homolog bir glikoprotein ko-inhibitör moleküldür (Xing vd., 2012; Chinai vd., 2015; Han vd., 2020).

PD-1, 288 amino asitten oluşan tirozin bazlı (aa, ~55 kDa) tip I transmembran protein reseptörüdür (Akinleye ve Rasool, 2019; Han vd., 2020). PD-1'in proteinin yapısı,

CD28 ailesi proteinlerinin diğer üyeleriyle aynı dizileri paylaşan immüoglobulin V (IgV) benzeri hücre dışı alanın ardından bir transmembran alan (~20 aa) ve bir sitoplazmik alan / hücre içi kuyruktan (~ 95 aa) oluşur (Han vd., 2020) (Şekil 2.17). Sitoplazmik alan 95 aa'lık bir immünoresptör tirozin bazlı anahtar motifi (ITSM) ve bir immünoresptör tirozin bazlı inhibitör motif (ITIM) içerir ve iki fosforilasyon bölgesine sahiptir. İnhibitör sinyallerin iletimi için ITSM'ler gereklidir (Akinleye ve Rasool, 2019). Ligandlarının PD-1'in sitoplazmik kuyruğuna bağlanması üzerine, reseptör aşırı fosforile olur, TCR sinyalini negatif olarak düzenler ve T-hücre reseptörünün aşağı modülasyonunu tetikler (Kim vd., 2005; Park vd., 2015; Akinleye ve Rasool, 2019).



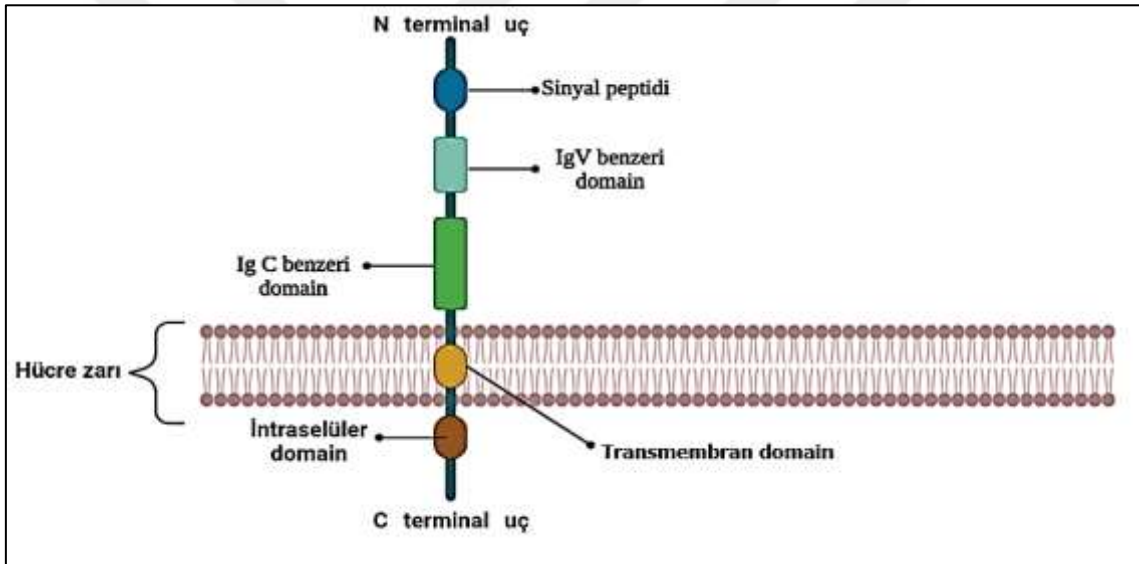
Şekil 2.17 PD-1 reseptörünün protein yapısı

PD-1 ekspresyonunun interlökin IL-2, IL-7, IL-15 ve IL-21 gibi sitokinler tarafından tetiklendiği bilinmektedir (Keir vd., 2008; Kinter vd., 2008; Lee vd., 2009; Zhu ve Lang., 2017).

#### ***PD-L1 Ligandının Yapısı:***

PD-L1 (B7-H1, CD274) ve PD-L2 (B7-DC, CD273) PD-1 reseptörünün ligandlarıdır (Youngnak vd., 2003; Sun vd., 2018; Akinleye ve Rasool, 2019). PD-L1'in PD-1 molekülüyle etkileşiminin keşfedilmesiyle B7-H1, CD274 adı PD-L1 olarak yeniden adlandırılmıştır (Freeman vd., 2000). Bu ligandlar CD274 geni tarafından kodlanır ve

yaklaşık 290 amino asit (33 kDa) içeren B7 ailesinin tip I transmembran protein reseptörleridir (Sanmamed vd., 2014; Han vd., 2020). PD-L1 ligandını kodlayan gen insanlarda kromozom 9 üzerinde bulunur ve 7 ekzondan oluşur (Akinleye ve Rasool, 2019). PD-L1 ligandı üç bölümden oluşur: bir hücre dışı IgV ve IgC benzeri alan ile sinyal dizisi, bir transmembran alan ve bir sitoplazmik (hücre içi) alan (Şekil 2.18). PD-L1'in hücre içi alanı 30 amino asitten oluşur ve bu alanın işlevi henüz bilinmemektedir (Akinleye ve Rasool, 2019). Kanser hücrelerinde PD-L1 mRNA veya PD-L1 proteininin ifadesinin IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, VEGF, hipoksi ile indüklenabilir faktör-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) gibi sitokinler ve JAK2/IFN, PI3K ve MEK/ERK/STAT1 gibi yapısal onkogen sinyal yolları tarafından artırıldığı bildirilmiştir (Ota vd., 2015; Bellucci vd., 2015; Dong vd., 2017).

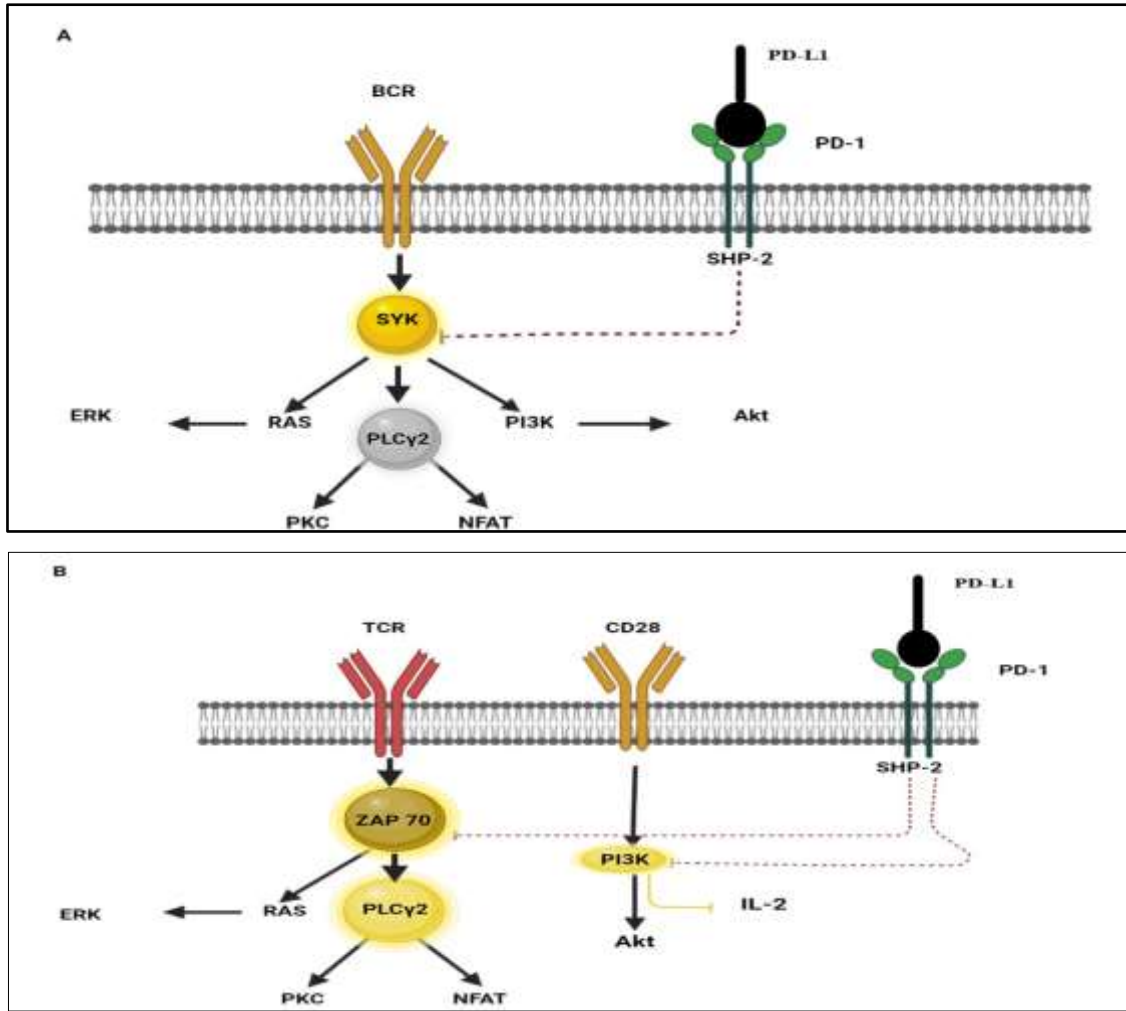


Şekil 2.18 PD-L1 ligandının protein yapısı

## 2.12 PD-1/PD-L1 Sinyalizasyon Mekanizması

PD-1'in sinyal mekanizmasının ilk olarak B hücre hattında (IIA1.6) çalışıldığı bilinmektedir. PD-1 sinyal yolağının, B hücrelerindeki benzer mekanizmalarla T hücrelerindeki TCR sinyalini zayıflattığı bildirilmiştir (Zhu vd., 2017). TCR sinyalizasyonu PD-1 reseptörünün ligandına (PD-L1) bağlanmasından sonra başlar. Sinyalizasyon, PD-1'in sitoplazmik alanının tirozininin fosforilasyonuna ve ardından ITSM'de SHP-2'nin C-terminal tirozin alımına yol açar. Daha sonra SHP-2 ve TCR-

ilişkili protein kinaz 70 (ZAP70) PI3K yolunu defosforile ederek aşağı yönlü sinyal kaskadını inhibe eder (Şekil 2.19 a, b). Ayrıca PI3K blokajı, T hücrelerinde sağkalım geni Bcl-XL ekspresyonunu, IL-2 üretimini, glukoz metabolizmasını azaltarak CD4<sup>+</sup> T ve CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin alerjene karşı duyarlılığın kaybolmasına (anerjiye) neden olur (Bishop vd., 2009; Chikuma vd., 2009). PD-1, T hücresi aktivasyonu için eşiği yükselterek, T hücresi proliferasyonunu inhibe ederek ve aktive edilmiş T hücrelerinin apoptozunu teşvik ederek T hücresi immün yanıtlarının etkinliğini azaltır. PD-1'in uyarılması, enfeksiyona yanıt olarak enflamatuvar ortamda otoimmüniteyi sınırlar (Nurieva vd., 2006; Keir vd., 2006; Akinleye ve Rasool, 2019).



Şekil 2.19 PD-1 yolu üzerinden sinyal iletiminin engellenmesi (Şekil A: B hücrelerinde, PD-1 ligasyonu ile birlikte BCR (B hücre antijen reseptörü) sinyal mekanizması, Şekil B: T hücrelerinde PD-1 ligasyonu ile birlikte TCR sinyal mekanizması Zhu vd., 2017 değiştirilerek alınmıştır)

### 2.13 Meme Karsinogenezinde PD-L1 Üzerine Güncel Çalışmalar

Son çalışmalar, tümörlerin büyümek, hayatta kalmak ve bağışıklık gözetiminden kaçmak için PD-1/PD-L1 yolunu kullandığını göstermiştir (Ledford vd., 2018; Salmaninejad vd., 2019; Lucibello vd., 2021). Bu araştırmacılar, doğrudan bağışıklık kontrol noktalarının (PD-1/CTLA-4) bir tümör bağışıklık kaçış stratejisi olarak kullanıldığını keşfetmişlerdir (Ljunggren vd., 2018). Bağışıklık kontrol noktasının engellenmesi, T hücrelerinin yeniden etkinleştirilmesi ve kanser hücrelerinin T hücreleri tarafından daha etkili bir şekilde ortadan kaldırılması için önemlidir (Salmaninejad vd., 2019). Bu nedenle, kanser tedavisinde bağışıklık sisteminin özgüllüğünü ve etkinliğini artırmak için immünoterapi ve immün kontrol noktası blokerleri ile tedavi, son on yılda büyük ilgi gören terapötik hedefler haline gelmiştir (Messenheimer vd., 2017; Salmaninejad vd., 2019). Günümüzde, PD-1/PD-L1'in hedeflenmesi, kanser kontrolü için deneysel immünoterapötik çalışmalarda çok popüler bir strateji olmuştur. Son yıllarda, PD-L1'in gen düzenlemesi ve post-translasyonel protein modifikasyonları gibi birçok stratejik yöntem araştırılmıştır (Akinleye ve Rasool, 2019). PD-L1 ligandlarının birçok farklı kanser türünde (melanom, yumurtalık, akciğer ve böbrek karsinomu) yüksek oranda ifade edildiği bilinmektedir (Akinleye ve Rasool, 2019). İmmünoterapide kullanılan immün kontrol noktalarını (CTLA-4, PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG3, Ig, TIGIT, NKG2A) hedef alan tedaviler klinikte test edilmektedir (André vd., 2018; Qin vd., 2019; Lucibello vd., 2021). Tüm bu çalışmalar kansere karşı tümör hedefli bağışıklık oluşturmayı amaçlamaktadır (Mortezaee, 2020; Lucibello vd., 2021). Çalışmalar, PD-L1'in hedefe yönelik ve klinik kullanımının kanser hastalarında antitümör bağışıklığı önemli ölçüde artırdığını, sağkalımı uzattığını ve tedavinin etkinliğini ve başarısını artırdığını ortaya koymuştur (Han vd., 2020). Melanom, küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve böbrek kanserinde PD-1/PD-L1 inhibitörü olarak klinikte kullanılan ilaç, tümör remisyonu açısından etkileyici ve uzun süreli bir etki gösteren nivolumab'dır (Topalian vd., 2012). Pembrolizumab ile de benzer sonuçlar gözlenmiştir. Son çalışmalar insan meme kanseri hücre hatlarında PD-L1 ekspresyonunun yüksek olduğunu göstermiştir (Darvin vd., 2019).

Hücre hatları karşılaştırıldığında, PD-L1'in MCF-7 ve BT-549 tümörlerinde aşırı eksprese edildiği ve PD-L1 seviyelerinin östrojen reseptörü (ER)- $\alpha$ -negatif meme kanserinin farklı alt tiplerinde daha yüksek olduğu bulunmuştur (Liu vd., 2018; Han vd., 2020). PD-L1'in inhibisyonu kanser hücresi büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Liu vd., 2017). Tüm bu literatür verileri ışığında, PD-L1 yolağını inhibe eden tedaviler meme kanserinde yeni ve uygun bir hedeftir.

## 2.14 miRNA'ların Keşfi

MikroRNA'lar (miRNA'lar), ortalama uzunluğu 22 nükleotid olan küçük kodlamayan RNA'lar olup gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. *Caenorhabditis elegans*'ta lin-4 olarak adlandırılan ilk miRNA'lar 1993 yılında Ambros ve Ruvkun ekibi tarafından keşfedilmiştir (Almeida vd., 2011; O'Brien vd., 2018). Bu keşfin ardından çok sayıda miRNA tanımlanmıştır (Davis-Dusenbery ve Hata, 2010; Li vd., 2010; Friedlander vd., 2014). Yeni miRNA'ların keşfi halen devam etmektedir (deRie vd., 2017). Aynı miRNA'nın birden fazla mRNA'yı susturma yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir (Hashimoto vd., 2013). miRNA'lar hücrede mRNA'yı bozma veya translasyonunu baskılama işlevine sahiptir (O'Brien vd., 2018; Petrović vd., 2021). miRNA'ların belirli koşullar altında mRNA gen ekspresyonunu ve translasyonunu düzenleyebildiği de bildirilmiştir (Makarova vd., 2016). Bununla birlikte, miRNA'ların 5' UTR, kodlama dizisi veya gen promotörleri gibi diğer gen bölgeleriyle de etkileşime girdiği rapor edilmiştir (Broughton vd., 2016; O'Brien vd., 2018; Petrović vd., 2021). miRNA'ların hedef genleriyle etkileşimi sürekli ve bu süreklilik miRNA'ların hücre içi lokalizasyonu, hedef mRNA'ların miktarı ve miRNA-mRNA etkileşimlerinin afinitesi gibi çok sayıdaki faktöre bağlıdır (O'Brien vd., 2018). miRNA'lar ayrıca hücre dışı sıvılara da salgılanır. Eksozomlar, veziküller veya argonotlar gibi proteinlere bağlanarak hedef hücrelere taşınabildikleri bilinmektedir (O'Brien vd., 2018). Hücre dışı miRNA'lar çeşitli hastalıklar ve hücreler arası iletişim için potansiyel biyobelirteçler olarak tanımlanmıştır; miRNA'lar tümör kontrolünde etkili olabilir (Hayes vd., 2014; Wang vd., 2016; Huang, 2017; Paul vd., 2018; Braicu vd., 2019). miRNA'ların kanser hücrelerinde hücre döngüsü, metastaz, anjiyogenez, hücre

metabolizması ve apoptozun düzenlenmesindeki rolleri nedeniyle kanser tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Catela Ivkovic vd., 2017; Iqbal vd., 2019).

## 2.15 miRNA'ların Biyogenezi

Ökaryotlarda miRNA olgunlaşması için gerekli genetik bilgi, çekirdekte genom boyunca DNA'nın intergenik bölgelerinde veya genomun protein kodlayan genlerinin intron veya eksonlarında kodlanır (O'Brien vd., 2018). miRNA biyogenezi, kanonik ve kanonik olmayan yol olmak üzere iki yolla gerçekleşir (Şekil 2.20). miRNA'ların sentezinde en yaygın kullanılan biyogenez yolu kanonik yoldur. Kanonik biyogenez, hem nükleer hem de sitoplazmik adımları içeren karmaşık bir yoldur (Lee vd., 2004; He vd., 2020). Kanonik biyogenez hem nükleer hem de sitoplazmik basamakları olan karmaşık bir yoldur (Lee vd., 2004; He vd., 2020).

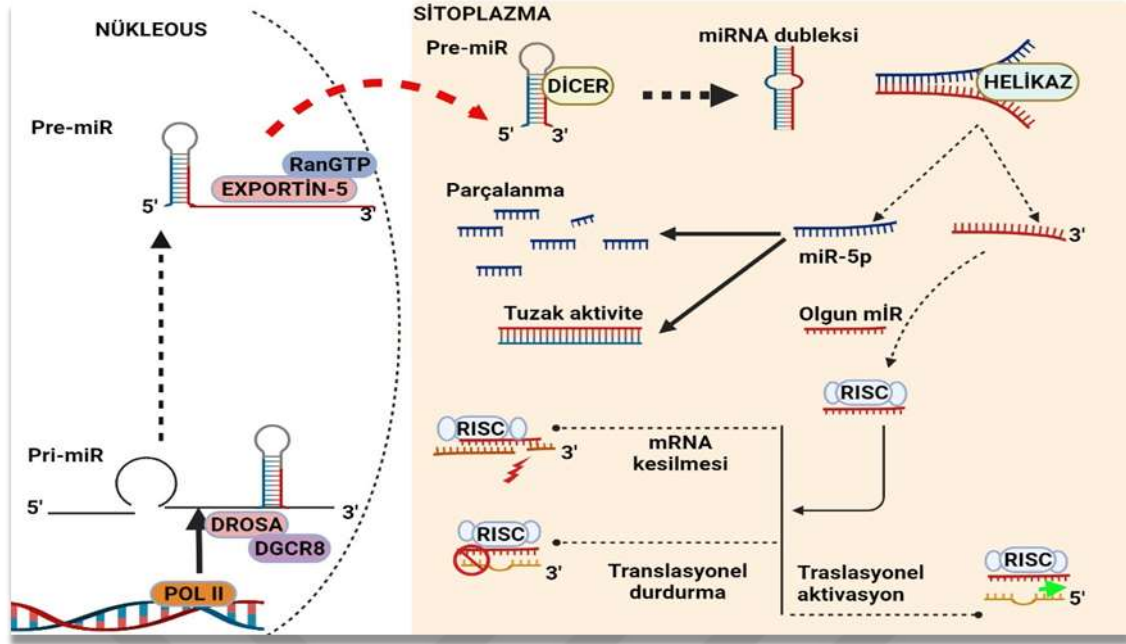


Şekil 2.20 miRNA biyogenezinin kanonik ve kanonik olmayan yolları

Kanonik biyogenezde miRNA biyogenezi çekirdekte başlar. Endojen olarak kodlanan 100-1.000 nükleotid uzunluğundaki primer miRNA'lar (pri-miRNA'lar), RNA polimeraz II kullanılarak nükleer transkripsiyon yoluyla genomdan saç tokası yapısında pri-miRNA'lar olarak sentezlenir (Ha vd., 2014). Bu uzun pri-miRNA'lar hem 5' hem de 3' yönünde uzanır. 5' ucunda bir başlık yapısı (şapka) ve 3' ucunda poliadenillenmiş (poliA) bir kuyruk bulunur. Pri-miRNA'lar daha sonra çekirdekte RNAaz III (Drosha)

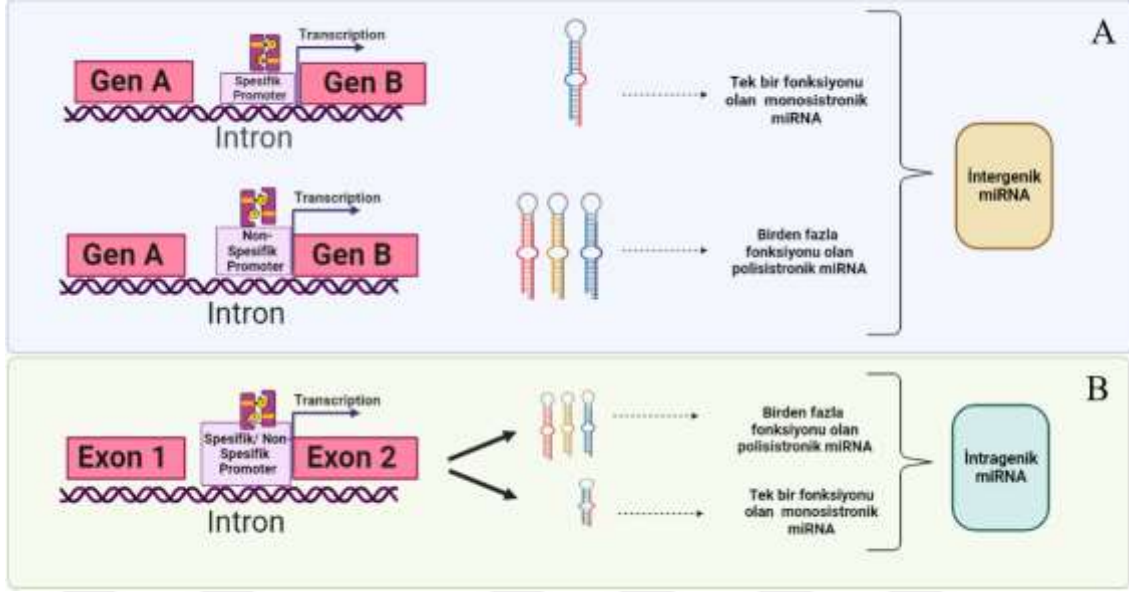
enzimi ve DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8) kofaktöründen oluşan bir kompleks (pasha) tarafından 60-70 nükleotid uzunluğunda kök-ilmek yapılı öncü-miRNA'lar (pre-miRNA'lar) oluşturmak üzere parçalanır (Luciano vd., 2004; Denli vd., 2004; Winter vd., 2009; Arenz, 2014; Nguyen vd., 2015). Çift zincirli pre-miRNA, eksportin-5 (EXPO5) tarafından çekirdekten sitoplazmaya taşınır ve 21-24 nükleotid miRNA ve antisens miRNA'dan oluşan çift sarmallı bir yapı üretmek için başka bir RNAaz III enzimi olan Dicer tarafından kesilir (Liu vd., 2004; Blow vd., 2006; Kawahara vd., 2012; Wilson vd., 2015; Kim vd., 2016; Hamam vd., 2017). miRNA baskılama işleyişinin temel taşı miRNA ile indüklenen susturma kompleksidir (RISC). Bu kompleks, olgun miRNA miRNA zincirlerden uzun olanının (~22 nt) Argonaute proteinine (AGO) bağlanmasıyla oluşur (Bosse vd., 2010; Hamam vd., 2017). Bu süreçte miRNA, hedef mRNA'nın 3' bölgesine (UTR) eksik baz eşleşmesi ile bağlanır. Bu bağlanma, hedef mRNA'nın ifadesinin istikrarsızlaşmasına (mRNA susturma), mRNA bölünmesine, mRNA'nın proteine çevrilmesinin bastırılmasına, translasyonel baskılamanın indüklenmesine veya ribozom ayrışmasına aracılık edilmesine yol açar (Ha vd., 2014; Yun vd., 2021, Şekil 2.21). Diğer kısa zincir genellikle bozulur (Bosse vd., 2010; Hamam vd., 2017).

Kanonik olmayan miRNA biyogenezinde miRNA'lar Drosha/DGCR8 ve Dicer'den bağımsız olarak üretilir (He vd., 2020). Kanonik olmayan yolda tanımlanan ilk ve en önemli alternatif miRNA olgunlaşma yolağı "Mirtron" yolağıdır. Mirtronlar, pre-miRNA'lar olarak doğrudan konak genlerden sentezlenir ve firkete potansiyeline sahiptir ve pri-miRNA Drosha/DGCR8 bu yolda yer almaz (Ruby vd., 2007). Günümüzde miRNA biyogenezi için çok sayıda kanonik olmayan miRNA biyogenez yolu keşfedilmiştir (Kim vd., 2016). miRNA tarafından translasyonel baskılama mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da, mRNA bölünmesi, deadenilasyon, degradasyon, p-body alımı ve çeşitli translasyonel adımların engellenmesi gibi çeşitli hipotezler vardır (Winter vd., 2009; Kwak vd., 2010; Arenz, 2014).



Şekil 2.21 miRNA'ların biyogenezi ve etki mekanizması

miRNA'ların gen ifadesi ve işlevleri, kromozom üzerindeki lokalizasyonlarına bağlı olarak değişir. Bu nedenle miRNA'lar genomik lokuslardaki lokalizasyonlarına bağlı olarak iki tipte sınıflandırılır: intragenik (intra-miR) ve intergenik (inter-miR) miRNA'lar (Bhattacharyya vd., 2012; He vd., 2012, Şekil 2.22). İntergenik (inter-miR) miRNA'lar genler arasında bulunan intron bölgelerinden üretilirler (Walker, 2014). Bu intergenik miRNA'lar spesifik bir promotör ile tek bir fonksiyon için üretildiklerinde monosistronik miRNA'lar olarak adlandırılırlar. Birden fazla fonksiyona sahip miRNA'lar spesifik olmayan tek bir promotör ile ifade edildiğinde, bu miRNA'lara polisistronik (poli-miR) miRNA'lar denir (Davis-Dusenbery vd., 2010; Hitit vd., 2014; Walker, 2014, de Rie vd., 2017; O'Brien vd., 2018). İntragenik (intra-miR) miRNA'lar kısa bir gende iki ekzon arasındaki kodlamayan intronlarda bulunur ve konak promotörün veya spesifik bir promotörün kontrolü altında transkribe edilir ve monosistronik polisistronik miRNA'ları ifade edebilir (Walker, 2014).



Şekil 2.22 miRNA üreten genomik lokusların çeşitliliği (İntergenik miRNA (A) Spesifik /Non-spesifik bir promotör bölgesinin (siyah ok) kontrolü altında monosistronik polisistronik miRNA ekspresyonu. (B) İntragenik miRNA genellikle intronların içinde bulunur ve konak promotörünün veya spesifik bir promotörün (siyah ok) kontrolü altında monosistronik ve polisistronik miRNA ekspresyonu)

## 2.16 Meme Kanseri Tedavisinde miRNA'ların Kullanımı

Mükemmel gen susturma yeteneklerine sahip miRNA'ların meme kanseri gelişimi, invazyon, metastaz ve tümör immünoterapisinde rol oynadığı bilinmektedir (Petrović vd., 2021). miRNA'lar ve çeşitli hastalıklar arasında yakın bir ilişki olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (Petrović vd., 2021). Hastalıklarda miRNA seviyelerindeki artış/azalış gibi değişiklikler sayesinde hastalıkların erken teşhisi ve tedavisi için yeni bir ilaç adayı olarak kullanılabilir (Ji vd., 2017; Petrović vd., 2021). Kanser tedavisinde, miRNA ekspresyon profilinin tanısal ve prognostik bir araç olarak araştırılması faydalı olabilir (Calin vd., 2005; Luce vd., 2005).

miRNA'lar onkogenik etkilere (oncomirs), tümör baskılayıcı etkilere veya her ikisine birden sahip olabilir (Iorio vd., 2005; Svoronos vd., 2016; Petrovic vd., 2017; Petrović vd., 2021). Kanser tedavisinde miRNA'lar iki şekilde kullanılmaktadır. İlk olarak, mikroRNA süngerleri, antago-miRNA'lar ve anti-miRNA'lar onkomirleri inhibe etmek ve susturmak için kullanılır. İkinci uygulama, transfeksiyon yoluyla mimikri/taklit miRNA'ların miktarını artırmak ve böylece tümör baskılayıcı

mikroRNA'ların işlevini eski haline getirmektir (Petrovic vd., 2018). miRNA'lar tümör bağışıklığını, tümör immünojenitesini ve anti-tümör immün yanıtını etkileyerek bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir (Eichmuller vd., 2017; Curtale vd., 2018; Zhang vd., 2020). Tümörlerle ilgili çalışmalar, miRNA'ların immünoterapide terapötik amaçlar için umut verici hedefler olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Ji vd., 2016; Yun vd., 2021). miRNA bazlı terapi, kanser immünoterapisinde kişiselleştirilmiş tedaviye olanak sağlar (Cortez vd., 2015; Wang vd., 2020). Çalışmalar, miRNA'ların tümör hücrelerinin yüzeyinde bağışıklık kontrol noktalarının ve PD-1/PD-L1 dahil ligandlarının ekspresyonunu doğrudan ve dolaylı olarak kontrol ederek anti-tümör potansiyellerini modüle edebildiklerini göstermiştir (Abdelrahman vd., 2016; Xu vd., 2017; Wang vd., 2018; Pesce vd., 2018). miRNA'lar, spesifik düzenleyici işlevleri nedeniyle, immünoterapide prognostik biyobelirteçler ve terapötik hedefler olarak kullanılabilir (Yun vd., 2021).

## 2.17 Hsa-miR-3670 Ailesi

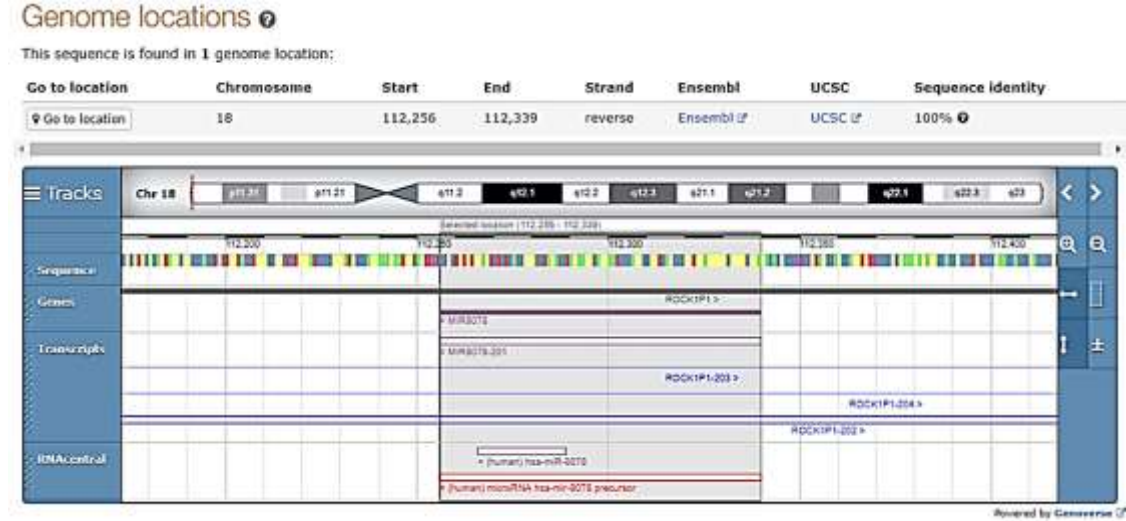
Bunlar 16p13.11 kromozomu üzerinde bulunan çift sarmallı RNA oligonükleotidleridir (Şekil 2.23) ve endojen post-translasyonel düzenlemeyi atlayan olgun mikroRNA'ların çalışmasını taklit etmek üzere tasarlanmıştır. Çift iplikli RNA transkripti Hsa-miR-3670 (MI0016071) insana özgü bir sekans içerir (<https://rnacentral.org/rna/URS000075B9CE/9606>, Erişim:23.12.2021). Olgun miR-3670'in nükleotid dizisi 65 nükleotid uzunluğunda olan "*agagcucucacagcuguccuucucua*"dır (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR3670-1&keywords=MI0016071>, Erişim; 23.12.2021).



miR-3670, tümör oluşumuyla yakından bağlantılı sinyal yollarını inhibe etme potansiyeline sahiptir ve bu da terapötik bir ajan olarak potansiyelini göstermektedir. Biyoinformatik çalışmamız, miR-3670 ile meme kanserinde rol oynayan bir immün kontrol noktası olan PD-L1 arasında bir ilişki olduğunu göstermiş ve bunun immünoterapi kullanımı için yeni bir gerekçe olabileceğini düşündürmüştür ([http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert\\_72/targetscan.cgi?species=Humanandgid=andmir\\_sc=andmir\\_c=andmir\\_nc=andmir\\_vnc=andmirg=miR-3670](http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_72/targetscan.cgi?species=Humanandgid=andmir_sc=andmir_c=andmir_nc=andmir_vnc=andmirg=miR-3670). Erişim tarihi: 24.12.2020).

## 2.18 Hsa-miR-8078 Ailesi

Bunlar şekil 2.24'te gösterildiği gibi 18p11.32 kromozomu üzerinde bulunan çift sarmallı RNA oligonükleotidleridir ve endojen, post-translasyonel düzenlemeye tabi olmayan olgun mikroRNA'ların işlevini taklit etmesi amaçlanmıştır. Hsa-miR-8078 (MI0025914) çift sarmallı RNA transkripti insanlara özgü bir sekans içerir (<https://rnacentral.org/rna/URS000075DC45/9606> Erişim:23.12.2021). Olgun miR-8078'in nükleotid uzunluğu 22'dir ve nükleotid dizisi "ggucuaggcccgugagacacuc" şeklindedir (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR3670-1&keywords=MI0016071>, Erişim; 24.12.2021).



Şekil 2.24 Prekürsör ve olgun hsa-miR-8078'in genom konumu (<https://macentral.org/rna/URS000075DC45/9606>)

miR-8078'in GREB1, HECTD3, RIPK4 gibi bazı önemli sinyal yollarını hedef olarak bunların ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Lee vd., 2019). GREB1'in tümör hücrelerinde aşırı eksprese edildiği ve tümör sinyal yolları ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Rae vd., 2006; Laviolette vd., 2014). Li ve diğerleri (2013a, 2013b) tarafından yapılan araştırma, HECTD3'ün tümör hücresi apoptozunu engellediğini ve anti-kanser ilaçlarına karşı direnci artırdığını öne sürmektedir. RIPK4'ün tümörlerin büyümesiyle bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Huang vd., 2013). GREB1, HECTD3 ve RIPK4 sinyal yollarının birçok kanser türünde kötü prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur. MiR-8078, tümörigenez ile yakından ilişkili sinyal yollarını inhibe edebildiği için terapötik bir ajan olarak potansiyele sahiptir. Öte yandan, miR-8078'in meme kanserinde bir immün kontrol noktası olan PD-L1 ve dolaylı sinyal yolları ile ilişkili olması nedeniyle immünoterapide kullanılabilecek yeni bir argüman olduğunu düşünüyoruz.

([http://www.targetscan.org/cgiin/targetscan/vert\\_72/targetscan.cgi?species=Humanandgid=andmir\\_sc=andmir\\_c=andmir\\_nc=andmir\\_vnc=andmirg=miR-8078](http://www.targetscan.org/cgiin/targetscan/vert_72/targetscan.cgi?species=Humanandgid=andmir_sc=andmir_c=andmir_nc=andmir_vnc=andmirg=miR-8078). Erişim tarihi: 24.12.2020).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Gerçekleştirilen tez 5 ana yöntem ve alt basamaklarından oluşmaktadır. Bu basamaklar Çizelge 3.1’deki iş akış şemasında belirtilmiştir.

Çizelge 3.1 Tez çalışmasının iş akış şeması

|                                                       |                                                                             |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Hücre Kültürüne Dayalı Yöntemler                      | Hücrelerin Çözdürülmesi                                                     |
|                                                       | Hücre Pasajlanması                                                          |
|                                                       | Hücre Dondurulması                                                          |
|                                                       | Hücre Sayımı                                                                |
| miR-3670 ve miR-8078’nin Transfeksiyon ve Validasyonu | miRNA’ların Hazırlanması ve Kontrolü                                        |
|                                                       | miRNA mimiklerinin transfeksiyonu                                           |
|                                                       | miRNA’ların sitotoksik etkisinin incelenmesi                                |
|                                                       | IC <sub>50</sub> Değerinin Hesaplanması                                     |
| Real Time PCR’a Dayalı Yöntemler                      | Toplam RNA izolasyonu                                                       |
|                                                       | RNA’ların miktar ve saflık tayini                                           |
|                                                       | cDNA Sentezi                                                                |
|                                                       | PD-L1 ifadesinin Real Time PCR ile analizi                                  |
|                                                       | qRT-PCR Datalarının Analizi                                                 |
| Ko-Kültüre Dayalı Yöntemler                           | PBMC Hücrelerinin Çözülmesi                                                 |
|                                                       | PBMC Hücrelerinin Stoğa Alınması                                            |
|                                                       | T Hücre İzolasyonu ve Manyetik Aktif Hücre Ayırması (MACS)                  |
|                                                       | T (CD8 <sup>+</sup> ) Hücrelerinin Pasajlanması                             |
|                                                       | Kanser Hücre Hattı Hücreleri ile CD8 <sup>+</sup> T Hücrelerinin Ko-Kültürü |
| Anti-Kanser Parametrelerin Analizi                    | Hücre Göçü Analizi                                                          |
|                                                       | Apoptoz ve Nekroz Analizi                                                   |
|                                                       | Koloni Oluşturma Yeteneği Analizi                                           |
|                                                       | 3D Sferoid Oluşum Yeteneği Analizi                                          |
|                                                       | E-kaderin Analizi                                                           |
|                                                       | VEGF Analizi                                                                |
|                                                       | TINAGL-1 Analizi                                                            |
|                                                       | İstatistiksel Analiz                                                        |

### 3.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal ve cihazlar çizelge 3.2 ve 3.3'te listelenmiştir.

Çizelge 3.2 Kullanılan cihazlar

| Kullanılan Mevcut / Ekipman Türü  | Modeli (Araç, Makine-Tecizat vb.)         |
|-----------------------------------|-------------------------------------------|
| -20°C Derin Dondurucu             | Uğur                                      |
| -80°C Derin Dondurucu             | Panasonic MDF-U5386S-PE                   |
| Azot Tankı (-196°C)               | International Cryogenics, InsIC35RX       |
| Biyogüvenlik Kabini               | Metisafe class 2                          |
| Buzdolabı                         | Samsung                                   |
| Çalkalamalı Su Banyosu            | Nüve Marka ST402 model                    |
| Distile Su cihazı                 | GLF Marka 2001/1 model                    |
| Floresans Mikroskop               | Zeiss Axioskop MC100                      |
| Hassas Terazı                     | RadWag                                    |
| Isıtmalı Magnetik Karıştırıcı     | Wisestir Marka MSH-20A model              |
| Işık Mikroskop                    | Olympus                                   |
| İnverted Mikroskop                | Olympus CKX31                             |
| Karbondioksitli Etüv              | Memmert                                   |
| Kar-Buz Makinası                  | Hoshizaki FM-80KE                         |
| Nanodrop                          | Thermo Scientific lite model              |
| pH Metre                          | Thermo Scientific Orion 3 star model      |
| RT-PCR                            | AB Applied Biosystems Step One Plus marka |
| Santrifüj                         | Hettich                                   |
| Soğutmalı Santrifüj               | Hettich universal 320/320R model          |
| Spektrofotometre                  | Thermo c Genesys model                    |
| UV Görüntüleme Cihazı             | Biorad                                    |
| UV-Vis Spektrofotometre/Nano Drop | Thermo Scientific                         |
| Vorteks                           | Yellow Line Tts3 Dijital model            |
| Yatay Elektroforez                | Biorad                                    |

Çizelge 3.3 Kullanılan kimyasallar

| Kimyasal adı                                                       | Marka ve menşei                       |
|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Agaroz                                                             | Lonza, İsviçre                        |
| 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) | Invitrogen, Almanya                   |
| Distile Su                                                         | Biological Industries, ABD            |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)                            | Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD |
| EntiLink™1sStrand cDNA Synthesis Kit                               | Wuhan, Çin                            |
| EnTurbo™ SYBRGreen PCR SuperMix                                    | Wuhan, Çin                            |
| Etanol (%99,%96)                                                   | Thermo Fisher Scientific, ABD         |
| Ethidium Bromid                                                    | Amresco, ABD                          |
| Fetal Bovine Serum (FBS)                                           | Biological Industries, ABD            |
| Hibriden® RNA izolasyon kit                                        | Hibriden, Türkiye                     |
| Hsa-miRNA-3670 ve Hsa-miRNA-8078                                   | Horizon Discovery Company, ABD        |
| INTERFERin, Transfection Reagent                                   | Polyplus, Fransa                      |
| İzopropanol                                                        | Sigma Aldrich, ABD                    |
| Lizis Tampon                                                       | Biological Industries, ABD            |
| PCR primerleri                                                     | IDT, ABD                              |
| Penicillin-Streptomycin Solution                                   | Biological Industries, ABD            |
| Phosphate Buffered Saline (PBS)                                    | Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD |
| RNAse free su                                                      | Biological Industries, ABD            |
| RPMI 1640 Medium                                                   | Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD |
| Tripan Blue                                                        | Thermo Fisher Scientific, ABD         |
| Trypsin/EDTA (%0.25), Fenol Red                                    | Gibco®, Thermo Fisher Scientific, ABD |

## **3.2 Solüsyonlar ve Hazırlanışı**

### **3.2.1 Kristal Viole Solüsyonu**

Boyamada kullanılacak %0.5'lik stok kristal viole solüsyonu hazırlamak için hassas terazide 0.5 gr kristal viole boyası hassas terazide dikkatlice tartıldı. Daha sonra bu boya 75 mL distile suda çözüldü. Son olarak da su içerisinde çözünmüş kristal viyole boyasının üzerine 20mL metanolden (%95) eklenerek tamamlandı. Bu solüsyon oda sıcaklığında ve karanlıkta muhafaza edildi.

### **3.2.2 Tripan Mavisi Solüsyonu**

Tripan mavisi çözeltisi (%0.4 (a/h)) için 0.4 g toz tripan mavisi tartıldı ve PBS içinde çözüldü; hacim 100 mL'ye tamamlandı.

### **3.2.3 Tripsin Solüsyonu**

Tripsin solüsyonu (%0.25 (a/h)) hazırlamak için 2.5 g Tripsin 1 litre steril PBS (pH 7.4) içerisinde içinde çözüldü ve 0.22-µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. Bu çözelti -20°C'de saklanmıştır.

### **3.2.4 Akridin Turuncusu / Etidyum Bromür (AO/EB) Solüsyonu**

Etidyum bromür (10 mg) 100 mL 1x PBS içinde çözülerek bir stok solüsyonu (100 µg/mL) hazırlandı. Akridin turuncusu stok solüsyonu (100 µg/mL), 10 mg akridin turuncusu 100 mL 1x PBS içinde çözünmesiyle hazırlanmıştır. Daha sonra bu stok solüsyonlar 1:1 oranında karıştırıldı ve kullanıldı.

### **3.2.5 MTT Solüsyonu**

Hücre canlılığını belirlemek için 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (Sigma, Germany) kullanıldı. Çözeltiyi hazırlamak için 0.05 mg MTT tartıldı ve 10 mL PBS içinde çözüldü. MTT çözeltisinin

her seferinde taze hazırlanmasına özen gösterildi ve alüminyum folyoya sarılarak karanlıkta saklandı.

### **3.2.6 Stok Alma Solüsyonu**

Hücreleri saklamak için kullanılan dondurma solüsyonu FBS ve DMSO'dan 9:1 oranında hazırlanır ve hemen kullanılır.

### **3.2.7 T Hücre Stok Alma Solüsyonu**

Dondurma solüsyonu FBS ve DMSO ile 9:1 oranında olacak şekilde hazırlandı ve hemen kullanıldı. Bu çözelti 45 mL FBS ve 5 mL DMSO karıştırılarak hazırlanmıştır.

### **3.2.8 1X miRNA Tamponu**

5x miRNA tamponundan 500 mL'lik 1x miRNA tamponuna seyreltmek için 400 mL steril RNaz içermeyen su ve 100 mL 5x miRNA tamponu karıştırılmıştır. Böylece bileşiminde KCl (60 mM), HEPES (6 mM), pH 7.5 ve MgCl<sub>2</sub> (0.2 mM) içeren 500mL 1x miRNA tamponu elde edilir.

### **3.2.9 1X PBS Tampon Hazırlanışı Solüsyonu**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2.38 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.190 g) ve NaCl (8 g) tartılarak 800 mL bidistile suda çözülerek 1000 mL'ye tamamlandı. Solüsyonun pH'sı ölçüldü, asidik ise Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; bazik ise KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> eklenerek pH 7.4'e ayarlandı.

## **3.3 Hücre Hatları ve Kullanılan Besiyerleri**

İnsan meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve normal epitel hücre hattı HME1'in proliferasyonu için L-glutamin (%1), esansiyel olmayan amino asitler, sodyum pirüvat, fetal bovin serumu (%10 FBS), penisilin-streptomisin-amfoterisin (%1) içeren yüksek glikozlu Dulbecco Modifiye Eagle Medium (DMEM, Sigma, ABD) kullanıldı. PBM

Rupaimoole C ve CD8<sup>+</sup> T hücre hatlarının çoğalması için, stabil %1 L-glutamin ve %10 FBS içeren 500 mL RPMI-1640, ısıyla inaktive edilmiş 50 mL FBS ve 5 mL (son konsantrasyon, ~%1) penisilin-streptomisin içeren taze hazırlanmış RPMI-1640 4°C'de saklandı. FBS oranları gerektiğinde değiştirilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Hücre hatları, katalog numaraları ve besiyeri içerikleri

| Hücre hattı                  | Katalog Numaraları | Besiyeri İçerikleri                                     |
|------------------------------|--------------------|---------------------------------------------------------|
| MCF-7                        | CRL-3435           | DMEM + %10 FBS + %1 Penisilin/Streptomisin/ Amfoterisin |
| HME1                         | HME1               | DMEM + %10 FBS + %1 Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin  |
| PBMC ve CD8 <sup>+</sup> (T) | 21875-034-Gibco    | RPMI + %10 FBS + %1 Penisilin/Streptomisin/ Amfoterisin |

### 3.4 Biyoinformatik Analizler

Çalışmamızda türlerin miRNA sekanslarını, isimlendirme ve referansları sağlayan web tabanlı bir biyoinformatik programı olan miRBase kullanılmıştır. miR-3670 ve miR-8078 mimik miRNA'ların erişim numaraları, olgun sekansları ve referansları miRBase programı kullanılarak doğrulanmıştır (Şekil.3.1, Erişim tarihi: 03.04.2023, <https://www.mirbase.org/index.shtml> ).



Şekil 3.1 miRBase veri tabanı web ekran görünümü

Ardından, miR-3670 ve miR-8078 mimik miRNA'larının hem doğrulanmış hem de varsayılan hedef genlerini ve bu hedef genlerle ilişkili olduğu biyokimyasal yollarını belirlemek için aşamalı bir biyoinformatik seçim gerçekleştirildi (Şekil 3.2). Bu amaçla, ilgili miRNA'ların hedef genleri ilk olarak Targetscan ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) ve miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>), miRPathDB v2.0 (<https://mpd.bioinf.uni-sb.de/>) programları kullanılarak tanımlanmıştır. Biyoinformatik programlarından elde edilen bu hedef grup kümeleri Venny web programı kullanılarak karşılaştırılmış ve ortak genler belirlenmiştir. Bu işlemten sonra, PD-L1 (CD274) mRNA'sının hangi bölgesinin miR-3670 ve miR-8078 mimik miRNA'ları tarafından hedeflendiğini analiz etmek için Targetscan veri tabanı ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) kullanılmıştır. Hedef genlerle ilişkili biyokimyasal yollar miRTargetLink 2.0, miRPathDB v2.0 veri tabanları kullanılarak tanımlanmıştır. Meme kanserinde hsa-miRNA-3670 ve hsa-miRNA-8078 sentetik mimiklerinin potansiyel moleküler mekanizmalarını keşfetmek için Gen ontolojisi (GO) zenginleştirme ve Kyoto Genler ve Genom ansiklopedisi (KEGG, <https://www.genome.jp/kegg/>) analizi yapılmıştır.



Şekil 3.2 Biyoinformatik analiz için takip edilen akış şeması (\*kullanılan biyoinformatik programları temsil etmektedir)

### 3.5 Hücre Kültürüne Dayalı Yöntemler

Çalışmamızda kullanılan stok hücre hatları, bölümümüzde halihazırda bulunan ve geçmiş yıllarda ATCC'den ticari olarak temin edilen CRL-3435 katalog numaralı

insan meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve 50-238-4935 katalog numaralı insan meme normal hücre hattı HME1(CRL-4010) kullanıldı.

### 3.5.1 Hücrelerin Çözdürülmesi

Su banyosu 37 °C'ye ayarlandı ve kullanılacak besiyeri bu su banyosunda yaklaşık 15 dakika ısıtıldıktan sonra laminar akış kabinine aktarılmıştır. Azot tankından alınan MCF-7 hücreleri (pasaj no. 12) yaklaşık 1-2 dakika boyunca çözülmüştür. Kriyotüpte çözülen MCF-7 hücreleri 15 mL'lik bir falkon tüpünde 5 mL DMEM besiyerine dikkatlice eklenmiştir. Çözülmüş hücrelerin bulunduğu falkon tüp 4°C'de 5 dakika boyunca 2000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden elde edilen süpernatant atılmış, falkon tüpünün dibindeki pelet 5 mL taze DMEM besiyeri ile yavaşça çözülmüş ve flasklara aktarıldı. Hücreler invert mikroskop altında incelendi ve %5 CO<sub>2</sub> içeren bir inkübatörde 37°C'de inkübe edildi Aynı deneysel işlemler DMEM besiyeri ile HME1 hücresi için de gerçekleştirildi.

### 3.5.2 Hücre Pasajlanması

Flasklardaki MCF-7 hücreleri, hücre sayısı ve yayılma hızı açısından invert mikroskop altında düzenli olarak incelenmiştir. MCF-7 hücrelerinin besiyeri 2. günde taze besiyeri ile değiştirilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda (4 gün) hücreler mikroskop altında incelendi ve flaskların %80-90 oranında dolu olduğu görüldü. Flask tabanına yapışan hücreler 4 mL fosfat tampon çözeltisi PBS (Gibco™, ABD) ile zarar görmeden yıkanmıştır. Ardından 1 mL tripsin (Gibco™, ABD) eklendi ve CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de yaklaşık 2 dakika inkübe edildi. Tripsin eklenmiş hücrelerin durumu mikroskop altında incelendi. Flaskın yüzeyinden tamamen ayrılmış olan hücreler bir pipetle dikkatlice çıkarıldı ve 4 mL DMEM besiyeri içeren bir falkon tüpüne yerleştirildi. Falkon 4°C'de 5 dakika süreyle 2000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonucu oluşan süpernatant atıldı ve falkon tüpünün dibindeki pelet 5 mL taze DMEM besiyeri ile dikkatli bir şekilde pipetlenerek çözüldü ve iki ayrı flaska ekildi. Hücreler mikroskop altında incelendi ve çoğalmaları için 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi. Aynı deneysel işlemler DMEM besiyeri ile HME1 hücresi için de gerçekleştirildi.

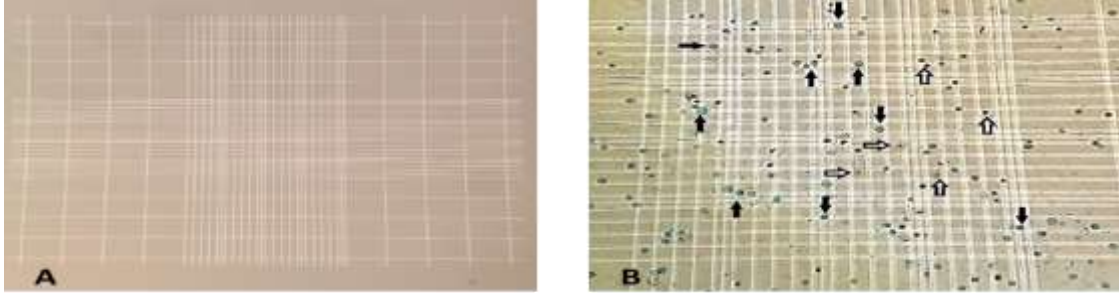
### 3.5.3 Hücre Dondurulması

Hücrelerin uzun süreli muhafazası için kullanılan dondurma besiyeri, dondurulacak her hücre hattı için 15 mL'lik bir falkon tüpüne %90 FBS ve %10 DMSO eklenerek hazırlanmıştır. Pasajlanmış hücrelerin 4 günlük inkübasyonundan sonra, flaskda %80-90 konfluensi olan MCF-7 hücreleri (pasaj no. 12) kullanıldı. Flaskdaki besiyeri bir pipet yardımıyla dikkatlice uzaklaştırıldı. Ardından flaska 5 mL 1X PBS eklenerek yıkandı, PBS pipetle uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 400 µl tripsin eklendi. Flasklar 37°C'de inkübe edilerek 2-3 dakika bekletildi. Hücreler inkübatörden çıkarıldı ve tripsin ile homojenize edildi. Bir falkon tüpüne (15 mL) 5 mL besiyeri eklendi ve flask tabanından tripsin ile ayrılan hücreler bu falkon tüpüne yerleştirildi. Tüpteki hücreler 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Falkon tüpün dibinde, önceden hazırlanmış %10 DMSO-FBS dondurucu çözeltiden 4 mL pipetle hücrelerin üzerine eklendi ve iyice pipetlendi. Her birine bu çözeltiden 1 mL eklenen dört kriyo tüp hazırlandı. Kriyo tüpler Mr. Frosty yerleştirildi. Mr Frosty kabı bir saat boyunca -20 °C'de ve ardından 24 saat boyunca -80 °C'de tutuldu. Daha sonra uzun süreli saklama için bir sıvı nitrojen tankına yerleştirildi. Aynı deneysel işlemler DMEM besiyeri ile HME1 hücresi için de gerçekleştirildi.

### 3.5.4 Hücre Sayımı

Pasajlanan hücreler PBS ile yıkanıp tripsin ile uzaklaştırıldıktan sonra 15 mL'lik falkon tüpüne konularak 2.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen hücre peletine 1 mL besiyeri eklenerek hücre süspansiyonu hazırlandı. Hücre süspansiyonunun 50 µl'si bir endorf tüpüne konuldu ve 50 µl tripan mavisi eklendi. Bu karışım pipetlenerek homojenize edildi ve bir thoma lamı üzerine yerleştirildi. Mikroskop altında 10x objektif büyütmede, thoma lamı üzerindeki 16 büyük karenin her birindeki 25 küçük karenin iç kısımları ve kare çizgilerine teğet veya kesişen hücreler sayıldı (Şekil 3.3). Sayım en az 3 kez tekrarlandı. Elde edilen sayıların ortalaması alınarak 1 mL besiyerindeki hücre sayısı hesaplandı.

$$\text{Toplam hücre sayısı} = (16 \text{ büyük karedeki hücre sayısı}) \times (10.000) \times (\text{dilüsyon faktörü})$$



Şekil 3.3 Thoma lamı ile hücre sayımı (A: klasik thoma lamı mikroskop görüntüsü (4X) B: thoma lamında tripan mavisi ile boyanmış hücre görüntüsü (4X) siyah Ok işaret ile gösterilen mavi renkli hücreler tripan mavisi ile boyanmış ölü hücreler iken, beyaz Ok işaret ile gösterilen şeffaf renksiz hücreler canlı hücreleri temsil etmektedir. Prof. Dr. Yasin Tülüce'nin arşivinden izni alınarak kullanılmıştır).

### 3.6 miR-3670 ve miR-8078'nin Transfeksiyon ve Validasyonu

#### 3.6.1 miRNA'nın Hazırlanması

Bu tez çalışmasında *agagcucacagcuguccuucucua* dizilişine sahip 24-mer'lik miR-3670 miRNA ve *ggucuaggcccgugagagacuc* dizilişine sahip 23-mer'lik miR-8078 kullanılmıştır. miRNA'ların hazırlanması şu şekilde gerçekleştirildi;

1. miRNA içeren tüpler, liyofilize miRNA peletinin tüpün dibinde toplandığından emin olmak için kısa bir süre santrifüjlenmiştir.
2. RNaz içermeyen 1x miRNA tamponunda istenen nihai konsantrasyona kadar yeniden süspanse edilir.
3. Bu çözelti oda sıcaklığında 30 dakika boyunca bir orbital karıştırıcı/çalkalayıcı üzerine yerleştirilmiş ve çözünmeye bırakılmıştır.
4. miRNA içeren tüpler daha sonra tüpün dibindeki çözeltiyi toplamak için kısa bir süre santrifüjlendi.
5. miRNA konsantrasyonunun doğrulanması 260 nm dalga boyunda UV spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (mikroRNA mimik için 1  $\mu$ M = 14.1 ng/L olması gerekir). RNA hemen kullanılabilir veya dondurma-çözme döngülerinin sayısını en aza indirmek için 50 $\mu$ l'lik alikotlara bölünebilir. Yeniden süspanse edilen miRNA, manuel defrost veya döngü yapmayan bir dondurucuda -20°C'de saklanabilir. Hemen analiz yapılması planlanıyorsa 4°C'de saklama 6 haftaya kadar uygundur.

### 3.6.2 miRNA'ların Spektrofotometrik Kontrolü

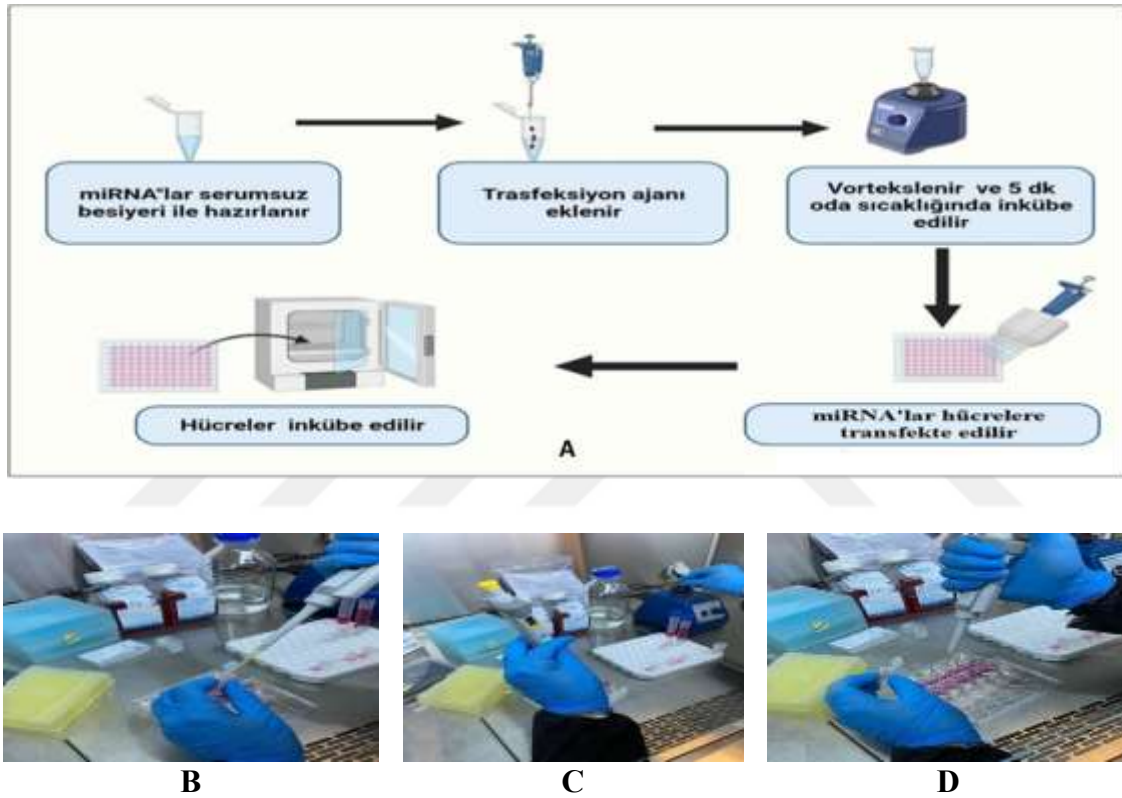
miRNA miR-3670 ve miR-8078'in konsantrasyon ve saflık nanodrop spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçümler kullanılarak belirlendi. Nükleik asitlerin, 260 nm dalga boyundaki absorbans değerleri, nükleik asitlerin miktarını gösterir. Saflık derecesinin belirlenmesinde ise OD260/OD280 oranı kullanılmıştır. Çift zincirli miRNA molekülünün konsantrasyon oranı da belirlenmiştir. miRNA standart eğrisi RNase içermeyen PBS tamponu kullanılarak oluşturulmuştur. Farklı konsantrasyonlarda çeşitli örnekler hazırlanmış ve bunların absorbans değerleri 260 nm dalga boyunda ölçülmüştür. İlgili veriler konsantrasyon eğrisini oluşturmak için kullanılmıştır.

### 3.6.3 miRNA Mimiklerinin Transfeksiyonu

MCF-7 ve HME1 hücrelerinin transfeksiyonu, transfeksiyon çözeltisi INTERFERin Transfection Reagent (Fransa) ve stok miR-3670 ve miR-8078 miRNA mimik (Horizon Discovery, UK) kullanılarak, üretici tarafından sağlanan yönergeler izlenerek gerçekleştirildi. Transfeksiyondan bir gün önce hücreler flasklara ekilmiş ve antibiyotik içermeyen bir besiyerinde 24 saat boyunca kültüre edildi. Transfeksiyon yapılacak gün hücreler %30-50 yoğunluğa ulaştığında, besiyeri uzaklaştırılmış ve yıkamak için soğuk PBS kullanılmıştır. Hücreler daha sonra tripsin-EDTA çözeltisi kullanılarak ayrılmış ve sayım için santrifüjlenmiştir. Daha sonra 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta  $0.5 \times 10^5$  hücre olacak şekilde üç kopya halinde ekim yapıldı. Hücrelere farklı konsantrasyonlarda (1nM, 5nM, 10nM, 25nM, 50nM, 100nM) miR-3670 ve miR-8078 miRNA mimikleri ile transfeke edilerek 48 saat boyunca 37°C'de CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi.

Transfeksiyon için miRNA mimiklerinin stoklarından belirlenen konsantrasyonlar hesaplandı ve ayrı falkon tüplerine yerleştirildi. Bu tüplerin her birine uygun miktarda serum içermeyen besiyeri eklendi. Ayrı bir falkon tüpü, her bir kuyu için belirlenen miktarda serumsuz besiyeri ile dolduruldu. Transfeksiyon solüsyonu (INTERFERin, Fransa) eklendi ve yavaşça pipetlendi. Daha sonra transfeksiyon kompleksinin oluşması için 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyondan

sonra farklı konsantrasyonlarda hazırlanan miRNA mimiği içeren falkon tüplerine ayrı ayrı seyreltilmiş INTERFERin eklenerek miRNA ve taşıyıcı ajan birleştirildi. Elde edilen karışım hafifçe karıştırıldı ve kompleksi oluşturmak için oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. miRNA-INTERFERin kompleks karışımı daha sonra 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna eklenerek ileri geri çalkalandı. Ortam 4-6 saat sonra tamamlanmış DMEM ile değiştirildi ve hücreler daha sonra 48 saat boyunca 37 °C'de CO<sub>2</sub>'li bir etüvde inkübe edildi (Şekil 3.4).

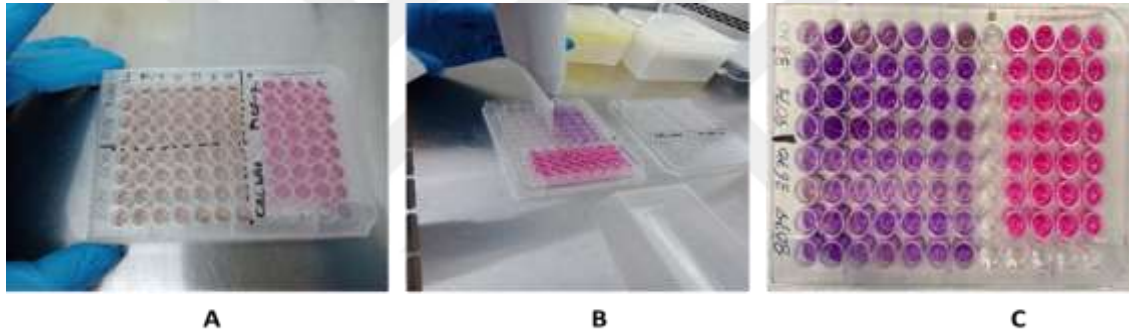


Şekil 3.4 miRNA mimiklerinin transfeksiyon süreç şeması (A: miRNA'ların transfeksiyon işlem akış şeması, B: Transfeksiyon ajanının eklenmesi, C: Karışımın vorteksle karıştırılması, D: miRNA'ların hücrelere transfeksiyon işlemi)

### 3.6.4 miRNA'ların Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması

Bu çalışmanın amacı, miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 ve CRL-4010 hücre hatlarının sitotoksitesisi ve hücre canlılığı üzerindeki etkisini incelemektir. MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi (Sigma, Almanya), canlı hücrelerdeki metabolik aktivitenin MTT'nin mitokondriyal dehidrojenaz enzimi

tarafından parçalanmasına bağlı olduğu ve bunun da çözünür formazan tuzlarının oluşumuyla sonuçlandığı varsayımına dayanmaktadır. Stoktan alınan hücreler flasklara kültürlenmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaştıklarında, tripsin kullanılarak ayrıldılar ve daha sonra steril 96 kuyulu petri kaplarına kuyu başına  $1 \times 10^5$  hücre yoğunluğunda tohumlandılar. 24 saat sonra, besiyerleri çıkarılmış ve değişen konsantrasyonlarda miR-3670 ve miR-8078 miRNA mimikleri (1nM, 5nM, 10nM, 25nM, 50nM, 100nM) eklenmiş ve 48 saat boyunca %5 CO<sub>2</sub> atmosferi ile 37 °C'deki bir etüvde inkübe edildi. Bu aşamadan sonra kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılmış ve önceden hazırlanmış besiyerinden 100 µl içeren her kuyucuğa 0.05 µl MTT çözeltisi eklendi. Plaka 4 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra besiyeri atıldı ve formazan kristalleri 100 µl DMSO ile çözüldü. Absorbans değerleri bir spektrofotometrede 570-690 nm dalga boyunda ölçüldü ve kaydedildi (Şekil 3.5, Tülüce vd., 2019; Koyuncu vd., 2019).



Şekil 3.5 miRNA 3670 ve 8078'in MCF-7 ve HME1 üzerindeki sitotoksik etkisi (A: miR-3670 ve miR-8078 uygulanmış hücrelerin inkübasyon sonrası görüntüsü, B: hücrelere MTT solüsyonunun eklenmesi, C: inkübasyon sonrası hücrelerde oluşan formazan kristalleri)

### 3.6.5 IC<sub>50</sub> Değeri

Hücreler üzerinde miR-3670 ve miR-8078 için doz-cevap eğrisi, GraphPad Prism yazılımı (GraphPad Prism 8 yazılımı, San Diego, ABD) kullanılarak konsantrasyonlara karşı inhibisyon yüzdesi çizilerek elde edildi. MCF-7 ve HME1 hücre hatlarında miR-3670 ve miR-8078'in IC<sub>50</sub> değerlerini belirlemek için doğrusal olmayan regresyon yapıldı. Analiz için aşağıdaki formül kullanıldı: Yüzde canlılık = (100) X (Her bir numuneyi içeren kuyucukların ortalama OD değeri) - (Negatif kontrol kuyucuklarının ortalama OD değeri) (Tülüce vd., 2019).

### 3.7 Gerçek Zamanlı PCR'a Dayalı Yöntemler

miR-3670 ve miR-8078 transfeksiyonunu takiben MCF-7 ve HME1 hücrelerinde PD-L1 geninin ekspresyonundaki değişiklikleri gözlemek için RT-qPCR yoluyla gen ekspresyon analizi yapıldı. Hücreler sayılmış ve 96 kuyulu petri kaplarında kuyu başına  $0,5 \times 10^5$  hücre olacak şekilde bölüm 3.5.3'e göre ekilmiştir. Hücreler daha sonra üç kopya halinde 24 saat boyunca  $37^{\circ}\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  atmosferi altında bir etüvde inkübe edildi. Hücreler inkübe edildikten sonra miRNA'lar çeşitli konsantrasyonlarda (1nM, 5nM, 10nM, 25nM, 50nM, 100nM) deney grubuna transfekte edilirken, kontrol grubu kuyucuklarına miRNA uygulanmadı. Her iki hücre seti de daha sonra 48 saat boyunca %5  $\text{CO}_2$  atmosferinde  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi. Ardından, PD-L1 ve kontrol GAPDH gen ekspresyon analizini değerlendirmek için total RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-qPCR testi gerçekleştirildi.

#### 3.7.1 Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu için kontrol grubu ve farklı dozlarda miR-3670, miR-8078 uygulanan deney grubu hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA ekstraksiyonu için RNA izolasyon kitinin (HibriGen kat.no: MG-RNA-01-10, Türkiye) genel protokolü takip edilmiştir. Kitin protokolü aşağıdaki gibidir:

- ❖ miRNA uygulanmış hücrelerin üzerine 1 mL HT tamponu eklenir. Hücreler 15 saniye boyunca pipetlenerek veya vortekslenerek hücrelerin parçalanması sağlanır.
- ❖ Ardından nükleoprotein kompleksinin tamamen parçalanması için buz üzerinde 5 dakika boyunca inkübasyon yapılır. (Opsiyonel olarak daha yüksek saflıkta RNA elde edebilmek için 1. adımdan sonra hücre karışımını  $4^{\circ}\text{C}$ 'de, 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Elde edilen süpernatantlar, protein, yağ, polisakkaritler, kas ve bitki fibrillerini uzaklaştırmak için yeni bir RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarılmalıdır.
- ❖ 200  $\mu\text{L}$  kloroform eklenir, homojenize olana kadar 15 saniye vorteksle karıştırılır ve 10 dakika buz üzerinde inkübe edilir. Numune  $4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika boyunca 12000 rpm'de santrifüjlenir. Not: Santrifüj işleminden sonra karışım 2 parçaya ayrılır. Fenol-kloroform fazı altta ve RNA içeren renksiz faz üsttedir. Üstteki

renksiz faz, alttaki diğer fazlarla karıştırılmadan bir pipet kullanılarak dikkatlice RNaz içermeyen yeni bir tüpe aktarılır.

- ❖ Önceden soğutulmuş EtOH (%100), hacme göre renksiz faza 1/2 oranında (örneğin 250 µl EtOH'a 500 µl renksiz faz) eklenir. Etanol ilavesinden sonra görünür çökeltiler oluşabilir, bu nedenle karışım bir vorteks ile iyice karıştırılır. Karışım daha sonra filtrelili bir tüpe aktarılmalı ve 4°C'de ve 12000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilir. Filtrenin altındaki tüpte toplanan sıvı atılır.
- ❖ Filtreye 500 µl RY1 eklenir ve 4°C'de, 12000 prm'de 30 saniye santrifüjlenerek yine altta kalan sıvı atılır.
- ❖ Daha sonra filtreye 500 µl RY2 eklenir, oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilir ve ardından 4 °C'de 12000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilir. Altta kalan sıvı atılır ve adım tekrarlanır. Filtrelili tüp 12000 prm'de 30 saniye santrifüj edilir.
- ❖ Kolon 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilir. Membrana 30-100 µl DEPC ile muamele edilmiş su eklenir. Oda sıcaklığında 2 dakikalık bir inkübasyon süresinden sonra, RNA'yı bu suda toplamak için tüp 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir. Tüpte kalan su saf RNA içerir ve uzun süreli saklama için -70°C'de saklanabilir.

### 3.7.2 RNA'ların Miktar ve Safılık Tayini

İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları Nanodrop ND-2000c (Thermo) kullanılarak belirlendi. Absorbanslar 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçüldü. A260/A280 oranı RNA'nın saflığını belirlemek için kullanıldı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 İzole edilen RNA'ların miktarın ve saflığının Nanodrop ile tayini

### 3.7.3 cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA'lerden cDNA sentez kiti (EntiLink™, EQ003-02) kullanılarak cDNA sentezlendi. İzole edilen RNA miktarları spektrofotometrede üç tekrarlı olacak şekilde ölçülerek ortalamaları alındı. Kit protokolü işleyişi;

1) Total RNA solüsyonunun içerisindeki DNA'nın parçalanması ve sadece RNA'ların kalması için çizelge 3.5'te belirtilen reaktifler total RNA'ya uygun miktarda eklendi. Çözelti daha sonra 42°C'de 2 dakika veya oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve ardından +4°C'ye kaldırıldı.

Çizelge 3.5 Total RNA çözeltisi içindeki DNA'nın ayrılması

| Reaktifler              | Kullanılan miktar |
|-------------------------|-------------------|
| 5x gDNA Eraser          | 2.0 µL            |
| gDNA Eraser             | 1.0 µL            |
| Template RNA(Total RNA) | 0.5-5 µg          |
| RNase Free Water        | To 10.0µL         |

2) İlk adımdan sonra, ters transkripsiyon için reaksiyon çözeltisi Çizelge 3.6'ya göre hazırlandı. Çözelti 70 °C'de 5 dakika ısıtıldı ve ardından buz üzerinde hızla soğutuldu. Soğutmanın ardından kısa bir santrifüj işlemi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.6 Ters transkripsiyon için reaksiyon çözeltisinin hazırlanışı

| Reaktifler                     | Kullanılan miktar |
|--------------------------------|-------------------|
| 1.Adımdaki reaksiyon solüsyonu | 10.0 µL           |
| RT Primer Mix*                 | 2.0 µL            |
| dNTP'ler (10mM her biri)       | 1.0 µL            |
| RNase free ddH <sub>2</sub> O  | to 15.0 µL        |

\*RT Primer Karışımı, bir oligo dT ve pd(N)9 karışımıdır.

İkinci adımda kısa bir santrifüj ve soğutmanın ardından, karışıma Çizelge 3.7'de listelenen reaktifler eklenmiştir.

Çizelge 3.7 Tamamlayıcı mix hazırlanışı

| Reaktifler                         | Kullanılan miktar |
|------------------------------------|-------------------|
| 1.Adımdaki reaksiyon solüsyonu     |                   |
| 5x RT tampon                       | 4.0 µL            |
| EntiLink™ ters transkriptaz enzimi | 1.0 µL            |
| RNaz inhibitörü                    | 1.0 µL            |

3) Bu karışım daha sonra dikkatlice karıştırıldı ve 37 °C'de 60 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından 95°C'de 5 dakika ısıtılıp soğutularak elde edilen cDNA'ların konsantrasyonları Nanodrop cihazında ölçüldü ve saflığı belirlendi (Şekil 3.7). Daha sonra kullanıma kadar kısa bir süre için -20°C'de saklanır. Uzun süreli depolama için -80°C tercih edilmelidir.



Şekil 3.7 cDNA'ların miktar ve saflığının Nanodrop ile tayini

### 3.7.4 PD-L1 İfadesinin Gerçek Zamanlı PCR ile Analizi

RT-PCR analizi, sentezlenen cDNA örneklerinden hsa-miRNA-3670 ve hsa-miRNA-8078 uygulanan hücrelerde PD-L1 ifadesinin inhibe edildiğini göstermek amacıyla yapıldı (Şekil 3.8). Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) Çizelge 3.8'de kontrol geni olarak listelendi. İki gen için bir kontrol grubu ve bir uygulama grubu toplam hacmi 10 µl olan iki ayrı karışım hazırlandı. RT-PCR için SYBR Green PCR Master Mix Kit (EntiLink, Çin) kullanıldı. **Her bir örnek için**, PD-L1 genine özel olarak tasarlanmış primerlerin (ileri ve geri) her biri için 0.2 µl, 5 µl SYBR- Green Master Mix, 1 µl ROX boyası, 2.6 µl distile su ve 1 µl cDNA kullanıldı. RT-PCR çalışma sıcaklıkları kitte verilen protokole göre ayarlandı (Çizelge 3.9) ve her numune iki replike halinde çalıştırıldı.

Çizelge 3.8 PD-L1 ifadesinin analizi için kullanılan primerler

| RT-PCR İçin Kullanılan Primerler |                                                                                          |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Human PD-L1 Primer               | (F): 5'- TGC CGA CTA CAA GCG AAT TAC TG -3'<br>(R): 5'- CTG CTT GTC CAG ATG ACT TCGG -3' |
| GAPDH Primer                     | (F): 5'GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG 3'<br>(R): 5'ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'                     |

Çizelge 3.9 RT-PCR amplifikasyon prosedürü

| Aşama                                       | Döngü sayısı | Sıcaklık | Zaman |
|---------------------------------------------|--------------|----------|-------|
| Ön denatürasyon                             |              | 95°C     | 30sn  |
| Denatürasyon                                | 1x           | 95°C     | 5sn   |
| Bağlanma                                    |              | 50-60°C  | 30sn  |
| Uzama                                       |              | 72°C     | 30sn  |
| Erime eğrisi analizi (erime eğrisi aşaması) |              |          |       |



Şekil 3.8 PD-L1 ifadesinin gerçek zamanlı PCR ile analizi

### 3.7.5 RT-PCR Datalarının Analizi

Gerçek zamanlı PCR çalışmasında, her bir numune iki kopya olarak çalışıldı ve elde edilen Ct (geçiş eşiği) değerlerinin ortalaması alındı. Göreceli miktar belirleme  $\Delta\Delta Ct$  yöntemi (önce housekeeping gen ve ardından bir kalibratöre normalizasyon) kullanılarak gerçekleştirildi ve ekspresyon seviyeleri belirlendi. Veriler SPSS 21 programı kullanılarak analiz edildi. Anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak belirlendi. PD-L1'in mRNA ifade düzeyi  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemi (hedef gen - referans gen) kullanılarak hesaplandı (Livak vd., 2001). Bu prosedürde, hedef gen PD-L1 ve housekeeping gen her örnekte iki kopya olarak çoğaltılır ve hedef genlerin ortalama Ct değerleri housekeeping genler çıkarılarak normalize edilir. Ayrıca kalibratör olarak kabul edilen

tüm örneklerin median Ct değerleri alındı ve tüm değerlerin normalize edilmiş Ct değerleri (delta Ct) kalibratörün delta Ct değerlerinden çıkarılarak PCR verimliliğini temsil eden 2<sup>-</sup>minus gücü alınarak ekspresyon seviyesi belirlendi ve böylece deney grupları arasındaki farklılıklar önleildi.

Yöntemin formülü;

$$\Delta CT = CT(\text{hedef}) - CT(\text{referans})$$

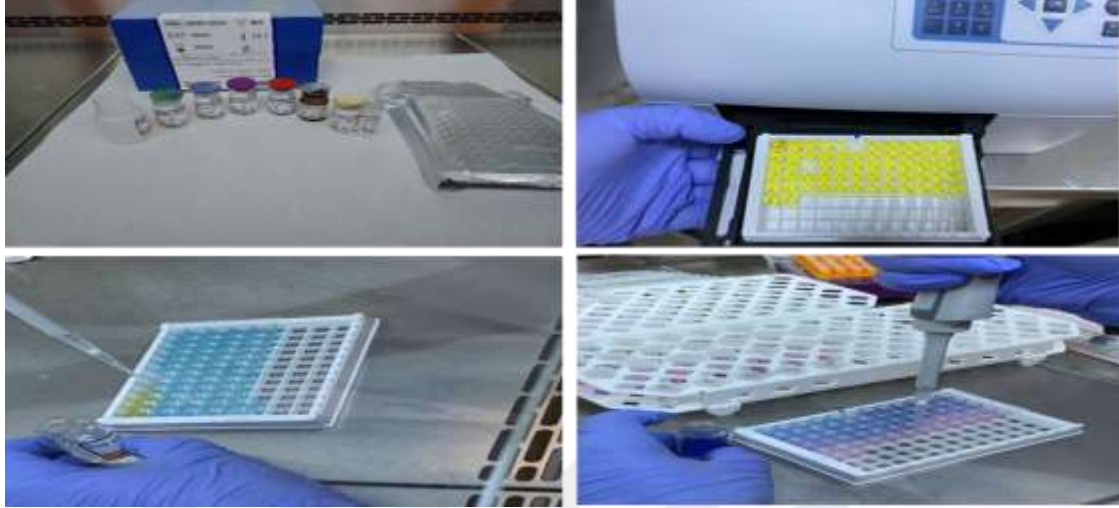
$$\Delta\Delta CT = [CT(\text{hedef}) - CT(\text{referans})] \text{ hücre hattı} - [CT(\text{hedef}) - CT(\text{referans})] \text{ kontrol}$$

2<sup>-</sup> $\Delta\Delta CT$  = Ürün miktarı oranı ( $\Delta CT$  değeri hedef ve referans genler için belirlenen döngü sayısı farkını ifade etmektedir).

### 3.7.6 Serbest PD-L1 Analizi

Bu testin amacı, miR-3670, miR-8078 uygulamasından sonra kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçmasını sağlayan süpernatanttaki serbest PD-L1'in antijen seviyeleri üzerindeki etkisini belirlemektir. MCF-7 ve HME1 hücre hatları farklı dozlarda miR-3670 ve miR-8078 (1nM, 5nM, 10nM, 25nM, 50nM, 100nM) ile transfekte edildi ve 37°C sıcaklıkta ve %5 CO<sub>2</sub>'de etüvde 48 saat boyunca inkübe edildi. Uygulamadan sonra, PD-L1 ELISA kiti hücre kültürü süpernatantlarından PD-L1 antijen konsantrasyonunu belirlemek için kullanıldı (Şekil 3.9). ELISA yöntemi üreticinin protokolüne göre gerçekleştirildi (SunRed, Çin). Hücre kültürü süpernatantında biriken çözünür PD-L1 proteininin ve rekombinant insan PD-L1 protein standardının dilüsyonları katı fazlı sandviç ELISA yöntemi kullanılarak analiz edildi. Kültür süpernatantı (insan PD-L1 proteini) insan PD-L1 proteinine özgü poliklonal antikorlarla kaplı kuyucuklarda inkübe edildi. Yıkamadan sonra PD-L1 proteinine özgü biyotinlenmiş monoklonal antikor eklendi. İnkübasyondan sonra streptavidin peroksidaz enzimi ilave edildi. Üçüncü inkübasyondan sonra ve tüm bağlanmamış enzim çıkarıldıktan ve yıkandıktan sonra, enzime bağlanan ve bir renk üreten substrat çözeltisi eklendi. Elde edilen ürünün renk yoğunluğu 450 nm absorbans değerinde spektrofotometrik olarak belirlendi. Kültür süpernatantındaki PD-L1 proteini miktarı, PD-L1 protein standartlarının absorbe edilmesiyle oluşturulan standart blank değerleri kullanılarak belirlendi. miRNA transfeksiyonu ile PD-L1 protein salgılanmasının inhibisyonu (%), örneklerdeki PD-L1 proteini kontrol ile karşılaştırılarak hesaplandı.

Tüm çalışmalar üç kez tekrarlandı ve standart sapmalar ( $\pm$ ) hesaplandı (Romero vd., 2020).



Şekil 3.9 Süpernatantta çözünen PD-L1 antijen miktarının PD-L1 elisa kiti ile tayini

### 3.8 Ko-Kültüre Dayalı Çalışmalar

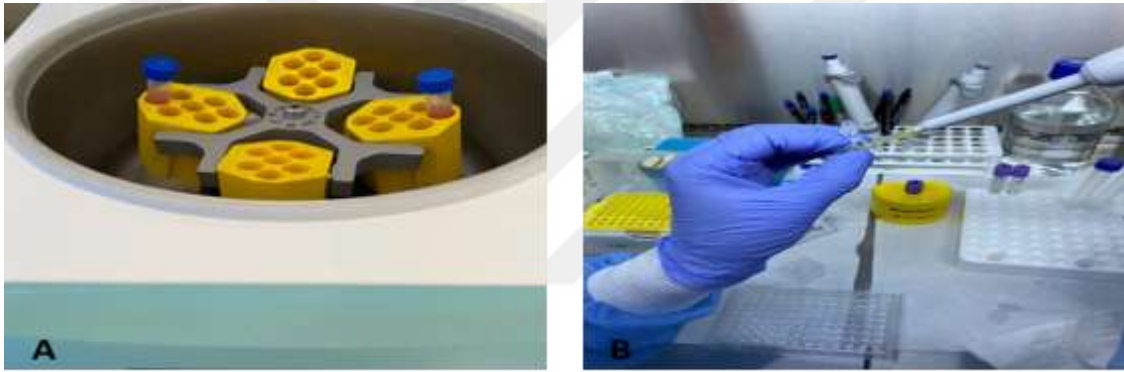
Mevcut çalışmada, ko- kültüre dayalı yöntemler 5 adımdan oluşmaktadır. İş akış diyagramı şekil 3.10'da gösterilmektedir.



Şekil 3.10 Ko-kültüre dayalı yöntemlerde iş akış şeması

### 3.8.1 PBMC Hücrelerinin Çözdürülmesi

Ticari olarak satın alınan ve bir sıvı nitrojen tankında kriyojenik şişelerde muhafaza edilen PBMC hücre hatları, önceden ısıtılmış damıtılmış su içeren bir behere aktarıldı. Tamamen çözülmeden önce hücreler önceden ısıtılmış %20 FBS ve tam RPMI-1640 besiyeri içeren 50 mL'lik bir tüpe aktarıldı. DMSO'ya maruz kalma süresini kısaltmak için hücreler oda sıcaklığında (RT) 1800 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant çıkarıldıktan sonra, hücreler %10 FBS, %1 PSA içeren tam RPMI-1640 içinde yeniden süspansiyon edildi ve petri kabına aktarıldı (Şekil 3.11). Petri kabı daha sonra 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> %95 nem oranına sahip bir inkübatörde kültürlendi (Ghanekar vd., 2007; Owen vd., 2007).



Şekil 3.11 Stok PBMC hücrelerinin çözülme işlemi (A: PBMC hücrelerinin santrifüj işlemi, B: Santrifüj işlemi sonrası peletin RPMI-1640 ile resüspansiyon edilmesi)

### 3.8.2 PBMC Hücrelerinin Stoklanması

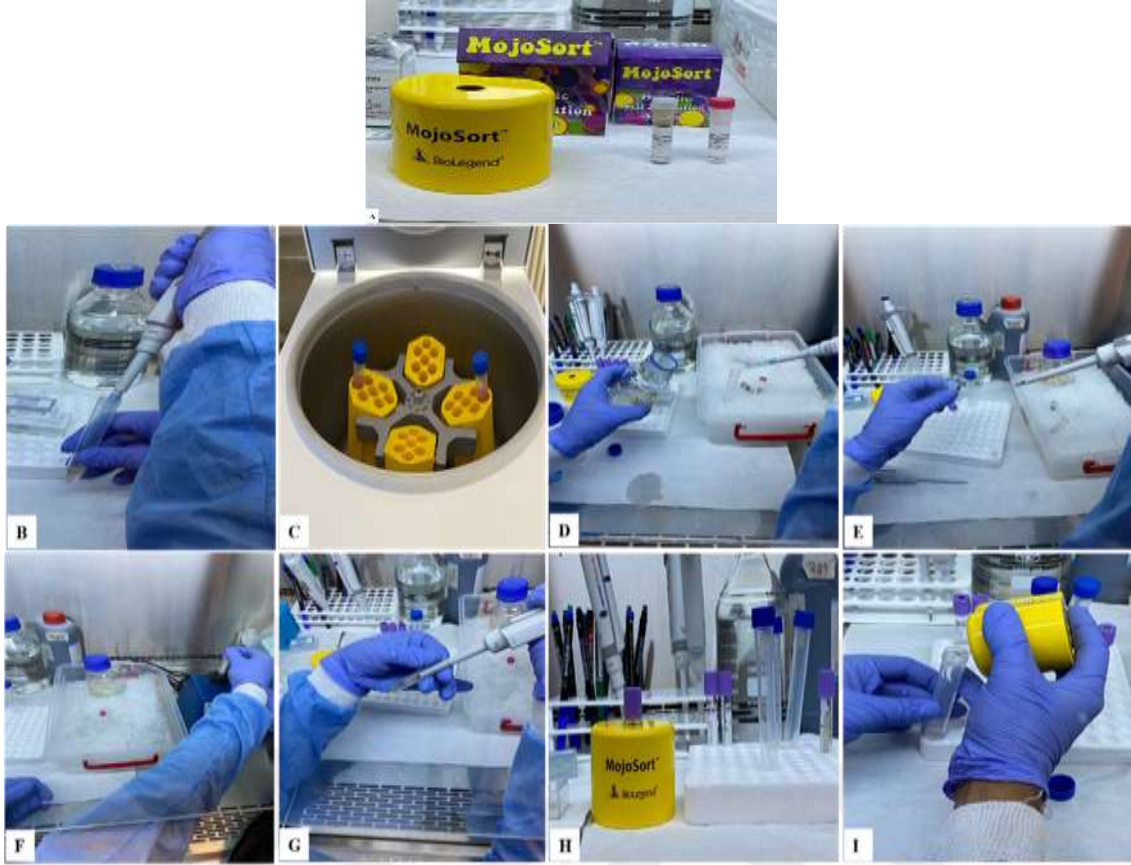
Hücrelerin uzun süreli korunması için, pasajlanmış PBMC hücreleri %80-90 konflüans elde edilene kadar 14 gün boyunca petri kaplarında inkübe edildi. PBMC hücrelerinin sıvı nitrojenin buhar fazında dondurularak korunması için hücreler 15 mL'lik bir tüpe aktarılmış (yapışık hücreler tripsin/EDTA ile flakstan ayrıldı) ve oda sıcaklığında 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve hücreler dondurma solüsyonu (%90 FBS - %10 DMSO) karışımı içinde yeniden süspansiyon edildi.

Daha sonra hemen kriyojenik kaplara aktarıldı. Kriyo flakonları, sıcaklığı -1°C/dk düşüren Mr Frosty dondurucuya (Thermo Fisher Scientific, ABD) aktarıldı.

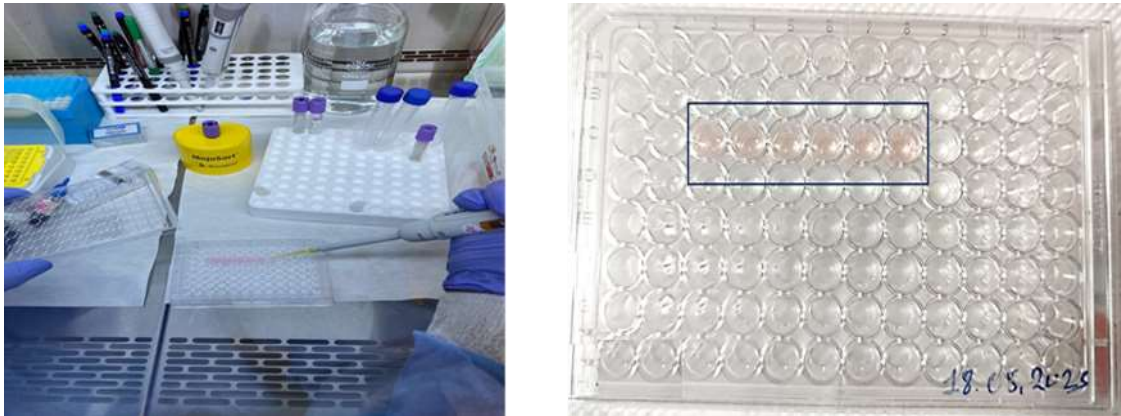
Flasklar -80 °C dondurucuda 4-24 saat kaldıktan sonra kriyojenik flakonlar çıkarıldı ve sıvı nitrojen tankında saklandı (Ghanekar vd., 2007; Owen vd., 2007).

### 3.8.3 T Hücrelerinin Manyetik Ayrımı

Manyetik aktive hücre sınıflandırması (MACS) CD8<sup>+</sup> T monositler, ticari olarak satın alınmış PBMC'lerinden üretici (MojoSort, USA) tarafından verilen protokole göre saflaştırıldı. Kısaca  $1 \times 10^7$  PBMC için hücreler 4 mL MojoSort tamponu (%0.5 BSA ve 2 mM EDTA içeren PBS) içinde yeniden süspanse edildi. Bu hücre süspansiyonu 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve hücre peleti  $1 \times 10^8$  hücre/mL olacak şekilde MojoSort tamponunda süspanse edildi. Bu hücre süspansiyondan 100 uL alınıp üzerine 10 uL Biotin-Antibody Kokteyli ilave edildi. Buz üzerinde 15 dakika inkübasyondan sonra; 10 µL Streptavidin Nanobeads hücrelere eklendi ve pipetleme yoluyla dikkatlice karıştırıp 15 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Inkübasyondan sonra karışıma 4 mL'ye kadar MojoSort tamponu eklendi ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant santrifüjden sonra atılırken, pelet üzerine 2,5 mL MojoSort tamponu eklendi. Ardından hücreler yeniden süspanse edilerek mıknatıslara yerleştirildi ve 5 dakika boyunca beklenildi. Bu sürenin sonunda CD8<sup>+</sup> T monositleri içeren sıvı başka bir temiz tüpe aktarıldı. Bu tüp oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 1800 rpm'de santrifüj edildi. Hücreler daha sonra tüm kültür büyüme ortamında (%10 FBS ve %1 RPMI-1640) yeniden süspanse edilerek petri kabına ekildi. Petri kapları 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem oranına sahip bir inkübatörde kültüre edildi (Şekil 3.12-3.13).



Şekil 3.12 Stok PBMC hücrelerinden T hücrelerinin manyetik ayırma işlemi (A: T hücre ayırma kitinin genel görüntüsü, B: PBMC'lerin MojoSort tamponu ile süspanse edilmesi, C: Santrifüj işlemi, D: Hücre pelletinin MojoSort tamponu ile süspanse edilmesi, E: süspansiyona Biotin-Antibody Kokteyli ilave işlemi, F: vorteks işlemi, G: Streptavidin Nanobeads eklenme işlemi, H: mıknatıs içerisine yerleştirme işlemi, I: CD8<sup>+</sup> hücrelerinin toplanması)



Şekil 3.13 İzole edilen CD8<sup>+</sup> hücrelerinin 96 kuyucuklu plakaya ekim işlemi

### 3.8.4 CD8<sup>+</sup> T Hücrelerinin Pasajlanması

Bölüm 3.8.3'te açıklandığı gibi, CD8<sup>+</sup> T hücreleri PBMC'den izole edilmiş ve %10 FBS, 50 IU/mL interleukin-2 (proleukin) ve %1 antibiyotik RPMI-1640 tam ortam içeren T25 veya T75 hücre kültürü flasklarında kültüre edildi. Flasklar 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem koşulları altında inkübe edildi. Alt kültürler ve hücre transferleri, tripsin-EDTA veya HyQTase kullanılmadan serolojik bir pipetle sıvı yıkama yoluyla mekanik olarak gerçekleştirildi.

### 3.8.5 Kanser Hücre Hatları ile CD8<sup>+</sup> T Hücrelerinin Ko-Kültürü

Mililitresinde  $4 \times 10^6$  hücre/mL içeren 0.5 mL tamamlanmış RPMI-1640 içerisindeki CD8<sup>+</sup>T hücresi ile mililitresinde  $4 \times 10^6$  hücre/mL içeren 0.5 mL tamamlanmış RPMI-1640 içerisindeki MCF-7 ve HME1 hücreleri (3.6. başlığı altında anlatıldığı üzere çalışma sonucu PD-L1 ekspresyonunu azalttığı belirlenen IC<sub>50</sub> dozunda hsa-miRNA-3670 ve hsa-miRNA-8078 transfekte edilmiş) efektör ve hedef 1:1 olacak şekilde (E:T) uygun 96 kuyucuklu plakalara ekimi yapıldı. Plakalar %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem oranına sahip bir inkübatörde 37°C sıcaklıkta 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından CD8<sup>+</sup> hücrelerinin sitotoksik aktivitesini belirlemek için hücrelere MTT testi uygulandı. Ayrıca aynı işleme tabi tutulan diğer plakalarda inkübasyon sonunda 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatantlar toplanarak alikotlandı ve daha sonra kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı. Deney üç kez tekrarlandı.

### 3.9 Hücre Göçü Analizi

Bu testin amacı, miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 ve HME1 hücre hatlarında hücre hareketliliği ve göç yeteneği üzerindeki etkisini araştırmaktır. Bu amaçla, bir in vitro yara iyileşmesi deneyi gerçekleştirildi. Stoktan alınan hücreler çoğalmaları için steril flasklara ekildi ve %5 CO<sub>2</sub> içeren bir etüvde 37 °C sıcaklıkta inkübe edildi. Yeterli sayıda hücre elde edildikten sonra altı kuyucuklu Petri kaplarına aktarıldı. Bu amaçla, steril 6-kuyulu hücre kültürü plakalarına ekilen hücreler ( $7 \times 10^4$  hücre/kuyucuk) 1nM

dozundaki miRNA'lar ile transfekte edildi. Daha sonra hücre kültürü plakasının tabanı steril bir pipet ucuyla düz bir çizgi halinde işaretlenmiştir (0.saat). Yüzen hücreleri uzaklaştırmak için ortam değiştirildi. Hücreler daha sonra %95 nem, 37 °C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarında inkübe edildi. Çizilen alanlar 0. ve 48. saatlerinde ters-ışık mikroskobu ile fotoğraflandı. Hücre göçünün boyutu, ImageJ yazılımı (NIH, Bethesda, ABD) kullanılarak başlangıçtaki yara genişliği ile 48 saat sonra elde edilen genişlik arasındaki fark ölçülerek belirlendi. Yara kapanma alanı daha sonra aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: % Yara kapatma alanı =  $[(A_t = 0 \text{ h} - A_t = \Delta \text{ h}) / A_t = 0 \text{ h}] \times 100\%$ , (0h: 0. Saatte ölçülen yara alanı,  $\Delta \text{ h}$ ; 48. Saatte ölçülen yara alanı). Denemeler üçer tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve her deneme için en az 5 rastgele ve birbirleriyle örtüşmeyen fotoğraf çekildi.

### 3.10 Apotoz ve Nekroz Analizi

Akridin turuncu/etidyum bromür (AO/EB) boyaması apoptoza özgü çekirdek değişiklikleri ve apoptotik hücrelerin oluşumunu görselleştirmek için kullanılır. Floresan mikroskobu altında hücreler incelenir ve apoptozu ölçmek için sayılır. Bu testin amacı, miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 ve HME1 hücre hatlarında apoptoz ve nekroz üzerindeki etkisini belirlemektir. MCF-7 ve HME1 hücreleri 6 kuyucuklu plakaya mililitre başına  $0.5 \times 10^6$  ila  $2 \times 10^6$  hücre yoğunluğunda ekildi. miR-3670 ve miR-8078 hücrelere önceden belirlenen dozda (1nM) transfekte edildi. Hücreler daha sonra etüvde %5 CO<sub>2</sub> içeren bir atmosferde 48 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. Besiyeri kuyucuklardan dikkatlice çıkarılarak her kuyucuğa 1X PBS eklendi ve hücreler yıkandı. Daha sonra PBS uzaklaştırıldı ve kuyucuklara 100 µl tripsin-EDTA eklendi ve etüvde 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda her kuyucuğa 500 µl taze besiyeri eklenerek Eppendorf tüplerinde toplandı ve 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant, pelete zarar vermeden dikkatlice uzaklaştırıldı. Pelete 50 µl besiyeri eklendi ve hücrelerin homojenizasyonu gerçekleştirildi. Her bir eppendorf tüpüne 5 µl akridin turuncu (100 µg/mL) ve etidyum bromür (100 µg/mL) boya karışımı pipetlenerek etüvde 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler yıkanarak floresan mikroskobu (Zeiss Axioskop MC100) ile görüntü analizi yapıldı (Tülüce vd., 2019; Tülüce vd., 2017).

### 3.11 Koloni Oluşum Analizi

Uygulanan miRNA'ların, hücreler üzerindeki metastatik etkisinin ve hücreler tek başına bırakıldığında davranışlarını belirlemek amacıyla koloni oluşum deneyi yapıldı. Stoktan alınan MCF-7 ve HEM1 hücrelerinin proliferasyonu için hücreler steril flasklara  $5 \times 10^2$  yoğunlukta ekildi. Hücreler daha sonra 24 saat boyunca  $37^\circ\text{C}$  ve %5  $\text{CO}_2$ 'de inkübe edildi. Yeterli hücre sayısına ulaşıldıktan sonra bunlar tripsin-EDTA kullanılarak petri kabından çıkarılarak bir Thoma lamında sayıldı. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara kuyu başına 500 hücre oranında ekildi. Her iki hücre hattı için de aynı prosedür kullanıldı. Hücreler daha önce belirlenen dozda (1nM) hsa miR-3670 ve hsa miR-8078 ile muamele edildi. Hücre kültürü ortamı her 48 saatte bir değiştirildi ve 21. günde besiyeri Petri kaplarından çıkarılarak PBS solüsyonu ile yıkandı. Hücreler 20 dakika boyunca %99 metanol ile sabitlendi ve ardından distile su ile yıkandı. Ardından ortaya çıkan koloniler sayılarak grafiğe dönüştürüldü.

### 3.12 Morfoloji Analizi

Bu deney, miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 ve HME1 hücrelerinin morfolojisindeki değişiklikleri gözlemlemek için gerçekleştirildi. Bu amaçla, MCF-7 ve HME1 hücrelerinde 1nM dozunda miRNA transfeksiyonu gerçekleştirildi ve 48 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler kristal viyole ile boyandı. Hücrelerin morfolojik değişiklikleri ters-ışık mikroskobu (Olympus CKX31, 10x büyütme) ile gözlemlendi. Ek olarak, muamele edilen hücreler akridin turuncusu ile boyandı ve floresan mikroskobu (40x büyütme) ile görüntülendi.

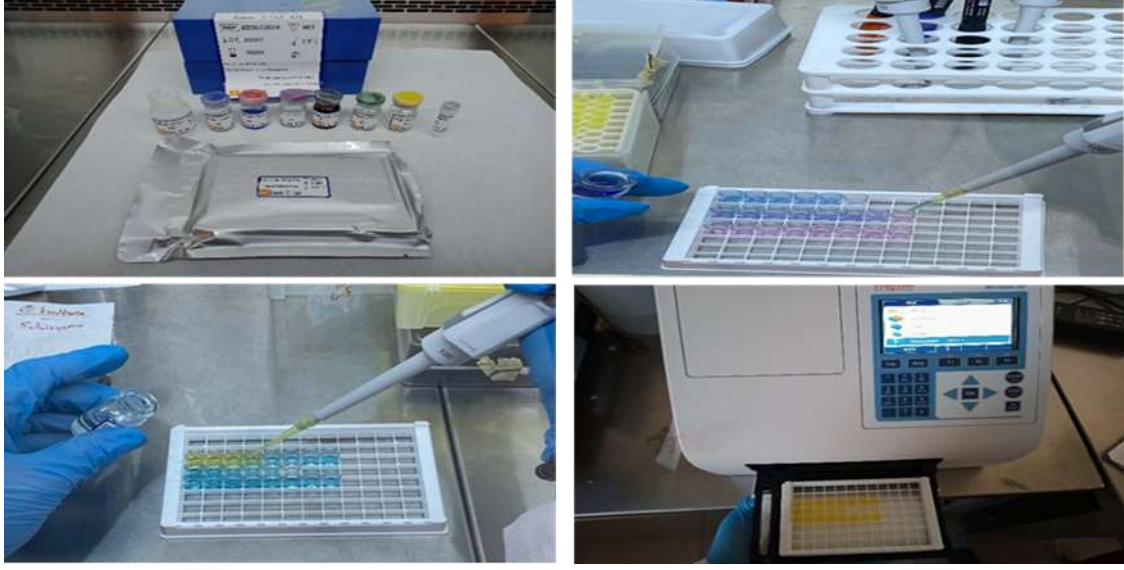
### 3.13 3D Sferoid Oluşum Analizi

3D sferoid oluşum deneyi, hücrelerin yüzeye yapışmadığı ankrajdan bağımsız bir ortamda hücrelerin kötü huylu dönüşüm geçirme kabiliyetini test etmek için kullanılır. Bu amaçla, 6 kuyucuklu petri kapları önce %20 FBS içeren DMEM ve %0.6 agaroz içeren DMEM ile 1:1 oranında kaplanmış ve polimerizasyona getirilmiştir. Hücrelere 1nM dozunda miR-3670 ve miR-8078 uygulandı. Daha sonra %20 FBS içeren DMEM ve %0.3 agaroz karışımı 1:1 oranında ( $5 \times 10^3$  hücre) Petri kaplarına

eklendi ve ardından polimerleşmeye bırakıldı. Ardından kuyucuklara 500 µl DMEM eklendi ve 20 gün boyunca inkübe edildi. Üst besiyeri her iki günde bir taze besiyeriyle değiştirildi. 20 gün sonra, kuyucuklar %0.005 kristal viyole ile muamele edildi ve 20 dakika bekletildi. Oluşan koloniler boyandıktan sonra mikroskopik olarak incelendi.

### 3.14 E-Kaderin Analizi

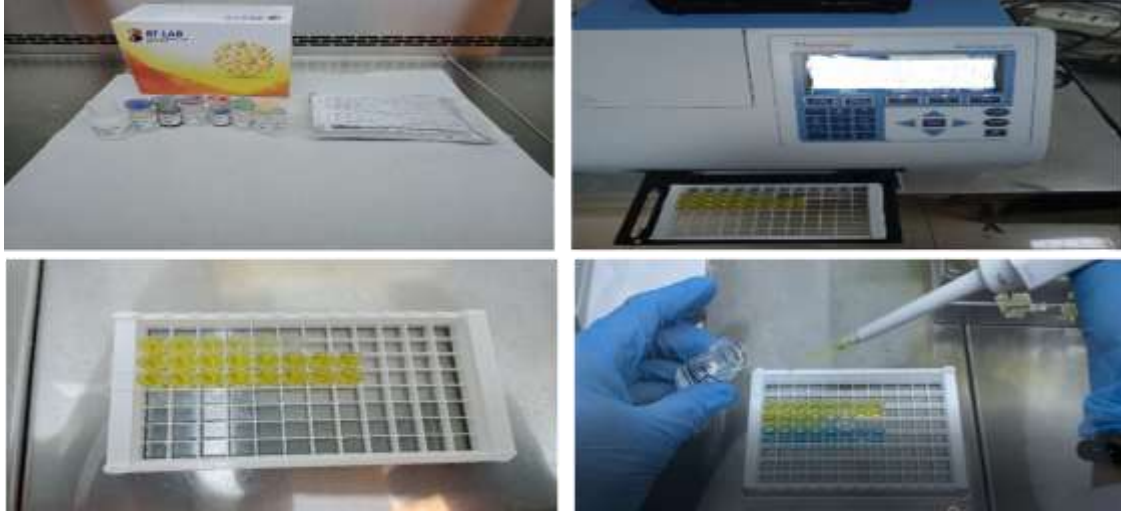
Bu çalışmanın amacı, miR-3670 ve miR-8078'in hücre hatlarında hücre hareketliliğinin bir göstergesi olarak işlev gören anti-metastatik protein e-kaderin antijeni seviyesi üzerindeki etkisini araştırmaktır. Daha önceden belirlenen 1 nM dozunda miR-3670 ve miR-8078 ile transfekte edilen MCF-7 ve HME1 hücrelerin 48 saat boyunca 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'de inkübasyonları gerçekleştirildi. Uygulamadan sonra, e-kaderin elisa kiti (SunRed, Çin) protokolüne göre hücre kültürü süpernatantlarından e-kaderin antijeni belirlendi. Hücre kültürü süpernatantında biriken e-kaderin proteininin ve rekombinant insan e-kaderin protein standardının dilüsyonları katı fazlı sandviç elisa yöntemiyle analiz edildi. Kültür süpernatantı (insan e-kaderin proteini), insan e-kaderin proteinine özgü bir poliklonal antikor ile kaplanmış kuyucuklarda inkübe edildi. Yıkamadan sonra, e-kaderin proteinine özgü biyotinlenmiş bir monoklonal antikor eklendi. İnkübasyondan sonra streptavidin peroksidaz enzimi eklendi. Üçüncü inkübasyondan sonra ve bağlanmamış enzim uzaklaştırılıp yıkandıktan sonra, enzimle bağlanan ve renk üreten substrat çözeltisi eklendi. Elde edilen ürünün renk yoğunluğu 450 nm absorbans değerinde spektrofotometrik olarak belirlendi. Kültür süpernatantındaki e-kaderin protein miktarı, e-kaderin protein standartlarının absorbe edilmesiyle oluşturulan standart kör değerler kullanılarak belirlendi (Şekil 3.14). E-kaderin protein sekresyonunun inhibisyonunu (%) hesaplamak için numunelerdeki e-kaderin proteini kontrol ile karşılaştırıldı. Tüm çalışmalar üç kere tekrarlandı ve standart sapmaları (±) hesaplandı (Maguire vd., 1990; Turan vd., 2012).



Şekil 3.14 Süpernatantta e-kaderin miktarının elisa kiti ile tayini

### 3.15 VEGF Analizi

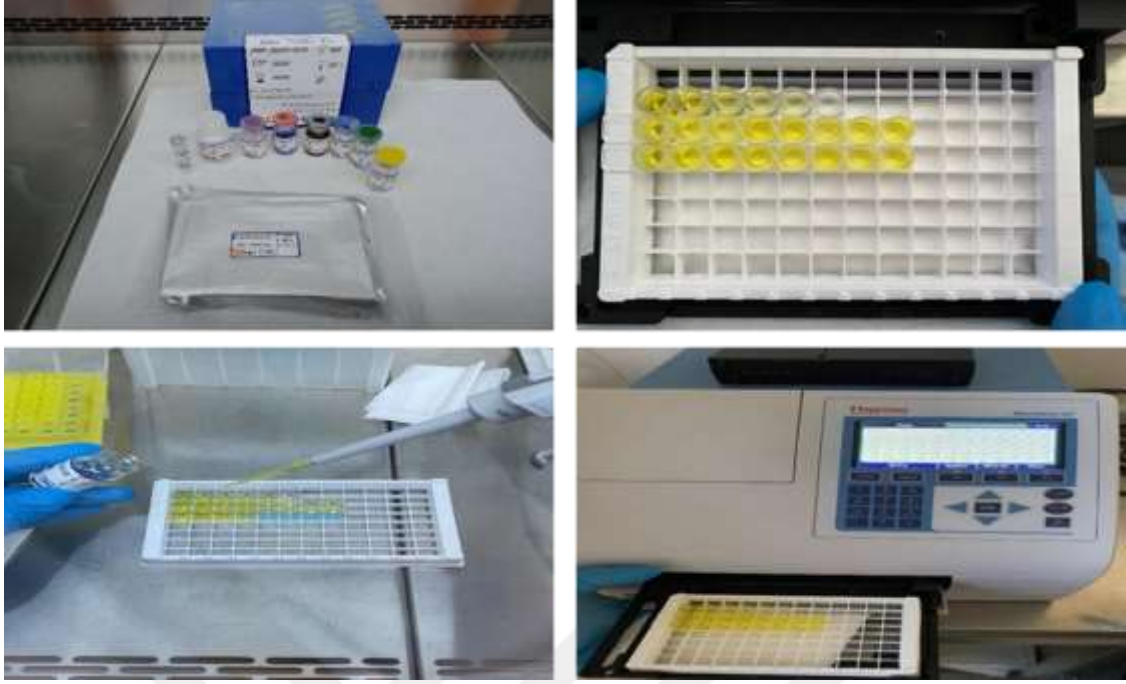
Bu testin amacı, metastaz sırasında anjiyogenezi uyaran hücreler tarafından üretilen bir sinyal proteini olan vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) ifade düzeyini belirlemektir. Bu amaçla, 1 nM dozunda miR-3670 ve miR-8078 ile transfekte edilen hücreler 48 saat boyunca %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C'de inkübe edildi. Uygulamadan sonra, hücre kültürü süpernatantlarındaki VEGF seviyesi, elisa kiti (BT-LAB, Çin) ile üretici protokolüne uygun olarak yapıldı (Şekil 3.15). VEGF seviyesini belirlemek için protokolün sonraki adımları yukarıdaki E-kaderin analizinde olduğu gibi aynı aşamaları izlemiştir. VEGF sekresyonunun inhibisyonu (%) örneklerdeki VEGF'nin kontrol ile karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Tüm çalışmalar üç kez tekrarlandı ve standart sapmalar ( $\pm$ ) hesaplandı (Pal vd.,2022).



Şekil 3.15 Süpernatanttaki VEGF miktarının elisa kiti ile tayini

### 3.16 TINAGL-1 Analizi

Bu testin amacı, uygulama sonrasında hücre hatlarında metastazı önleyen bir protein olan TINAGL-1 (Tubulointerstisyel Nefrit Antijen Benzeri-1) proteininin ekspresyonundaki değişiklikleri belirlemektir. Bu amaçla, 1nM dozunda miR-3670 ve miR-8078 ile transfekte edilen hücreler 48 saat boyunca %5 CO<sub>2</sub> atmosferinde ve 37°C'de etüvde inkübe edildi. Kültür süpernatantındaki TINAGL-1 konsantrasyonu uygulamadan sonra üreticinin protokolü kullanılarak elisa kiti (SunRed, Çin) ile ölçülmüştür (Şekil 3.16). TINAGL-1 düzeyinin belirlenmesine yönelik protokolün sonraki adımları, yukarıda açıklanan e-kaderin analizi prosedüründe olduğu gibi aynı adımları izlemiştir. miRNA transfeksiyonunun TINAGL-1 sekresyonu üzerindeki etkisi kontrol grubu ile karşılaştırılarak hesaplandı. Her uygulama, üç tekrarlı olarak çalışıldı ve standart sapmalar ( $\pm$ ) hesaplandı (Shan vd., 2021).



Şekil 3.16 Süpernatantta TINAGL-1 miktarının elisa kiti ile tayini

### 3.17 İstatistikî Analiz

Tüm istatistiksel analizler MINITAB 14® paket programı kullanılarak gerçekleştirildi (Tülüce vd.,2019). Kontrol ve uygulama gruplarının arasındaki sonuçları üç tekrarlı olarak sunuldu. Deneysel veriler varyans analizi (tek yönlü ANOVA) kullanılarak değerlendirildi. Tüm testler için  $P \leq 0.05$  anlamlı değer kabul edildi. Çalışmadan elde edilen veriler ortalama±standart sapma (SD) olarak sunuldu. Kontrol grubu ile deney grupları karşılaştırılmasında istatistiksel analiz olarak eşleştirilmiş t testi kullanıldı.



## 4. BULGULAR

### 4.1 Biyoinformatik Analizlere Ait Bulgular

#### 4.1.1 miRNA'ların Validasyonu ve Hedef Genlerinin Belirlenmesi

Biyoinformatik analizlerde ilk adım, miRBase programını kullanarak hsa-miRNA-3670 ve hsa-miRNA-8078 için sentetik mimiklerin erişim numaralarını, olgun dizilerini ve referanslarını doğrulamak olmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 miRNA-3670 ve miRNA-8078'in kimliklendirme bilgileri

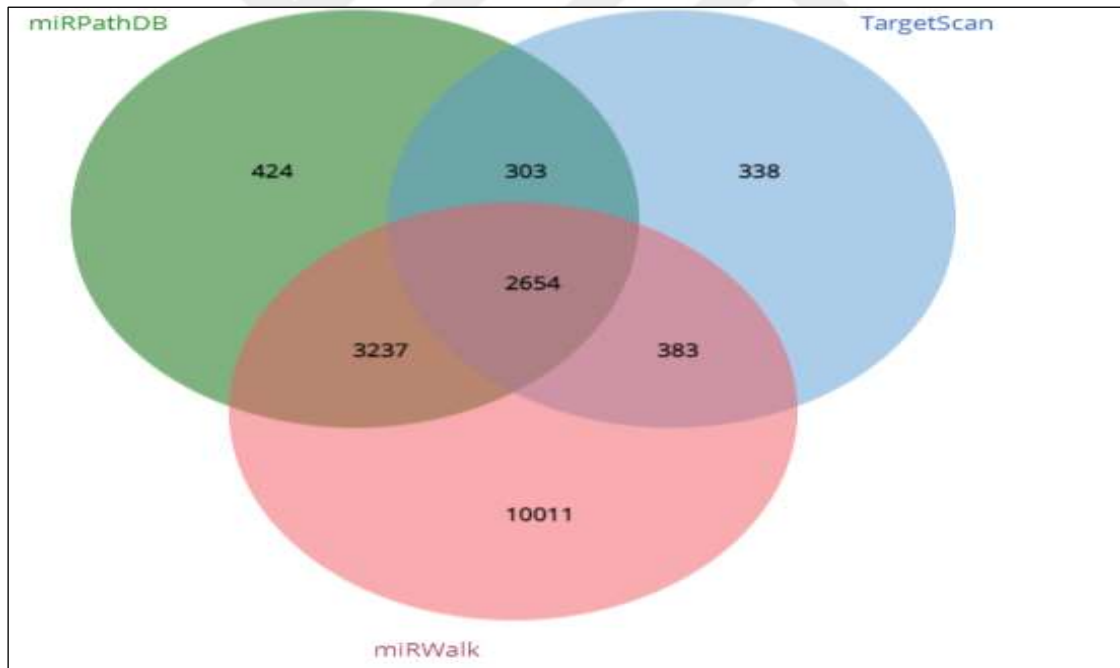
| Ailesi                                   | miR-3670                                                                                                       |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Prekürsörleri                            | hsa-mir-3670-1 (MI0016071), hsa-mir-3670-2 (MI0019112), hsa-mir-3670-3 (MI0031513), hsa-mir-3670-4 (MI0031514) |
| Sekans dizilimi                          | UCUAGACUGGUAUAGCUGCUUUUGGAGCCUCA<br>CCUGCUGAGAGCUCACAGCUGUCCUUCUCUAG<br>A                                      |
| Olgun sekans dizilimi (5'-3')            | AGAGCUCA CAGCUGUCCUUCUCUA                                                                                      |
| Kromozomal lokasyon                      | chr16:14907756-14907779                                                                                        |
| Merkezi çekirdek sekans dizilimi (5'-3') | GAGCUCA                                                                                                        |

| Ailesi                                   | miR-8078                                                                                 |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Prekürsörleri                            | hsa-mir-8078 (MI0025914)                                                                 |
| Sekans dizilimi                          | UCCGCCCGCCCCUCCACCGGGCUGACCGGCC<br>UGGGAUUCUGCCUUCUAGGUCUAGGCCCGGU<br>GAGAGACUCACACAGCGG |
| Olgun sekans dizilimi (5'-3')            | GGUCUAGGCCCGGUGAGAGACUC                                                                  |
| Kromozomal lokasyon                      | chr18:112266-112288                                                                      |
| Merkezi çekirdek sekans dizilimi (5'-3') | GUCUAGG                                                                                  |

miR-3670 ve miR-8078 mimik miRNA'larının hem doğrulanmış hem de varsayılan biyolojik aday hedef genlerini belirlemek amacıyla web tabanlı miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) ve TargetScan ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)),

miRPathDP (<https://mpd.bioinf.uni-sb.de/>) biyoinformatik programları kullanıldı. miR-3670 için yapılan analizde TargetScan ile 3679 adet, miRWalk ile 16285 adet ve miRPathDP tarafından 6618 adet hedef-varsayılan gen tanımlanmıştır. miR-8078 için yapılan analizde TargetScan ile 1985 adet hedef-varsayılan gen, miRWalk programı ile 15913 adet hedef-varsayılan gen miRPathDP programı ile 4233 adet hedef-varsayılan gen belirlendi.

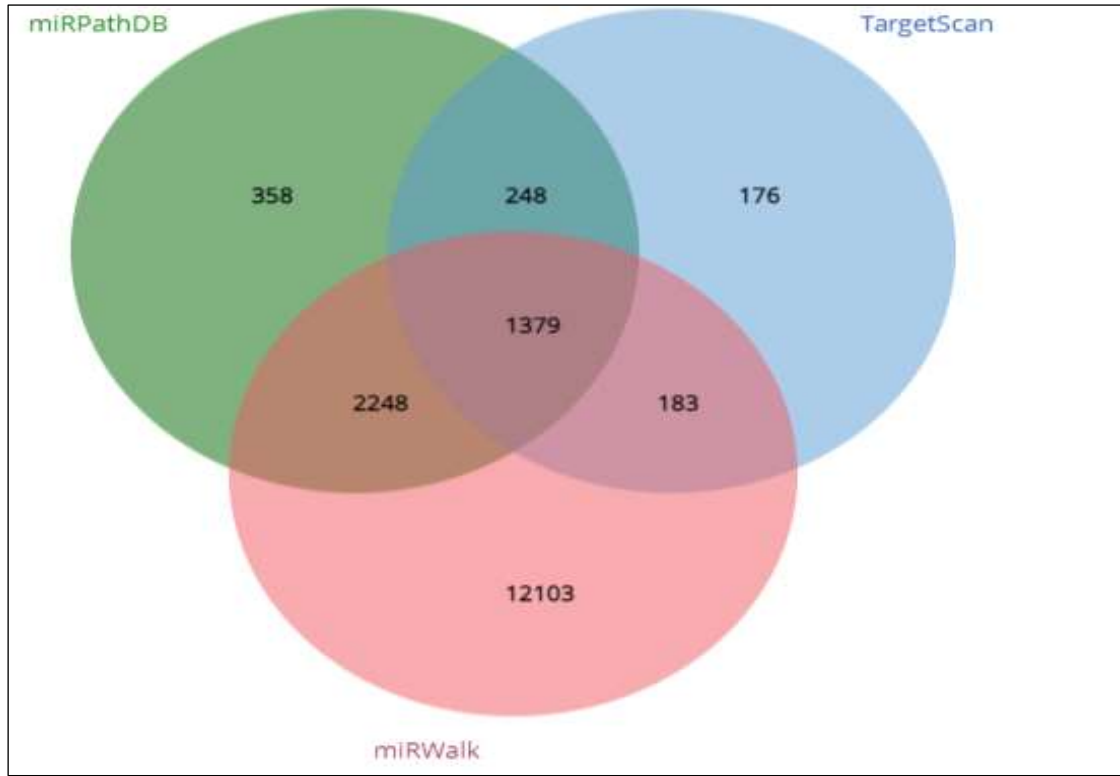
miR-3670 ve miR-8078 için TargetScan, miRWalk ve miRPathDP programı ile belirlenen hedef-varsayılan gen setleri VENNY ( <https://www.biotoools.fr/misc/venny>) web programı aracılığıyla kesiştirilmiştir. Kesişim analizi sonucunda miR-3670 için her üç biyoinformatik programdan elde edilen gen setlerinden 2654 gen ortak hedef/ varsayılan genler olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.1). Bu ortak genler arasında PD-L1'e ait gen olan CD274 geninin yanı sıra PD-L1 sentezinde ana düzenleyici olan birçok gen tanımlanmıştır.



Şekil 4.1 miR-3670'in ortak ve örtüşen hedef genlerinin Venn diyagram gösterimi

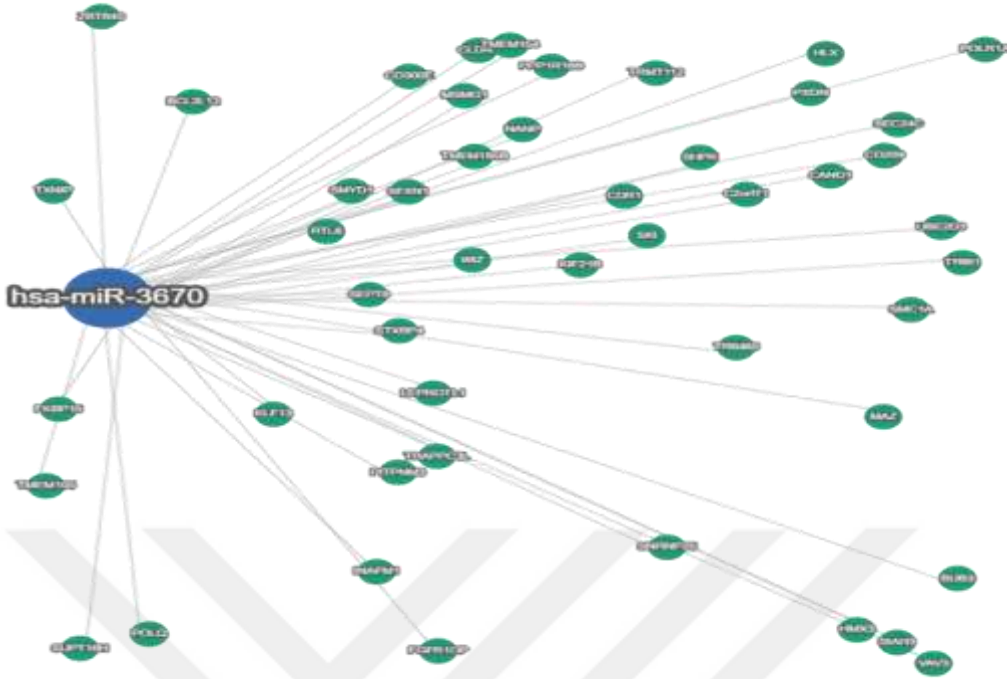
miR-8078 için gen kesişim analizinin ardından, 1379 ortak gen hedef/varsayılan genler olarak tanınmıştır (Şekil 4.2). PD-L1 ile bağlantılı olan CD274 geni tanınmamıştır. Ancak, bu spesifik gen PD-L1 sentezinde önemli bir düzenleyici olan birkaç gen arasında fark edilmiştir. Bu genler arasında PD-L1 ile doğrudan ilişkili olan

CD274 geni tespit edilememiş ancak PD-L1 sentezinde ana düzenleyici olan birçok gen olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, onkogenik genler ve metastaz ile ilişkili birçok genin de bu ortak gen havuzunda bulunduğu belirlendi.



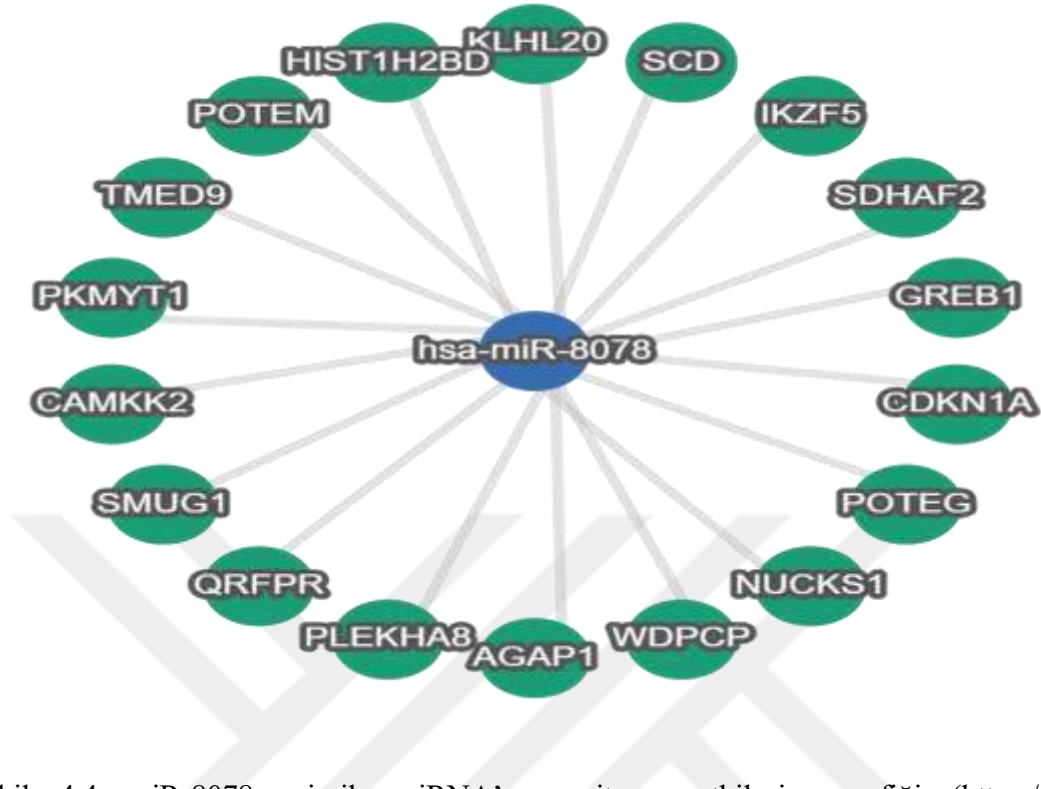
Şekil 4.2 miR-8078'in ortak ve örtüşen hedef genlerinin Venn diyagram gösterimi

Biyoinformatik analiz sonucunda PD-L1 (CD274) ligand geninin miR-3670 mimik miRNA tarafından hedeflendiği tespit edildi (Çizelge 4.2). miRTargetlink 2.0 programı ile miR-3670'in tüm hedef genleri arasında güçlü bir şekilde doğrulanmış genlerin etkileşim grafiği Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3 miR-3670 mimik miRNA'sına ait gen-etkileşim grafiği (<https://ccb-compute.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink2/network/a3132f33-9a6c-4c6d-b6c5-165442790d8c>, Turkuaz nodüller, miR-3670'in tahmin edilen çeşitli genlerini temsil eder. Çizgiler, düğümler arasındaki etkileşimleri ifade etmektedir)

Benzer şekilde, miR-8078 mimiği için TargetScan 1987, miRWalk 5823 ve miRPathDP 4233 hedef-varsayılan genler tanımlandı. Biyoinformatik analiz yoluyla miR-8078 mimik miRNA ile PD-L1 (CD274) ligand geni arasında doğrudan bir ilişki belirlenememiştir. miRTargetlink 2.0 programı ile tüm hedef genler arasında güçlü bir şekilde doğrulanmış genlerin etkileşim grafiği Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4 miR-8078 mimik miRNA'sına ait gen-etkileşim grafiği (<https://ccb-compute.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink2/network/55a6a78e-a33f-4f1f-b897-f4d0509ac37c>, Turkuaz nodüller, miR-8078'in tahmin edilen çeşitli genlerini temsil eder. Çizgiler, düğümler arasındaki etkileşimleri ifade etmektedir)

#### 4.1.2 mRNA Hedefleme Analizine Ait Bulgular

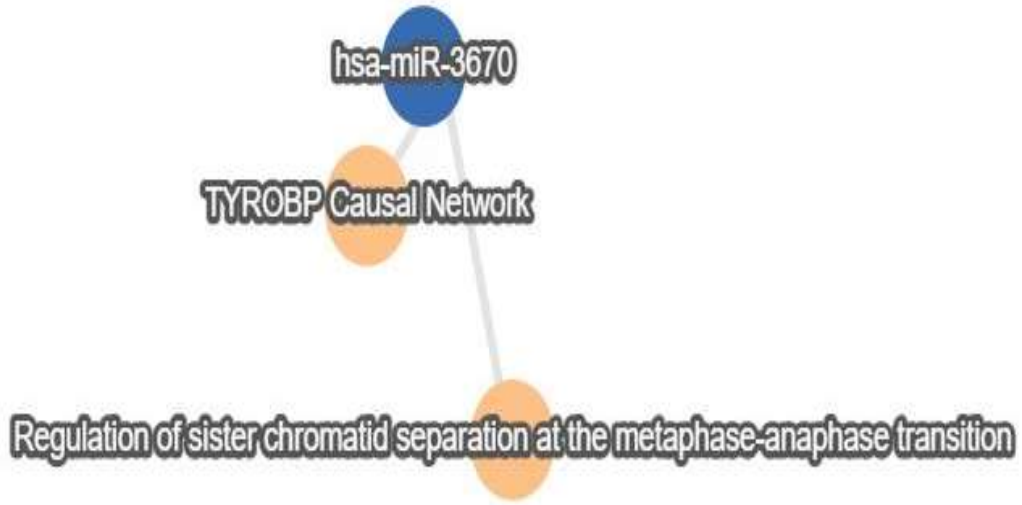
PD-L1 (CD274) mRNA molekülünün hangi bölümünün hsa-miRNA-3670 ve hsa-miRNA-8078 tarafından hedeflendiğini belirlemek için TargetScan ([http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/)) veri tabanı kullanıldı. Biyoinformatik analiz, hsa-miRNA-3670'in çekirdek dizisi ile CD274'ün (PD-L1/L2) 5' UTR dizisi arasında iki farklı konumda (82.15 ve 87.35) güçlü bağlanma olduğunu göstermiştir. Ancak, hsa-miRNA-8078 ile ilgili analizde doğrudan bağlanma tespit edilmemiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 hsa-miRNA-3670 mimiğine ait mRNA hedefleme analizi sonuçları

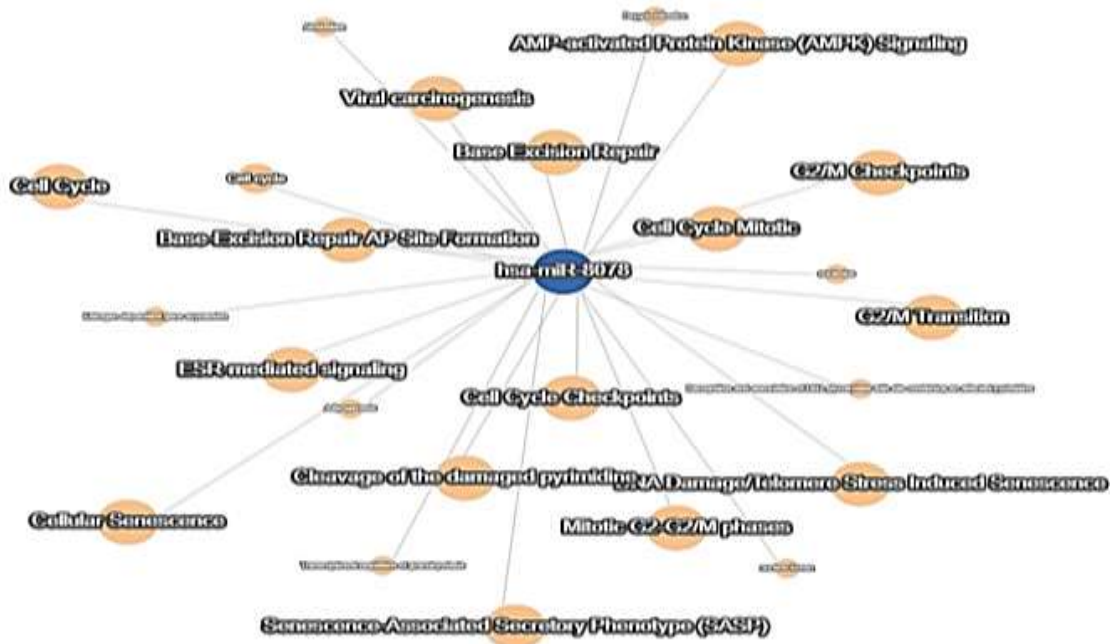
|                                                              |                                                                                                  |               |
|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Kromozom konumu                                              | 5470201(chr9)                                                                                    |               |
| PDCD1L'in konumu                                             | 2339                                                                                             |               |
| Hedef bölgenin ve miRNA'nın tahmin edilen sonuçsal eşleşmesi | 5'(CD274 mRNA)<br>GGCUGAAGAAACAGUGUCUCCAACAGAGCUCCUUGUGUUA<br>miR-3670-AUCCUUCCUGUCGACAC UCGAGA  | 2339<br> <br> |
| 5'CD274 mRNA'yı hedefleme skoru                              | 82,15                                                                                            |               |
| Kromozom konumu                                              | 5468960(chr9)                                                                                    |               |
| PDCD1L'nin konumu                                            | 1098                                                                                             |               |
| Hedef bölgenin ve miRNA'nın tahmin edilen sonuçsal eşleşmesi | 5'(CD274 mRNA)<br>GCAAGACAAAGUACCCUGUCCUCCAAGGAGCUCAUAGUAUAA<br>miR-3670-AUCCUUCCUGUCGACACUCGAGA | 1098<br> <br> |
| 5'CD274 mRNA'yı hedefleme skoru                              | 87,35                                                                                            |               |

#### 4.1.3 Biyolojik Yolak Analizine Ait Bulgular

Sentetik mimik miRNA'lar hsa-miRNA-3670 ve hsa-miRNA-8078 tarafından etkilenen biyolojik yolları tespit etmek için miRTargetlink 2.0 (<https://ccb-compute.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink2/>) biyoinformatik analiz yazılımı kullanıldı. Bu analiz sonucunda, hsa-miRNA-3670'in hücre canlılığı için hayati önem taşıyan ve tamamen doğrulanmış iki biyolojik sinyal yolunu etkilediği belirlendi (Şekil 4.5). Aynı analizde, hsa-miRNA-8078'in hücre döngüsü, hücre bölünmesi ve hücre yaşlanması dahil olmak üzere çok sayıda önemli biyolojik yolu hedef aldığı tespit edildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.5 miR-3670 mimik miRNA'nın biyolojik sinyal yolağı-etkileşim grafiği (Turuncu nodlar, miR-3670 ile ilişkili biyolojik sinyal yollarını temsil eder. Çizgiler, nodlar arasındaki etkileşimleri ifade etmektedir)

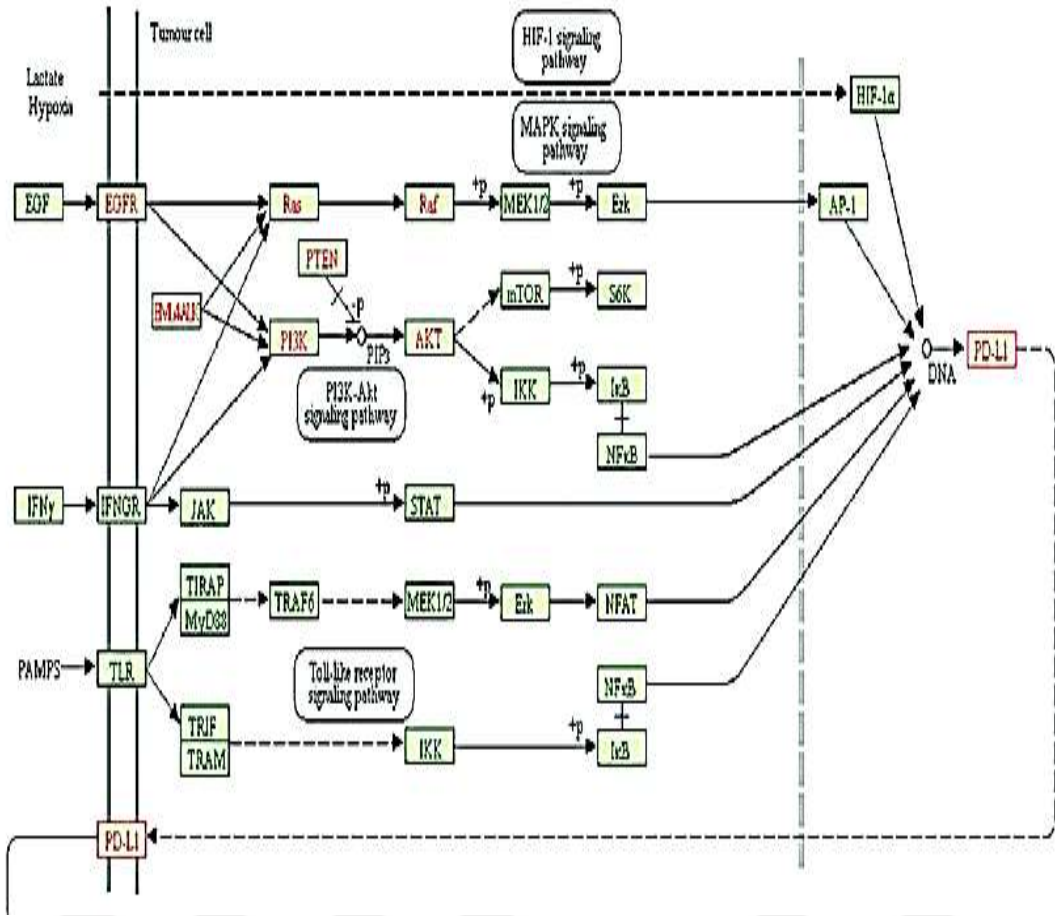


Şekil 4.6 miR-8078 ile ilişkili biyolojik sinyal yolağı-etkileşim grafiği (Turuncu nodlar, miR-8078 ile ilişkili biyolojik sinyal yollarını temsil eder. Çizgiler, nodlar arasındaki etkileşimleri ifade etmektedir)

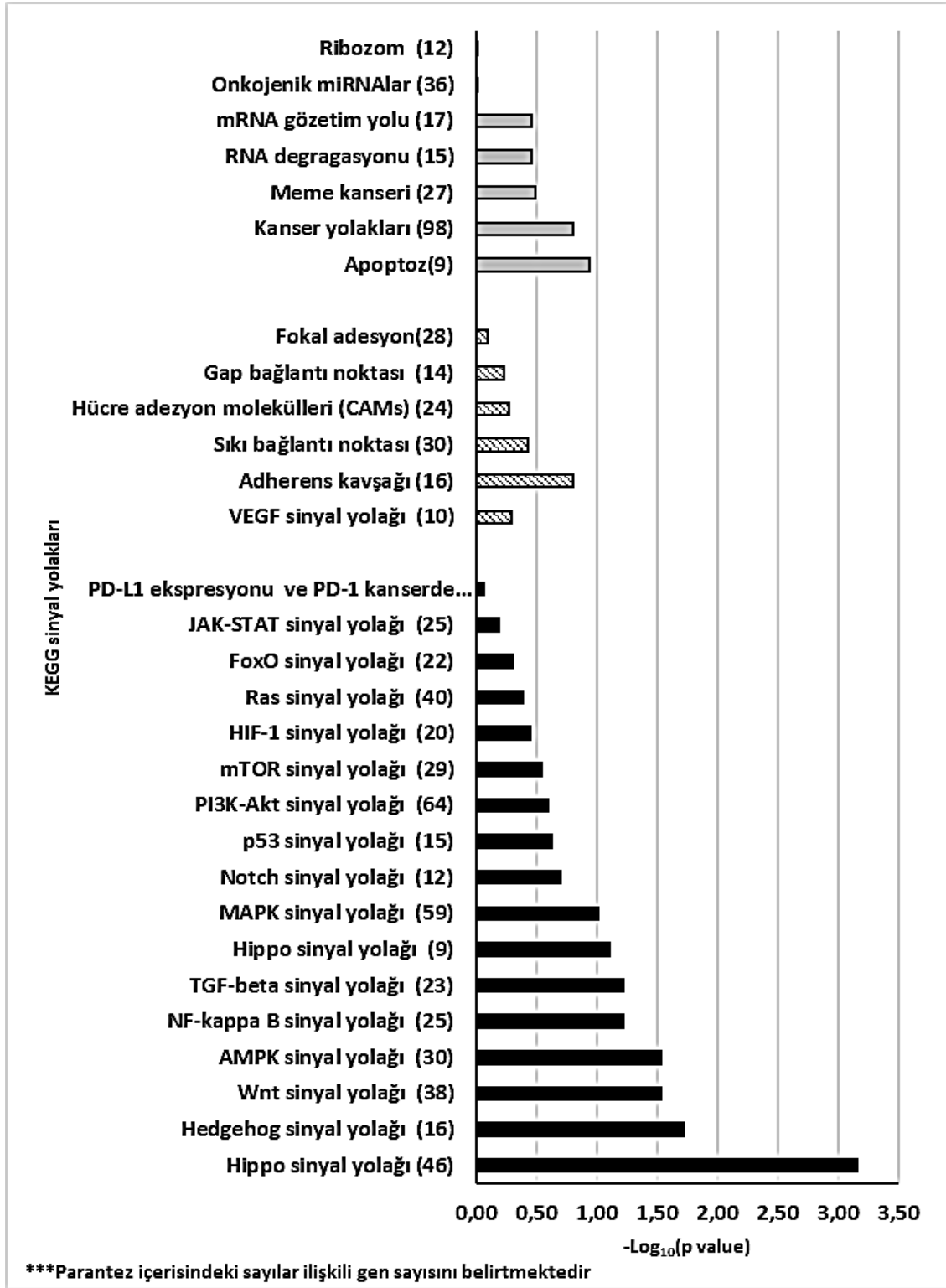
#### 4.1.4 Yolak Zenginleştirme Analizlerine Ait Bulgular

Meme kanserinde hsa-miRNA-3670 ve hsa-miRNA-8078'in sentetik mimiklerinin potansiyel moleküler mekanizmalarını araştırmak için, Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi'nden (KEGG, <https://www.genome.jp/pathway/map05235+K06745>) ve gen ontolojisi (GO) zenginleştirme analizi kullanarak biyolojik süreci (BP), moleküler işlevi (MF) ve hücresel bileşenleri (CC) analiz edildi. miRNA-3670 için yapılan KEGG yolu analizinde, önemli ölçüde zenginleştirilmiş PI3K-Akt, Jak-STAT, Ras, Wnt, MAPK, Nf-kB, TNF- $\alpha$ , Notch, HIF-1 $\alpha$ , Hedgehog, mTOR, AMPK, TLR gibi hem kanserleşmeye neden olan hem de PD-L1 ligandının sentezinde görevli master düzenleyici sinyal yolları olan 13 yol tanımlandı (Şekil 4.7-4.8).

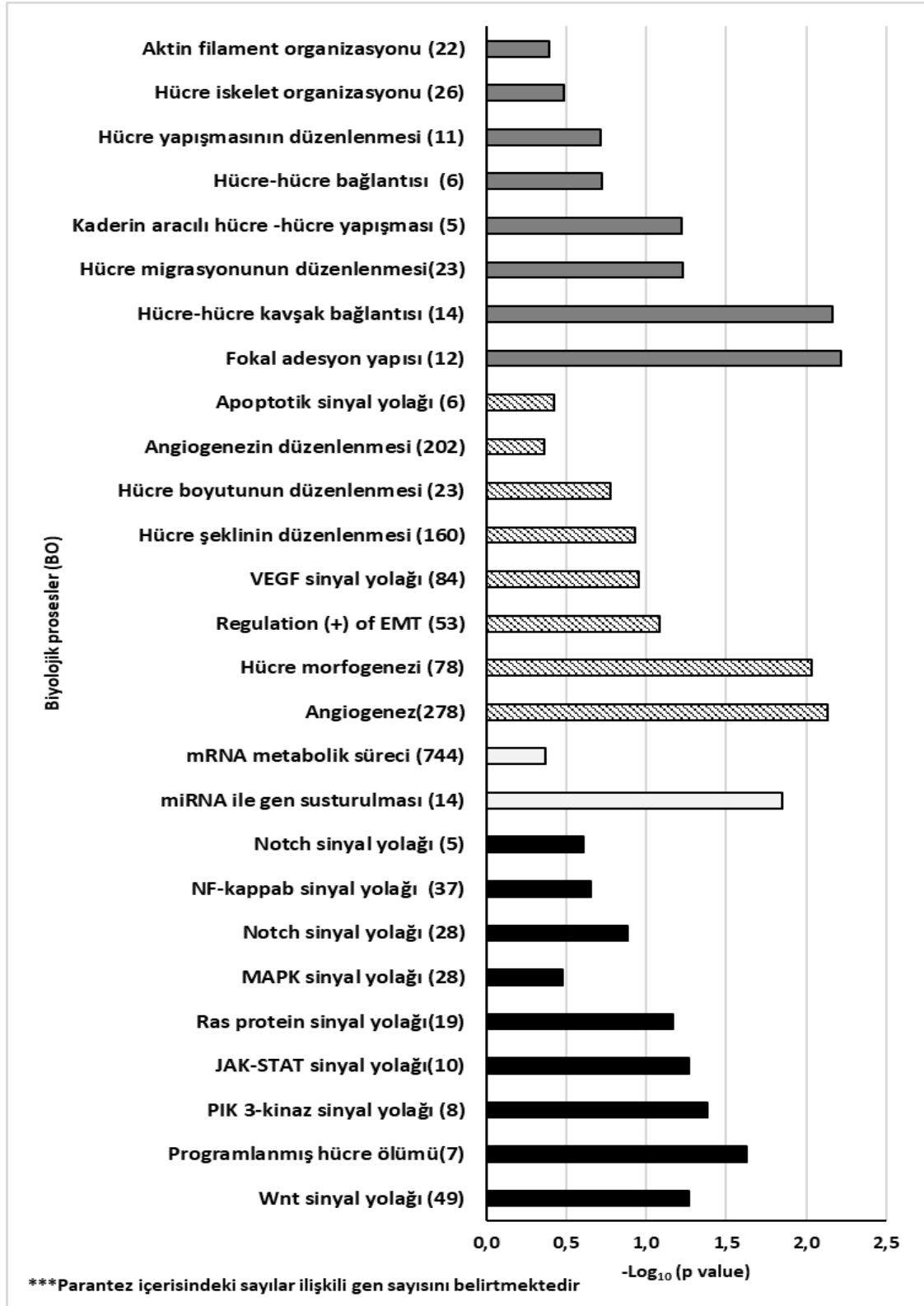
miRNA-3670 için KEGG yol analizi, önemli ölçüde zenginleştirilmiş PI3K-Akt, Jak-STAT, Ras, Wnt, MAPK, Nf-kB, TNF- $\alpha$ , Notch, HIF-1 $\alpha$ , Hedgehog, mTOR, AMPK, TLR dahil olmak üzere, hem kansere neden olan hem de PD-L1 ligandının sentezinde yer alan ana düzenleyici sinyal yolları olan 13 yol belirledi (Şekil 4.8 ). miRNA-3670 için Gen Ontolojisi (GO) yolunun analizi, 2230 GO bileşeninin tanımlanmasıyla sonuçlanmıştır. Bu bileşenler spesifik olarak 720 biyolojik süreç (BP), 552 moleküler fonksiyon (MF) ve 958 hücresel bileşenden (CC) oluşmaktadır. BP kategorisindeki onkogenik genlere ek olarak, PD-L1 ligandının sentez, anjiyogenez, metastaz, hücresel şekil, boyut, yapışma, hücreleri şekillendiren yapısal unsurlar ve apoptoz ile ilgili genlerle bağlantılı olduğu bulunmuştur. Ayrıca, translasyon ve protein trafiğinde yer alan önemli genlerle de ilişki kurulmuştur (Şekil 4.9). MF kategorisinde, PD-L1 sentezi, karsinogenez, metastaz, adezyon, hücre iskeletinin yanı sıra mRNA ve protein sentezi ve degradasyonu dahil olmak üzere çeşitli moleküler işlevlerle ilişkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.10). CC kategorisinde, genlerin çoğu aktinler, mikrotübüller ve hücre iskeleti dahil olmak üzere hücreyi şekillendiren yapısal bileşenlerle bağlantılıdır. Ayrıca, bu kategori endoplazmik retikulum, Golgi, ribozomlar ve mRNA kompleksleri ile ilgili genleri de içerir. Bu kategori aynı zamanda hücre zarında filopodia, psödopodia ve lamellipodia gibi spontane yapıların oluşumu ile de ilişkilidir (Şekil 4.11).



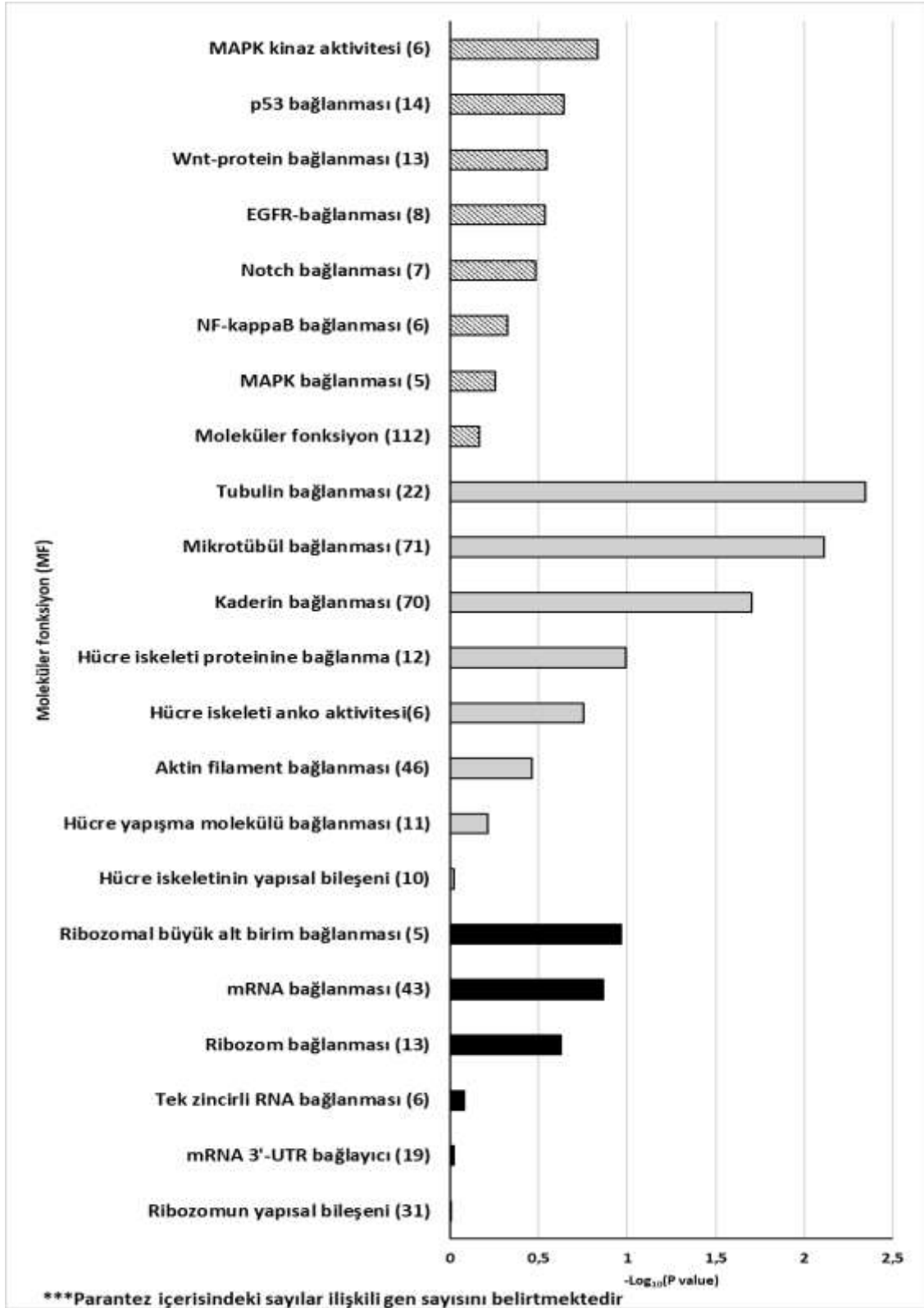
Şekil 4.7 PD-L1 yolağını gösteren KEGG figürü



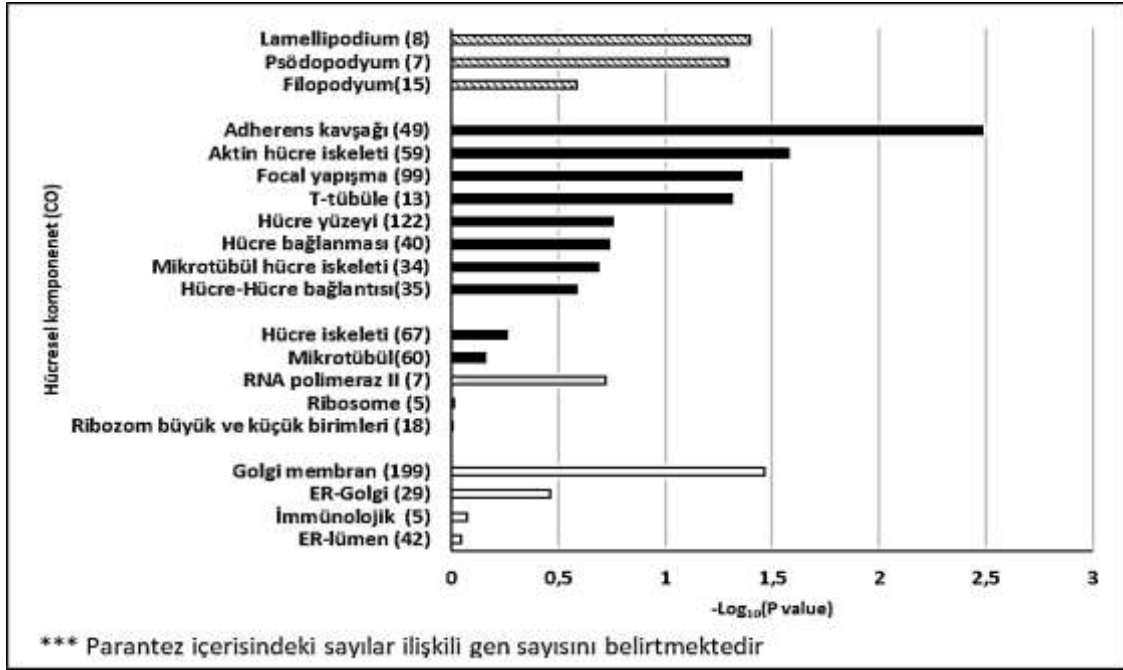
Şekil 4.8 miRNA-3670 ile ilgili önemli genler için KEGG yolak analizinin sonuçları (P değeri <0,05, minimum sayısı 3 ve zenginleştirme faktörü >1,5 olan GO terimleri veya KEGG yolları istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi)



Şekil 4.9 miRNA-3670 ile ilişkili önemli genlerin biyolojik proses (BP) analizi sonuçları (P değeri <0,05, minimum sayısı 3 ve zenginleştirme faktörü >1,5 olan GO terimleri veya KEGG yolları istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi)



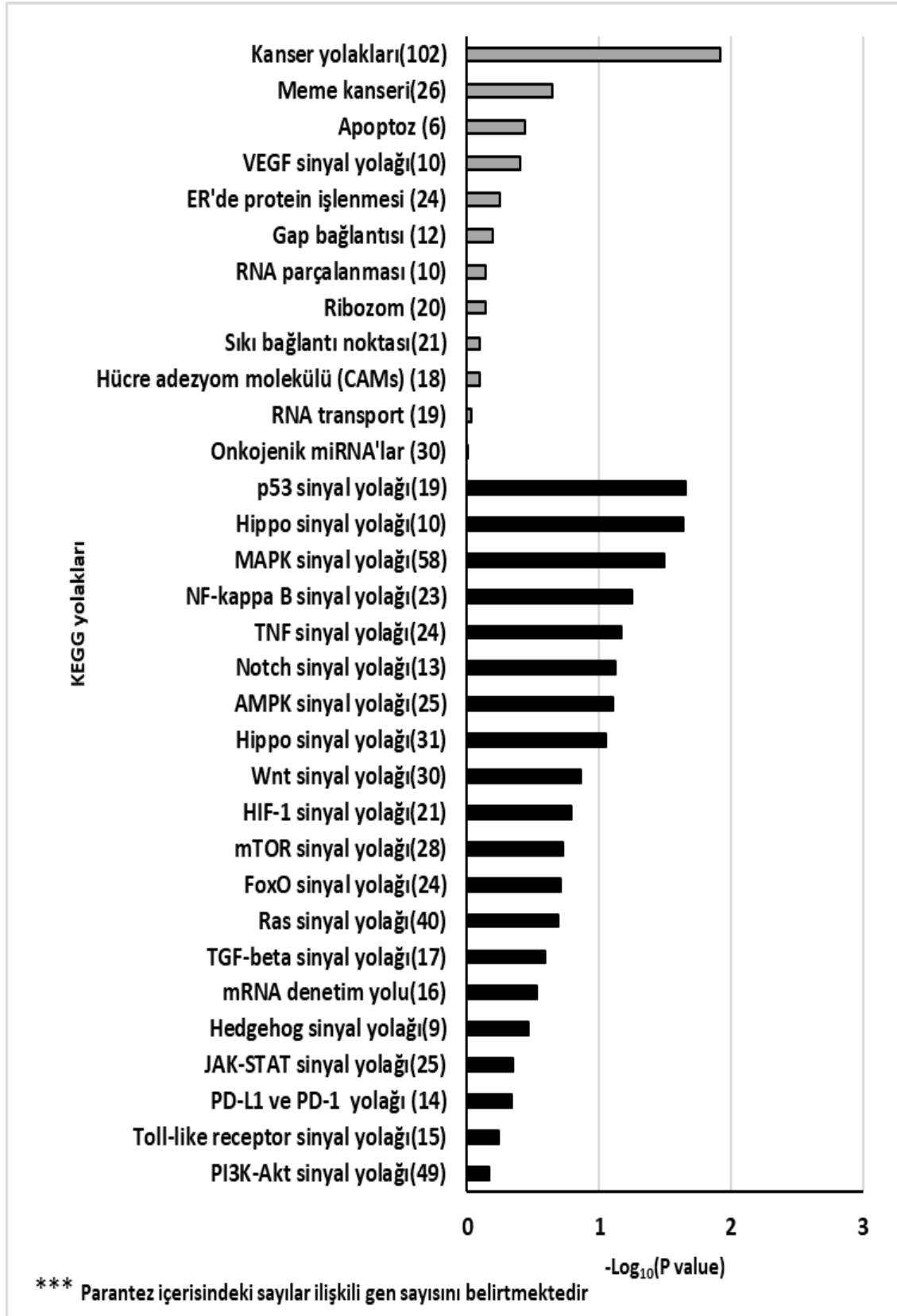
Şekil 4.10 miRNA-3670 ile ilişkili önemli genlerin moleküler fonksiyon (MF) analizinin sonuçları (P değeri <0,05, minimum sayısı 3 ve zenginleştirme faktörü >1,5 olan GO terimleri veya KEGG yolları istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi)



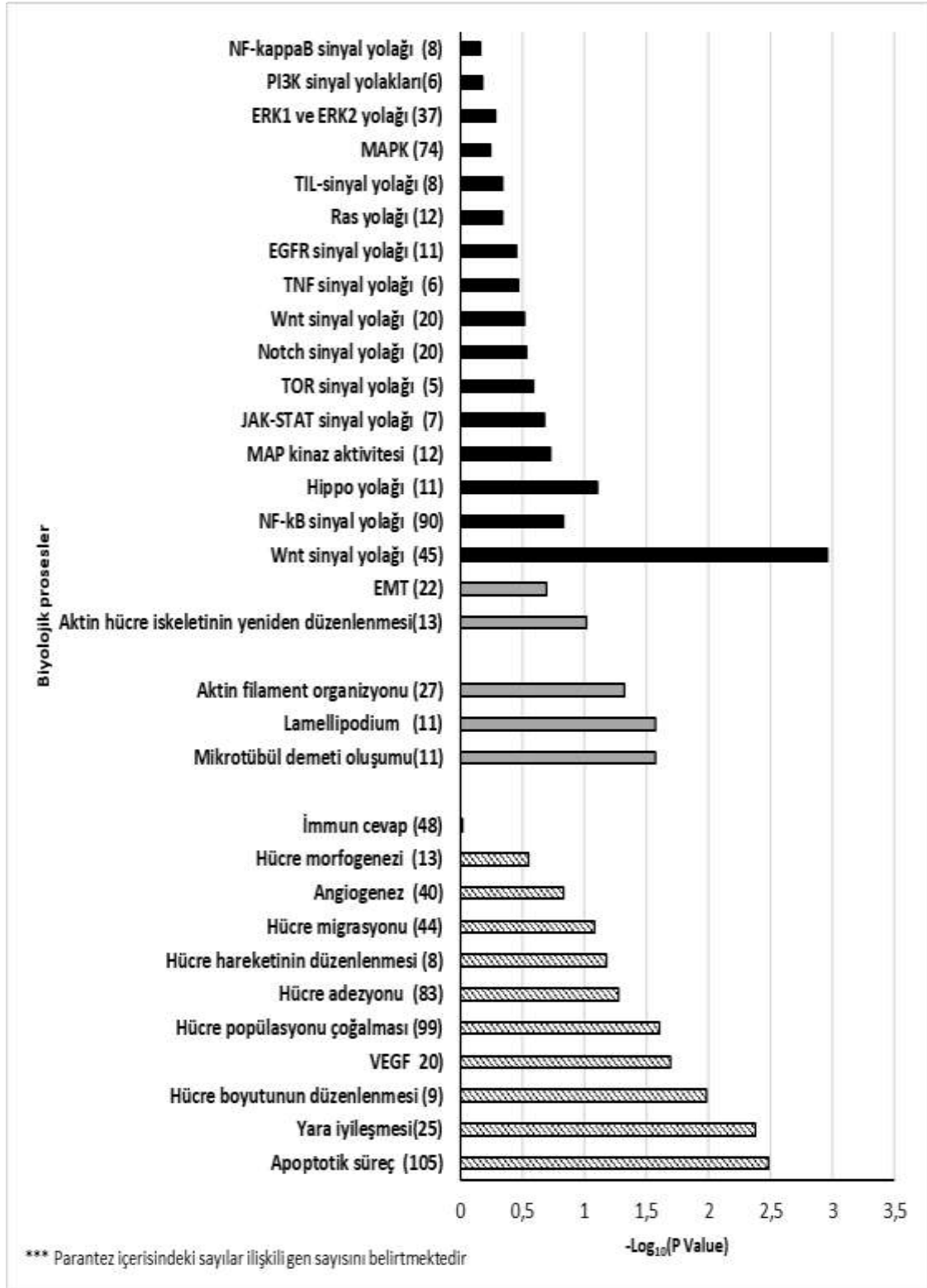
Şekil 4.11 miRNA-3670 ile ilişkili önemli genlerin hücresel komponent (CC) analizi sonuçları (P değeri <0,05, minimum sayısı 3 ve zenginleştirme faktörü >1,5 olan GO terimleri veya KEGG yolları istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi)

miRNA-8078 için KEGG yol analizi, hem karsinogenez hem de PD-L1 ligandının sentezinde yer alan ana düzenleyici sinyal yolları olan PI3K-Akt, Jak-STAT, Ras, Wnt, MAPK, Nf-kB, TNF- $\alpha$ , Notch, HIF-1 $\alpha$ , Hedgehog, mTOR, AMPK, TLR dahil olmak üzere önemli ölçüde zenginleştirilmiş 13 yol belirledi (Şekil 4.12 ). Bu sonuçlar meme kanseri ve PD-L1 ligandının sentez mekanizmasına ilişkin önemli ipuçları sağlamaktadır. miRNA-8078 için Gen Ontolojisi (GO) yol analizi sonucunda, 956'sı biyolojik proses (BP), 515'i moleküler fonksiyon (MF) ve 820'si hücresel bileşen (CC) olmak üzere toplam 2.291 önemli GO bileşeni tanımlandı. BP sınıfında hem kansere neden olan hem de PD-L1 ligandının üretimi, hücre göçü, metastaz, adezyon, proliferasyon, yara iyileşmesi, anjiyogenez ve apoptozda rol oynayan genler tanımlanmıştır (Şekil 4.13). MF kategorisindeki genler PD-L1 ile bağlantılıdır ve karsinogenez, hücre büyüme, migrasyon, metastaz, adezyonun yanı sıra mRNA ve proteinlerin sentezi ve degradasyonunda rol oynadığı belirlenmiştir (Şekil 4.14).

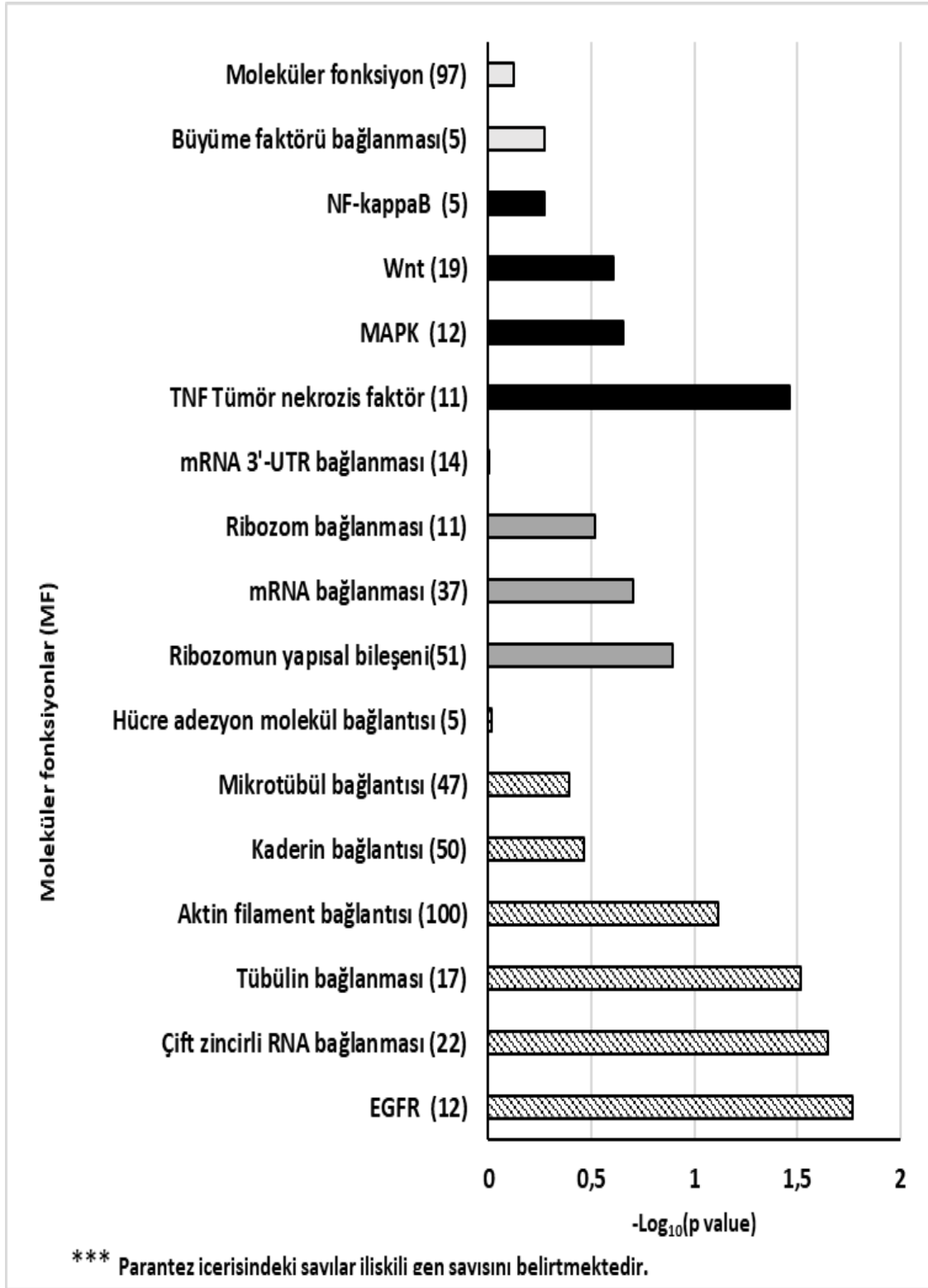
CC kategorisindeki genlerin çoğu hücre dışı matris, endoplazmik retikulum ve golgi lümeni ile bu iki organel arasındaki trafikten sorumlu veziküller, hücreye şeklini veren yapısal unsurlar (aktinler, mikrotübüller, hücre iskeleti), protein üretiminin merkezi olan ribozom ve mRNA kompleksi ile ilişkilidir (Şekil 4.15).



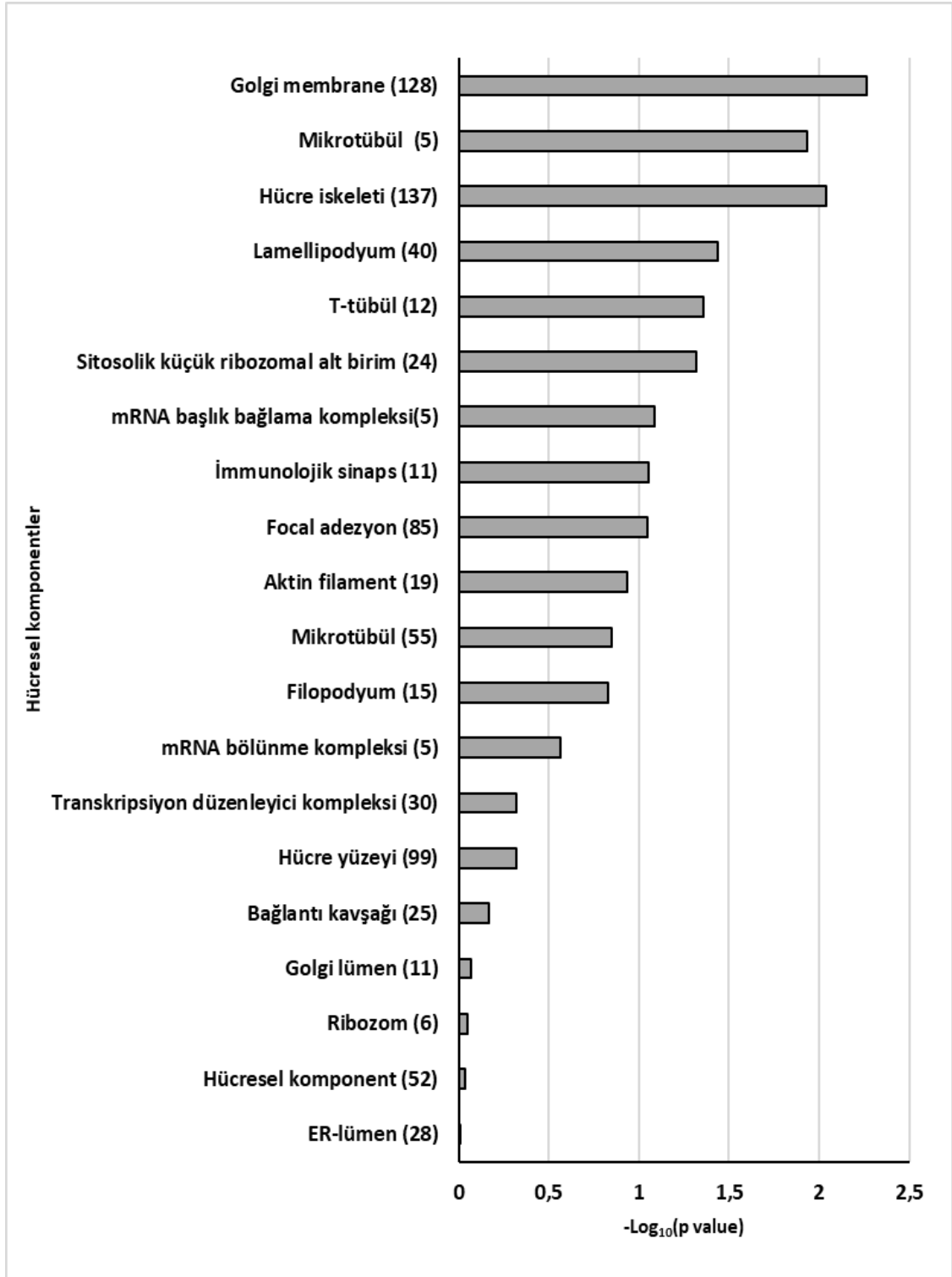
Şekil 4.12 miRNA-8078 ile ilişkili önemli genlerin KEGG yolak analizi sonuçları (P değeri <0,05, minimum sayısı 3 ve zenginleştirme faktörü >1,5 olan GO terimleri veya KEGG yolları istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi)



Şekil 4.13 miRNA-8078 ile ilişkili önemli genlerin biyolojik proses (BP) analizi sonuçları (P değeri <0,05, minimum sayısı 3 ve zenginleştirme faktörü >1,5 olan GO terimleri veya KEGG yolları istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi)



Şekil 4.14 miRNA-8078 ile ilişkili önemli genlerin moleküler fonksiyon (MF) analizi sonuçları (P değeri <0,05, minimum sayısı 3 ve zenginleştirme faktörü >1,5 olan GO terimleri veya KEGG yolları istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi)



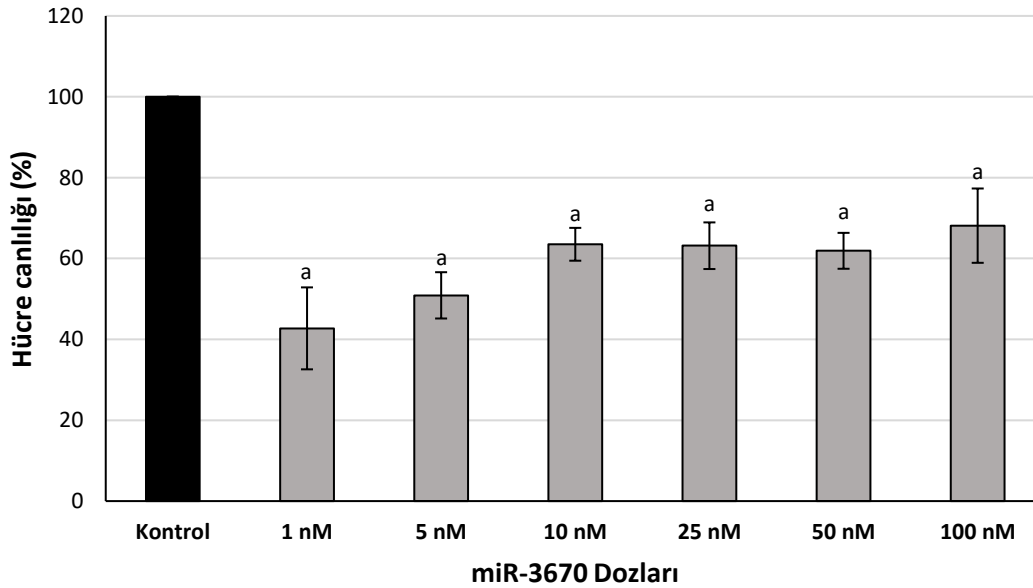
Şekil 4.15 miRNA-8078 ile ilişkili önemli genlerin hücresel komponent (CC) analizi sonuçları (P değeri <0,05, minimum sayısı 3 ve zenginleştirme faktörü >1,5 olan GO terimleri veya KEGG yolları istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi)

#### 4.2 miRNA'ların Sitotoksik Aktivitesi ve IC<sub>50</sub> Değerine İlişkin Bulgular

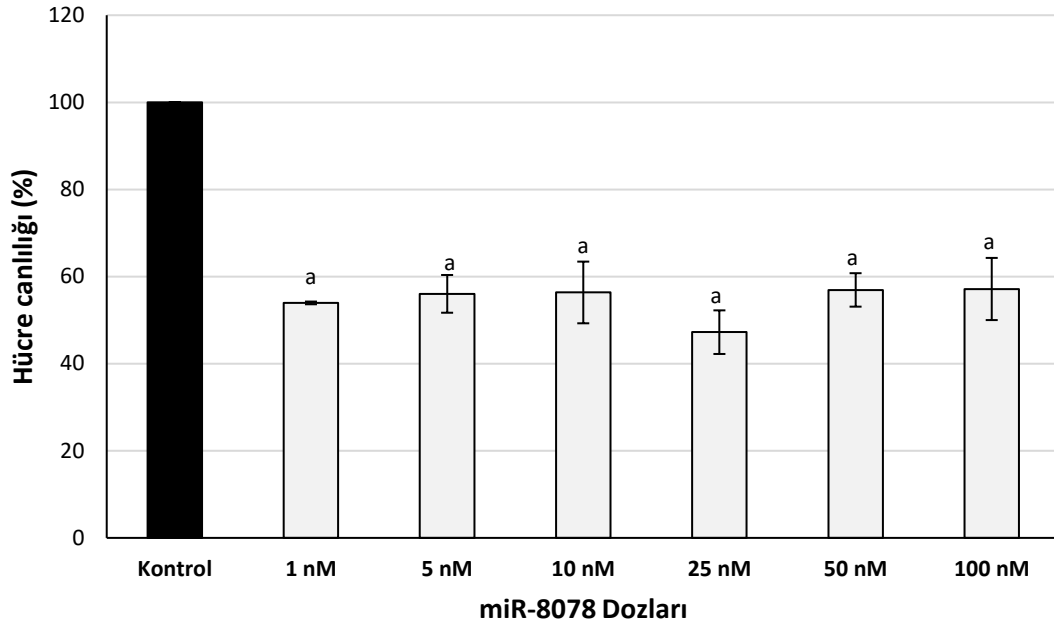
MTT sonuçlarına göre miRNA-3670 ve miRNA-8078'in tüm dozlarının MCF-7 hücre hattı üzerinde yüksek bir sitotoksikite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p \leq 0.05$ , Şekil 4.16-Şekil 4.17).

Sağlıklı HME1 hücre hattında da miRNA-3670 tüm dozları kontrol grubuna kıyasla kısmi sitotoksik etki göstermiş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0.05$ , Şekil 4.18). Aynı hücre hattında miRNA-8078 1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM dozları kontrol grubuna kıyasla sitotoksik etki göstermiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0.05$ , Şekil 4.19).

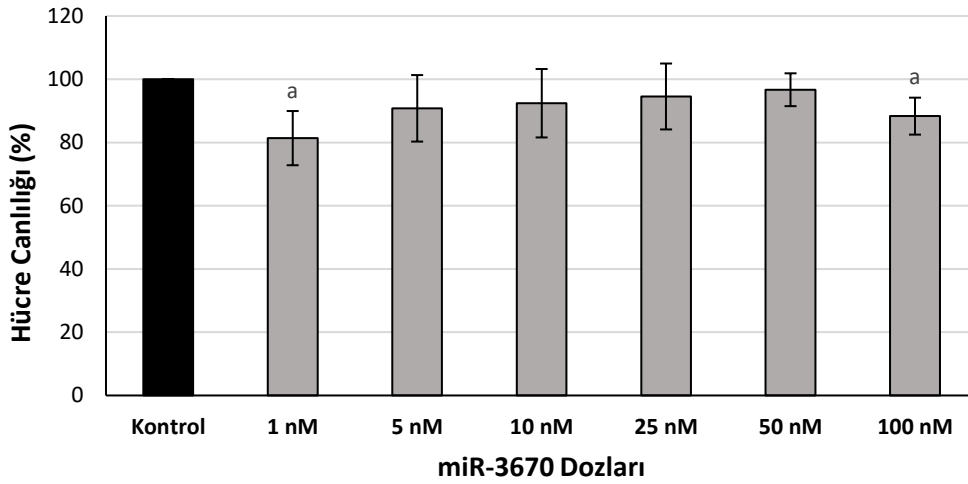
Yapılan sitotoksikite analizleri sonucunda miRNA-3670 ve miRNA-8078'in 1nM dozunun MCF-7 hücre hattında yüksek toksik etkiye, HME1 hücre hattında ise düşük toksik etkiye yol açtığı görülmüştür. MCF-7 ve HME1 hücre hatlarında miR-3670 ve miR-8078'in doza bağlı IC<sub>50</sub> değerleri analiz edildikten sonra, tüm gruplarda her iki miRNA için IC<sub>50</sub> değerinin 1nM'nin altında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).



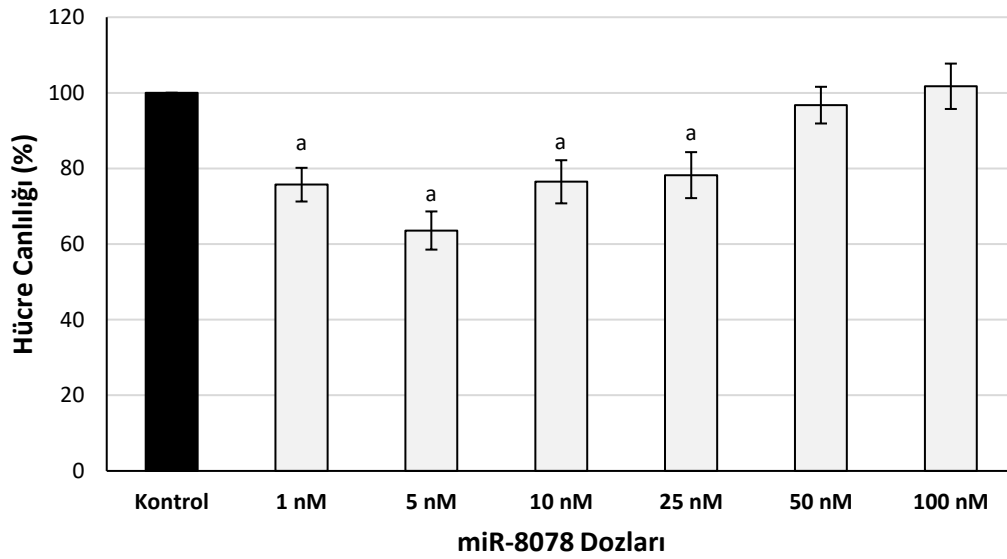
Şekil 4.16 miRNA-3670'in MCF-7 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki doza bağlı sitotoksik etkisi (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)



Şekil 4.17 miRNA-8078'in MCF-7 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki doza bağlı sitotoksik etkisi (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)



Şekil 4.18 miRNA-3670'in HME1 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki doza bağlı sitotoksik etkisi (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)



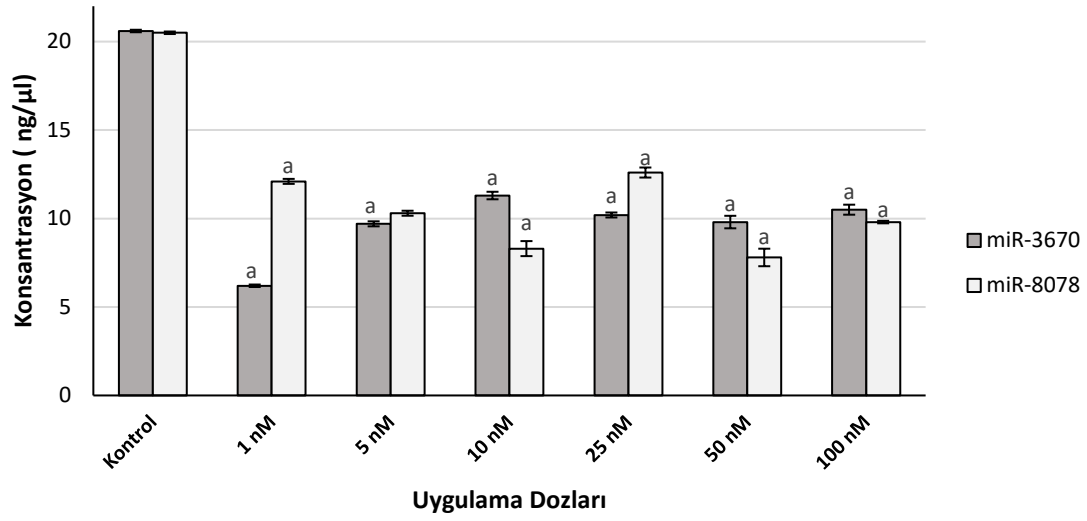
Şekil 4.19 miRNA-8078'in HME1 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki doza bağlı sitotoksik etkisi (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

Çizelge 4.3 miR-3670 ve miR-8078'in  $IC_{50}$  değerleri

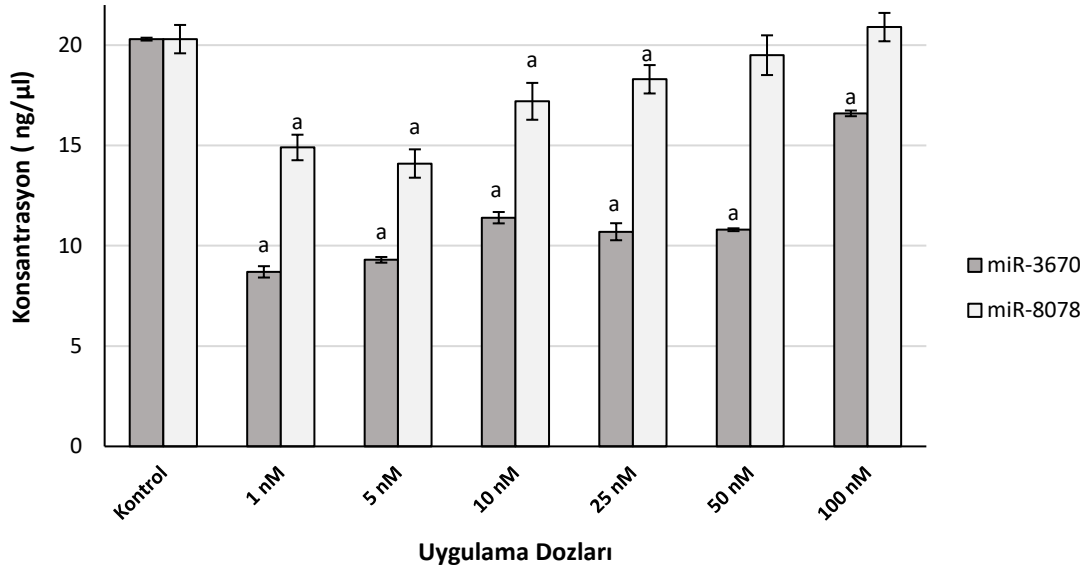
| Uygulama Grupları | $IC_{50}$   |               |
|-------------------|-------------|---------------|
|                   | MCF-7       | HME1          |
| Hsa-miRNA-3670    | 175.8pmol/L | 116684 pmol/L |
| Hsa-miRNA-8078    | 111.5pmol/L | 41891 pmol/L  |

#### 4.3 Total RNA İzolasyonuna Ait Bulgular

MCF-7 ve HME1 hücrelerinin farklı dozlarda miR-3670, miR-8078 sentetik mimik miRNA'lar ile transfeksiyonundan sonra, bu hücrelerden yapılan toplam RNA izolasyonlarından elde edilen spektrofotometrik değerler, incelendiğinde total RNA seviyesinin kontrole göre miRNA uygulanan gruplarda ciddi oranda düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca toplam RNA konsantrasyonları ve sitotoksikite bulgularıyla uyumlu bulunmuştur (Şekil 4.20-4.21).



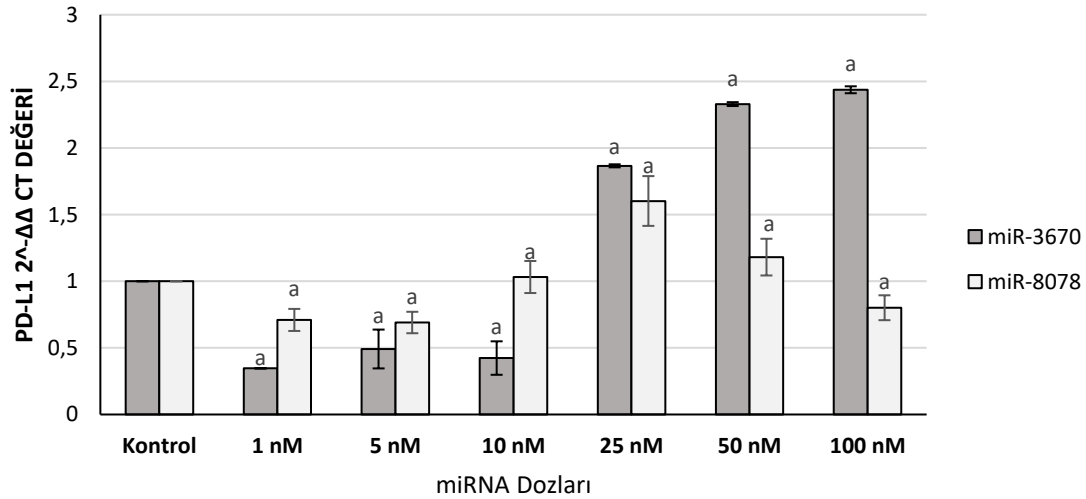
Şekil 4.20 MCF-7 hücre hattının miR-3670 ve miR-8078 ile uygulanmasından sonra izole edilen total RNA konsantrasyonlarının doza bağlı değerleri (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)



Şekil 4.21 HME1 hücre hattının miR-3670 ve miR-8078 ile uygulanmasından sonra izole edilen total RNA konsantrasyonlarının doza bağlı değerleri (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

#### 4.4 Real Time PCR ile PD-L1'in İfadesinin Analizine Ait Bulgular

Bu analizin amacı, miR-3670 ve miR-8078 sentetik mimiklerinin farklı dozlarının PD-L1 ligandının mRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkinliğini incelemektir. Sentetik mimik miR-3670 ve miR-8078, MCF-7 ve HME1 hücrelerine değişen dozlarda transfekte edilmiştir. Ardından miRNA ile muamele edilmiş hücrelerden elde edilen total RNA'lar cDNA'ya çevrilmiştir. Her grup kendi kontrol grubuyla karşılaştırıldı ve kat değişimleri hesaplandı. Daha sonra istatistiksel analiz yapıldı. miRNA-3670 mimiğinin 1nM, 5nM ve 10nM dozlarının uygulanmasının MCF-7 hücrelerinde PD-L1 mRNA seviyelerinde önemli bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Tersine, 25nM, 50nM ve 100nM dozları, herhangi bir uygulama almayan kontrol grubuna kıyasla genin mRNA ekspresyon seviyelerini artırmıştır. Çalışma, 1nM, 5nM ve 100nM dozlarındaki miRNA-8078 mimiğinin, kontrol grubuna kıyasla aynı hücre hattı grubunda PD-L1'in mRNA seviyesinde önemli bir azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur. Tersine, aynı miRNA'nın 25nM ve 50nM dozları PD-L1'in mRNA seviyesini önemli ölçüde artırmıştır. Analiz sonuçları Şekil 4.22'de grafik ve Çizelge 4.4'da tablo olarak sunulmuştur.



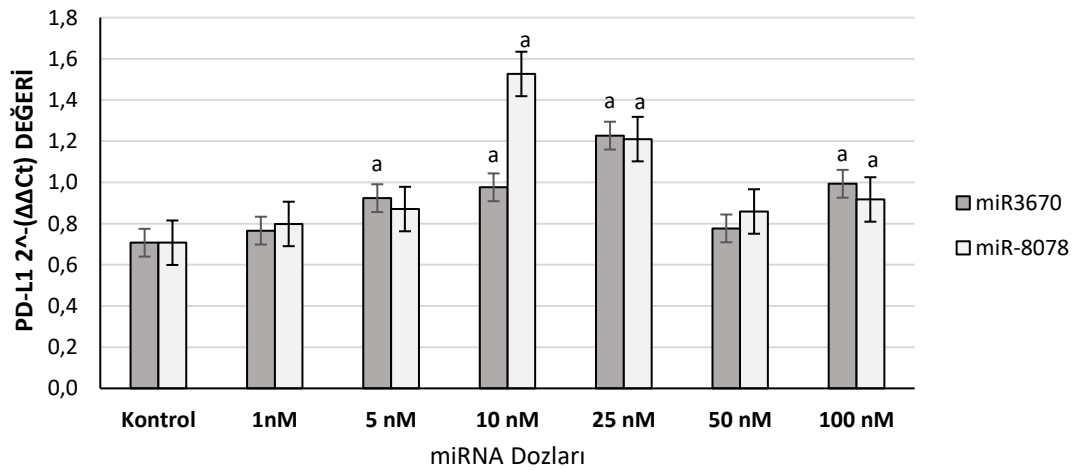
Şekil 4.22 Farklı dozlarda miR-3670 ve miR-8078 ile transfekte edilen MCF-7 hücre hattında PD-L1 gen ekspresyon seviyesinin grafiksel gösterimi (Bar yüksekliği ile mRNA gen ifade düzeyi doğru orantılıdır. Veriler ortalama ve standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

Çizelge 4.4 MCF-7 hücre hattında PD-L1'in mRNA gen ifade düzeyi

|       | Uygulanan miRNA |                 | Kontrol             | 1 nM                | 5 nM                | 10 nM               | 25 nM               | 50 nM               | 100 nM              |
|-------|-----------------|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| MCF-7 | miR-3670        | Ort $\Delta$ Ct | 37.50<br>$\pm 0.11$ | 38.25<br>$\pm 0.30$ | 37.74<br>$\pm 0.07$ | 37.96<br>$\pm 0.03$ | 35.82<br>$\pm 0.03$ | 35.50<br>$\pm 0.37$ | 35.43<br>$\pm 0.01$ |
|       |                 | Kat değişimi    | 2.89                | -2.03               | -2.36               | -1.87               | 2.33                | 2.44                | 2.89                |
|       |                 | p değeri        | $p \leq 0.05$       | $p \leq 0.05$       | $p \leq 0.05$       | $p \leq 0.05$       | $p \leq 0.05$       | $p \leq 0.05$       | $p \leq 0.05$       |
| MCF-7 | miR-8078        | Ort $\Delta$ Ct | 36.20<br>$\pm 0.65$ | 36.44<br>$\pm 0.13$ | 36.48<br>$\pm 0.17$ | 35.90<br>$\pm 0.19$ | 35.26<br>$\pm 0.40$ | 35.70<br>$\pm 0.10$ | 36.26<br>$\pm 0.27$ |
|       |                 | Kat değişimi    | 1.41                | -1.45               | -0.97               | 1.60                | 2.26                | 2.32                | -1.41               |
|       |                 | p değeri        | $p \leq 0.05$       | $p \leq 0.05$       | $p \leq 0.05$       | $p \leq 0.05$       | $p \leq 0.05$       | $p \leq 0.05$       | $p \leq 0.05$       |

<sup>1</sup> Veriler ortalama $\pm$ standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a: $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla.

HME1 hücrelerinde yapılan RT-PCR analizi sonucunda PDL-1'in mRNA seviyesinin kontrol grubuna kıyasla miRNA-3670 mimiğinin tüm dozlarında yükseldiği tespit edilmiştir ( $p \leq 0.05$ ). İlgili genin mRNA ifadesi özellikle 25 nM konsantrasyonda belirgin bir şekilde artmıştır ( $p \leq 0.05$ ). Benzer şekilde, miRNA-8078 mimiğinin tüm dozları, özellikle de 10 nM dozu, kontrol grubuna kıyasla PD-L1 mRNA seviyelerinde bir artışa yol açmıştır ( $p \leq 0.05$ ). Analiz sonuçları şekil 4.23'te grafiksel olarak ve Çizelge 4.5'te tablo halinde sunulmuştur.



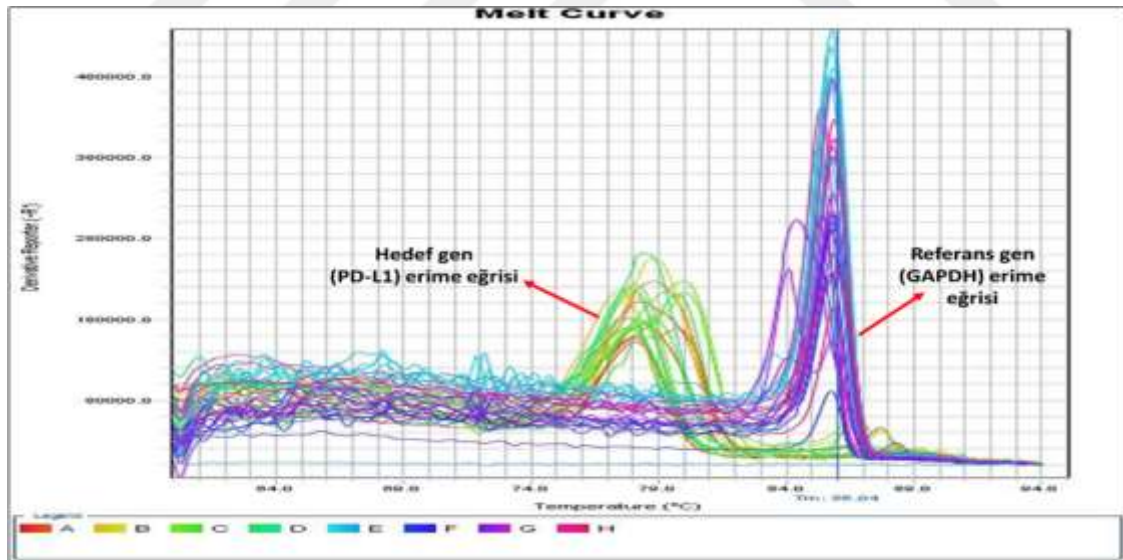
Şekil 4.23 Farklı dozlarda miR-3670 ve miR-8078 ile transfekte edilen HME1 hücre hattında PD-L1 geninin ifade düzeyinin grafiksel gösterimi (Bar yüksekliği ile mRNA gen ifade düzeyi doğru orantılıdır. Veriler ortalama ve standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a: $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

Çizelge 4.5 HME1 hücre hattında PD-L1 mRNA gen ifade düzeyi

| Uygulanan miRNA |          |              | Kontrol | 1 nM   | 5 nM   | 10 nM  | 25 nM  | 50 nM  | 100nM  |
|-----------------|----------|--------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| HME1            | miR-3670 | Ort ΔCt      | 34.8    | 35.18  | 34.91  | 34.83  | 34.50  | 35.16  | 34.81  |
|                 |          |              | ±0.10   | ±0.26  | ±0.21  | ±0.68  | ±0.49  | ±0.43  | ±0.89  |
|                 |          | Kat değişimi | 0.92    | 0.77   | 1.38   | 1.74   | 0.91   | 1.40   | 0.92   |
|                 |          | p değeri     | p≥0.05  | p≥0.05 | p≤0.05 | p≤0.05 | p≤0.05 | p≥0.05 | p≤0.05 |
| HME1            | miR-8078 | Ort ΔCt      | 37.23   | 37.55  | 37.42  | 36.61  | 36.95  | 37.44  | 37.35  |
|                 |          |              | ± 0.11  | ±0.30  | ± 0.21 | ±0.24  | ±0.31  | ±0.15  | ±0.32  |
|                 |          | Kat değişimi | 1.05    | 1.11   | 2.41   | 2.00   | 1.09   | 0.66   | 1.05   |
|                 |          | p değeri     | p≥0.05  | p≥0.05 | p≥0.05 | p≤0.05 | p≤0.05 | p≥0.05 | p≤0.05 |

<sup>1</sup> Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:p≤0.05 kontrol grubuna kıyasla.

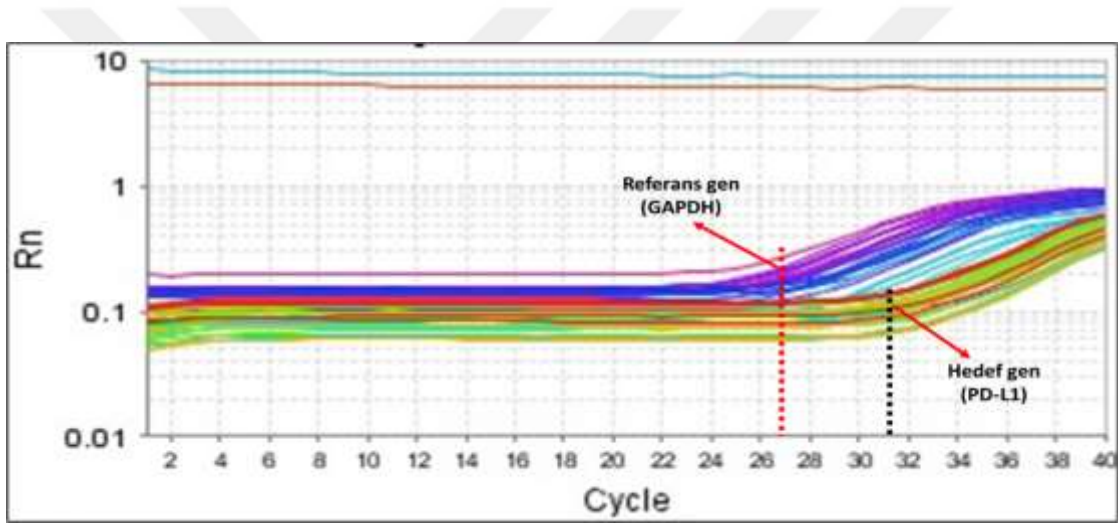
Amplifiye edilen DNA'nın istenen hedef bölge olduğunu doğrulamak için, miR-3670 ve miR-8078 uygulanan meme kanseri hücrelerinden elde edilen DNA'lara PCR sonrasında erime eğrisi analizi uygulanmıştır. Erime eğrisi analizi sonucunda RT-PCR ile çoğaltılan bölgelerin istenen bölgeler olduğu ve tüm hedef gen (PD-L1) bölgelerinin aynı sıcaklıkta eridiği, benzer şekilde tüm referans gen (GAPDH) bölgelerinin de farklı sıcaklıkta aynı noktada eridiği tespit edilmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24 PD-L1 ve GAPDH genlerinin erime eğrisi grafiği

Amplifikasyon eğrisi grafiğindeki döngü eşiği yani Ct değeri, RT-PCR analizi sırasında numunedeki ilgili genin konsantrasyonunu (düşük ekspresyonlu, orta ekspresyonlu ve yüksek ekspresyonlu) sınıflandırmamızı sağlayan yarı kantitatif bir

ölçüdür. Grafikteki düşük bir Ct değeri genellikle ilgili genin yüksek oranda ifade edildiğini gösterirken, yüksek bir Ct değeri genellikle hedef genin daha az ifade edildiğini gösterir. Amplifikasyon eğrisi grafiği incelendiğinde hedef gen olarak belirlenen PD-L1'in Ct değerlerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, miR-3670 ve miR-8078'in farklı dozlarının MCF-7 hücre hattında PD-L1 mRNA ekspresyonunun azalmasına neden olduğunu göstermektedir (Şekil 4.25). Aynı grafik incelendiğinde, referans gen olarak kullanılan GAPDH'nin (Gliseralehit 3-fosfat dehidrojenaz) Ct değerlerinin hedef genin Ct değerine kıyasla daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, ilgili miRNA'ların GAPDH mRNA'yı hedeflemediğini göstermektedir (Şekil 4.25).

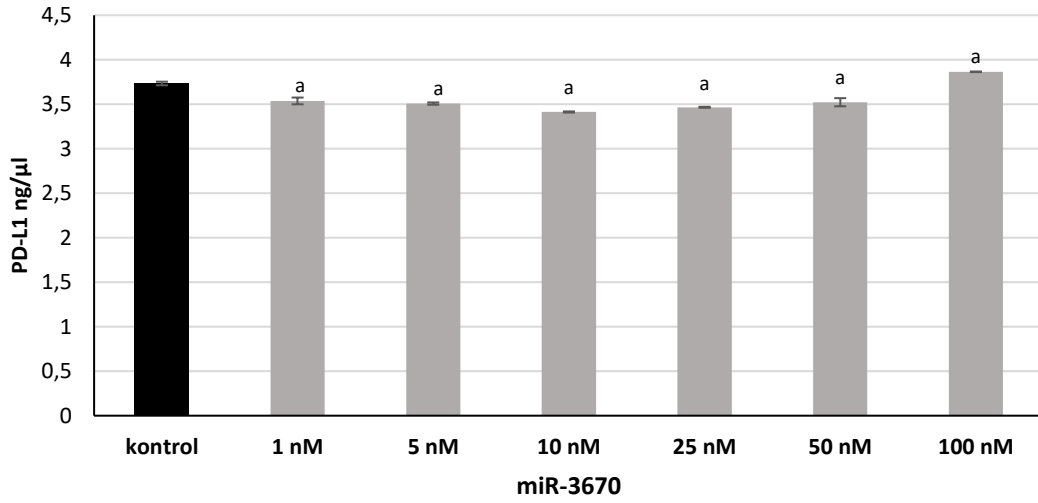


Şekil 4.25 PD-L1 ve GAPDH genleri için döngü başına floresan emisyonu birikimini gösteren amplifikasyon eğrisi grafiği

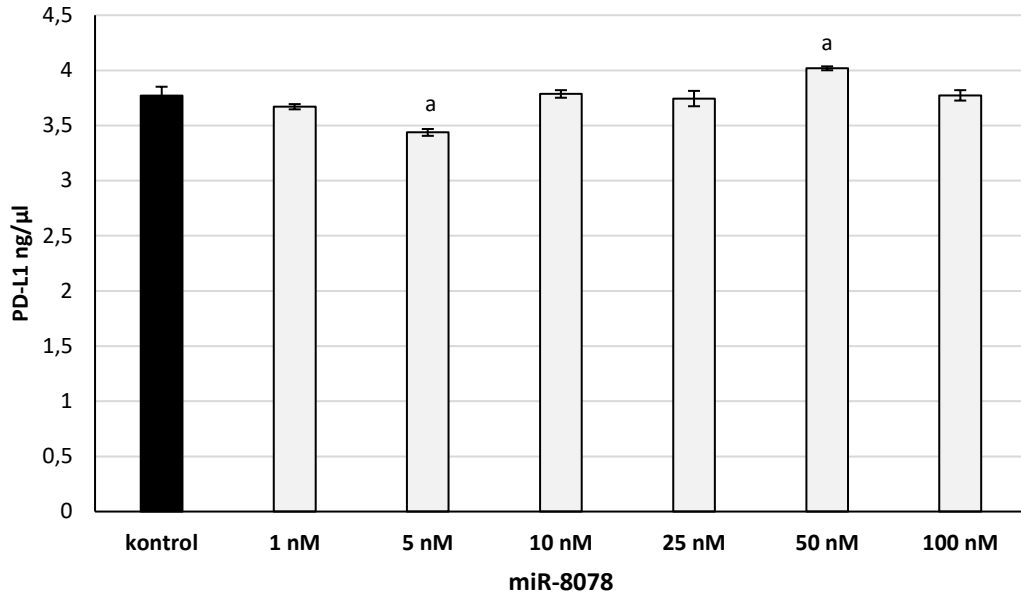
#### 4.5 Serbest PD-L1 Analizine Ait Bulgular

Bu testin amacı, miR-3670, miR-8078 uygulaması sonrasında kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçışında rol oynayan süpernatanttaki serbest PD-L1'in antijen düzeyine etkisini belirlemektir. Bu amaçla, MCF-7 ve HME1 hücre hatları farklı dozlarda (1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM) sentetik mimik miR-3670 ve miR-8078 ile transfekte edilmiştir. Analizimiz, MCF-7 kanser hücre hattında 100 nM miR-3670 dışındaki dozların, hücrenin süpernatantlarındaki serbest PD-L1 antijen seviyesini başarılı bir şekilde azalttığını ve istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir ( $p < 0.05$ ). MCF-7 hücrelerine çeşitli miktarlarda miR-8078

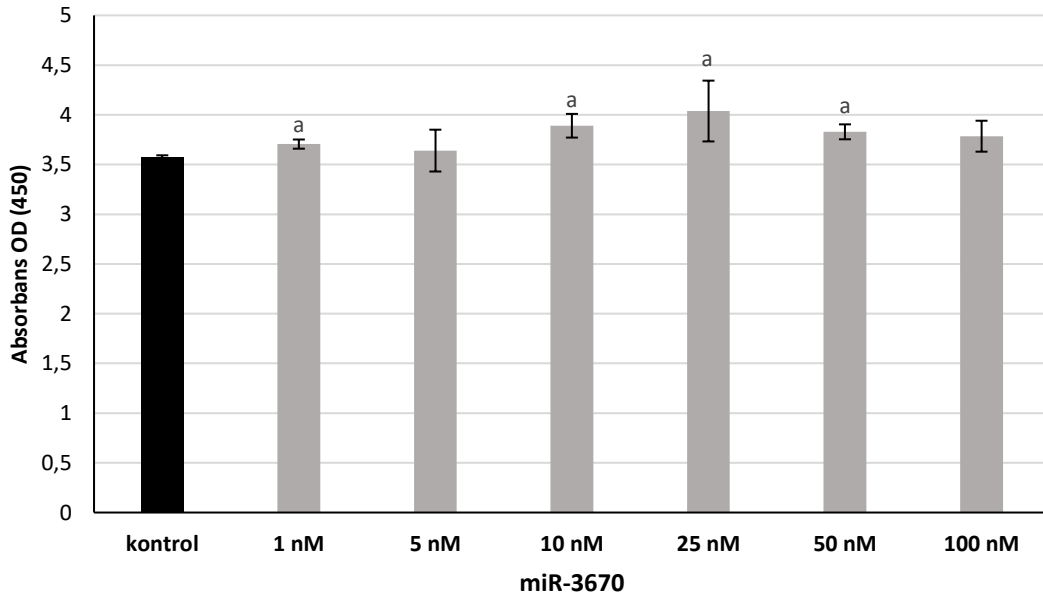
uygulanmasından elde edilen süpernatantlarda, serbest PD-L1 antijen seviyesinde hem 1nM hem de 5 nM dozlarında azalma gözlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı ve en keskin düşüşün 5 nM dozunda olduğu belirlendi ( $p \leq 0.05$ , Şekil 4.26-4.27). Sağlıklı meme dokusu hücre hattı HME1 üzerinde yapılan analizde, miR-3670'in tüm dozlarının hücrelerden elde edilen süpernatantlardaki serbest PD-L1 antijen seviyelerinde kısmi bir artışa neden olduğu 1 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM dozlardaki artışın istatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) tespit edilmiştir ( $p \leq 0.05$ ), Şekil 4.28). Aynı hücre hattına miR-8078 uygulandıktan sonra süpernatantlarda serbest PD-L1 antijen seviyelerinde kısmi artışlar tespit edilmiştir. Artış 10 nM için istatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) ve 25 nM için istatistiksel olarak anlamsızdı ( $p \geq 0.05$ ). miR-8078'in 1 nM, 50 nM ve 100 nM dozları ile muamele edilen hücrelerden elde edilen süpernatantlardaki serbest PD-L1 antijen seviyeleri azalmış istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş bulunmuştur ( $p \leq 0.05$ , Şekil 4.29).



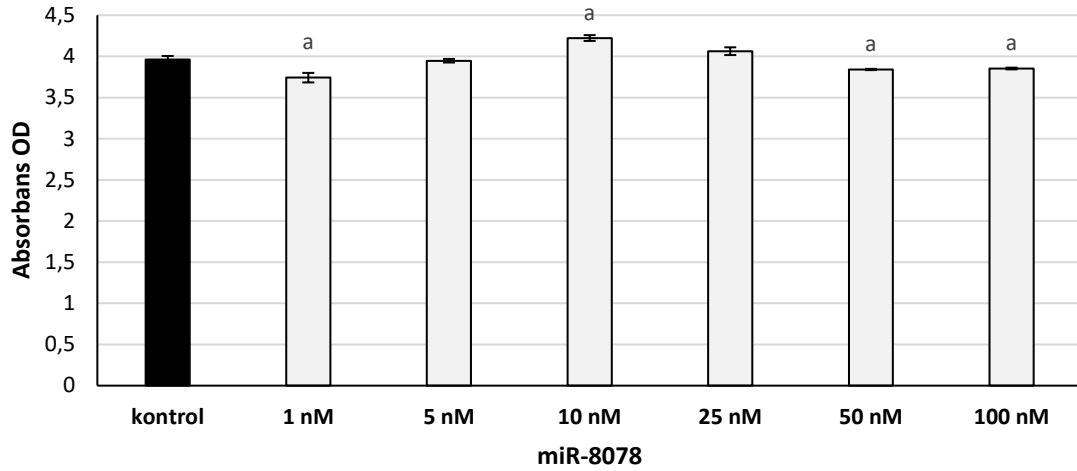
Şekil 4.26 miR-3670 uygulanan MCF-7 hücre hattında doza bağlı serbest PD-L1 antijen miktarları. (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)



Şekil 4.27 miR-8078 uygulanan MCF-7 hücre hattında doza bağlı serbest PD-L1 antijen miktarları (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)



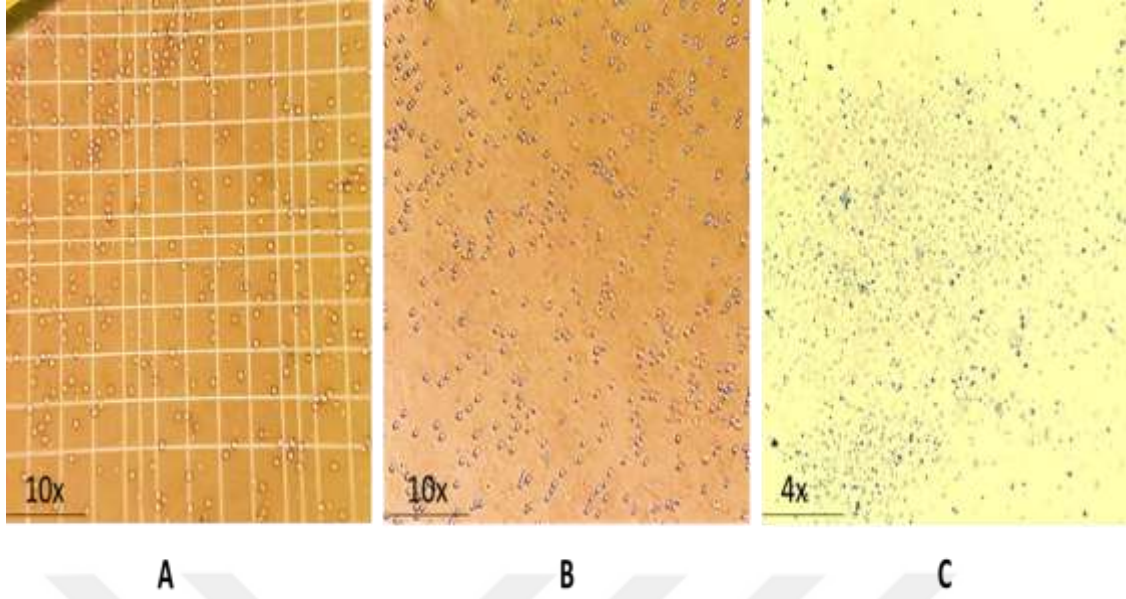
Şekil 4.28 miR-3670 uygulanan HME1 hücre hattında doza bağlı serbest PD-L1 antijen miktarları. (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)



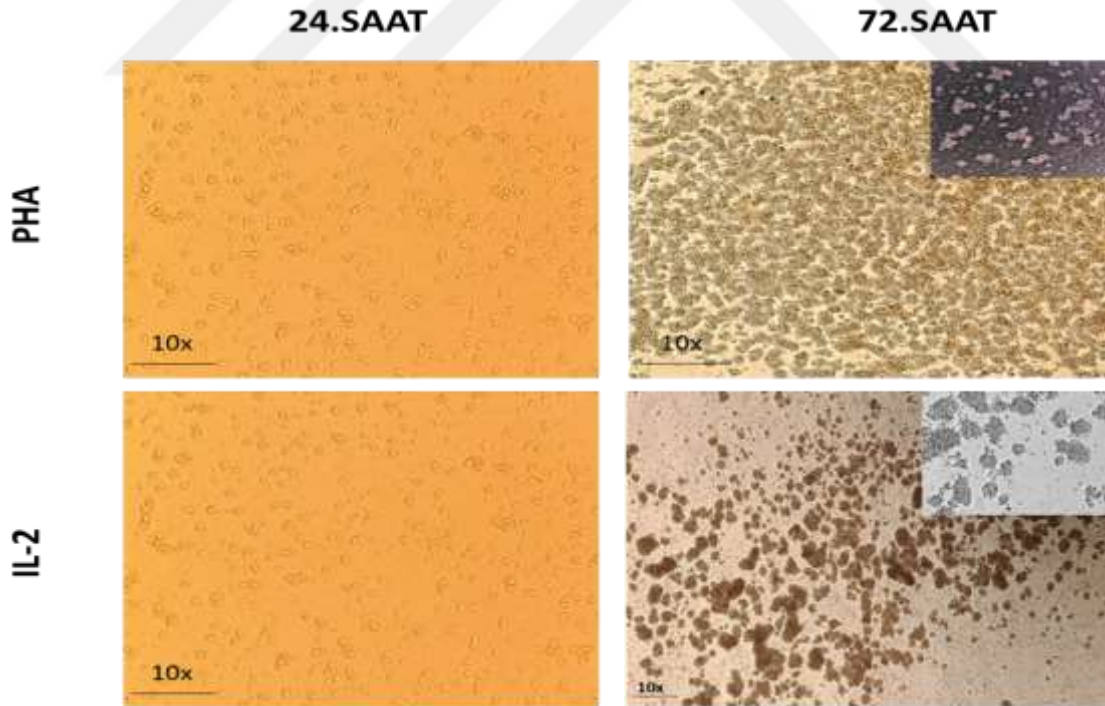
Şekil 4.29 miR-8078 uygulanan HME1 hücre hattında doza bağlı serbest PD-L1 antijen miktarları (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

#### 4.6 Kanser Hücre Hattı ile CD8<sup>+</sup> T Hücrelerinin Ko-Kültürü

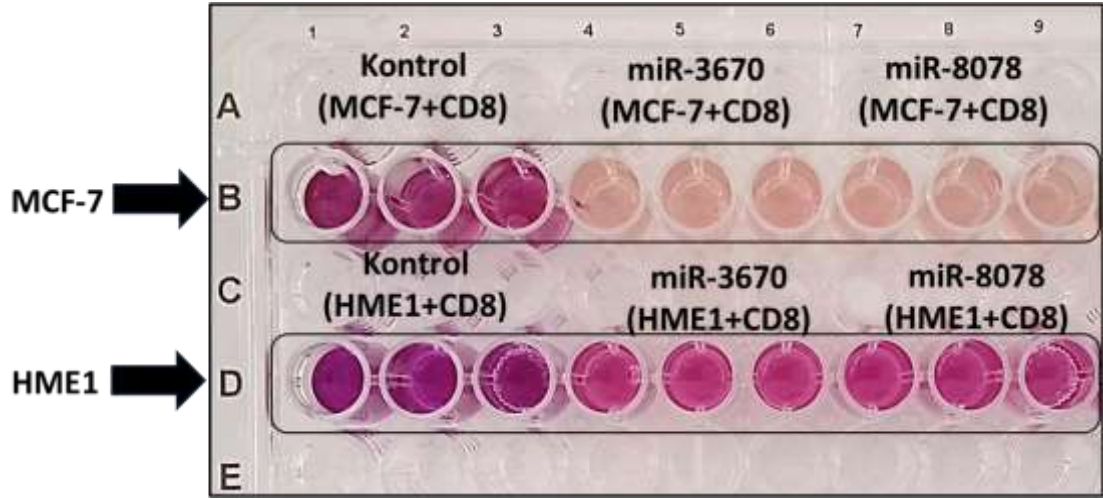
Ko-kültür, aynı kültür ortamında iki farklı hücre tipinin doğrudan veya dolaylı olarak kültürlenmesine yönelik bir yöntemdir (Paschos vd., 2015). Kanser ko-kültür modeli, kanser hücreleri ile immün hücreleri arasındaki etkileşimi verimli bir şekilde simüle edebildiği için kanser immünolojisi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda miR-3670 ve miR-8078'in kanser hücrelerinin immünojenitesi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla *in vitro* ko-kültür testi gerçekleştirildi. Bu amaçla PBMC'lerden magnetik sort yöntemi ile CD8<sup>+</sup> izolasyonu gerçekleştirildi ve CD8<sup>+</sup>T hücrelerinin morfolojik kontrolü giemsa boyama ile kontrol edildi (Şekil 4.30). CD8<sup>+</sup>T hücreleri, sırasıyla PHA (Fitohemaglutinin) ve IL-2'ile uyarılmasının ardından hücrelerin yeterli miktarda çoğaldığı belirlendi (Şekil 4.31). Uyarılmış CD8<sup>+</sup>T hücreleri miR-3670 ve miR-8078 mimikle (1 nM) transfekte edilmiş MCF-7 ve HME1 hücreleriyle birlikte 10:1 (T:E) oranında 48 saat kültürlendi. Kültürleme işleminin ardından yapılan MTT analizinde, miRNA uygulanan kanser hücrelerindeki PD-L1'in azalmasına bağlı olarak bağı T hücresi aracılı sitotoksitenin arttığı ve kanser hücrelerinde güçlü bir ölüm oranı (%80) tespit edildi (Şekil 4.32-Şekil 4.33). miRNA uygulanan HME1 hücrelerinde ise kısmi bir sitotoksiste gözlemlenmiştir.



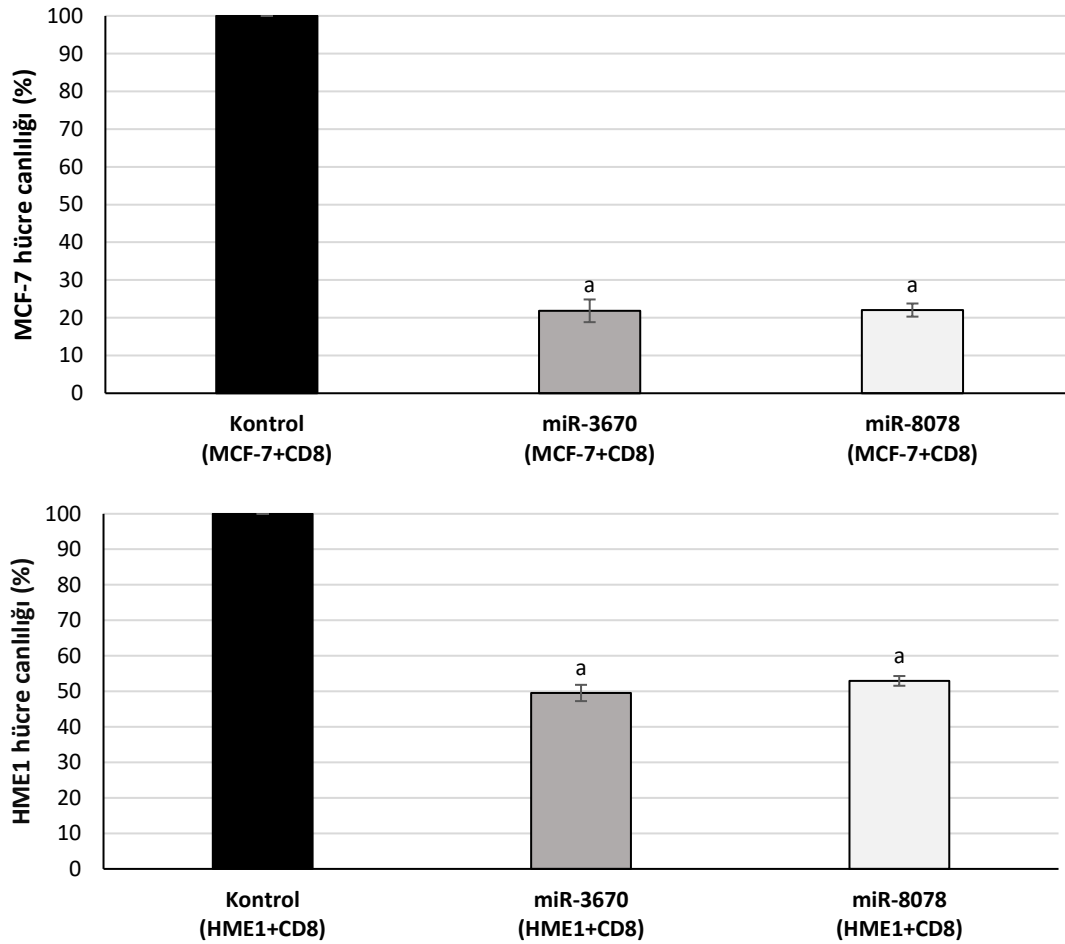
Şekil 4.30 İzolasyonu gerçekleştirilen CD8<sup>+</sup>T hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (Olympos CKX31’da 10x büyütme, **A**:Magnetik sort sonrası Thoma lamdaki görüntü, **B**:Magnetik sort sonrası petri kabındaki görüntüsü, **C**:Giemsa boyama görüntüsü)



Şekil 4.31 CD8<sup>+</sup>T hücrelerinin PHA (Fitohemaglutinin) ile aktivasyon sonrası inverted mikroskop görüntüsü (Olympos CKX31’da 10x büyütme)



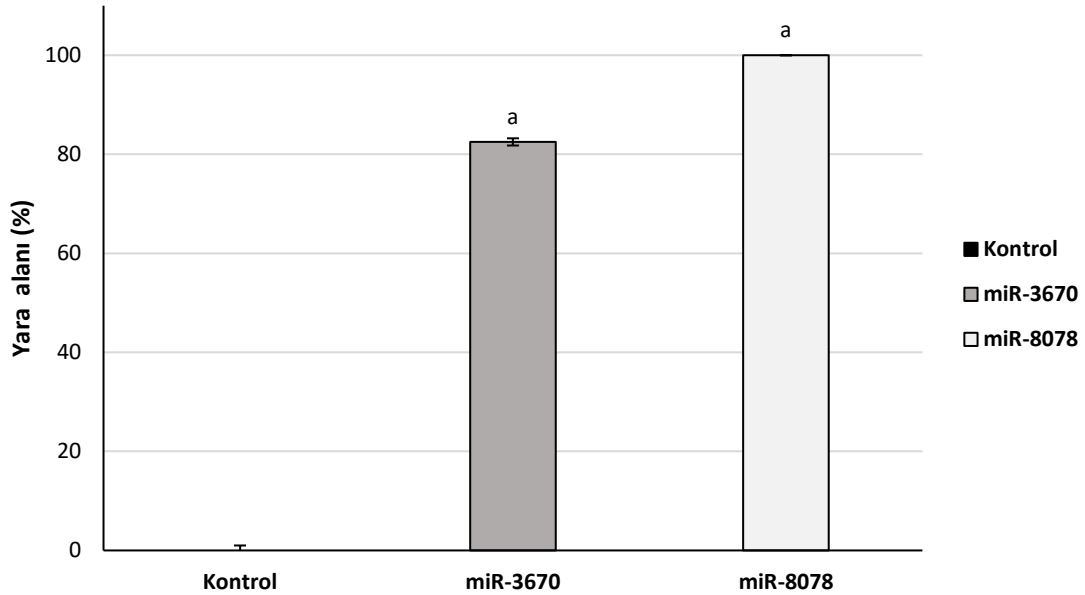
Şekil 4.32 Ko kültür (CD8<sup>+</sup>T/MCF-7, CD8<sup>+</sup>T/HME1) sonrası yapılan MTT analizine ait multiplate görüntüsü



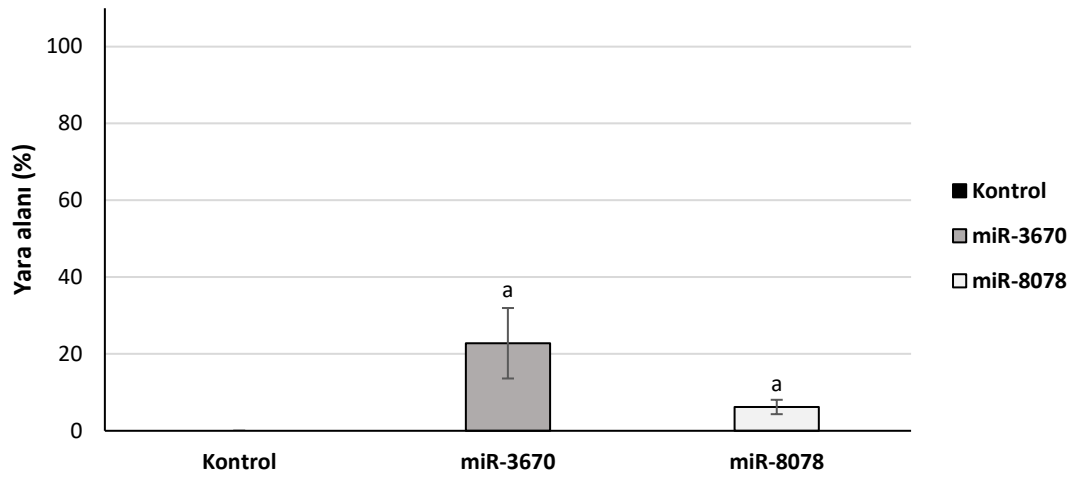
Şekil 4.33 miRNA uygulanan MCF-7 ve HME1 hücreleri ile CD8<sup>+</sup>T hücrelerinin ortak kültürü sonrası canlılık grafikleri (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a: p<0.05 kontrol grubuna kıyasla)

#### 4.7 Hücre Göçü Analizi Bulguları

Yara iyileşme testi, bir maddenin veya uygulamanın hücre göçü üzerindeki etkisini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Araştırmamız, miR-3670 ve miR-8078'in kanser hücrelerindeki anti-metastatik etkinliğini bu test aracılığıyla değerlendirmeyi amaçlamıştır. Bu amaçla, MCF-7 ve HME1 hücreleri 1nM konsantrasyonda miR-3670 ve miR-8078 ile transfekte edilmiş ve yara iyileşmesi analiz edilmiştir. Her iki hücre hattında miRNA uygulanmamış grup negatif kontrol olarak kabul edildi. Çalışmada, miR3670 ve miR-8078 MCF-7 hücrelerine uygulandıktan sonra, negatif kontrole kıyasla hücre göçünün önemli ölçüde inhibisyonu ile sonuçlanmıştır (Sırasıyla %81.47 ve %99.9). Aynı miRNA'lar sağlıklı meme dokusu hücrelerinde hücre göçünü inhibe edemediği (sırasıyla %22.8 ve %6.2) tespit edilmiştir ve her iki sonuçta istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0.05$ ). (Şekil 4.34, Şekil 4.35, Çizelge 4.6).



Şekil 4.34 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücre hattında grubuna ait yara iyileşmesi yüzde grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)



Şekil 4.35 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan HME1 hücre hattında grubuna ait yara iyileşmesi yüzde grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

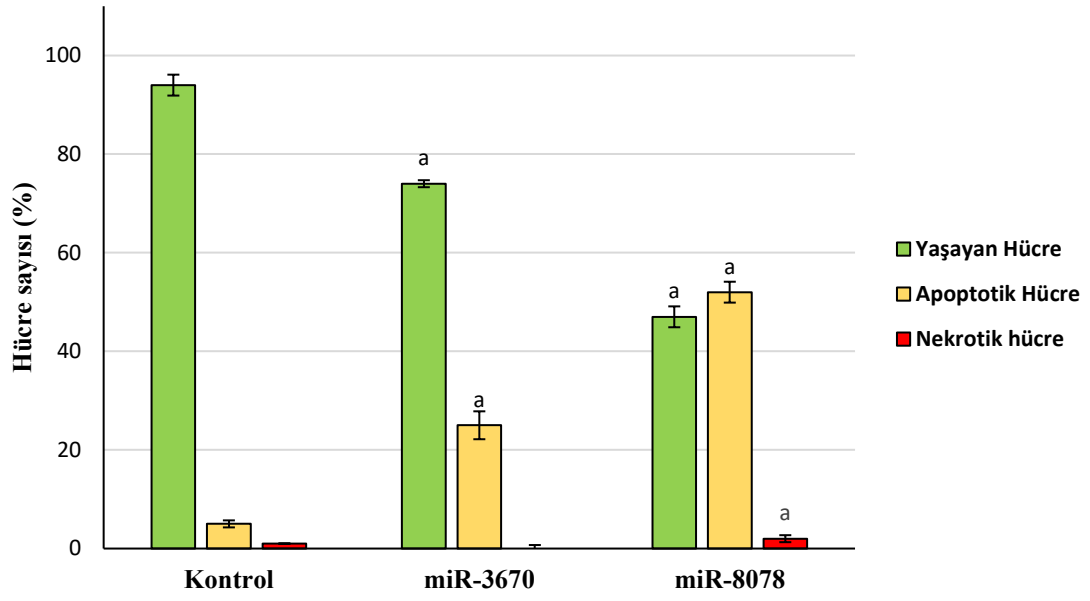
Çizelge 4.6 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 ve HME1 hücre hatlarına ait yara iyileşmesi analizi görüntüsü (10x Büyütme)

| Zaman<br>Hücre | Kontrol<br>0.Saat | Kontrol<br>48. Saat | miR-3670<br>0. Saat | miR-3670<br>48. Saat | miR-8078<br>0. Saat | miR-8078<br>48. Saat |
|----------------|-------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
|                |                   |                     |                     |                      |                     |                      |
| MCF-7          |                   |                     |                     |                      |                     |                      |
| HME1           |                   |                     |                     |                      |                     |                      |

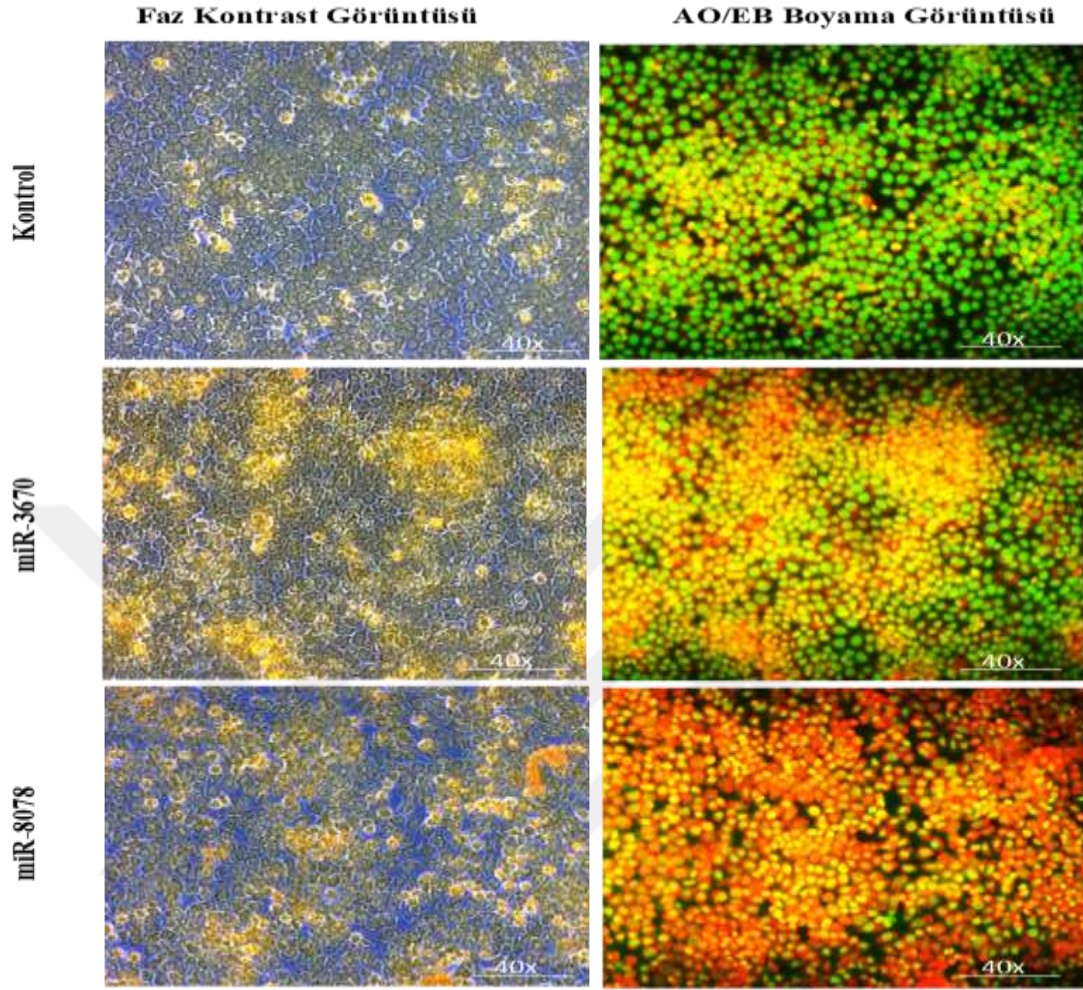
#### 4.8 Apoptoz ve Nekroz Analiz Bulguları

MCF-7 ve kontrol HME1 hücrelerine 1nM miR-3670 ve miR-8078 dozlarının uygulanmasından sonra ilgili miRNA'ların apoptoz indüksiyonu üzerindeki etkisini gözlemlemek için AO/EB immünofloresan boyama yapıldı. AO/EB uygulamasından sonra sağlıklı hücreler yeşil, erken evre apoptozdaki hücreler yoğunlaşmış ve parçalanmış çekirdekleriyle sarı-yeşil bir renk sergilemiştir. Geç evre apoptotik hücreler yoğunlaşmış veya parçalanmış çekirdekleriyle parlak turuncu renkte görünmüştür. Geç apoptotik ve nekrotik (ölü) hücreler hasarlı membranlara sahip hücreler olduğundan dolayı AO/EB immünofloresan boyama sonrası kırmızı bir renk sergilemiştir. AO/EB analizi sonuçlarına göre, miR-3670 ve miR-8078'in 1nM dozunun MCF-7 hücrelerinde hücre sağkalımını azaltarak apoptozu indüklediği ve negatif kontrole kıyasla apoptotik hücreleri önemli ölçüde artırdığı bulunmuştur (Şekil 4.36-Şekil 4.37).

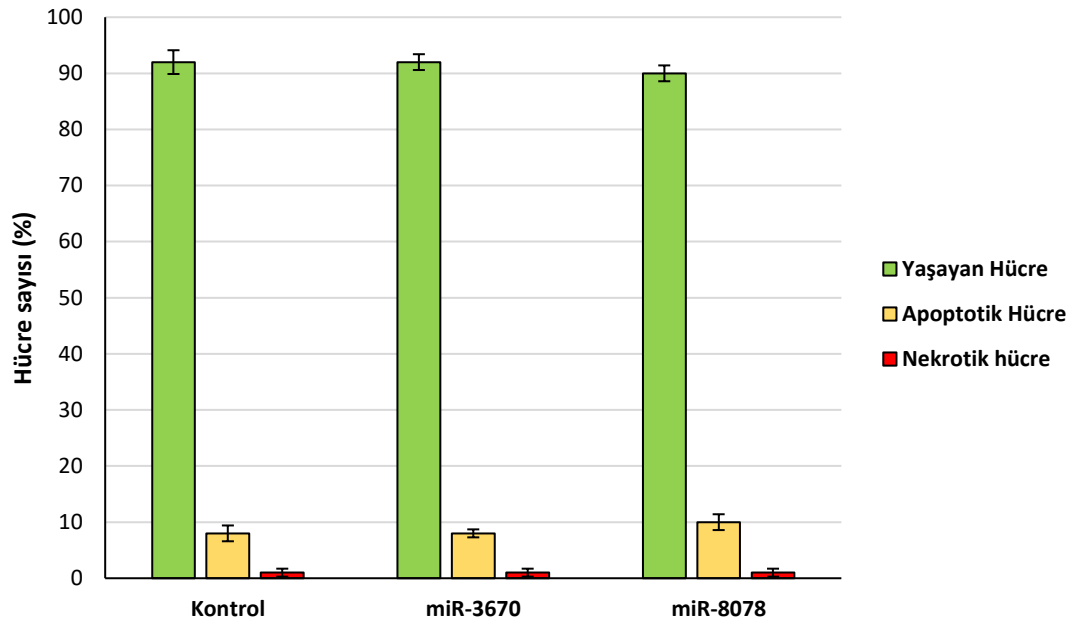
Bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlıdır ( $p \leq 0.05$ ). Çalışma sonuçları analiz edildiğinde, apoptotik oran miR-8078 grubunda %52 ve miR-3670 grubunda %25 olarak bulunmuş ve miR-8078'in MCF-7 meme kanseri hücrelerinde daha fazla apoptozise neden olduğu görülmüştür. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p \leq 0.05$ ). Negatif kontrol grubunda hücre kültürü işlemi sürecinde sıradan ölü hücrelerden oluşan sadece az sayıda apoptotik hücre (%5) tespit edilmiştir (Şekil 4.36, Şekil 4.37). HME1 hücrelerinde, 48 saat boyunca 1nM dozunda miR-3670 ve miR-8078 uygulanmasının apoptoz seviyesinde önemli bir değişikliğe neden olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p \leq 0.05$ , Şekil 4.38, Şekil 4.39).



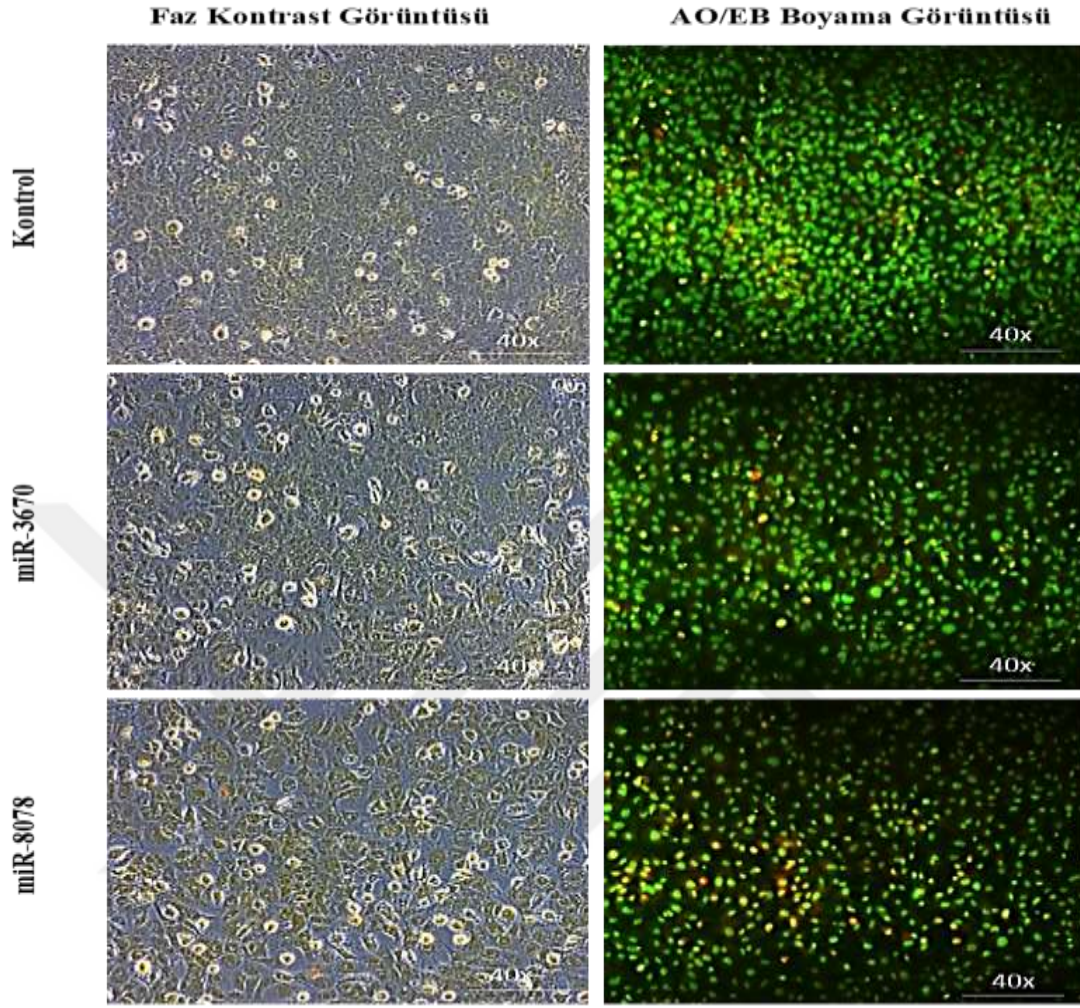
Şekil 4.36 MCF-7 hücrelerinin 48 saat boyunca miR-3670 ve miR-8078 ile muamelesinden sonra apoptotik ve nekrotik hücre seviyelerini gösteren yüzde grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)



Şekil 4.37 miR-3670 ve miR-8078 ile 48 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücrelerinin AO-EtBr boyama yöntemiyle apoptozun tespiti (Yeşil renk canlı hücreleri, sarı/turuncu renk apoptotik hücreleri, kırmızı renk nekrotik hücreleri temsil etmektedir)



Şekil 4.38 HME1 hücrelerinin 48 saat boyunca miR-3670 ve miR-8078 ile muamelesinden sonra apoptotik ve nekrotik hücre seviyelerini gösteren yüzde grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)



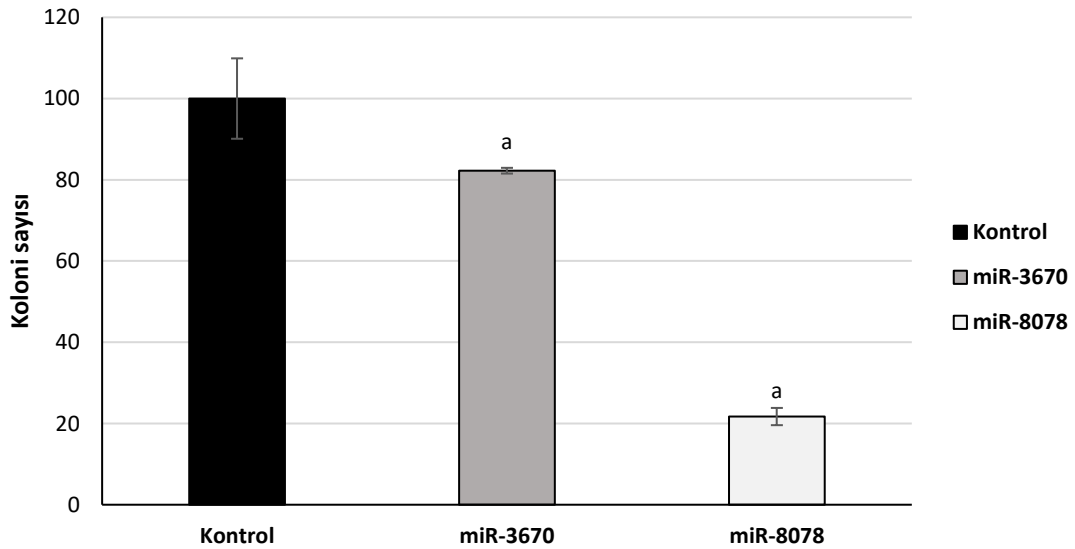
Şekil 4.39 miR-3670 ve miR-8078 ile 48 saat boyunca muamele edilen HME1 hücrelerinin AO-EtBr boyama yöntemiyle apoptozun tespiti (Yeşil renk canlı hücreleri, sarı/turuncu renk apoptotik hücreleri, kırmızı renk nekrotik hücreleri temsil etmektedir)

#### 4.9 Koloni Oluşum Analizi Bulguları

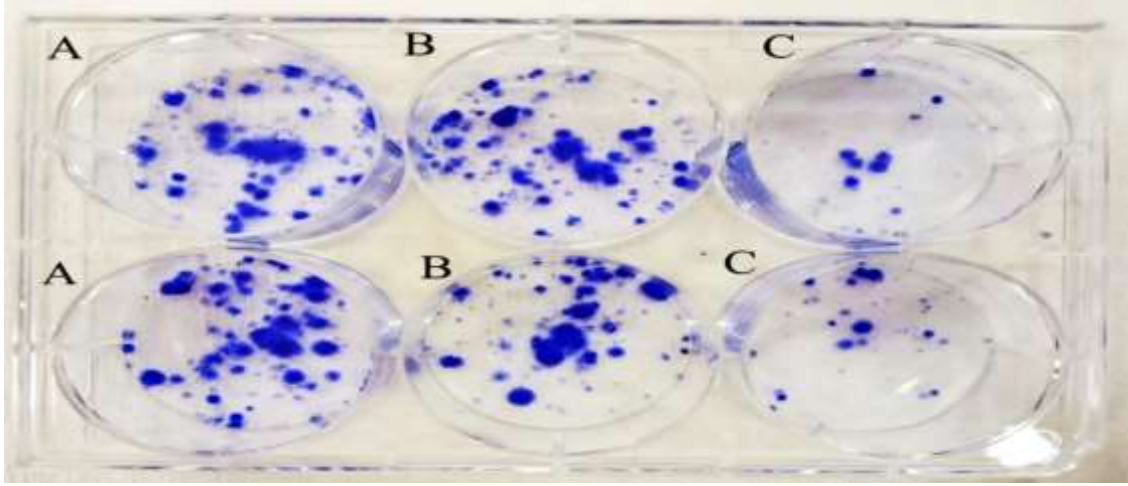
Bu deneyin amacı, MCF-7 ve HME1 hücrelerine 1nM dozunda miR-3670 ve miR-8078 uygulanmasının anti-metastatik etkilerini değerlendirmektir. Ek olarak, miRNA uygulamasının hücrelerin ankraj bağımlı büyüme ve kolonizasyon davranışını etkileyip etkilemediğini araştırmak için bir koloni oluşum deneyi yapıldı.

Analiz sonrasında, MCF-7 hücre hatlarının 1nM dozunda miR-3670 mimik miRNA'ları ile transfekte edilmesinin, kontrol grubuna kıyasla koloni sayılarında %17.7 oranında anlamlı bir düşüşe neden olduğu tespit edildi ( $p \leq 0.05$ ). Aynı hücre hattına 1nM dozunda miR-8078 transfekte edildiğinde, kontrolün aksine koloni sayısında %78.2'lik önemli ve dikkat çekici bir azalma gözlenmiştir. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlıydı (Şekil 4.40 ve Şekil 4.41 MCF-7 hücre hattında koloni oluşumunun engellenmesi ile ilgili olarak, miR-8078'in miR-3670'ten önemli ölçüde daha güçlü bir inhibitör etki sergilediği keşfedildi ( $p \leq 0.05$ )).

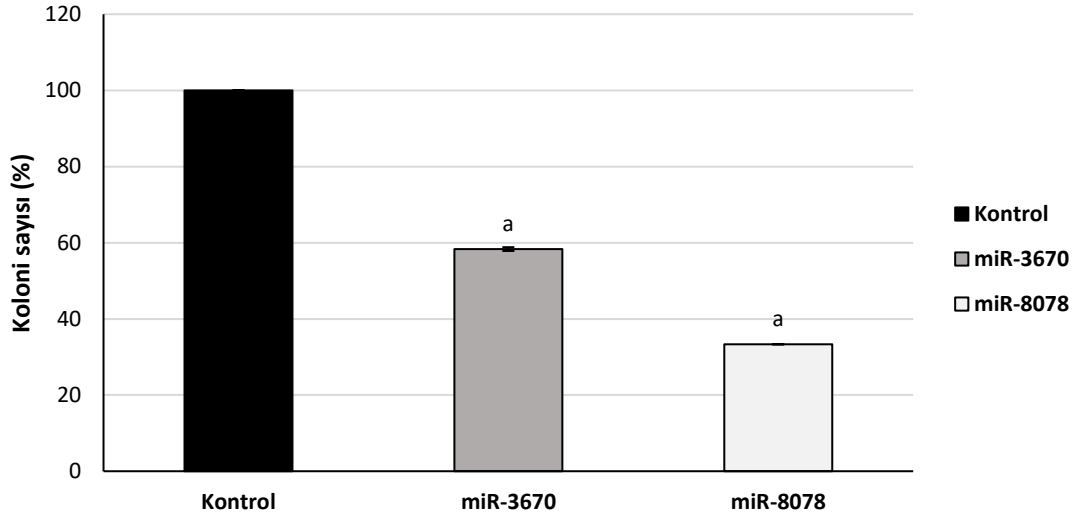
Benzer şekilde, miR-3670 mimik miRNA'larının HME1 hücre hatlarına 1nM dozunda transfeksiyonunun, koloni sayılarında kontrole kıyasla %41.6 oranında düşüşe neden olduğu keşfedildi ( $p \leq 0.05$ ). Aynı hücre hattına 1nM dozunda miR-8078 transfekte edildiğinde, kontrol grubuna kıyasla koloni sayılarında %66.6 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ( $p \leq 0.05$ , Şekil 4.42 ve Şekil 4.43). HME1 hücre hatlarında koloni oluşumunun miR-8078 tarafından miR-3670'e göre daha fazla inhibe edildiği tespit edilmiştir ve bu veri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0.05$ ).



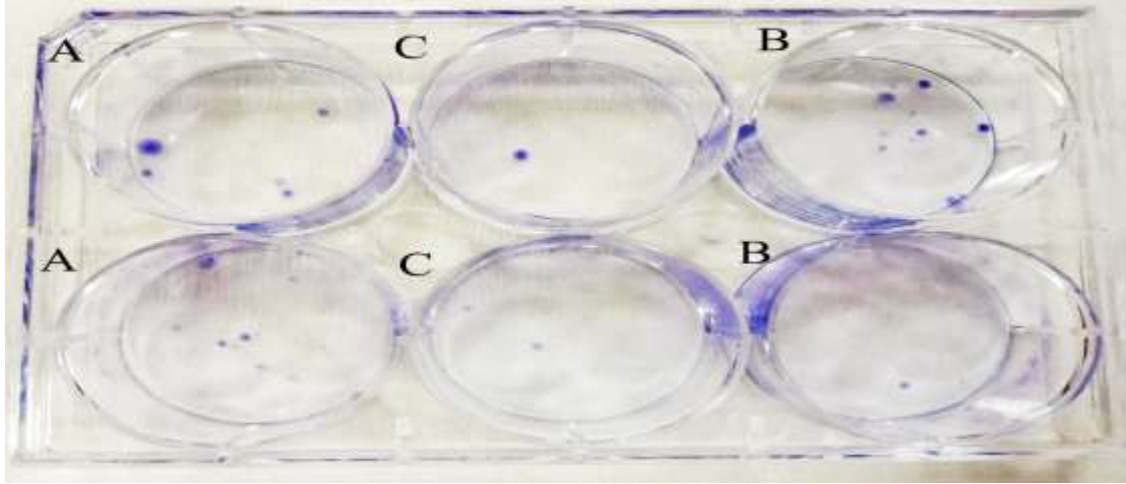
Şekil 4.40 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinin koloni oluşum grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)



Şekil 4.41 miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 hücrelerinde koloni oluşumu üzerindeki etkisi (A: kontrol grubu B: miR-3670 uygulanan grup, C: miR-8078 uygulanan grup)



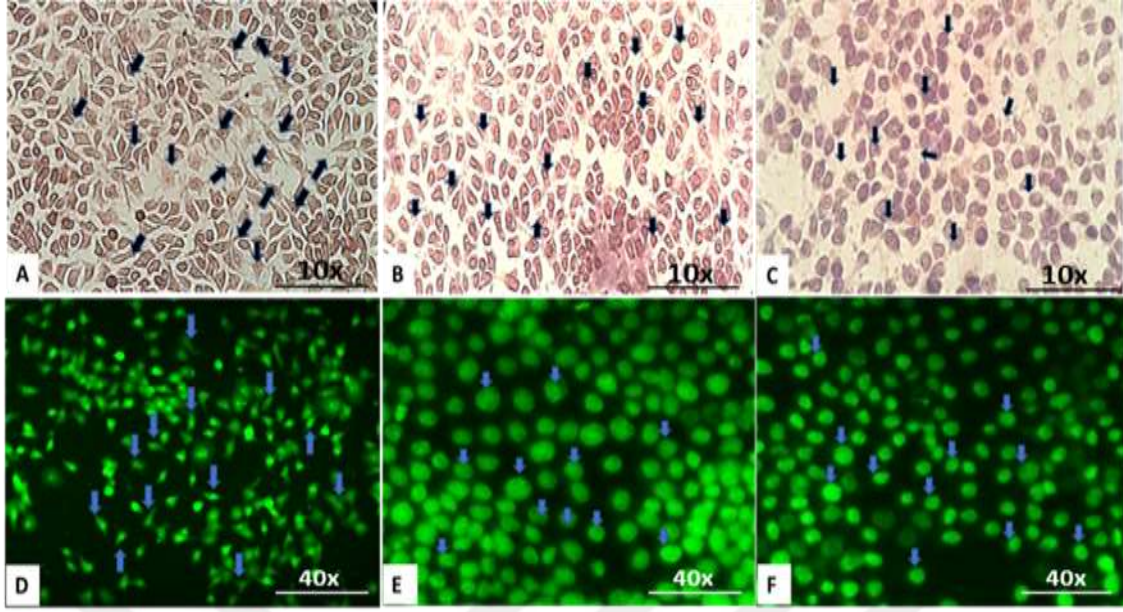
Şekil 4.42 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan HME1 hücrelerinin koloni oluşum grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)



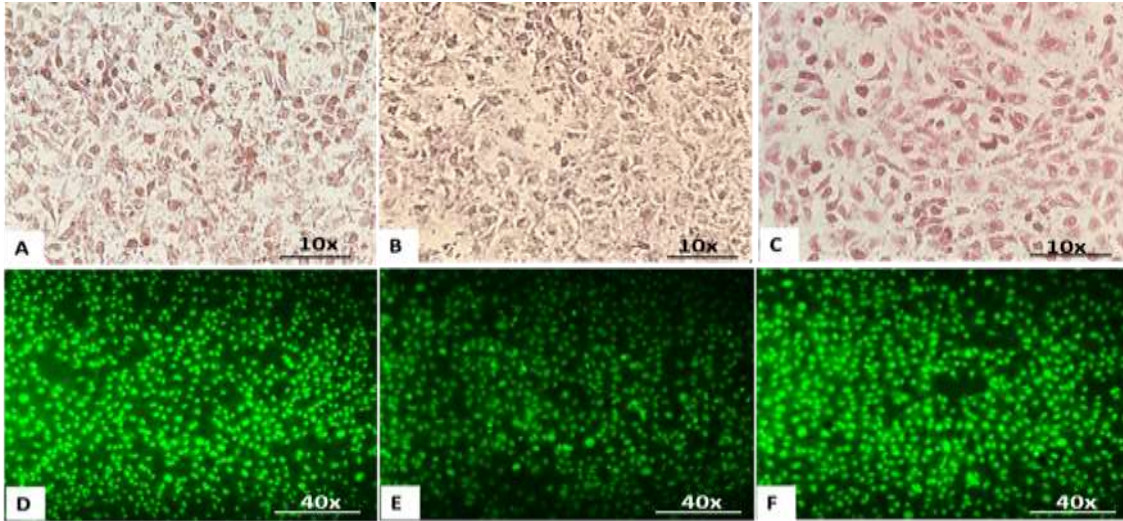
Şekil 4.43 miR-3670 ve miR-8078'in HME1 hücrelerinde koloni oluşumu üzerindeki etkisi (A: kontrol grubu B: miR-3670 uygulanan grup, C: miR-8078 uygulanan grup)

#### 4.10 Morfolojik Analiz Bulguları

miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 ve HME1 hücrelerinin morfolojisi üzerindeki etkilerini tespit etmek için morfoloji analizi gerçekleştirildi. miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 hücre hattına transfeksiyonundan sonra, MCF-7 hücrelerinde, uzun ve iğ şeklindeki formlarından epitel hücrelerinin tipik bir özelliği olan daha yuvarlak ve küboidal bir şekle doğru kayda değer bir değişiklik gözlemlendi. miR-3670 ve miR-8078'in transfeksiyonu MCF-7 hücrelerinde lamellipodia'nın önemli ölçüde azalmasıyla sonuçlanmıştır (Şekil 4.44). Öte yandan, miR-3670 ve miR-8078 transfeksiyonu, sağlıklı bir meme dokusu hücre hattı olan HME1 hücrelerinde herhangi bir morfolojik değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.45).



Şekil 4.44 miR-3670 ve miR-8078 mimikleri ile transfekte edilen MCF-7 hücrelerinin transfeksiyon sonrası morfolojisinin gözlenmesi (A: kontrol hücresi, B: miR-3670 transfekte edilmiş hücreler, C: miR-8078 transfekte edilmiş hücreler inverted mikroskop Olympos CKX31'da 10x büyütme D: kontrol hücresi, E: miR-3670 transfekte edilmiş hücreler, F: miR-8078 transfekte edilmiş hücreler floresan mikroskop 40x büyütme)



Şekil 4.45 miR-3670 ve miR-8078 mimikleri ile transfekte edilen HME1 hücrelerinin transfeksiyon sonrası morfolojisinin gözlenmesi (A: kontrol hücresi, B: miR-3670 transfekte edilmiş hücreler, C: miR-8078 transfekte edilmiş hücreler inverted mikroskop Olympos CKX31'da 10x büyütme D: kontrol hücresi, E: miR-3670 transfekte edilmiş hücreler, F: miR-8078 transfekte edilmiş hücreler floresan mikroskop 40x büyütme)

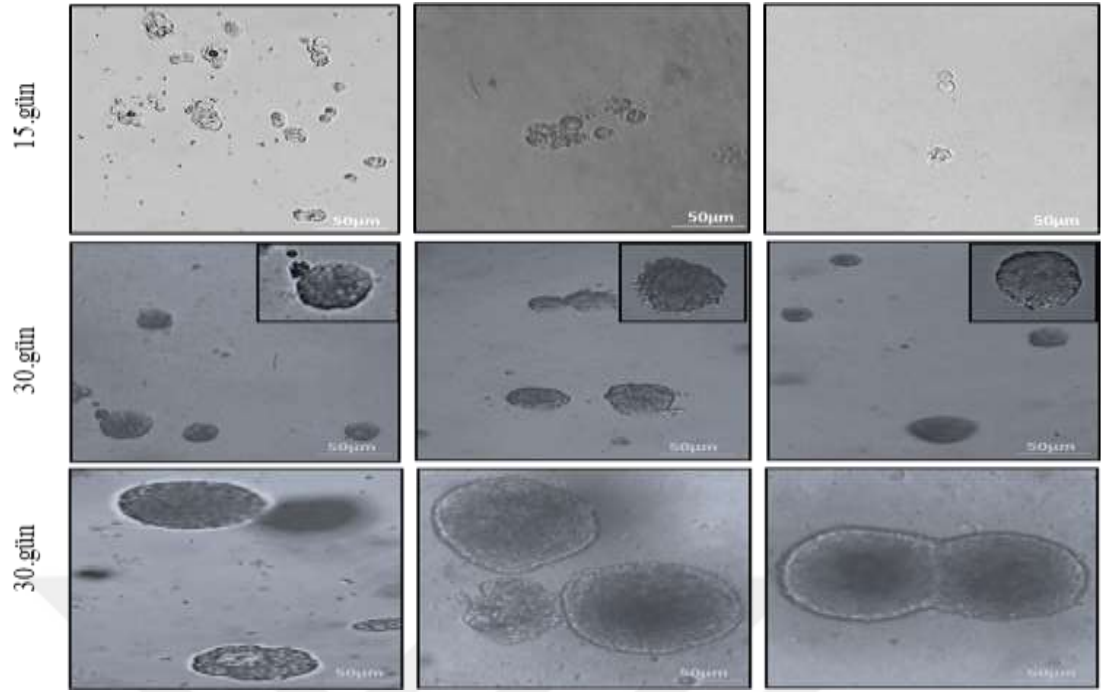
#### 4.11 3D Sferoid Oluşum Analizi Bulguları

3D Sferoid Oluşum Deneyi, hücrelerin yüzeye yapışamadıkları (yani ankrajdan bağımsız) bir ortamda malign transformasyon kabiliyetini tespit etmek için kullanılır. 3D sferoid yapı oluşumunu araştırmak için, 1nM miR-3670 ve miR-8078 miRNA'lar MCF-7 ve HME1 hücrelerine uygulanmış ve yarı katı ortamda inkübe edilmiştir.

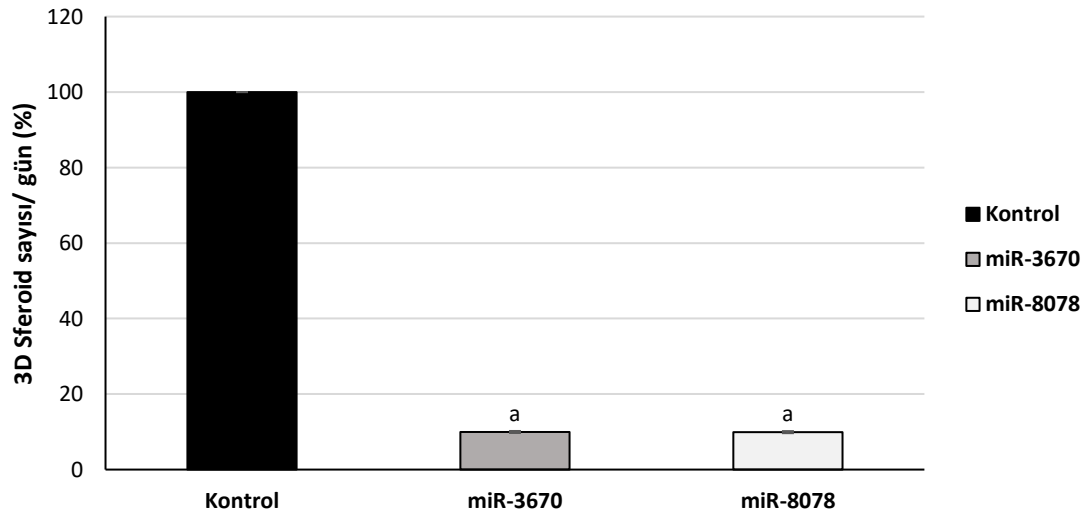
Analiz sonrasında, kontrol grubunda 15.günden itibaren sferoidlerin oluşmaya başladığı 30.günde ise tamamen belirginleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.46-Şekil 4.47). Deney grubunda ise uygulanan her iki miRNA'nın (miR-3670, miR-8078) 1nM dozu MCF-7 hücre hattında kontrol grubuna kıyasla sferoid oluşumunu %90 oranında baskıladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.48-Şekil 4.49).



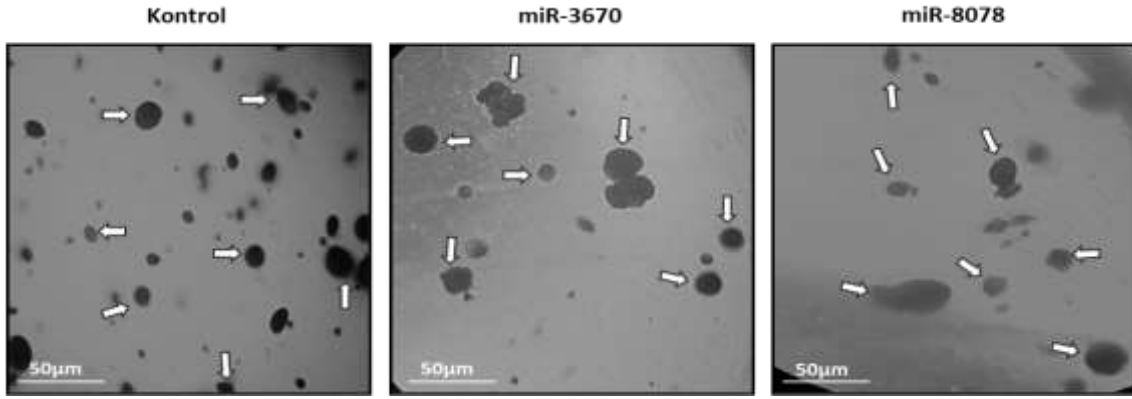
Şekil 4.46 miRNA uygulanmış MCF-7 hücrelerinin oluşturduğu 3D tümör sferoid ve şematik diyagramı (Olympus CKX31'da 40x büyütme)



Şekil 4.47 MCF-7 hücrelerinin 15 ve 30. gün sonunda oluşan 3D sferoid yapıları (Olympus CKX31’da 10x ve 40x büyütme)

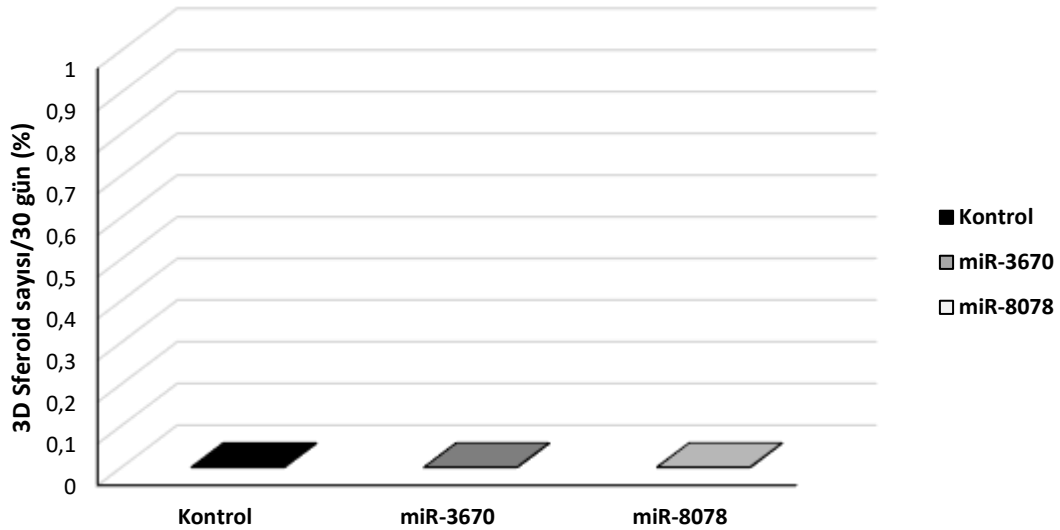


Şekil 4.48 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinde 3D sferoid yüzdesini gösteren grafik (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

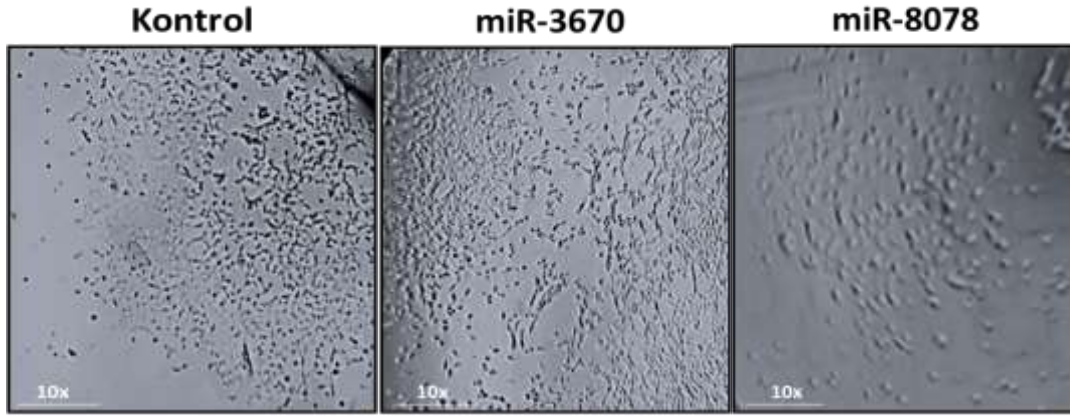


Şekil 4.49 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinde 3D sferoid oluşumu (Olympos CKX31'da 10x büyütme, Beyaz ok işareti 3D sferoid yapılarını göstermektedir)

HME1 hücre hattında 1nM dozunda miR-3670 ve miR-8078 mimik miRNA'larının transfeksiyonundan sonra kontrol dahil hiçbir grupta 3D sferoid yapı gözlenmemiştir (Şekil 4.50-Şekil 4.51).

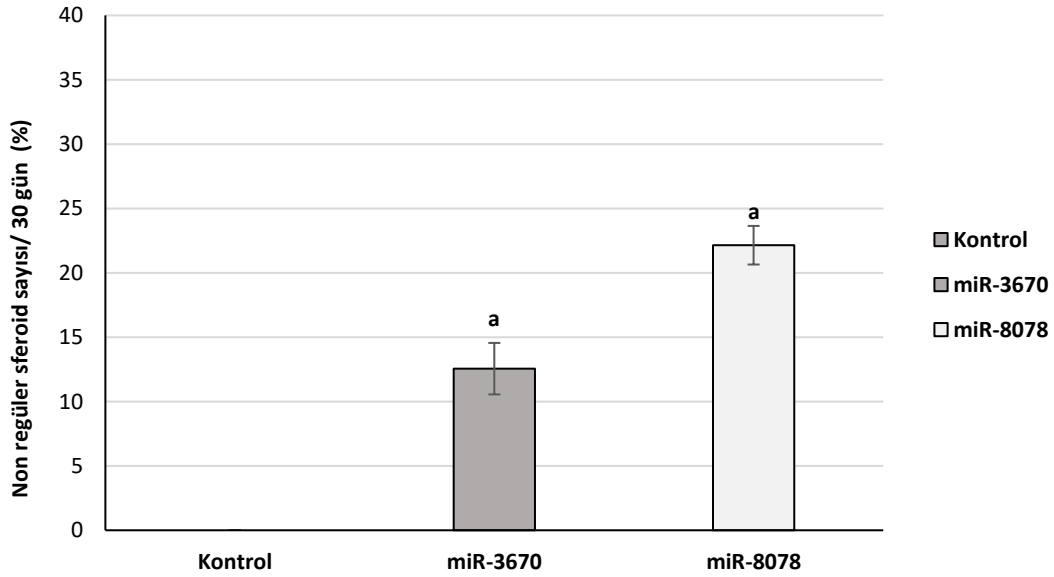


Şekil 4.50 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan HME1 hücrelerinde 3D sferoid oluşum yüzdesini gösteren grafik (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

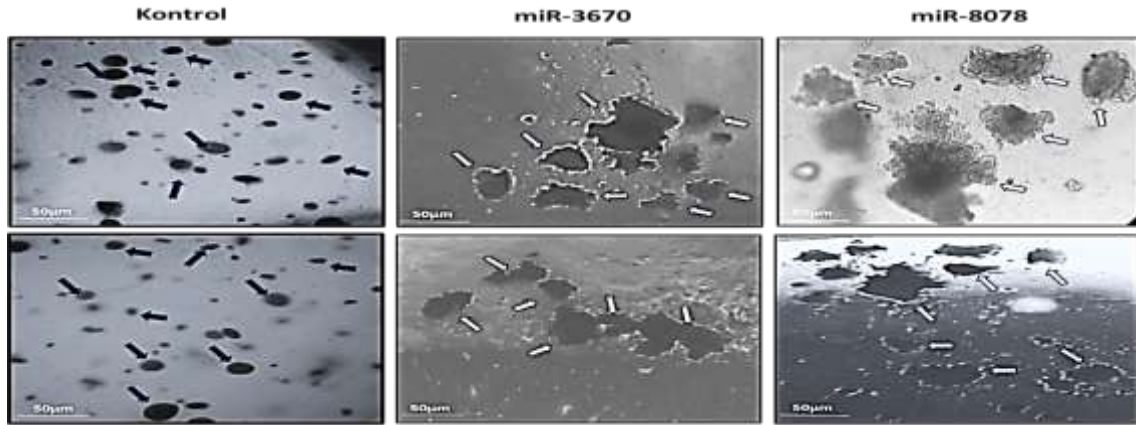


Şekil 4.51 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan HME1 hücrelerinin 30. gün sonunda görüntüsü (Olympos CKX31’da 10x büyütme)

3D sferoid analizi çalışmamızda, miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinde normal elipsoidik şekillerinden sapan non-regüler (amorft) sferoidlerin oluştuğu tespit edildi. Bu amorf sferoidlerin %13’ü miR-3670 grubunda, %22’si ise miR-8078 grubunda görülmüştür (Şekil 4.52, Şekil 4.53).

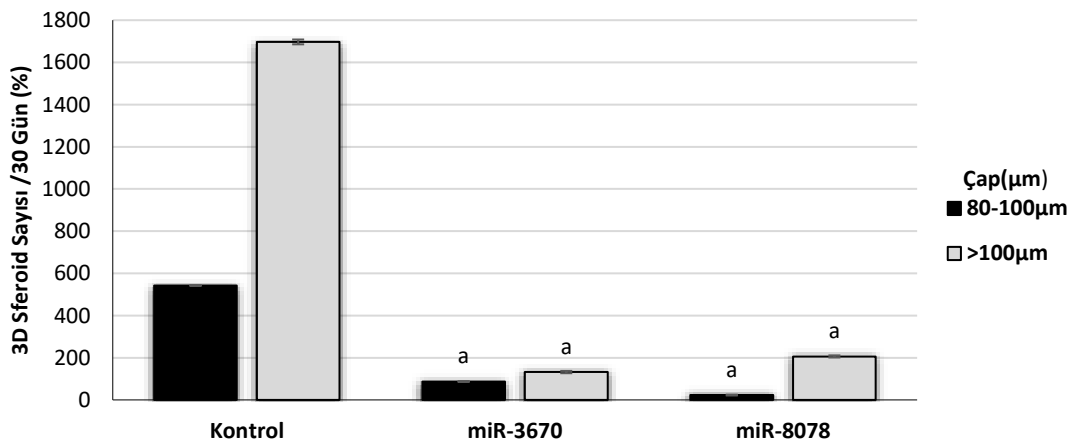


Şekil 4.52 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinde amorf 3D sferoidlerin gelişimini gösteren yüzde grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)



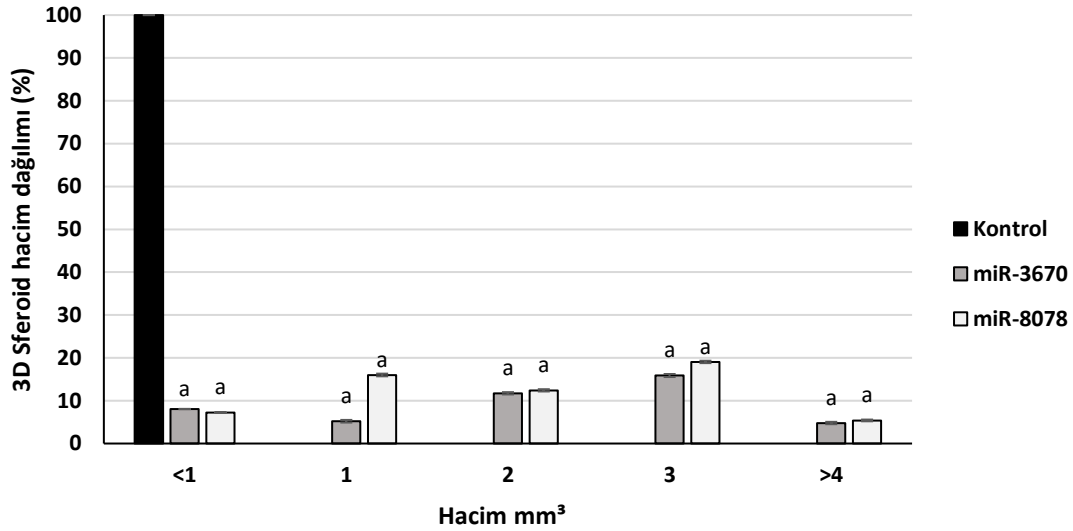
Şekil 4.53 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinde 30. gün sonunda oluşan non-regüler 3D sferoidler (Olympos CKX31’da 10x büyütme, Siyah ok işareti: regular sferoidi, beyaz ok işareti: non regular sferoidi göstermektedir)

3D Sferoid analizi çalışmasında, oluşan sferoidlerin boyutları üzerinde testler gerçekleştirildi. Analiz sonucunda, transfekte edilen miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 hücreleri tarafından oluşturulan 3D sferoidlerin boyutunu 100 µm'lik bir eşiğin altında tuttuğunu ortaya koydu. 3D sferoidlerin boyut dağılımı sırasıyla kontrol grubunda %92.53'ü 100 µm altında, %7.47 100 µm üzerinde, miR-3670 uygulama grubunda %67.76'sı 100 µm altında, %32.24 100 µm üzerinde, miR-8078 uygulama grubunda %81.12'si 100 µm altında, %18.88 100 µm üzerinde 3D sferoid oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.54).



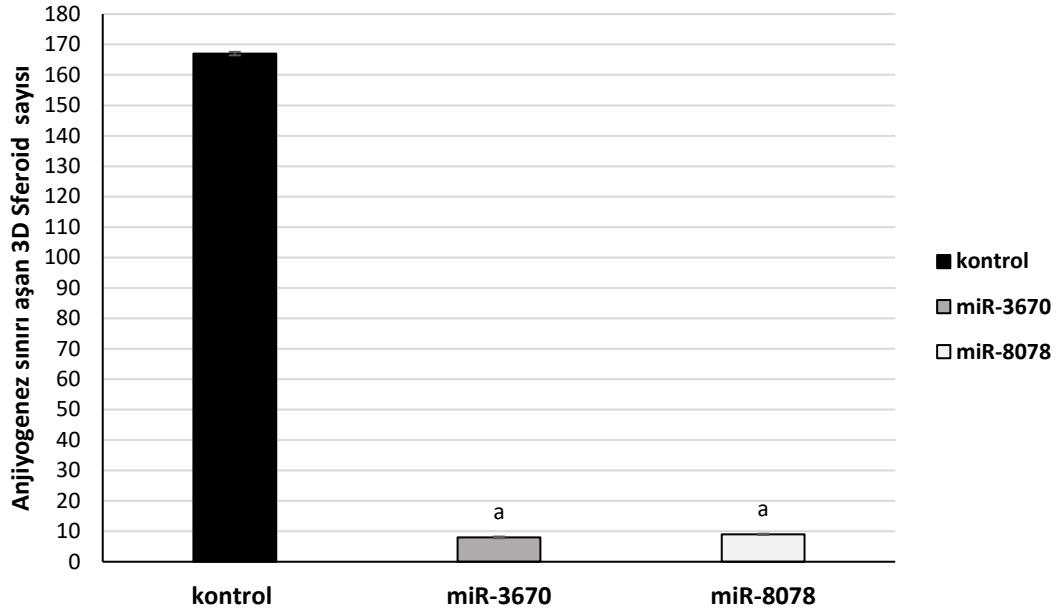
Şekil 4.54 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücreleri tarafından oluşturulan 3D sferoidlerin çap dağılım grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

3D sferoidlerin analizinde hacimlerini değerlendirdik ve miR-3670 ve miR-8078 ile transfekte edilen MCF-7 hücrelerinin 1mm<sup>3</sup>'ün altında hacimlere sahip sferoidler ürettiği tespit edildi (Şekil 4.55).



Şekil 4.55 miRNA uygulanmış MCF-7 hücreleri tarafından oluşturulan 3D sferoidlerin hacim dağılım grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

3D Sferoid analizinde, miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinin oluşturduğu 3D sferoidlerin, tümör büyüklüğünün 1-2 mm aşıttan sonra başlayan kanser gelişimi ve çevre dokulara yayılımında önemli bir mekanizma olarak bilinen anjiyojenik aktivite açısından incelenmiştir. Veriler analiz edildikten sonra, kontrol grubundaki 3D sferoidlerin önemli bir kısmının anjiyojenik sınırı (2mm) aştığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, miR-3670 ve miR-8078 ile muamele edilen hücreler tarafından oluşturulan bu tür sferoidlerin sayısı önemli ölçüde daha düşüktü (Şekil 4.56).

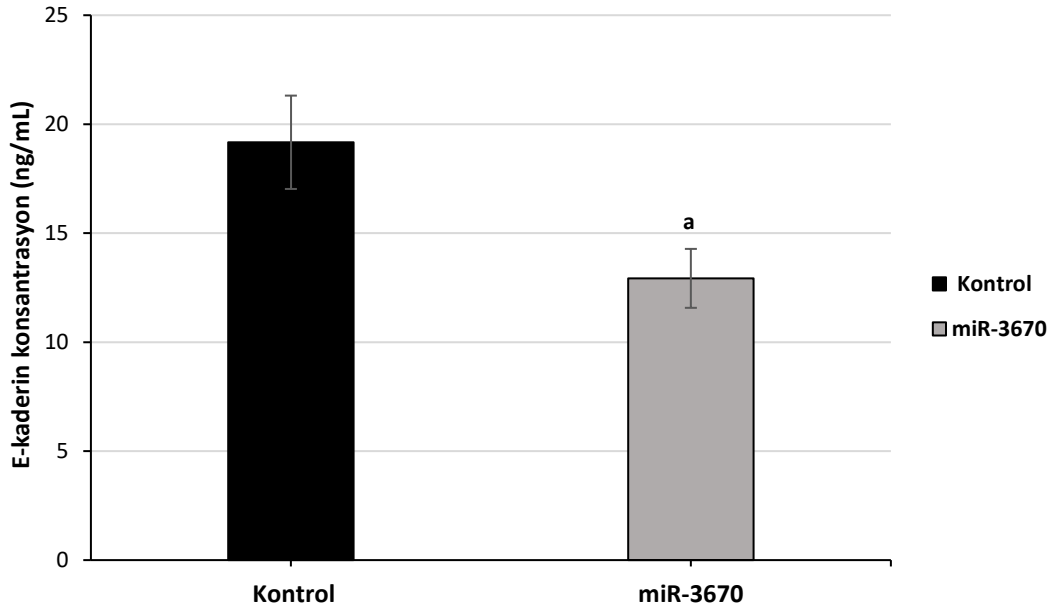


Şekil 4.56 miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinde anjiyogenik sınırı aşan 3D sferoid sayısının gruplara göre dağılım grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

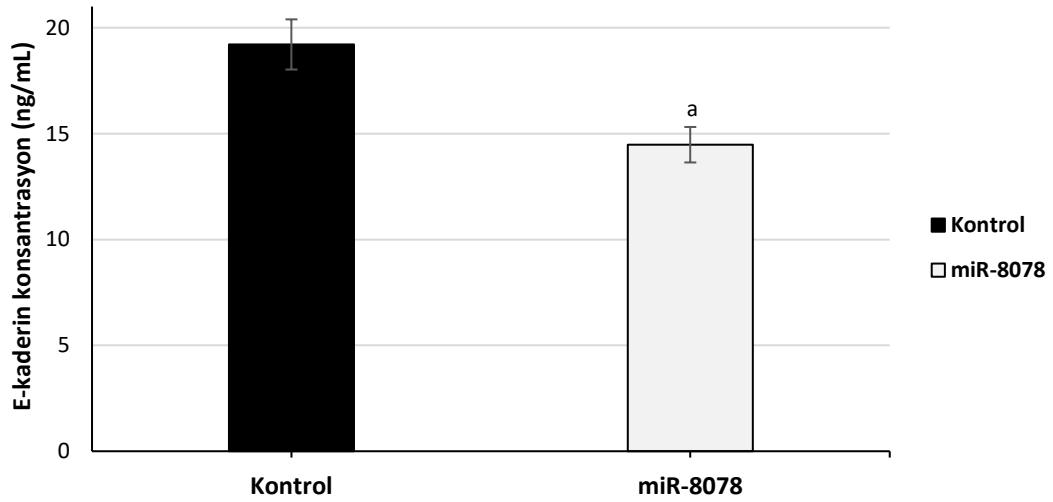
#### 4.12 E-kaderin Analizinin Bulguları

Bu testin amacı, miR-3670 ve miR-8078'in, hücre hareketliliği belirteci olarak görev yapan ve hücrelerin kendi bölgelerine bağlanmasını kolaylaştıran hücre hatlarındaki e-kaderin antijen seviyeleri üzerindeki etkisini araştırmaktır.

Analiz sonucunda, MCF-7 hücrelerine 1nM miR-3670 ve miR-8078 dozunun uygulanmasının serbest e-kaderin antijeni seviyesinde anlamlı bir azalmaya neden olduğu sonucuna varılmıştır ( $p \leq 0.05$ , Şekil 4.57, Şekil 4.58).

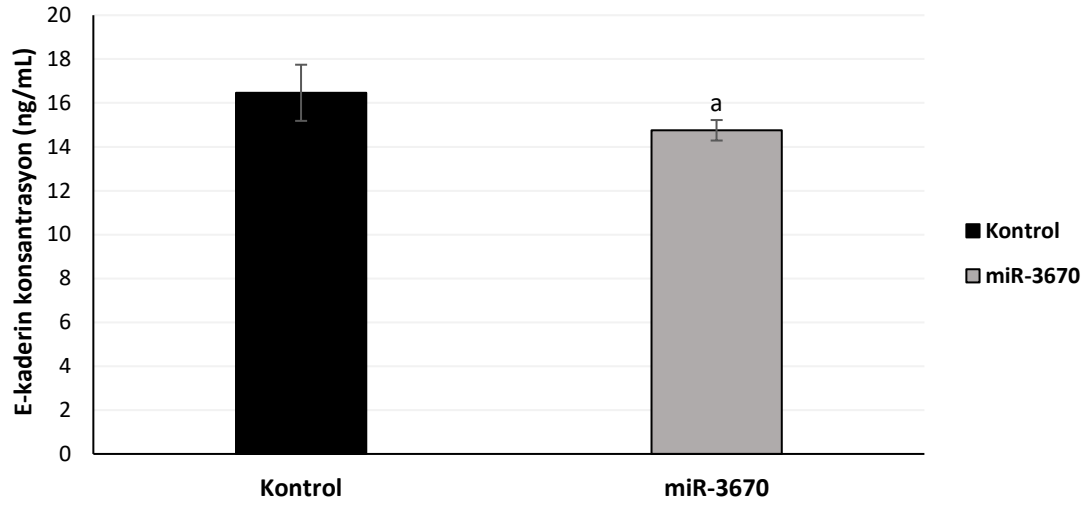


Şekil 4.57 miR-3670 uygulanan MCF-7 hücrelerinde serbest e-kaderin antijen seviyesinin grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

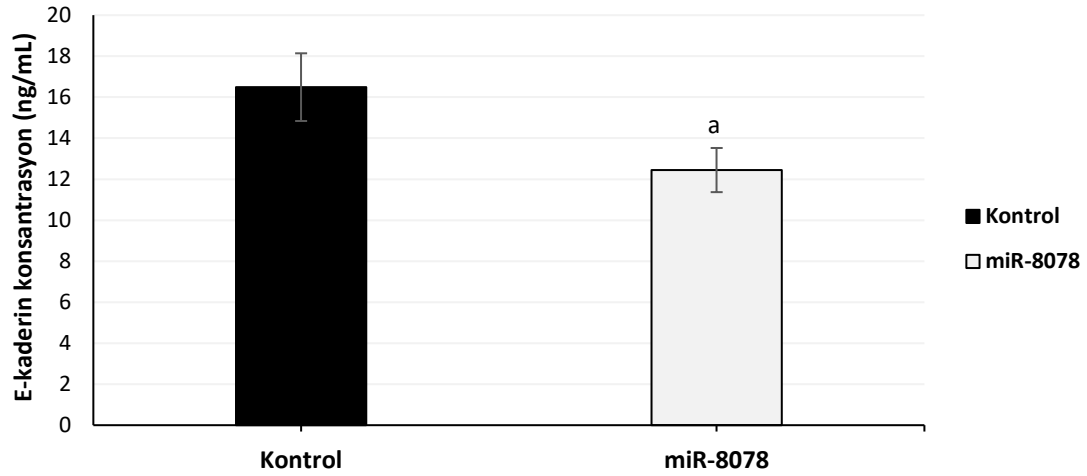


Şekil 4.58 miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinde serbest e-kaderin antijen seviyesinin grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

HME1 hücrelerine 1nM dozunda miR-3670 ve miR-8078 uygulandıktan sonra, serbest e-kaderin antijen seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş sergilemiştir (a:  $p \leq 0.05$ , Şekil 4.59, Şekil 4.60).



Şekil 4.59 miR-3670 uygulanan HME1 hücrelerinde serbest e-kaderin antijen seviyesinin grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

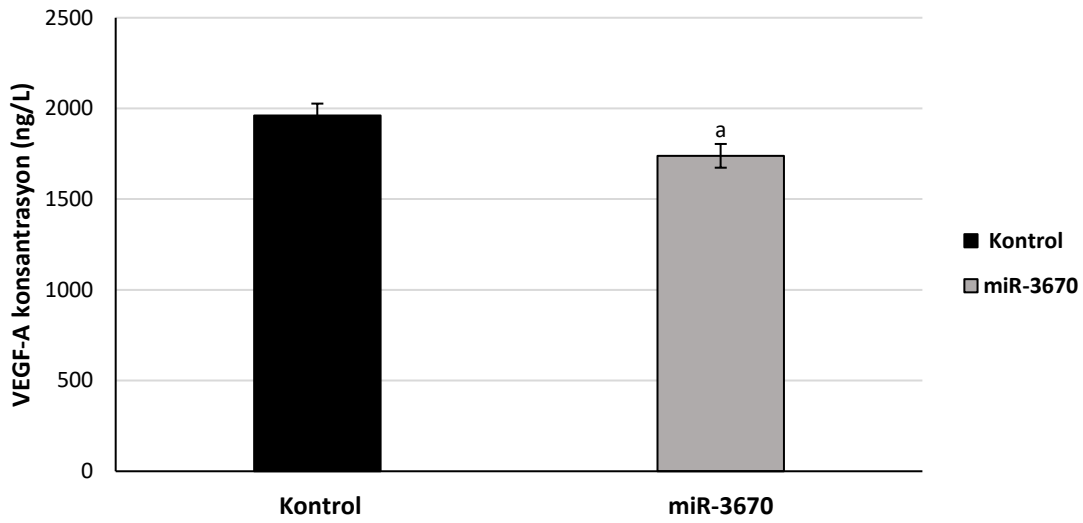


Şekil 4.60 miR-8078 uygulanan HME1 hücrelerinde serbest e-kaderin antijen seviyesinin grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

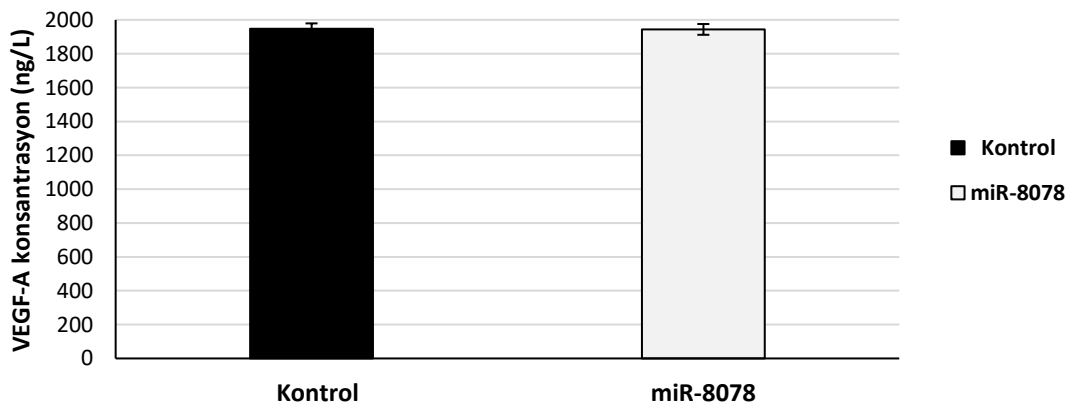
#### 4.13 VEGF Analizinin Bulguları

Bu testin amacı, miRNA uygulamasını takiben, hücreler tarafından üretilen ve anjiyogenezi uyaran bir sinyal proteini olan VEGF'nin ekspresyon seviyesini değerlendirmektir. Bu amaçla, MCF-7 ve HME1 hücre hatlarının 1nM dozunda miR-3670 ve miR-8078 sentetik mimikleri ile transfeksiyonu sonrasında toplanan

süpernatantlardaki serbest VEGF-A antijen seviyesi VEGF-A elisa kiti kullanılarak belirlendi. Analiz, miR-3670'in MCF-7 hücrelerinde serbest VEGF-A seviyesinde bir düşüşe neden olduğunu ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç göstermiştir (a:  $p \leq 0.05$ , Şekil 4.61), Benzer şekilde, miR-8078 aynı hücre hattında VEGF-A'nın serbest seviyesini azaltmış ancak bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p \geq 0.05$ , Şekil 4.62).

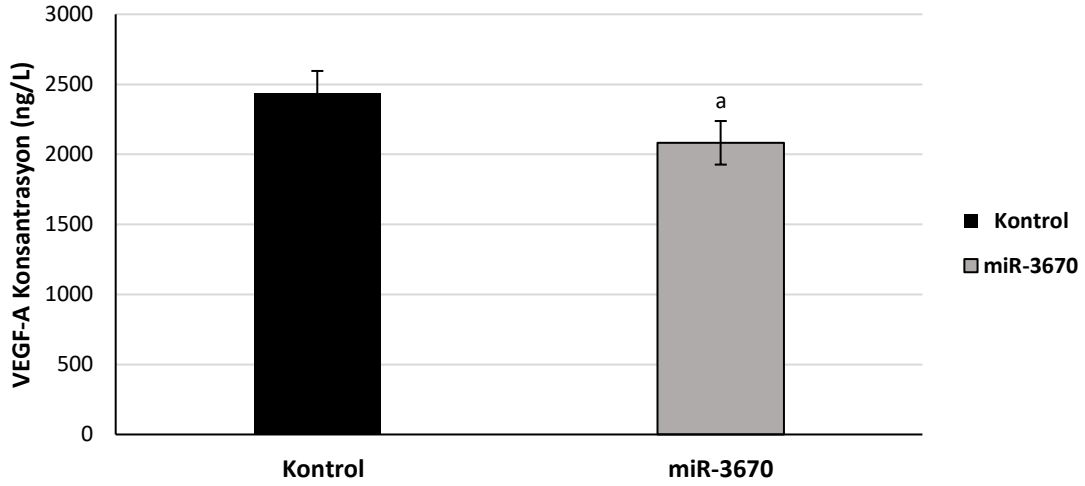


Şekil 4.61 miR-3670 uygulanan MCF-7 hücrelerindeki serbest VEGF-A antijen seviyesinin grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

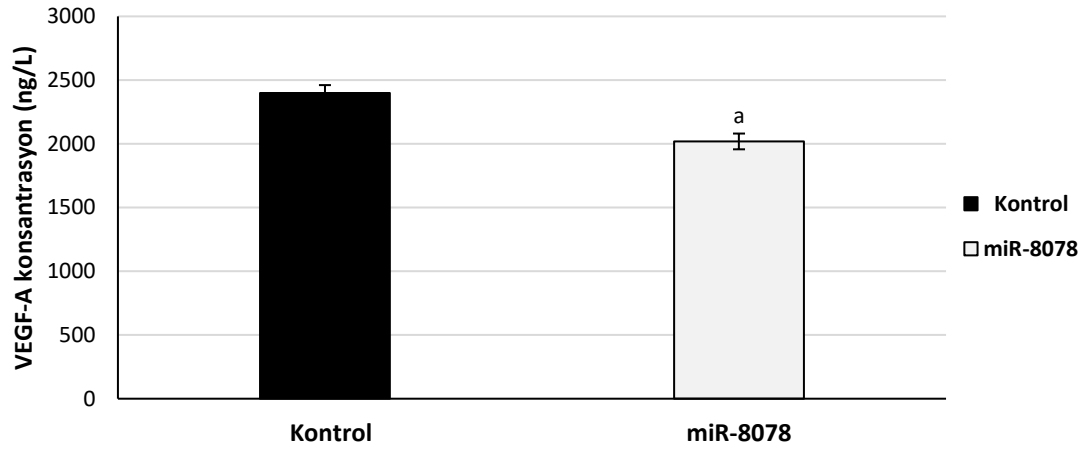


Şekil 4.62 miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerindeki serbest VEGF-A antijen seviyesinin grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

HME1 hücrelerine hem miR-3670 hem de miR-8078'in 1nM dozunun uygulanmasından sonra, serbest VEGF-A seviyesinin her iki miRNA grubunda da istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $p \leq 0.05$ ) (Şekil 4.63, Şekil 4.64).



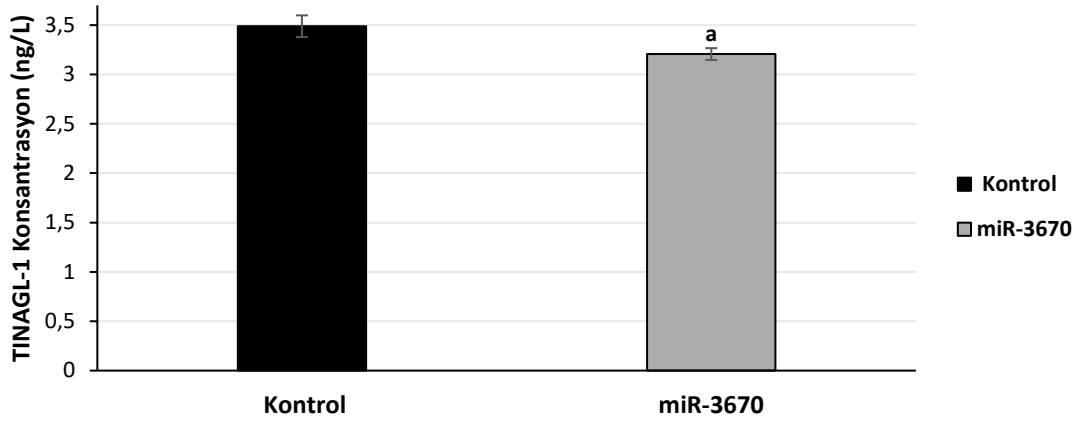
Şekil 4.63 miR-3670 uygulanan HME1 hücrelerindeki serbest VEGF-A antijen seviyesinin grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)



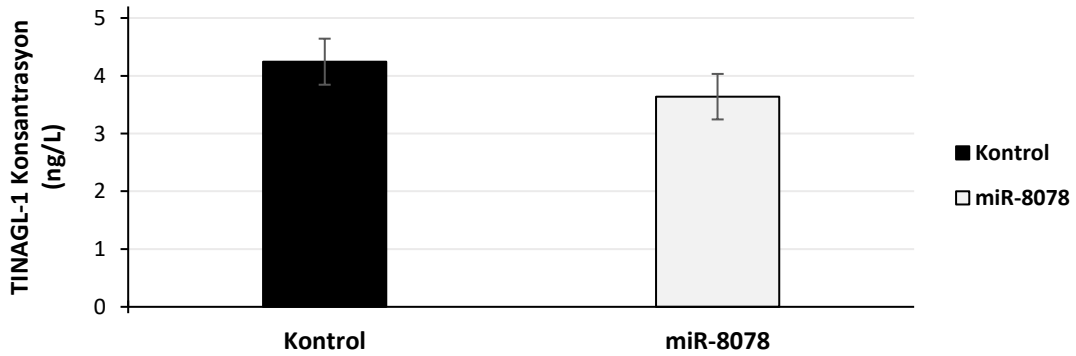
Şekil 4.64 miR-8078 uygulanan HME1 hücrelerindeki serbest VEGF-A antijen seviyesinin grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

#### 4.14 TINAGL-1 Analizinin Bulguları

Bu testin amacı, miRNA uygulamasından sonra hücre hatlarında metastazı önleyen bir protein olan TINAGL-1 proteininin ifade seviyesindeki değişiklikleri belirlemektir. Analiz sonucunda, miR-3670'in 1nM dozunun MCF-7 hücrelerine transfeke edilmesinden sonra serbest TINAGL-1 antijen seviyesinin önemli ölçüde ( $p \leq 0.05$ ) azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.65). Benzer şekilde, serbest TINAGL-1 antijen seviyesi miR-8078'in 1nM dozundan sonra azalmış, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p \geq 0.05$ ), (Şekil 4.66).

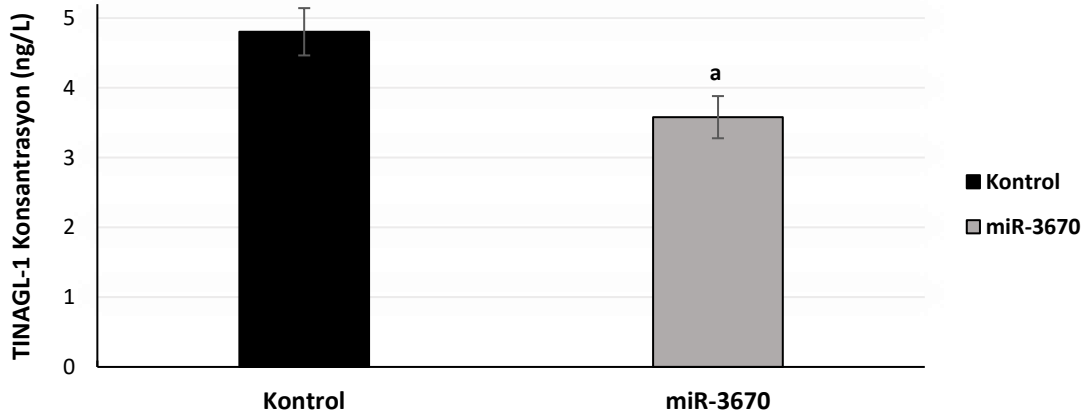


Şekil 4.65 miR-3670 uygulanan MCF-7 hücrelerindeki serbest TINAGL-1 antijen seviyesinin grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

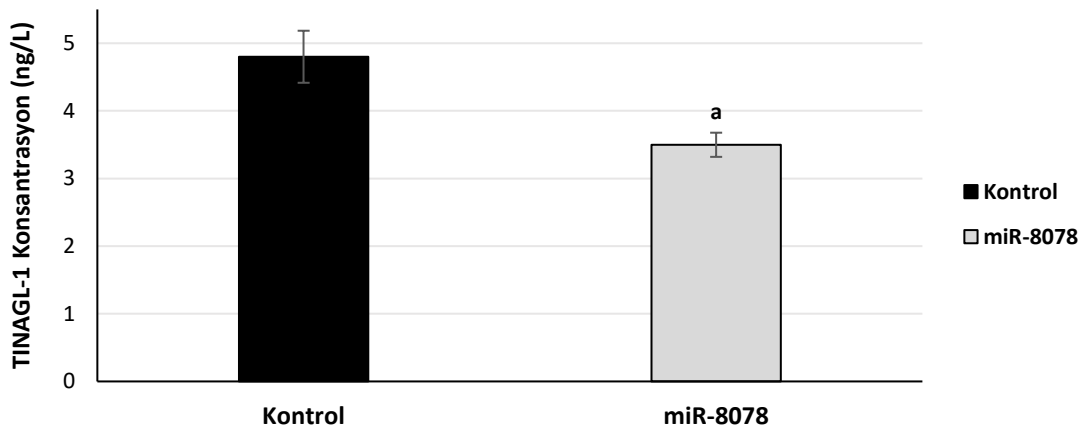


Şekil 4.66 miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerindeki serbest TINAGL-1 antijen seviyesinin grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

Sağlıklı meme dokusu hücre hattı olan HME1 hücrelerine miR-3670 ve miR-8078'in 1nM dozlarının transfekte edilmesinin ardından serbest TINAGL-1 antijen seviyesini istatistiksel olarak anlamlı olarak düşürdüğü belirlendi ( $p \leq 0.05$ ), (Şekil 4.67, Şekil 4.68).



Şekil 4.67 miR-3670 uygulanan HME1 hücrelerindeki serbest TINAGL-1 antijen seviyesinin grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)



Şekil 4.68 miR-8078 uygulanan HME1 hücrelerindeki serbest TINAGL-1 antijen seviyesinin grafiği (Veriler ortalama±standart hata (SD) olarak sunulmuştur. a:  $p \leq 0.05$  kontrol grubuna kıyasla)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri, dünya genelinde akciğer kanserinden sonra en sık teşhis edilen kanserdir. Bu durum Türkiye için de geçerlidir (Anonim, 2019). Günümüzde teşhis edilen her 8 kanserden birinin meme kanseri olduğu ve toplam 2,3 milyon yeni vaka tespit edildiği bildirilmiştir (Sung vd., 2021). İstatistiksel çalışmalar sonucunda, meme kanseri küresel olarak kadınlarda teşhis edilen tüm kanserlerin dörtte birini oluşturmaktadır. Bu eğilim gelişmekte olan ülkelerde artış göstermektedir (Heer vd., 2020). Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından 2019 yılı Türkiye kanser istatistikleri raporunda belirtildiği üzere, 2030 yılına kadar kanser vakalarında %75'lik bir artışla 22 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (Anonim, 2019). COVID-19 salgını nedeniyle ülkemizde ve dünyada 2020-2023 yıllarını kapsayan detaylı bir kanser raporunun derlenmesi mümkün olamamıştır. Bununla birlikte, çeşitli çalışmalar hem yerel hem de dünya çapında meme kanseri insidansında sürekli bir artış öngörmektedir. Bu nedenle DSÖ, meme kanserinin ölüm oranını düşürmek için erken teşhis ve uygun tedaviyi teşvik etmek amacıyla farklı kurum/kuruluşlar ve küresel ortaklarla birlikte çalışmaktadır (Arnold vd., 2022).

Günümüz kanser tedavisinde, geleneksel yöntemlerinin kullanımı, seçici olmayan sitotoksik etkileri nedeniyle azalmaktadır. Buna karşılık, tedavide yeni trend, hedefe yönelik kişiselleştirilmiş kanser immünoterapisi de dahil olmak üzere hedefe yönelik tedavilerdir. Kanser immünoterapisinde etkili ve minimum yan etkiye sahip hedefe yönelik immün kontrol noktası inhibitörü tedavilerine olan talep her geçen gün artmaktadır. Smith ve diğerleri (2021) son yıllarda bu alanda önemli ilerlemeler kaydedildiğini bildirmiştir. İmmünolojik kontrol noktaları (CTLA-4, PD-1, PD-L1) hedefe yönelik tedavilerde çok önemli bir rol oynamaktadır. Homeostatik koşullar altında, immünolojik kontrol noktaları (ICI), hücrelerdeki proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sinyaller arasında dengeyi bağışıklık hücrelerinin aktivitesini uyararak veya engelleyerek sağlar (Pardoll vd., 2012; Cai vd., 2021). ICI kökenli tümör immünoterapisinin ana odak noktalarından biri, PD-1 ve ligandı PD-L1'i hedef alan inhibitörlerin kullanılması olmuştur (Han vd., 2020). Çeşitli kanser türlerinde PD-L1'in yüksek düzeyde protein ekspresyonu gözlenmiştir (Cha vd., 2019). T-lenfositleri, kanser hücre membranlarındaki immünolojik reseptörleri hedef alarak, anti-tümöral immün

yanıt oluşturarak kanser tedavisinde etkili olurlar. Kanser hücresinin membranında bulunan PD-L1 ligandı, T hücre membranında bulunan PD-1 reseptörüne bağlanır. Bu bağ, T hücrelerinin çoğalmasını ve aktivasyonunu yavaşlatarak sitotoksik etkilerini azaltır ve kanser hücrelerinin bağışıklık gözetiminden kaçmasına izin verir (Huang vd., 2020). Son yıllarda, FDA tarafından kanser immün tedavisinde kullanılmak üzere PD-1, PD-L1 ve CTLA-4 gibi immün kontrol noktalarını hedef alan birkaç inhibitör ajanının tedavide kullanımına onay vermiştir (Seidel vd., 2018; Choi vd., 2022).

miRNA'lar ile bağışıklık sistemi arasında önemli bir korelasyon vardır. miRNA'ların kanser tedavisinde kritik bir rol oynadığı 2011 yılından bu yana yaygın olarak kabul edilmektedir (Berindan-Neago vd., 2014; Cortez vd., 2019). miRNA'lar, tümörü hedef alan bağışıklık tepkilerini hassaslaştırma ve böylece tümörlerle mücadele etme yetenekleriyle tanınmaktadır (Dong vd., 2022). řu anda, miR-34a, miR-124, miR-424, miR-138 ve miR-155 dahil olmak üzere çok sayıda terapötik miRNA, faz I klinik denemelerden geçmektedir. miRNA'ların kanser bağışıklığını düzenlemedeki işlevini anlamak ve yüksek etkinliğe sahip yeni terapötik miRNA'ları tanımlamak çok önemlidir (Grivennikov vd., 2010; Beatty vd., 2015).

Çalışmamız, řu sorulara cevap vermeyi amaçlamaktadır;

MCF-7 hücrelerinde PD-L1'i hedeflemek için miR-3670 ve miR-8078 kullanarak PD-L1'i post-transkripsiyonel düzeyde susturarak PD-L1 tabanlı immünoterapi için miRNA aracılığıyla PD-L1 hedeflenebilir mi?

Bir diğeri araştırma sorusu ise "hsa miR-3670 ve hsa miR-8078'in MCF-7 hücrelerinde sitotoksikite, morfoloji, göç ve kolonizasyon ve 3D sferoid oluşturma yeteneği üzerindeki etkisi nedir?" Bu çalışmada, bir immün kontrol noktası olan PD-L1'in blokajı, MCF-7 hücre hattında ilk kez hsa miR-3670 ve hsa miR-8078 ile birlikte kullanılacaktır. Hsa miR-3670 ve hsa miR-8078 tarafından düzenlenen potansiyel işlevleri ve sinyal ağlarını değerlendirmek için zenginleştirme analizleri yapılmıştır. Bu amaçla biyoinformatik algoritmalar kullanılarak hedef gen ve miRNA-mRNA eşleme analizlerinin yanı sıra GO ve KEGG yol analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizin ardından miR-3670, PD-L1 mRNA'nın iki farklı bölgesine yüksek bağlanma skorları (82.15 ve 87.35) göstermiştir. Bu bulgular, bağlanmanın işlevsel öneme sahip olabileceği hipotezimizi güçlendirmeye hizmet etmektedir. Analizimizde hsa miR-8078 ile PD-L1 mRNA arasında doğrudan bir bağlanma bölgesi tespit edememiş olsak da,

biyoinformatik çalışmamız hsa miR-8078'in PD-L1 ekspresyonunda rol oynayan önemli sinyal yollarını (PI3K-Akt, Jak-STAT, Ras, Wnt, MAPK, Nf-kB, TNF- $\alpha$ , Notch, HIF-1 $\alpha$ , Hedgehog, mTOR, AMPK, TLR) hedef aldığını ve dolaylı şekilde baskılanmasına yol açtığını ortaya koymuştur. Çok sayıda çalışma, PD-L1'in kanserli hücre hatlarında benzer bir mekanizma yoluyla susturulduğunu göstermekte ve böylece bu araştırmada yapılan gözlemi güçlendirmektedir (Liu vd., 2021; Yan vd., 2021; Li vd., 2022).

İkinci biyoinformatik analiz olan GO analizi sonucunda, miR-3670 ve miR-8078 ile PD-L1 ligandlarının sentezinde yer alan temel düzenleyici sinyal yolları (PI3K-Akt, Jak-STAT, Ras, Wnt, MAPK, Nf-kB, TNF- $\alpha$ , Notch, HIF-1 $\alpha$ , Hedgehog, mTOR, AMPK, TLR) ile farklı biyolojik süreç (BP), hücresel bileşen (CC) ve moleküler işlev (MF) kategorileri arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermiştir. Literatür incelendiğinde, birçok çalışma yukarıda bahsedilen sinyal yollarının PD-L1'in ekspresyonunda önemli olduğunu göstermektedir (Coelho vd., 2017; Martin vd., 2018; Nakayama vd., 2019; Castagnoli vd., 2019; Antonangeli vd., 2020; Quan vd., 2022; Zhang vd., 2022; De Ridder vd., 2022; Cao vd., 2023; Bailey vd., 2022; Chen vd., 2022). Bulgular, miRNA-3670 ve miRNA-8078 kullanımının meme kanserinde PD-L1 ekspresyonunu etkili bir şekilde baskılayabileceğini göstermektedir. Ayrıca, GO analizimiz bu miRNA'ların meme kanseri ilerlemesi için çok önemli olan çeşitli biyolojik süreçlerde (metastaz, proliferasyon, hücresel göç ve farklılaşma gibi) önem arz eden, integrinler, selektinler, kaderinler gibi hücre bağlanma molekülleri ile doğrudan ilişkili olduğu ve süreçler üzerinde potansiyel etkinliğe sahip olduğunu belirlenmiştir. Önceki çalışmalar, hücre adezyon moleküllerinin ve bağlantı noktalarının meme kanseri metastazı ve invazyonunun düzenlenmesine katkıda bulunduğunu göstermiştir (Makrilia vd., 2009; Ilina vd., 2020). Kullanılan miRNA'ların (miR-3670, miR-8078) hücre hareketi ve metastazda rol oynayan lamellipodların ve filopodia yanı sıra sitomorfolojiyi etkileyen ve aktin filamentleri ve mikrotübül organizasyonu ile ilişkili olduğu belirlendi. Yapılan çalışmalarda, lamellipodia ve filopodia kanser metastazı ve hareketi ile bağlantılı olduğu (Machesky, 2008), Aktin filamentleri ve Mikrotübüllerin ise yara iyileşmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Ahangar vd., 2022). Bu bulgular miRNA-3670 ve miRNA-8078'in PD-L1'i susturmasının yanı sıra anti-kanser özelliklere sahip olabileceğini göstermiştir.

Üçüncü biyoinformatik araştırma olan KEGG yol analizi, miR-3670 ve miR-8078'in PD-L1 ligand sentezi sinyal yollarının temel düzenleyicilerini (PI3K-Akt, Jak-STAT, Ras, Wnt, MAPK, Nf-kB, TNF- $\alpha$ , Notch, HIF-1 $\alpha$ , Hedgehog, mTOR, AMPK, TLR) önemli ölçüde hedeflediğini göstermiştir. Önceki çalışmalarda, bu sinyal yolları ile PD-L1 arasında bir korelasyon olduğunu ve PD-L1 blokajının bu sinyal yollarının inhibe edilmesiyle sağlanabileceğini gösterilmiştir (Coelho vd., 2017; Martin vd., 2018; Castagnoli vd., 2019; Nakayama vd., 2019; Antonangeli vd., 2020; Bailey vd., 2022; Chen vd., 2022; de Ridder vd., 2022; Zhang vd., 2022; Quan vd., 2022; Cao vd., 2023). Bu yolların aşırı aktivasyonunun da karsinogenezi indüklediği bilinmektedir. Bu sonuçlar, miR-3670 ve miR-8078'in PD-L1 baskılamasına ek olarak anti-kanser özelliklere sahip olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda, biyoinformatik algoritmik verilerin *in vitro* korelasyonunu araştırmak ve miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 ve HME1 hücre hatlarındaki sitotoksik aktivitesi MTT testi kullanılarak incelenmiştir.

Önceki araştırmalar, hücre içinde önemli bir rol oynaması nedeniyle sitotoksisite testlerinde transfeğe edilen miRNA miktarının önemini vurgulamıştır (Vasudevan, 2012). Bu sebeple sitotoksisite çalışmamızda, her iki miRNA'yı belirli bir doz aralığında (1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM) test ettik. Sonuç olarak, miR-3670 ve miRNA-8078'in uygulanan tüm dozlarının MCF-7 hücre hattında kayda değer sitotoksik aktivite sergilediğini gösterdiği belirlenmiştir. Bu sitotoksisiteye ilgili miRNA'ların kanser hücrelerindeki hayati genler (örneğin K-RAS, c-MYC, BCL-2) üzerindeki inhibitör etkilerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bu düşüncemizi desteleyen literatür çalışmalar mevcuttur. Nadiminty ve diğerleri (2012) miRNA let-7c ile replasman tedavisinin hayati genleri inhibe ederek prostat kanseri büyümesini engellediğini bildirmişlerdir (Nadiminty vd., 2012). Benzer sonuçları farklı miRNA'ların kullanıldığı diğer çalışmalarda da bildirilmiştir (Johnson vd., 2005; Chen vd., 2009; Slaby vd., 2009). Lee ve diğerleri (2019), miR-3670 ve miR-8078'in akciğer kanseri hücrelerine (NCI-H460) transfeğe edilmesinden sonra bu miRNA'ların akciğer hücre hattında yüksek sitotoksisite ve anti-kanser aktivitesi gösterdiğini bildirmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızdaki verileri desteklemektedir. Çalışmamızda bu miRNA'lar literatürde ilk kez sağlıklı meme dokusu hücre hattında (HME1) da test edilmiş ve her

iki miRNA'nın (miRNA-3670 ve miRNA-8078) 1nM dozunun MCF-7 hücre hattında yüksek toksisiteye, HME1'de ise düşük toksisiteye sahip olduğu bulunmuştur.

Çalışma kapsamında yapılan total RNA analizlerinde, total RNA konsantrasyonları ile sitotoksikite seviyesi arasında anlamlı ve korelasyonlu bir ilişki olduğunu göstermiştir. Total RNA miktarının, yüksek sitotoksik dozlarda azaldığı ve düşük sitotoksik dozlarda ise arttırdığı belirlendi. Mapletoft ve diğerleri (2020) yumurtalık kanseri araştırmalarında sitotoksikite ve toplam RNA miktarı arasında güçlü ve doğrusal olmayan bir korelasyon bulmuşlardır (Mapletoft vd., 2020). Bu literatür incelemesi, çalışmamızın bulgularıyla uyumludur. Total RNA miktarındaki azalma, sitotoksikiteye bağlı olarak canlı hücre sayısındaki azalma ve uygulanan miRNA'ların hücredeki çeşitli önemli yolları (yaşamsal yollar gibi) etkileyerek protein trafiğini bloke etmesinden kaynaklanabileceğini söyleyebiliriz. Benzer bilgiyi Guo ve diğerleri (2010), yaptıkları çalışma neticesinde bildirmişlerdir (Guo vd., 2010). Ek olarak, KEGG ve GO analizleri, çalışmamızda kullandığımız her iki miRNA'nın da protein sentezi ve taşınmasından sorumlu organeller ve yollar üzerinde negatif etkileri olduğunu göstermiştir.

miRNA-3670 ve miRNA-8078'in hangi dozunun PD-L1'i transkripsiyonel olarak baskıladığını belirlemek amacıyla, MCF-7 ve HME1 hücre hatlarına miRNA-3670 ve miRNA-8078'in MTT testinde uygulanan doz aralığı (1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM) uygulandı ardından PD-L1 ekspresyonu RT-PCR analizi ile değerlendirildi. RT-PCR analizi sonuçları, miRNA-3670'in 1 nM, 5 nM ve 10 nM mimik dozajları ile miRNA-8078'in 1 nM, 5 nM ve 100 nM mimik dozajlarının MCF-7 hücrelerinde PD-L1 gen ekspresyonunu etkili bir şekilde baskıladığını göstermiştir. Bu bulgular ilgili miRNA'ların meme kanser hücrelerinde PD-L1 yolağının hedefleyerek önemli ölçüde PD-L1 baskılanmasına yol açtığını ortaya koymuştur. Literatürdeki çeşitli çalışmalar farklı miRNA'ların aynı yolu kullanarak PD-L1 inhibisyonuna yol açtığını göstermiştir. Bu çalışmalarda ilki Hajibabaei ve diğerleri çalışma olup, bu çalışmada miRNA-145'i MDA-MB231, BT549 ve MCF-7 gibi meme kanseri hücre hatları üzerinde kullanılmış ve miRNA-145'in PD-1/PD-L1 yolu üzerinden PD-L1 ekspresyonunu inhibe edebildiğini ve meme kanserinin ilerlemesini engellemek için etkili bir terapötik ajan olarak hareket edebileceğini gözlemlemişlerdir (Hajibabaei vd., 2022). Bir diğer çalışmada ise Rasoolnezhad ve diğerleri (2021), miRNA-138-5p

transfeksiyonunun meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231) PD-1/PD-L1 yolu üzerinden PD-L1 ekspresyonunu inhibe ettiğini bildirmiştir. Çalışma bulgularımız da bu literatür verileriyle örtüşmektedir.

İlginç bir şekilde, biyoinformatik analizlerimiz PD-L1 mRNA'sında miR-8078 için bir bağlanma bölgesi tespit etmemiş olsa da, RT-PCR analizi miR-8078'in PD-L1'in gen ifadesini aşağı doğru düzenlediğini ortaya koymuştur. KEGG ve GO analizlerinin yanı sıra RT-PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, hsa miR-8078'in PD-L1'in ekspresyonunda rol oynayan ana eksenindeki önemli sinyal yollarının mRNA'sını engelleyerek PD-L1'in ekspresyonunu dolaylı olarak baskıladığı sonucuna varılabilir. Literatür, kanser hücrelerindeki çeşitli pro-onkogenik yolların farklı kanser türlerinde PD-L1 ekspresyonu ile bağlantılı olduğunu vurgulamaktadır (Miao vd., 2017; Janse van Rensburg vd., 2018). Pekçok çalışmada, Liu ve diğerleri (2021), Yan ve diğerleri (2021) ve Li ve diğerlerinde (2022) olduğu gibi, PD-L1 ekspresyonuyla ilgili bu yolları inhibe eden ve PD-L1 ekspresyonunu baskılayan çok sayıda miRNA tanımlamıştır. Bu literatür kaynakları, hsa miR-8078'in dolaylı mekanizmalar yoluyla PD-L1'i potansiyel olarak kısıtlayabileceği hipotezimiz için kanıt sağlamaktadır.

RT-PCR verilerinin analizi üzerine, miR-3670 ve miR-8078'in 10 nM'yi aşan dozlarının MCF-7 hücrelerinde PD-L1 hedef geninin ekspresyonunda azalma yerine artışa yol açtığı ve doğrusal olmayan bir korelasyon gösterdiği keşfedilmiştir. Benzer şekilde, Shu ve diğerleri (2012) MCF-7 ve HCT-116 hücrelerinde doza bağlı hedef gen susturma araştırmalarında karşılaştırılabilir sonuçlar bulmuşlardır.

Yapılan bir çalışma, miRNA'ların biyolojik etkilerinin doza bağlı olduğunu ve hedeflenen proteinin mRNA'sını maksimum düzeyde baskılamak için dar bir optimal doz penceresi gerektirdiğini bildirmiştir (Shu vd., 2012). Diğer çalışmalar, yüksek konsantrasyonlardaki mimik miRNA'ların gen ifadesinde spesifik olmayan değişikliklere neden olduğunu göstermektedir (Jin vd., 2015; Rupaimoole ve Slack, 2017; Lai vd., 2019). Yakın zamanda yapılan bir çalışma, potansiyel hedef dışı etkiler nedeniyle kanser tedavisinde yüksek dozda mimik miRNA kullanımına karşı uyarıda bulunmuştur (Diener vd., 2022).

Transfeksiyon ajanı ve miRNA üreticileri de ürün teknik dokümanlarında (<https://www.polyplus-transfection.com/products/interferin/> erişim tarihi:23.06.2023;<https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=3e1477ad->

[74a2-4ee6-9c31-54b1997f2941andlang=en](#), erişim tarihi:23.06.2023) hedef geni susturmak için en etkili mimik miRNA konsantrasyonunun hedef gen, hücre tipi, miRNA tipi ve hedef mRNA'nın yarı ömrüne bağlı olarak değiştiğini belirtmişlerdir. Optimum gen susturma elde etmek için, gen susturma çalışmalarında mimik miRNA kullanarak 1 nM ila 10 nM arasında değişen miRNA konsantrasyonlarının test edilmesi tavsiye edilmiştir. Böylece hedef dışı etkiler ve yanlış bağlanma (uyumsuzluk) sorunlarının genellikle düşük miRNA konsantrasyonlarında daha az olduğu bildirilmiştir.

HME1 hücre hattında yapılan RT-PCR analizinde, miRNA-3670 ve miRNA-8078 mimik miRNA'larının tüm dozlarının başlangıçta beklendiği gibi PD-L1 ekspresyonunu inhibe etmek yerine artırdığı keşfedilmiştir. Bu sonuç, ilgili miRNA'ların sağlıklı hücrelerde PD-L1 seviyesinin düşmesini önleyerek immün yanıtları düzenleyebileceğini, böylece otoimmün yanıtları hafifletebileceğini ve tedavi sırasında sağlıklı doku hasarını azaltabileceğini düşündürmektedir. Çok sayıda çalışma, sağlıklı doku hücrelerindeki PD-L1'in otoimmüniteye ve ilişkili doku hasarına karşı koruma sağladığını belgelemiştir (Wang vd., 2016; Khunger vd., 2017; Qin vd., 2019).

miR-3670 ve miR-8078 tarafından meme kanseri hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunun protein düzeyinde post-translasyonel baskılanmasını belirlemek için PD-L1 elisa testi yapıldı. Bu testin yapılmasının bir diğer amacı RT-PCR test sonuçlarını doğrulamak ve miRNA'ların transfeksiyonundan sonra sentezlenen ve hücreden salgılanan çözünür PD-L1 (sPD-L1) seviyesindeki değişikliği değerlendirmektir. Analiz sonucuna göre, MCF-7 kanser hücre hattındaki serbest PD-L1 protein seviyelerinin, miR-3670'in 100nM dozu hariç tüm dozları ve miR-8078'in sadece 1nM ve 5nM dozları ile azalttığı tespit edildi.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, kanser hastalarının sPD-L1 düzeylerinin sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (Oh vd., 2021). Benzer şekilde, hepatoselüler karsinom, mide kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarda sPD-L1 seviyeleri yüksek bulunmuş ve yüksek sPD-L1 seviyeleri kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Zhang vd., 2015; Finkelmeier vd., 2016; Ito vd., 2018; Mazzaschi vd., 2020).

Gao ve diğerleri (2019), miR-873'ün PD-L1 ekspresyonunu düzenleyebileceğini ve meme kanseri hücrelerinde immün modülasyon sağlayabileceğini bulmuştur (Gao

vd., 2019). Önceki araştırmalar miR-138-5p'nin kolorektal kanserde (Zhao vd., 2016), miR-200'ün küçük hücreli dışı akciğer kanserinde (Chen vd., 2016) ve miR-15a'nın malign plevral mezotelyomada (Kao vd., 2017) PD-L1 protein seviyelerini azalttığını göstermiştir. Bu bulgular, PD-L1 protein seviyelerine ilişkin gözlemlerimizle uyumludur. Yukarıda bahsedilen sonuçlar, miR-3670 ve miR-8078'in PD-L1 ekspresyonunu inhibe etmek suretiyle tümör mikroçevresini düzenleyerek meme kanseri hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçışını engelleyebileceğini göstermektedir. HME1 hücre hattı için PD-L1 elisa testinde, miRNA-3670 ve miRNA-8078 için tüm mimik miRNA dozları, beklendiği gibi sPD-L1 protein seviyesinde önemli bir değişikliğe yol açmamıştır.

Deneyisel çalışmalarımızda sitotoksiste, RT-PCR ve PD-L1 elisa test sonuçları dahil olmak üzere çoklu yaklaşımları değerlendirdikten ve bulguların karşılaştırmalı bir analizini yaptıktan sonra, diğer ileri çalışmalarda 1 nM'lik seçici bir miR-3670 ve miR-8078 dozunun kullanılmasının en uygun karar olduğunu belirledik. Bu dozun seçilmesinde temel etken, her iki miRNA için 1 nM'deki yüksek sitotoksitesiydi ve MCF-7 hücrelerinde PD-L1 seviyesinde bir düşüşe neden oldu. Buna karşılık, sağlıklı meme dokusu hücre hattı (HME1) üzerinde ters bir etkiye sahipti, böylece hedef dışı etkilere ve her iki miRNA'nın uyumsuz bağlanmasına karşı koruma sağladı. Michaille ve diğerleri (2019), hücrede terapötik bir yanıt ortaya çıkarmak için terapötik bir miRNA'nın düşük doz aralığında uygulanması gerektiğini bildirmişlerdir (Michaille vd., 2019). Özetle literatüre ve mevcut analizlerimize dayanarak 1 nM miR-3670 ve miR-8078 dozunun bu aşamadan sonraki testlerimiz için uygulanacak optimum doz olduğu belirlendi. Tümör ve mikro çevresindeki hücrelerinde immün kontrol noktası olan PD-L1 ekspresyonunun arttığı bilinmektedir. PD-L1 deki bu artışı kanser hücreleri, bağışıklık hücrelerinin gözetim ve sitotoksik etkisinden kaçınmada, tümör ilerlemesinde kullandığı bilinmektedir (Ren vd., 2020). Ko-kültür çalışmamızda, miR-3670 ve miR-8078 uygulandıktan sonra azalmış PD-L1 ekspresyonuna sahip MCF-7 hücreleri ile aktive (PHA ve IL-2) edilmiş CD8<sup>+</sup>T hücreleri ko kültür yapılmasının kanser hücrelerinde yüksek seviyede hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. Bu hücre ölüm mekanizması, miR-3670 ile miR-8078'nin meme kanseri (MCF-7) hücrelerinde aşırı ekspresyonu, PD-L1'i azaltması yoluyla *in vitro* ortak kültür sisteminde CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin aktivasyonunu arttırarak anti tümöral etkinliğini teşvik ederek

gerçekleşmiştir. Literatür incelendiğinde benzer mekanizmayı kullanarak anti tümöral etkinliğin gösterildiği çok sayıda çalışma mevcuttur (Miliotis and Slack, 2021; Lin vd., 2021; Pathania vd., 2022; Wang vd., 2022; Du vd., 2023).

Canlı organizmalarda, işlevsel olmayan hücrelerin (yani yaşlı veya hasarlı hücrelerin) ortadan kaldırılması ile yeni, sağlıklı hücrelerin üretilmesi arasında bir denge vardır. Bu denge homeostazın sürdürülmesinde çok önemli bir rol oynar (Wyllie, 1980; Hu vd., 2001). Her hücrenin sınırlı bir ömrü vardır; ömrünün sonuna ulaşmış ya da hasar görmüş hücreler önceden belirlenmiş bir süre sonunda ölürler. Canlı organizmalarda hücrelerin sonlandırılmasından iki mekanizma sorumludur: apoptoz ve nekroz. Apoptoz, hücrelerin genetik olarak düzenlenmiş ölümüdür (Renehan vd., 2001). Bu organize hücre ölümü mekanizması, membran kabarcıklarının oluşumu, hücrenin fiziksel olarak küçülmesi, kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanması ile karakterize edilir (Saraste ve Pulkki, 2000; Renehan vd., 2001). Nekroz ise, programlanmamış dış faktörlerin neden olduğu hücrelerin kendiliğinden ölümüdür. Nekrotik hücreler fiziksel olarak şişmiş, bozulmuş veya patlamış hücre zarı ve dağılmış sitoplazmik organellerle karakterize edilir (Fink ve Cookson, 2005). Apoptoz ve nekroz arasındaki temel fark, apoptotik ölümün önceden belirlenmiş olması ve inflamasyona neden olmamasıdır. Sonuç olarak, tümör hücrelerinde apoptozu uyaran kanser tedavileri, kanser hücrelerinin ortadan kaldırılması için esastır (Carneiro ve El-Deiry, 2020). Bu tez çalışmasıyla, miR-3670 ve hsa-miRNA-8078'in 1 nM dozajında uygulanmasının MCF-7 hücrelerinde hedef genleri baskılayarak hücre çoğalmasını güçlü bir şekilde engellediği ve sitotoksik etkiyle hücre ölümüne yol açtığı bulunmuştur. Bu hücre ölümünün modunu aydınlatmak için apoptoz ve nekroz analizleri yapılmıştır. Analizler, 1 nM dozunda miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 hücre sağkalımını azaltarak apoptozu tetiklediğini ve apoptotik hücreleri sırasıyla %25 ve %52 oranında artırdığını ortaya koymuştur. Nekrotik hücrelerin sayısı kontrol grubuna göre önemsizdi.

Aynı miRNA'ların 1 nM dozunun HME1 apoptozunu artırmadığı ve kontrol grubundan belirgin bir şekilde farklı olmadığı bulunmuştur. Bu sonuçlara göre çalışmada kullanılan miRNA'ların apoptotik yollar aracılığıyla meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediğini ve sağlıklı hücrelere zarar vermedikleri için seçici olarak hedeflenmiş tedavilerde potansiyel bir uygulama sunabileceğini göstermektedir.

Öte yandan, miRNA-3670 yüksek sitotoksosite sergilemesine rağmen, apoptotik indeksi miR-8078'e kıyasla daha düşüktür. Bu da miRNA 3670'in kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için apoptotik yol yerine farklı yollar kullandığını düşündürmektedir. Literatür incelendiğinde, kanser hücrelerinde apoptoz ile aynı yolu kullanan veya tamamen bağımsız yollarla hücre ölümünü tetikleyen başka mekanizmaların da olduğu bildirilmiştir. Bu mekanizmalar arasında methuozis, nekroptoz, NETozis, pironkroz, piroptoz, entoz ve ferroptoz yer almaktadır (Rex vd., 2022). Çalışmalar miRNA'ların ölüm yollarını hedefleyebildiğini ve bir miRNA'nın bu tür birden fazla yolu hedefleyebildiğini göstermiştir (Su vd., 2015). Nyhan ve diğerlerinin (2016), yaptıkları çalışmada, miR-193b'nin özofagus kanserinde apoptozu aktive etmediği, bunun yerine apoptotik olmayan bir yolla otofaji ve hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir (Nyhan vd., 2016). Benzer şekilde, Xu ve diğerleri (2022) miR-15a'nın prostat kanserinde ferroptoz yolu ile hücre ölümünü indüklediğini bildirmiştir. Yukarıda sunulan literatür verileri, bu çalışmada kullandığımız miR-3670'in apoptotik ve apoptotik olmayan hücre ölüm mekanizmalarını kullanarak meme kanseri hücrelerini (MCF-7) öldürebildiğini destekler niteliktedir.

miR-3670'in apoptotik olmayan yollarla kanser hücrelerini yok etme kapasitesi çok önemlidir. Çünkü literatür raporları, çeşitli faktörler nedeniyle apoptoza karşı kanser hücresi direncinin geliştiğini vurgulamakta, dolayısıyla bu direnci yenmek için inflamasyonu önleyen apoptotik olmayan hücre ölümüne yönelik yeni tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır (Fulda, 2009; Chen vd., 2018; Dong vd., 2023).

Bu açıdan bakıldığında, miR-3670'in apoptotik olmayan yollarla kanser hücrelerini yok etme yeteneği nedeniyle apoptoza dirençli meme kanserlerinde terapötik bir seçenek ve tedavi stratejisi olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu söylenebilir. Kansere bağlı ölümlerin %90'ından metastazın sorumlu olması nedeniyle, metastaz kanser tedavisinde önemli bir zorluk teşkil etmektedir (Labelle ve Hynes, 2012; Ramos-Silva vd., 2017; Roshani vd., 2021). Hücre göçü ve invazyonu, metastaz gelişiminde iki kritik faktördür. Hücre göçü deneyi veya yara iyileşmesi deneyi, hücre göçünü ve metastazı *in vitro* olarak incelemek ve anti-metastatik molekülleri keşfetmek veya doğrulamak için klasik, basit, uygun maliyetli, tekrarlanabilir ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Yarrow vd., 2004; Gulhati vd., 2011; Freitas vd., 2021).

MCF-7 meme kanseri hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu üzerinde miR-3670 ve miR-8078'in aktivitesinin değerlendirilmesinin ardından, bu miRNA'ların MCF-7 ve HME1 hücrelerinin göçü ve invazyonu üzerindeki inhibisyon aktivitesini değerlendirmek için bir dizi analiz yapılmıştır.

İlk analiz olarak biyoinformatik analiz (KEEG ve GO) gerçekleştirildi ve her iki miRNA'nın (miR-3670 ve miR-8078) metastazla ilgili genlerin mRNA'larına yönelik yüksek bir hedefleme etkinliğine sahip olduğu belirlenmiştir.

İkinci bir analiz olarak *in vitro* ortamda hücre göçü analizi gerçekleştirildi. Hücre göçü analizimizin sonuçlarına göre, miR-3670 ve miR-8078 MCF-7 hücrelerinde hücre göçünü güçlü bir şekilde inhibe etmiş (sırasıyla %81.47 ve %99.9) ve anti-metastatik etki göstermiştir. Bu anti-metastatik etkinin, miR-3670 ve miR-8078'in neden olduğu MCF-7 meme kanseri hücre hattındaki metastazla ilişkili gen mRNA'larının (MMP-1,2,9, CXCR-4, EMT, SNAIL-1, vb.) baskılanmasına atfedilebileceğini öneriyoruz. Çeşitli kanser hücre hatlarında farklı miRNA'ların kullanıldığı son araştırmalarda, miRNA'ların metastazla ilişkili genlerin mRNA'larını hedefleyerek anti-metastatik aktivite sergilediği bulunmuştur (Asghariazar vd., 2022; Chen vd., 2022; Guo vd., 2022; Lin vd., 2022; Suyal vd., 2022). Bu literatür verileri çalışmamızı desteklemektedir.

HME1 hücrelerinde miR-3670 ve miR-8078 hücre göçünü inhibe edemediği (sırasıyla %22.8 ve %6.2) tespit edilmiştir. Bu, test edilen miRNA'ların sağlıklı dokuya zarar verme riskinin düşük olduğunu ve kanser tedavisi için yalnızca MCF-7 hücrelerini hedef aldığını göstermektedir. Bu nedenle, tedavi sırasında potansiyel olarak düşük yan etkilere sahip olabilirler.

Analizlerimiz sonucunda, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde PD-L1 etkili bir şekilde inhibe eden miR-3670 ve miR-8078'in 1nM dozunun MCF-7 hücrelerinde kayda değer bir anti-metastatik etki sağladığını belirledik. Bulgularımız PD-L1'in hücre yapışmasını düzenleyerek hücre göçünü teşvik etmede rol oynadığını göstermiştir. Literatür verileri incelendiğinde, PD-L1'in onkogenik bir etkiye sahip olduğunu ve aşırı ekspresyonunun hücre proliferasyonu, kemorezistans ve metastazda artışa yol açtığını göstermiştir (Sheng vd., 2016; Tsutsumi vd., 2017). Benzer şekilde, kolorektal kanserde yapılan bir çalışmaya göre, PD-L1 doğrudan hücre göçü ile ilişkili olduğunu ve susturulması, hücre invazyonunu ve çoğalmasını engellediği bildirilmiştir (Cao vd.,

2022). Lee ve diğerleri (2017) PD-L1'in baskılanmasıyla akciğer kanseri hücrelerinin (PC9 ve PC9/GR) çoğalmasında ve göçünde önemli bir inhibisyon olduğunu göstermiştir. Rugamba ve diğerleri (2021) PD-L1'in silibinin ile bloke edilmesinin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinin göçünü engellediğini göstermiştir. Tüm bu literatür verileri çalışma sonuçlarımızla, uyumludur ve araştırma verilerimizi güçlü bir şekilde desteklemektedir.

Metastatik kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerden farklı morfolojik özellikleri taşıdığı bilinmektedir (Lyons vd., 2016). EMT ve MET yolları metastaz sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. EMT yollarının özellikle kanser hücreleri tarafından metastatik özellikler kazanmak için kullanıldığı belirtilmektedir (Nelson vd., 2008). EMT'nin, epitelial hücrelerin artan hareketlilik kazandığı, hücre iskeletinde değişikliklere uğradığı ve morfolojik olarak kübik epitelial yapıdan uzun iğ iplik şeklindeki mezenkimal forma dönüştüğü bir olgudur (Nelson vd., 2008). EMT'nin, PD-L1 ile birlikte kanser metastazında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. EMT'nin PD-L1 aracılı immünoşüpresyonu mümkün kılabileceği iyi bilinmekle birlikte, bunların karşılıklı etkileşiminin kesin moleküler mekanizmaları büyük ölçüde bilinmemektedir (Burger vd., 2022).

Meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) ifade edilen PD-L1'i etkili bir şekilde inhibe eden miR-3670, miR-8078'in hücre morfolojisi ve EMT/MET yolağı ile ilişkisini araştırma amacıyla yaptığımız biyoinformatik analizle (KEGG ve GO) her iki miRNA'nın da (miR-3670, miR-8078) metastaza katkıda bulunan EMT sinyal yolağı ile yakın bir ilişkiye sahip olduğunu gösteren belirledik. Ayrıca, miRNA'lar aktin filamentleri ve mikrotübül filamentleri de dahil olmak üzere hücre iskeleti bileşenlerinin yanı sıra lamellipodia, psödopodyum, silyum ve filopodyum gibi hücre hareketliliğinde rol oynayan yapılarla önemli bir ilişki sergilemiştir. Ayrıca, bu moleküllerin metastatik hücre morfolojisinde rol oynayan fokal adezyon molekülleri ve hücre bağlantıları gibi bağlarla korelasyonu olduğu tespit edilmiştir. Bu testin ardından, olası anti-metastatik aktivitesini incelemek ve EMT süreciyle ilgili olası hücre morfolojik değişikliklerini değerlendirmek için *in vitro* morfoloji analizi yapılmıştır.

Analiz sonucunda, kullanılan miRNA'ların MCF-7 hücrelerini mezenkimal hücrelerin karakteristik uzun, iğ şeklindeki morfolojisinden epitelial hücrelere benzer şekilde daha yuvarlak, küboidal bir morfolojiye dönüştürdüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca,

miRNA uygulamasının ardından MCF-7 hücrelerinde lamellipodia varlığında belirgin bir azalma, MET dönüşümünü indüklediği tespit edilmiştir. Bu sonuç da ilgili miRNA'ların (1nM dozu) anti-metastatik özelliklerini göstermektedir. MCF-7 hücrelerinin aksine, çalışmada incelenen miRNA'lara maruz kalan HME1 hücrelerinde herhangi bir morfolojik değişiklik gözlenmemiştir. Literatürde, bulgularımızı destekleyen farklı miRNA'lar (miR-200 ailesi, miR-203 ve miR-205) kullanılarak EMT dönüşümünün baskılanmasıyla kanser hücrelerinde epitelyal farklılaşmanın korunduğunu ve metastazın önlenemediğini gösteren çok sayıda yayın bulunmaktadır (Brabletz ve Brabletz, 2010; Dykxhoorn, 2010; Greene ve Pisano, 2010; Xia vd., 2012; Feng vd., 2022). Yumurtalık seröz adenokarsinom hücre hatları (HEY A8 ve SKOV-3) üzerinde yapılan bir araştırmada Chen ve diğerleri (2011) ile Jabbari ve diğerleri (2014) miR-429'un yumurtalık kanser hücrelerini, morfolojik mezenkimal hücre özelliği olan uzun iğ iplik şeklinden epitelyal hücre özelliği olan küboidal şekle dönüştürdüğünü bildirmiştir. Benzer şekilde, çeşitli miRNA'lar aracılığıyla kanser hücrelerinin lamellipodia ve hücre iskeletinin hedeflenmesi ve azaltılmasıyla metastazın engellendiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Nair vd., 2012; Bockhorn vd., 2013; Tanaka vd., 2017). Bu sonuçlar bulgularımızı güçlü bir şekilde desteklemektedir. Analizlerimiz sonucunda ayrıca PD-L1 inhibisyonunun EMT oluşumunu engellediğini söyleyebiliriz. Burger ve diğerleri (2022) tarafından yapılan bir matematiksel modelleme çalışmasında da PD-L1 ifadesinin inhibisyonu EMT oluşumunu potansiyel olarak engelleyebileceği bildirmişlerdir. Ayrıca, Muralidharan ve diğerleri (2022) tarafından yapılan biyoinformatik çalışmada PD-L1 ile EMT programı arasında güçlü bir pozitif korelasyon olduğunu ortaya koymuşlardır (Muralidharan vd., 2022). Yukarıda sunulan literatür verileri çalışmamızın verilerini desteklemektedir.

miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 hücreleri üzerindeki potansiyel anti-metastatik etkisini araştırmak için, metastaz ve hücre hareketliliğiyle bağlantılı bir faktör olan çözünür e-kaderin analizi yapıldı. Bulgularımız, miR-3670 ve miR-8078'in 1 nM dozunun MCF-7 hücrelerinde serbest e-kaderin antijen seviyelerini önemli ölçüde ( $p \leq 0.05$ ) azalttığını göstermektedir.

E-kaderin membrana bağlı bir adezyon glikoproteinidir. Metastazda e-kaderin ile ilgili genel kanı, e-kaderin eksikliğinin kanser hücrelerinde invazyon ve metastazı kolaylaştırdığı yönündedir (Maguire vd., 1997). Buna karşın, farklı kanser türlerinde

yapılan bir dizi çalışma, yüksek e-kaderin seviyelerine sahip kanser hücrelerinin tam EMT geçirmeden göç ve metastaz yapabildiğini ortaya koymuştur (Bukholm vd., 2000; Lou vd., 2008; Yang ve Weinberg, 2008; Querzoli vd., 2010; Hollestelle vd., 2013; Şamir vd., 2014). Özellikle yumurtalık kanseri, glioblastoma ve prostat kanseri gibi farklı invaziv ve metastatik kanserli hastalarda yüksek düzeyde e-kaderin ekspresyonu bulunmuştur. Sonuç olarak, e-kaderinin tümör ilerlemesini engellemek yerine belirli kanser türlerinde metastazı teşvik ettiği gösterilmiştir (Reddy vd., 2005; Lewis-Tuffin vd., 2010; Putzke vd., 2011; David ve Rajasekaran, 2012). Park ve diğerleri (2017) mide kanseri hücre hattı (AGS) üzerinde yaptıkları araştırmada, kanser hücre proliferasyonunun teşvik edilmesinin e-kaderin ekspresyonu ile indüklendiğini göstermiştir (Park vd., 2017). Alsaleem ve diğerleri (2019), e-kaderin kaybının invaziv duktal karsinomda metastazı teşvik etmediğini bildirmişlerdir. E-kaderin kaybının büyük olasılıkla karsinogenez sırasında ortaya çıkan genomik instabilitenin bir sonucu olduğunu öne sürmüşlerdir. Çalışmalar, e-kaderinin toplu hücre göçü davranışlarını teşvik ederek meme tümör hücrelerinin metastazını kolaylaştırdığını göstermiştir. Ayrıca, bu tümör hücreleri kanda yapışık kümeler (kolektif) halinde dolaştıklarında, tek tek tümör hücrelerine kıyasla daha yüksek metastatik yetenekler sergilerler (Cheung vd., 2013; Cheung vd., 2016). Çeşitli çalışmalar e-kaderinin hücre sağkalımını teşvik ederek metastazı kolaylaştırdığını bildirmiştir (Shamir vd., 2014; Cai vd., 2014; Padmanaban vd., 2019; Na vd., 2020). Kanser metastaz sürecinin dört temel aşamasında (yapışma, ayrılma, göç ve invazyon), hücre yüzeyindeki e-kaderin aktivitesinin metastazı farklı şekilde düzenlediği öne sürülmüştür (Na vd., 2020). Venhuizen ve diğerleri (2020) çözünür e-kaderin üzerine bir çalışma yürütmüş ve tümörü teşvik edici etkilerini rapor etmiştir. Çalışmada, çözünür e-kaderinin çeşitli kanser türlerinde yüksek bir ekspresyona sahip olduğu bulunmuştur (Venhuizen vd., 2020). Ayrıca Venhuizen ve diğerleri (2020), e-kaderinin kanser metastazı ile ilgili karşıt işlevlerinin hücrelerde bulunduğu forma bağlı olduğunu bildirmiştir. Hücre zarında bulunan çözünmez e-kaderin formu (E-cad) hücre metastazını inhibe ederken, membrana bağlı formun proteolitik bölünmesiyle üretilen çözünür hücre dışı sE-kaderin formu, çeşitli onkogenik fonksiyonel özellikler yoluyla metastazı teşvik eder (Venhuizen vd., 2020). Yapılan çalışmalarda sE-kaderinin, insan meme tümör hücrelerinin adeziv fonksiyonlarını inhibe ederek yüzey bağlantılarını bozabildiği gösterilmiştir (Wheelock vd., 1987; Noë vd.,

2001; Symowicz vd., 2007). Sunulan literatür bilgileri de, çalışma bulgularımız olan miR-3670 ve miR-8078'in meme kanseri (MCF-7) hücreleri tarafından serbest e-kaderin salgılanmasını azaltmaları yoluyla anti-metastatik aktivitelerinin olduğunu desteklemektedir.

Yukarıda sunduğumuz literatür verilerine dayanarak metastazın intravazasyon (yapışma, ayrılma) safhasında bağlı e-kaderin artışı metastazı önlerken ekstrasvazasyon (göç ve istila) aşamasında çözünür e-kaderin azalışı metastazı baskıladığını söylemek mümkündür. Özellikle ekstrasvazasyon (göç ve istila) aşamasında uyguladığımız miRNA'lar ile hücrelerdeki çözünür e-kaderin azalışı kanda dolaşan tümör hücrelerinin uzak dokulara ulaştığında dokuya tutunamamasına böylece hücrede proliferasyon ve çoğalma sinyalleri oluşmamasına, morfogenetik hareketlerin inhibisyonuna yoluyla metastatik kolonizasyonunu engelleyebileceğini kanıslındayız.

Araştırmamızda, PD-L1 ekspresyonunu inhibe eden miR-3670 ve miR-8078'in (1 nM) MCF-7 hücrelerinde serbest e-kaderin seviyesini aşağı doğru düzenlemesi bu iki faktör arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Suda ve diğerleri da (2017) yaptıkları çalışmada akciğer kanserinde shRNA ile tedaviden sonra e-kaderin ve PD-L1 ifadesi arasında bir korelasyon bulmuş ve her ikisinde de bir düşüş gözlemlemiştir. Bu veri, çalışmamızın sonuçları için sağlam bir destek sağlamaktadır.

miR-3670 ve miR-8078'in, 1 nM dozunda, HME1 hücrelerinde serbest e-kaderin antijen seviyesini azalttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç, her iki miRNA'nın da mikro çevredeki serbest e-kaderin antijeni miktarını baskılayarak yani, kanserli hücrelerini çevreleyen sağlıklı doku hücrelerinde (HME1) serbest e-kaderin ifadesini ve salınımını sınırlayarak tümör hücresi metastazının dolaylı olarak engellenmesine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Tümörlerde önemli bir anjiyojenik faktör olan VEGF, meme karsinogenezinde (tümör gelişimi, ilerlemesi ve metastaz) kritik bir rol oynamaktadır (Liu vd., 2011).

Bu çalışmada, miR-3670 ve miR-8078'in anjiyogenez ve metastaz inhibisyonu ile ilgili potansiyel hedeflerini belirlemek için yapılan biyoinformatik araştırmada (KEEG ve GO) ilgili miRNA'ların VEGF-A ve VEGF-A ekspresyonu ile ilişkili çoklu onkojenik yolları (p38/MAPK, RAS/RAF/MEK/ERK ve PI3K/AKT), hipoksiyle indüklenebilir faktör-1 (HIF-1) hedef alma potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonucu *in vitro* olarak doğrulamak için MCF-7 ve HME1 hücre

hatlarında yapılan analiz sonucunda, miR-3670 ve miR-8078'in (1 nM) MCF-7 ve HME1 hücrelerinde serbest VEGF-A seviyelerinde düşüşe neden olduğunu tespit edilmiştir.

Biyoinformatik ve VEGF-A analizlerinin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, miR-3670 ve miR-8078'in HIF-1a'yı hedef alarak meme kanseri hücrelerinde serbest VEGF-A seviyesini düşürdüğü sonucuna varılmıştır. Literatürdeki çok sayıda çalışma, hedef olarak HIF-1a'ya özellikle vurgu yaparak, çeşitli miRNA'ların kullanılmasıyla serbest VEGF-A seviyelerinin azaltıldığını göstermektedir (Zou vd., 2012; Krutilina vd., 2014; Ma vd., 2017; Sancho-Garnier ve Colonna, 2019; Tang vd., 2021; Laitinen vd., 2022). Çalışmalar VEGF-A'nın p38/MAPK, RAS/RAF/MEK/ERK ve PI3K/AKT yolaklarını aktive ederek proliferasyon ve metastazı indüklediğini göstermiştir (Liu vd., 2022).

Literatür ve çalışma bulgularımız gözden geçirildiğinde, miR-3670 ve miR-8078'in VEGF-A seviyelerini azaltarak ve VEGF-A tarafından aktive edilen çeşitli onkojenik yolakları engelleyerek çok çeşitli anti-proliferatif ve anti-metastatik etkilere sahip olduğu sonucuna varılabilir. Benzer sonuçlar Ellis ve Hicklin (2008) ve Barba ve diğerleri (2021) tarafından da bildirilmiştir (Ellis ve Hicklin, 2008; Barba ve diğerleri, 2021). VEGF sinyal yolağının tümör bağışıklığının baskılanması üzerinde önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir (Kim ve Chen, 2016; Geindreau vd., 2021). Araştırmamız, 1nM dozunda miR-3670 ve miR-8078 kullanımının kanser immünoterapisi için güçlü bir monoterapötik potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Bunun nedeni, hem çözünür PD-L1 hem de çözünür VEGF-A seviyelerini düşürme kabiliyetidir. Mevcut kanıtlar, anti-PD-L1 tedavilerinin VEGF-A yolağı inhibisyonu yoluyla daha etkili hale getirilebileceğini göstermektedir (Reck vd., 2019; Finn vd., 2020; Zhao vd., 2021; Ishikura vd., 2022). Tada ve diğerleri, *in vitro* çalışmalarında VEGF'nin inhibisyonunun bağışıklık tepkilerini artırdığını bulmuşlardır (Tada vd., 2018). Çalışma bulgularımız ve destekleyici literatür verileri bu sonucu pekiştirmektedir.

Tubulointerstisyel nefrit antijen benzeri-1 (TINAGL-1) bir hücre dışı matris (ECM) proteini olarak kabul edilmiştir. TINAGL-1, hücre adezyonuna katılımı nedeniyle hücre proliferasyonu, göçü ve farklılaşmasının modülasyonunda temel bir oyuncudur (Sun vd., 2019). TINAGL-1 hem yapısal matris proteinleri hem de hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşime girerek integrin aracılı hücre yapışmasını teşvik eder

(Li vd., 2007; Igarashi vd., 2009). TINAGL-1'in fizyolojik rolleri ve ifadesinin düzenlenmesi yeterince aydınlatılamamıştır (Igarashi vd., 2009). Ayrıca, TINAGL-1'in tümör mikro çevresindeki işlevi büyük ölçüde bilinmemektedir (Musetti ve Huang, 2021).

Bu tez çalışması kapsamında, TINAGL-1 elisa analizini kullanarak miR-3670 ve miR-8078'in (1nM) meme kanseri hücre hatlarında serbest TINAGL-1 üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. Sonuç olarak, ilgili miRNA'ların MCF-7 ve HME1 hücre hatlarında serbest TINAGL-1 antijen seviyesini azalttığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda, MCF-7 hücrelerinde yüksek düzeyde TINAGL-1 üretildiği tespit edilmiştir. Literatür incelendiğinde, çok sayıda çalışmada TINAGL-1'in metastatik kanserlerde sıklıkla aşırı eksprese edildiğini, VEGF ve matris metalopeptidazların ekspresyonunu artırarak kanser hücrelerinin çoğalmasını ve metastazı teşvik ettiğini bildirmiştir (Brown vd., 2010; Sun vd., 2019; Shan vd., 2021; Sato vd., 2022). Zhou ve diğerleri (2023), akciğer kanserli hastaların kan dolaşımında TINAGL-1'in azalması ile sağkalım süreleri arasında bir korelasyon bulmuştur (Zhou vd., 2023) ve bu literatür verileri çalışma bulgularımızı desteklemektedir. Fakat literatüre bakıldığında TINAGL-1'in kanserde çok yönlü bir rol oynadığı ve bazı çalışmalarda yüksek TINAGL-1 ekspresyonunun hem üçlü negatif meme kanseri hem de belirli meme kanseri hücre tiplerinin metastazını ve büyümesini azalttığını öne sürmektedir (Durai vd., 2006; Igarashi vd., 2009; Kang, 2014; Shen vd., 2019; Yang vd., 2020; Musetti ve Huang, 2021; Kato vd., 2022). Literatürde bulunan bu çelişkili sonuçlar ve tutarsızlıklar, kanser türlerindeki farklılıklardan, kanser hücresi alt türlerindeki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca TINAGL-1 seviyeleri ile tümör mikro çevresi, PD-L1 ve diğer immün kontrol noktaları arasında doğrudan veya dolaylı bir korelasyon olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır. Çalışmamızın bulguları, PD-L1 ekspresyonunu inhibe eden miR-3670 ve miR-8078'in (1nM) MCF-7 hücrelerindeki TINAGL-1 seviyelerinde bir azalmaya yol açtığını göstermektedir. Bu sonuca dayanarak PD-L1 ve TINAGL-1 arasında bir korelasyon olduğu kanısını taşımaktayız. Sonuç olarak TINAGL-1'in kanserdeki rolünün daha kapsamlı bir şekilde araştırılması ve tam olarak tanımlanmasının acilen gerekli olduğunu literatür verileri ortaya koymaktadır.

Koloni oluşumu analizi, tek bir kanser hücresinin tümör oluşturma kapasite ölçen bir testidir (Franken vd., 2006; Brix vd., 2021). Koloni analizi, hücrenin "sınırsız"

bölünme yeteneğini ölçer. Bu test, farklı terapötik ajanların ve klinik uygulamaların ankraja bağlı büyüme, çoğalma, sitotoksosite veya genotoksosite üzerindeki etkilerini ölçmek için kanser çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Ayoub vd., 2021; Brix vd., 2021).

Çalışma kapsamında miR-3670 ve miR-8078'in meme kanseri hücrelerinin ankraj bağımlı büyümesi üzerindeki etkisini değerlendirmek için koloni analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz, MCF-7 hücrelerinin miR-3670 ve miR-8078 (1 nM) mimik miRNA'lara maruz kaldıklarında önemli ölçüde daha az sayıda koloni ürettiğini (sırasıyla %17.7 ve %78.2) belirlenmiştir. Lee ve diğerleri (2019), miR-3670 ve miR-8078 ile transfekte edilen akciğer kanseri hücrelerinde (NCI-H460) bu miRNA'ların koloni oluşturma kabiliyetini araştırmış ve her iki miRNA'nın da koloni oluşumunu yüksek oranda baskıladığını ortaya koymuştur. Bu bulgular kendi çalışma sonuçlarımızla uyumludur.

Literatürdeki çok sayıda çalışma, çeşitli miRNA'ların hücre büyümesi ve bölünmesi ile ilgili sinyal yollarını hedef alarak meme kanseri hücrelerinde kolonizasyonu engellediğini göstermektedir (Iorio vd., 2009; Li vd., 2014; Luo vd., 2014; Chen vd., 2023; Mani vd., 2023; Yao vd., 2023). Bu çalışmanın biyoinformatik analizleri, miR-3670 ve miR-8078'in hücre büyümesi ve bölünmesiyle ilgili spesifik genleri ve sinyal yollarını hedeflediğini ortaya koymaktadır. Literatür ve koloni oluşum analizi göz önünde bulundurulduğunda, miR-3670 ve miR-8078'in hücre büyümesi ve bölünmesi için önemli genleri ve sinyal yollarını hedef alarak MCF-7 hücrelerinin çoğalmasını uzun bir süre boyunca etkili bir şekilde engellediği sonucuna varılabilir.

Meme kanseri yüksek proliferasyon oranı ile karakterize edilir. Kanıtlar, PD-L1'in ifade düzeyi ile meme kanseri hücrelerindeki hücre çoğalması arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermektedir (Ghebeh vd., 2007). Bu tez kapsamında, MCF-7 hücre hattında PD-L1'in miR-3670 ve miR-8078 ile baskılanmasının koloni oluşumunu engellediği tespit edilmiştir. Bu inhibisyonun PD-L1 üretimindeki kilit sinyal yollarını (Akt, Erk, Ras/MAPK) inhibe ederek hem hücre proliferasyonunu hem de kolonizasyonunu engellemiş olacağı kanısındayız.

Mevcut literatür incelendiğinde, Alkaabi ve diğerleri (2023) bir meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231) PD-L1'in inhibe edilmesinin kolonizasyon kabiliyetinde

azalmaya yol açtığını bulmuştur. Bu, siRNA veya CRISPR/Cas9 kullanılarak PD-L1'in susturulması üzerine TNBC MDA-MB-231 hücre hattında hücre büyümesi ve koloni oluşumunda bir azalma gözlemleyen Chen ve diğerleri (2021) tarafından elde edilen benzer sonuçlarla ilişkilidir (Chen vd., 2021). Ayrıca, birçok çalışma PD-L1 inhibisyonunun çeşitli kanser hücre hatlarında kolonizasyonu azalttığını bildirmiştir (Clark vd., 2016; Chen vd., 2017; Yu vd., 2020; Lotfinejad vd., 2021; Geum vd., 2022; Padmanabhan vd., 2022; Ma vd., 2022).

Sferoidler, düz bir yüzeye yapışmayı engelleyen bir ortamda hücrelerin bir araya gelmesiyle oluşan kümeler olarak tanımlanmaktadır (Kitel vd., 2013; Sant ve Johnston, 2017). Günümüzde, 3D tümör sferoidleri ilaç etkinliğini değerlendirmek ve yeni antitümör bileşikler geliştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Nath ve Devi, 2016; Yeonhwa and Seo, 2016; Zanoni vd., 2019; Pinto vd., 2020). Benzer şekilde, sferoidler invazyon, metastaz ile ilgili mekanizmaları incelemek ve metastazı hedefleyen terapötik ajanların etkinliğini prelinik olarak değerlendirmek için seçilir. Sonuç olarak, immüno-onkolojik araştırmalarda tümörlerin yapısını ve hücresel konfigürasyonunu taklit eden 3D modellerin kullanılması esastır (Boucherit vd., 2020).

Bu tezde immün kontrol noktası inhibitörleri olarak kullanmayı amaçladığımız miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 hücre hattında 3D sferoid oluşumunu %90 oranında engellediğini tespit ettik. Biyoinformatik analizlerimiz bizi her iki miRNA'nın da hücre döngüsü, hücre bölünmesi, büyüme, gelişme ve yüzeylerde bulunan bağlanma unsurları (örneğin e-kaderin, aktin filamentleri ve boşluk bağlantıları) ile ilgili yolları etkilemeyi amaçladığı bulgusuna götürdü. Bu sonuçlarla 3D sferoid analizi birlikte değerlendirildiğinde, miR-3670 ve miR-8078'in hücre bölünmesi, büyüme ve gelişimin yanı sıra yüzey bağlantılarının sinyal yollarını inhibe ettiğini ve böylece meme kanseri hücrelerinde 3D sferoid oluşumunu engellediğini söylemek mümkündür. Mevcut literatür incelendiğinde, Han ve diğerlerinin (2020) miR-34a'nın meme kanseri hücre hatlarına transfekte edildikten sonra hücre döngüsüne bağlı E2F1 ve E2F3 sinyal yollarını inhibe ederek 3D sferoid oluşumunu engelleyebileceğini keşfettiği görülmüştür. Buna paralel olarak, Cagle ve diğerleri (2019) miR-214'ün prostat kanseri hücrelerine transfeksiyonunun, hücre göçü ve metastazında rol oynayan protein tirozin kinaz 6'yı (PTK6) hedefleyerek 3D sferoid gelişimini önleyebileceğini bulmuştur. Benzer sonuçlar rapor edilmiştir (Chaudhary vd., 2017; Liao vd., 2017; Xu vd., 2019;

Egea vd., 2021). Bulgularımızı immünoloji çerçevesinde değerlendirdiğimizde miR-3670 ve miR-8078'in PD-L1/PD-1 sinyal yolunu düzenleyerek, sitotoksik CD8 T hücrelerinin tümör mikro ortamına kolayca sızmasını teşvik edeceğini bu şekilde de umut vadeden yeni bir immonoterapötik ajan olacağını söylemek mümkündür. Acúrcio ve diğerleri (2022), insan katı tümörlerinde yaptıkları çalışmada PD-L1 inhibisyonu ile T lenfositlerin üç boyutlu katı tümör modellerine sızdığını ve sitotoksik T lenfositlerin *in vivo* olarak tümör mikro ortamına alınmasını sağlayarak sferoidin küçüldüğünü bildirmişlerdir (Acúrcio vd., 2022). Bu literatür bilgisi söylemimizi desteklemektedir. HME1 hücre hattının hem kontrol hem de miRNA (miR-3670 ve miR-8078) uygulanan gruplarında 3D sferoid yapı gözlenmemiştir. Önceki çalışmalar doku mikroçevresinin sağlıklı homeostatik koşullarda tümörlere karşı baskılayıcı olduğunu bildirdiğinden, bu beklenen bir neticedir. Sonuç olarak, gelişen metastatik tümörlerin doku mikroçevresinin sağlıklı dokulara kıyasla önemli ölçüde değiştiği ve böylece 3D sferoidlerin oluşumunu desteklediği sonucuna varılabilir (Bhowmick ve Moses, 2005; Egeblad vd., 2010; Bissell ve Hines., 2011; Lu vd., 2012; Bloch ve Harel, 2016; Martin vd., 2016).

Kanser sferoidlerinin, hücre morfogenezi nedeniyle boyut ve şekillerinde önemli değişiklikler sergilediği ve bunun sonucunda anti-kanser ilaçlarına karşı dirençe sonuçlandığı iyi bilinen bir gerçektir (Lovitt vd., 2014). Bununla birlikte, sferoidlerin boyut ve şeklinin ilaç direncini nasıl etkilediği hala belirsizdir. Ayrıca, sferoid şeklinin EMT ve metastaz üzerindeki etkisine ilişkin mevcut veriler net değildir (Gunay vd., 2020).

3D sferoid analizi çalışmamızda, miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinde tipik elipsoid şekilli 3D sferoidlerin dışında amorf sferoidlerin geliştiğini tespit ettik. Bu amorf sferoidlerin %13'ü miR-3670 uygulanan grupta, %22'si ise miR-8078 uygulanan grupta oluşmuştur. Biyoinformatik analizimizin ardından, her iki miRNA'nın da hücre yapısı ve iskelet sistemlerinin yanı sıra hücre morfogenezi ve yapı molekülleriyle ilgili yolları hedef aldığını belirledik. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, miR-3670 ve miR-8078'in bu yolları inhibe ederek amorf 3D sferoid oluşumuna katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır. Sefidgar ve diğerleri (2014), tümör şekli ve boyutunun tümöre ilaç penetrasyonunu önemli ölçüde etkilediğini bildirmiştir. Spesifik olarak, iğ şeklindeki prolate elipsoid tümörler, diğer

tümör şekillerine kıyasla tümör merkezine daha fazla miktarda kemoterapötik ilaç taşımaktadır (Sefidgar vd., 2014). Thakuri ve diğerleri (2019) da benzer bulgular bildiren bir çalışma yürütmüştür (Thakuri vd., 2019). Choi ve diğerleri (2016) yumurtalık kanserini araştırmış ve siRNA yoluyla e-kaderin ifadesinin geçici olarak susturulmasının metastazı engellediğini ve tümör yapılarını bozduğunu bulmuştur (Choi vd., 2016).

Elipsoidal şekilli 3D sferoidler hücresel katmanlardan oluşur. Bu katmanlı yapının bir sonucu olarak, sferoidin dış kısmı besin ve oksijenin merkeze doğru taşınması için sınırlı difüzyon sunar. Warburg etkisinin varlığı hipoksik bir çevre oluşturarak HIF-1a'yı uyarır ve tümör mikroçevresinde anjiyogenezi başlatır. Bu süreç metastaz için çok önemlidir (Longati vd., 2013; Zhang vd., 2018; Protopsaltis vd., 2019; Aung vd., 2020; Kashyap vd., 2020). Bu literatür bilgisi göz önünde bulundurulduğunda, çeşitli teknikler kullanılarak sferoidlerin şeklinin değiştirilmesinin bir tedavi stratejisi olarak hizmet edebileceği öne sürülebilir. Bu çalışmada olduğu gibi, miR-3670 ve miR-8078'in 3D sferoidlerin normal sferoid şeklini kaybetmesine neden olması, tümör mikroçevresini manipüle ederek (hipoksik ortamı ve HIF-1a'yı inhibe ederek) kanser tedavisine katkıda bulunabileceklerini göstermektedir.

3D sferoid analizi çalışmamızda, oluşan sferoidlerin boyutunu değerlendirdik. Yapılan analiz sonucunda MCF-7 hücrelerine miR-3670 ve miR-8078 transfeksiyonu yapıldığında, oluşan 3D sferoidlerin boyutunun 100 µm'nin altında kaldığı belirlendi. Araştırmamızda, kontrol grubunda önemli miktarda sferoid oluşmasına rağmen, mikro çevresel dengenin bozulmasına rağmen (besin ve oksijen eksikliği, artık ürünlerin birikmesi nedeniyle) gelişen sferoidlerin çoğunun ısrarla genişlediği ve çapının 100 µm'yi aştığı kaydedilmiştir.

miR-3670 ve miR-8078 uygulanan gruplarda büyüme için elverişli bir tümör mikro ortamına rağmen, sferoidlerin sayısının ve çaplarının azaldığı ve çoğunun 100 µm altında olduğu gözlenmiştir. Bu durum, miRNA'ların uygun bir ortamda bile sinyal yolları aracılığıyla 3D sferoidlerin çoğalmasını ve farklılaşmasını belirgin şekilde engellediğini göstermektedir. Bu argümanı biyoinformatik analiz çalışmalarımızda da tespit ettik ve her iki miRNA'nın da hücre büyümesi ve bölünmesi sinyal yollarını kapsamlı bir şekilde hedeflediğini bulduk.

Literatür verileri bu çerçevede incelendiğinde Rezaei ve diğerleri (2021), miRNA-124'ün kolorektal kanser hücreleri üzerinde kullanılmasının tümör boyutunda önemli bir azalmaya neden olduğunu bulmuşlardır (Rezaei ve ark, 2021). Ji ve diğerleri (2016), miR-133a'nın hücre büyüme ve bölünme yollarını doğrudan düzenlediğini, hücre proliferasyonunu baskıladığını ve meme kanserinde tümör boyutunu azalttığını bildirmiştir (Ji vd., 2016). Song ve diğerleri (2015), miR-107'nin renal hücreli karsinomda tümör baskılayıcı bir gen olarak işlev gördüğünü, hücre proliferasyonu ve metastazı engellediğini ve tümör boyutunu azalttığını göstermiştir. Chen ve diğerleri (2010), gastrointestinal kanser üzerine yaptıkları çalışmada, miR-148a ve miR-152 ekspresyonu azalmış hastalarda daha büyük tümörler görüldüğünü keşfetmiştir.

Yazarlar buna dayanarak, miR-148a ve miR-152'nin mide kanserinde tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceğini öne sürmüş ve proliferasyon ve invazyonu engelleyerek kanser ilerlemesini kısıtlamadaki rollerini tanımlamışlardır. Shinde ve diğerleri (2023) miR-155 uygulanan meme kanseri tümör boyutunda bir azalma olduğunu göstermiştir (Shinde vd., 2023). Çalışmamızın sonuçları, yukarıda özetlenen literatür verileriyle büyük ölçüde desteklenmektedir. Anjiyogenez, kanserin ilerlemesinde çok önemli bir faktördür. VEGF, tümör gelişimi sırasında gerçekleşen temel bir bileşen olan anjiyogenezin en etkili aracıdır (Cayé-Thomasen vd., 2005). Bu çalışmada, 3D kültürde oluşturulan sferoidlerin boyutu ile anjiyogenez arasındaki korelasyonu inceledi. Analizlerimiz, kontrol grubunun 2 mm'lik anjiyojenik sınırı aşan önemli sayıda 3D sferoide sahip olduğunu, miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücreleri tarafından oluşturulan ve nispeten az sayıda 3D sferoidin eşiği aştığını ortaya koydu. Bu sonuç sferoid boyut analiz sonucu ile birlikte ele alındığında, sferoid çapındaki artış ile anjiyogenez sınırını aşan sferoid sayısı arasında doğrudan bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Bulgularımız literatürdeki çok sayıda mevcut çalışmayla tutarlıdır (Li vd., 2017; Rodríguez-Hernández vd., 2020; Cheng vd., 2021).

Tümör boyutunun çap kullanılarak ölçülmesi radyolojide yaygın olarak kullanılan ve pratik bir yöntemdir. Bununla birlikte, bu yöntemin elipsoid hacme uymayan düzensiz tümörleri tespit etmede önemli bir dezavantajı vardır. Tümör hacmi prognozla güçlü bir şekilde ilişkilidir (Mezei vd., 2021). Bu nedenle, tümörlerin üç boyutlu (3D) hacim ölçümü, onkolojide önemli bir klinik potansiyele sahip olması

açısından hayati önem taşımaktadır (Lee vd., 2010). Tümör hacminin ölçülmesi, tedavinin başarısını değerlendirmek için de etkili olabilir (Singh vd., 2008).

Araştırmamız sırasında, miR-3670 ve miR-8078'in meme kanseri hücreleri tarafından oluşturulan 3D sferoidlerin hacimsel dağılımını nasıl etkilediğine dair bir değerlendirme yaptık. Analizimiz, her iki miRNA'nın da meme kanseri (MCF-7) hücreleri tarafından oluşturulan 3D sferoidlerin hacimini 1 mm<sup>3</sup>'ün altına sınırladığını gösterdi. Bu bulgular, her iki miRNA'nın da 3D sferoidlerin büyümesini ve oluşumunu düzenleyen sinyal yollarını engelleme ve sonuçta boyutlarını azaltma yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Biyoinformatik analizlerimizde bu ifadenin doğru olduğunu gördük ve her iki miRNA'nın da hücresel büyüme ve bölünmeyi hedefleyen sinyal yollarını kullandığını tespit ettik. Lang ve diğerleri (2022), meme kanseri üzerine yaptıkları araştırmada, miR-4731-5p uygulamasının tümör hücrelerinin ilerlemesine ve bölünmesine neden olan PAICS güdümlü FAK yolağını engelleyerek tümör hacmini azalttığını bildirmişlerdir (Lang vd., 2022). Benzer şekilde, Shi ve diğerleri (2011) miR-301 uygulamasının meme kanseri tümörlerinin büyümesini engellediğini ve hacimde azalmaya yol açtığını bildirmiştir (Shi vd., 2011). Guo ve diğerleri (2013) meme kanserinde miR-510 ekspresyonunun artmasının hücre büyümesini ve bölünmesini teşvik ettiğini ve sonuçta tümör hacminde bir artışa neden olduğunu bulmuştur. Bu çalışmalar ışığında, literatür kendi bulgularımızla uyumludur ve çalışmamızdaki verileri güçlü bir şekilde desteklemektedir.

Sonuç olarak tez kapsamında elde edilen tüm bulgular değerlendirildiğinde;

- ✓ Biyoinformatik analizimiz sonucunda miR-3670'in PD-L1 mRNA'nın iki farklı bölgesine yüksek bağlanma skorlarıyla (82.15 ve 87.35) bağlandığı ve meme kanserinde PD-L1 ekspresyonunu etkili bir şekilde baskılayabildiği tespit edilirken, miR-8078 ile PD-L1 mRNA arasında doğrudan bağlanma bölgesi tespit edilmemiştir.
- ✓ İkinci biyoinformatik analiz olan GO analizi sonucunda miR-3670 ve miR-8078'in meme kanseri progresyonu için çok önemli olan çeşitli biyolojik süreçlerde (metastaz, proliferasyon, hücresel göç ve farklılaşma gibi) önemli olan integrinler, selektinler ve kaderinler gibi hücre bağlayıcı moleküllerin ve ayrıca PD-L1 ligandlarının sentezinde rol alan temel düzenleyici sinyal yolları

ile doğrudan ilişkili olduğu ve süreçler üzerinde potansiyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

- ✓ KEGG yol analizimizde, miR-3670 ve miR-8078'in PD-L1 ligand sentezi sinyal yollarının temel düzenleyicilerini önemli ölçüde hedeflediğini belirlemiştir.
- ✓ miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 ve HME1 hücre hatlarındaki sitotoksik aktivitesi incelenmiş ve her iki miRNA'nın 1nM dozunun MCF-7 hücre hattında yüksek, HME1'de ise düşük toksisiteye sahip olduğu bulunmuştur.
- ✓ Çalışmada gerçekleştirilen total RNA analizleri, total RNA konsantrasyonları ile sitotoksikite seviyeleri arasında anlamlı bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur. Spesifik olarak, total RNA konsantrasyonları yüksek sitotoksik dozlarda azalmış ve düşük sitotoksik dozlarda artmıştır.
- ✓ RT-PCR analiz bulgularımıza göre, miRNA-3670'in 1 nM, 5 nM ve 10 nM mimik dozajları ve miRNA-8078'in 1 nM, 5 nM ve 100 nM mimik dozajları MCF-7 hücrelerinde PD-L1 gen ekspresyonunu başarıyla inhibe etmiştir. Ancak, PD-L1 ifadesi HME1 hücrelerinde azalmamıştır.
- ✓ MCF-7 hücrelerinde, serbest PD-L1 protein seviyeleri miR-3670'in 100nM dozu hariç tüm dozları ve miR-8078'in sadece 1nM ve 5nM dozları ile azalırken, HME1 hücre hattında, miRNA-3670 ve miRNA-8078'in tüm dozları beklendiği gibi sPD-L1 protein seviyesinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır.
- ✓ MCF-7 hücrelerinde, miR-3670 ve miR-8078'in 1 nM dozu hücre sağkalımını azaltıp apoptozu tetiklerken, HME1 hücrelerinde apoptozu artırmamış ve kontrol grubundan önemli ölçüde farklılık göstermemiştir.
- ✓ Hücre göçü analizinden elde edilen bulgulara göre, miR-3670 ve miR-8078, MCF-7 hücrelerinde hücre göçünü önemli ölçüde inhibe ederek (sırasıyla %81.47 ve %99.8) anti-metastatik etkiler göstermiş, ancak HME1 hücrelerinde sınırlı hücre göçü inhibisyonu göstermiştir (sırasıyla %21 ve %6).
- ✓ MCF-7 hücrelerinde miR-3670 ve miR-8078'in hücre morfolojisi ve biyoinformatik analiz (KEGG ve GO) bulgularına dayanarak, her iki miRNA'nın da metastazda rol oynayan EMT sinyal yolağı ile yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ Ayrıca, kullanılan miRNA'ların MCF-7 hücrelerini mezenkimal hücrelerin karakteristik uzun, iğ şeklindeki morfolojisinden epitelyal hücrelere benzer

şekilde daha yuvarlak, küboidal bir morfolojiye dönüştürdüğü ve lamellipodları azalttığı, MET dönüşümünü indüklediği tespit edilmişken HME1 hücrelerinde herhangi bir morfolojik değişiklik gözlenmemiştir.

- ✓ MCF-7 ve HME1 hücre hatları üzerinde gerçekleştirilen *in vitro* ve biyoinformatik analizlerin ardından, miR-3670 ve miR-8078'in 1nM dozunun MCF-7 ve HME1 hücrelerinde serbest e-kaderin antijen seviyelerini önemli ölçüde azalttığı kaydedilmiştir.
- ✓ MCF-7 ve HME1 hücre hatları üzerinde yapılan (biyoinformatik ve *in vitro*) analizler sayesinde araştırma, 1nM miR-3670 ve miR-8078 uygulamasının serbest VEGF-A seviyelerinde azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur.
- ✓ MCF-7 ve HME1 hücre hatlarında yapılan analizler sonucunda miR-3670 ve miR-8078'in (1nM) her iki hücre hattında da serbest TINAGL-1 antijen seviyesini azalttığı tespit edilmiştir.
- ✓ miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 hücrelerinde koloni oluşumunu önemli ölçüde (sırasıyla %17.7 ve %78.2) engellediği belirlenmiştir.
- ✓ miR-3670 ve miR-8078'in MCF-7 hücre hattında 3D sferoid oluşumunu %90 oranında engellediği ve HME1 hücre hattının hem kontrol hem de miRNA uygulanan gruplarında 3D sferoid yapının gözlenmediği belirlenmiştir.
- ✓ 3D sferoidlerin analizi, miR-3670 ve miR-8078 uygulanan MCF-7 hücrelerinin normal eliptik şekilden farklı düzensiz sferoidler ürettiğini göstermiştir. Bu amorf sferoidlerin %13'ü miR-3670 uygulanan grupta, %22'si ise miR-8078 uygulanan grupta oluşmuştur.
- ✓ 3D sferoidlerin boyut analizi sonucunda, MCF-7 hücrelerinde miR-3670 ve miR-8078 transfeksiyonu yapıldığında oluşan 3D sferoidlerin boyutunun 100 µm'nin altında kaldığı ve hacimlerinin de 1 mm<sup>3</sup> sınırını aşmadığı belirlenmiştir.

Bu sonuçlar, çalışmamızda kullanılan miRNA'ların (miR-3670, miR-8078), meme kanseri hücrelerinde bağışıklık tepkilerinin yeniden yönlendirilmesi yoluyla kanser immünoterapisi için potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir. Özellikle mevcut kanser tedavisi yaklaşımlarında giderek daha önemli hale gelen kişiselleştirilmiş kanser immünoterapisi de dahil olmak üzere hedefe yönelik tedaviye ilişkin gelecekteki araştırmalar için bir temel sağlayabilir.

**İlerde yapılması düşünülen çalışmalar;**

- ✓ Bu çalışmadan elde edilen ön bulgulara dayanarak, miR-3670 ve miR-8078'in antikanser aktivitelerinin farklı kanser hatlarında *in vitro* ve ardından *in vivo* bir modelde test edilmesi öngörülmektedir.
- ✓ PD-L1 ve TINAGL-1 arasındaki korelasyonun yanı sıra TINAGL-1'in kanserdeki rolünü tam olarak tanımlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.



## KAYNAKLAR

- Abadie, V., Discepolo, V., Jabri, B., (2012). Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology. *Seminars. Immunopathology*, 34(4), 551–66.
- Abbott, M., Ustoyev, Y. (2019). Cancer and the immune system: the history and background of immunotherapy. *Seminars In Oncology Nursing*, 35(5), 150923.
- Abdelrahman M.M., Fawzy I.O., Bassiouni A.A., Gomaa A.I., Esmat G, Waked I., et al., Enhancing (2016). NK cell cytotoxicity by miR-182 in hepatocellular carcinoma. *Human Immunology*, 77:667-73.
- Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Horikawa N, Murakami R, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Baba T, Konishi I, Mandai M. (2015). IFN- $\gamma$  from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, (112):1501–09.
- Acúrcio, R.C., Pozzi, S., Carreira, B., Pojo, M., Gómez-Cebrián, N., Casimiro, S., ernandes, A., Barateiro, A., Farricha, V., Brito, J., Leandro, A. P., Salvador, J. A.R., Graça, L., Puchades-Carrasco, L., Costa, L., Satchi-Fainaro, R., Guedes, R. C., Florindo, H. F. (2022). Therapeutic targeting of PD-1/PD-L1 blockade by novel small-molecule inhibitors recruits cytotoxic T cells into solid tumor microenvironment. *The Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 10(7), e004695.
- Ahangar, P., Strudwick, X.L., Cowin, A.J. (2022). Wound healing from an actin cytoskeletal perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 14(8), a041235.
- Akinleye, A., Rasool, Z. (2019). Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *Journal of Hematology and Oncology*, 12: 92.
- Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*, 50 (1):33.
- Aksu Ö, Şengül Ş. (2019). İmmün Denetim Noktaları ve İnhibitörleri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 72(3), 262- 67.
- Alkaabi, D., Arafat, K., Sulaiman, S., Al-Azawi, A.M., Attoub, S. (2023). PD-1 Independent role of PD-L1 in triple-negative breast cancer progression. *International Journal of Molecular*, 24(7), 6420.
- Almeida M.I., Reis R.M., Calin G.A., (2011). MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research*, 717:1–8.
- Alsaleem, M., Toss, M.S., Joseph, C., Aleskandarany, M., Kurozumi, S., Alshankyty, I., Ogden, A., Rida, P.C.G., Ellis, I.O., Aneja, R., Green, A.R., Mongan, N.P., Rakha, E.A. (2019). The molecular mechanisms underlying reduced E-cadherin expression in invasive ductal carcinoma of the breast: high throughput analysis of large cohorts. *Modern Pathology*, 32(7), 967–76.
- Al-Thoubaity F.K., (2019). Molecular classification of breast cancer: a retrospective cohort study. *Annals of Medicine and Surgery*, 49: 44–48.
- American cancer society (ACS), April 22, (2021). American cancer society recommendations for the early detection of breast cancer. Erişim tarihi: 09.11.2021. Erişim adresi: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/screening-tests-and-early-detection/american-cancer-society-recommendations-for-the-early-detection-of-breast-cancer.html>.
- American type culture collection (ATCC), (2023) Erişim tarihi: 11.01.2023, Erişim adresi: <https://www.atcc.org/products/htb-22>.
- American type culture collection (ATCC), (2023). Erişim 11.01.2023. Erişim adresi:

- <https://www.atcc.org/products/crl-4010>.
- André, P., et.al., (2018). Anti-NKG2A mAb is a checkpoint inhibitor that promotes anti-tumor immunity by unleashing both T and NK cells. *Cell*, (175):1731-1743.
- Anonim, (2000a). *Global Health Estimates* 2020. Deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000-2019. WHO; 2020. Accessed December 11, 2020.
- Anonim, (2017). Türkiye kanser istatistikleri raporu, 2017. Erişim tarihi: (03.11.2021). Erişim adresi: <https://sagligim.gov.tr/kanser/kanserden-korunma/903-kanser-onleme-calismalari.html>.
- Anonim, (2019) Türkiye kanser önleme çalışmaları raporu:2019 Erişim tarihi: (15.03.2021). Erişim adresi: <https://sagligim.gov.tr/kanser/kanserden-korunma/903-kanser-onleme-calismalari.html>.
- Anonim, (2020b). Assessing national capacity for the prevention and control of noncommunicable diseases: report of the 2019 global survey. 2000-2019. WHO; 2020. Accessed December 11, 2020.
- Antonangeli F, Natalini A, Garassino M.C., Sica A, Santoni A, Di, et al. (2020). Regulation of PD-L1 expression by NF-kappaB in cancer. *Frontiers in Immunology*.11:584626.
- Arenz, C., 2014. *Mirna maturation methods and protocols*. Berlin, Germany. Humana press. Humana Press.
- Arnold, M., Morgan, E., Rumgay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Gralow, J. R., Cardoso, F., Siesling, S., Soerjomataram, I., (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast*, 66, 15–23.
- Asghariazar, V., Mansoori, B., Kadkhodayi, M., Safarzadeh, E., Mohammadi, A., Baradaran, B., Sakhinia, E., (2022). MicroRNA-143 act as a tumor suppressor microRNA in human lung cancer cells by inhibiting cell proliferation, invasion, and migration. *Molecular Biology Reports*, 49(8), 7637–47.
- Aung, A., Kumar, V., Theprungsirikul, J., Davey, S.K., Varghese, S., (2020). An engineered tumor on a chip device with breast cancer-immune cell interactions for assessing t-cell recruitment. *Cancer Research*, 80, 263–75.
- Ayoub, N.M., Alkhalifa, A.E., Ibrahim, D.R., Alhusban, A. (2021). Combined crizotinib and endocrine drugs inhibit proliferation, migration, and colony formation of breast cancer cells via downregulation of MET and estrogen receptor. *Medical Oncology*, 38(1), 8.
- Bailey, C.M., Liu, Y., Liu, M., Du, X., Devenport, M., Zheng, P., Liu, Y., Wang, Y., (2022). Targeting HIF-1 $\alpha$  abrogates PD-L1-mediated immune evasion in tumor microenvironment but promotes tolerance in normal tissues. *Journal of Clinical Investigation*, 132(9), e150846.
- Balacescu, O., Visan, S., Baldasici, O., Balacescu, L., Vlad, C., Cadariu, P. A., (2019). MiRNA-Based therapeutics in oncology, realities, and challenges. In S. Sharad, S. Kapur (Eds.), *Antisense Therapy. Intech Open*. ss;1-2.
- Barba, D., León-Sosa, A., Lugo, P., Suquillo, D., Torres, F., Surre, F., Trojman, L., Caicedo, A., (2021). Breast cancer, screening and diagnostic tools: all you need to know. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 157, 103174.
- Barbaros, M.B., Dikmen, M., (2015). Kanser immünoterapisi. *Erciyes Tıp Dergisi*, 31 (4): 177-82.
- Baykara,O., (2016). Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Balıkesir Health Sciences Journal*, 5(3), 154–65.

- Beatty G.L, Gladney W.L., (2015). Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 21:687-92.
- Beavers, K.R., Nelson, C.E., Duvall, C.L., (2015). MiRNA inhibition in tissue engineering and regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 88, 123–37.
- Bek M., (2022). *Immunomodulation by basophilic granulocytes: fiction and facts Basophilic orchestration of allergic inflammatory responses*. M.Sc. thesis. Drug Innovation, Utrecht University. Utrecht, Hollanda.
- Berindan-Neagoe, I., Monroig Pdel C., Pasculli B., et al. (2014). MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy. *Cancer Journal for Clinicians*, 64:311-36.
- Beverley., P.C.L., (2005). *The immunology of cancer*. Chap. 20. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cance, (M.A. Knowles., P.J. Selby). Published in the United States by Oxford University Press Inc 2005., New York, Fourth Edition. 566.
- Bhattacharyya M, Feuerbach L, Bhadra T, Lengauer T, Bandyopadhyay S., (2012). MicroRNA transcription start site prediction with multi-objective feature selection. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 11:1–25
- Bhowmick N.A., Moses H.L., (2005). Tumor-Stroma Interactions. *Current Opinion in Genetics and Development*, 15(1):97–101.
- Bishop K.D, Harris J.E, Mordes J.P, Greiner D.L, Rossini A.A, Czech M.P, Phillips N.E., (2009). Depletion of the programmed death-1 receptor completely reverses established clonal anergy in CD4(+) T lymphocytes via an interleukin-2-dependent mechanism. *Cellular Immunology*, 256:86–91.
- Bissell, M.J., Hines, W.C., (2011). Why don't we get more cancer? a proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature Medicine*, 17(3), 320–29.
- Bloch N, Harel D., (2016). The Tumor as an organ: comprehensive spatial and temporal modeling of the tumor and its microenvironment. *BMC Bioinformatics*, 17(1):317.
- Blow M.J, Grocock R.J., van Dongen S., Enright A.J., Dicks E, Futreal P.A, Wooster R, Stratton M.R, (2006). RNA editing of human microRNAs. *Genome Biology*, 7: R27.
- Blum, J.S., Wearsch, P.A., Cresswell, P., (2013). Pathways of antigen processing. *Annual review of immunology*, 31, 443–73.
- Bockhorn, J., Yee, K., Chang, Y.F., Prat, A., Huo, D., Nwachukwu, C., Dalton, R., Huang, S., Swanson, K.E., Perou, C.M., Olopade, O.I., Clarke, M.F., Greene, G.L., Liu, H., (2013). MicroRNA-30c targets cytoskeleton genes involved in breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Research and Treatment*, 137(2), 373–82.
- Bonilla, F.A., Oettgen, H.C., (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2): S33–40.
- Booms, A., Coetzee, G.A., Pierce, S.E., (2019). MCF-7 as a model for functional analysis of breast cancer risk variants. cancer epidemiology, biomarkers and prevention: a publication of the american association for cancer research, cosponsored by the american society of preventive. *Oncology*, 28(10):1735-45.
- Borgstein P.J, Meijer S, Pijpers R.J, van Diest P.J., (2000). Functional lymphatic anatomy for sentinel node biopsy in breast cancer: echoes from the past and the

- periareolar blue method. *Annals of Surgery*, 232:81–89.
- Bosse G.D., Simard M.J., (2010). A new twist in the microRNA pathway: not dicer but argonaute is required for a microrna production. *Cell Research*, 20: 735–37. Boston, USA. 379-92.
- Boucherit, N., Gorvel, L., Olive, D., (2020). 3D Tumor models and their use for the testing of immunotherapies. *Frontiers in Immunology*, 11, 603640.
- Brabletz, S., Brabletz, T., (2010). The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer?. *EMBO reports*, 11(9), 670–77.
- Braicu C, Zimta AA, Harangus A, Iurca I, Irimie A, Coza O, Berindan-Neagoe I., (2019). The function of non-coding RNAs in lung cancer tumorigenesis. *Cancers*, 11.
- Brix, N., Samaga, D., Belka, C., Zitzelsberger, H., Lauber, K., (2021). Analysis of clonogenic growth *in vitro*. *Nature Protocols*, 16(11), 4963–991.
- Broughton J.P, Lovci M.T, Huang J.L, Yeo G.W, Pasquinelli A.E, (2016). Pairing beyond the seed supports microrna targeting specificity. *Molecular Cell*, 64:320–33.
- Brown, L.J., Alawoki, M., Crawford, M.E., Reida, T., Sears, A., Torma, T., Albig, A. R., (2010). Lipocalin-7 is a matricellular regulator of angiogenesis. *PloS One*, 5(11), e13905.
- Bukholm, I.K., Nesland, J.M., Børresen-Dale, A.L., (2000). Re-expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin, but not of gamma-catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients. *The Journal of Pathology*, 190(1), 15–19.
- Burger, G.A., Nesenberend, D.N., Lems, C.M., Hille, S.C., Beltman, J.B., (2022). Bidirectional crosstalk between epithelial-mesenchymal plasticity and IFN $\gamma$ -induced PD-L1 expression promotes tumour progression. *Royal Society Open Science*, 9(11), 220186.
- Butte M.J, Keir M.E, Phamduy T.B, et al., (2007). Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7–1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*, 27: 111–122.
- Cagle, P., Niture, S., Srivastava, A., Ramalinga, M., Aqeel, R., Rios-Colon, L., Chimeh, U., Suy, S., Collins, S. P., Dahiya, R., Kumar, D. (2019). MicroRNA-214 targets PTK6 to inhibit tumorigenic potential and increase drug sensitivity of prostate cancer cells. *Scientific Reports*, 9(1), 9776.
- Cai X, Hagedorn C.H, Cullen B.R., (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10:1957-66.
- Cai, D., Chen, S.C., Prasad, M., He, L., Wang, X., Choesmel-Cadamuro, V., Sawyer, J.K., Danuser, G., Montell, D.J. (2014). Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. *Cell*, 157(5), 1146–59.
- Cai, X., Zhan, H., Ye, Y., Yang, J., Zhang, M., Li, J., Zhuang, Y., (2021). Current progress and future perspectives of immune checkpoint in cancer and infectious diseases. *Frontiers in Genetics*, 12, 2352.
- Calin G.A, Ferracin M, Cimmino A, et.al., (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 353 (17):1793–1801.
- Cao, Y., Liang, W., Fang, L., Liu, M.K., Zuo, J., Peng, Y. L., Shan, J.J., Sun, R.X., Zhao, J., Wang, J., (2022). PD-L1/PD-L1 signalling promotes colorectal cancer

- cell migration ability through RAS/MEK/ERK. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 49(12), 1281–93.
- Cao, Y., Liu, B., Cai, L., Li, Y., Huang, Y., Zhou, Y., Sun, X., Yang, W., Sun, T., (2023). G9a promotes immune suppression by targeting the Fbxw7/Notch pathway in glioma stem cells. *CNS neuroscience and therapeutics*, 10.1111/cns.14191.
- Carlson, R.D., Flickinger, J.C., Jr, Snook, A.E., (2020). Talkin' toxins: from coley's to modern cancer immunotherapy. *Toxins*, 12(4), 241.
- Carneiro, B.A., El-Deiry, W.S., (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. Nature reviews. *Clinical Oncology*, 17(7), 395–417.
- Castagnoli, L., Cancila, V., Cordoba-Romero, S.L., et.al., (2019). WNT signaling modulates PD-L1 expression in the stem cell compartment of triple-negative breast cancer. *Oncogene*, 38(21), 4047–60.
- Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G., (2016). MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 17.
- Catela Ivkovic T, Voss G, Cornella H, Ceder Y., (2017). MicroRNAs as cancer therapeutics: a step closer to clinical application. *Cancer Letters*, 407:113–22.
- Cayé-Thomasen, P., Werther, K., Nalla, A., et.al., (2005). VEGF and VEGF receptor-1 concentration in vestibular schwannoma homogenates correlates to tumor growth rate. *Otology and Neurotology*, 26(1), 98–101.
- Ceeraz S, Nowak E.C, Noelle R.J., (2013). B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends in Immunology*, 34: 556–63.
- Cha, J. H., Chan, L.C., Li, C.W., Hsu, J.L., and Hung, M.C., (2019). Mechanisms controlling PD-L1 expression in cancer. *Molecular Cell*, 76(3), 359–70.
- Chang T.T, Jabs C, Sobel R.A, et al., (1999). Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine*, 190: 733–40.
- Chang-Qing, Y., Jie, L., Shi-Qi, Z., Kun, Z., Zi-Qian, G., Ran, X., Hui-Meng, L., Ren-Bin, Z., Gang, Z., Da-Chuan, Y., Chen-Yan, Z., (2020). Recent treatment progress of triple negative breast cancer. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 151: 40–53.
- Chaudhary, A.K., Mondal, G., Kumar, V., Kattel, K., Mahato, R.I., (2017). Chemosensitization and inhibition of pancreatic cancer stem cell proliferation by overexpression of microRNA-205. *Cancer Letters*, 402, 1–8.
- Chen J, Jiang C.C, Jin L, Zhang X.D. (2016). Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Annals of Oncology*, 27:409–16.
- Chen, A., Beetham, H., Black, M.A., Priya, R., Telford, B.J., Guest, J., Wiggins, G. A., Godwin, T.D., Yap, A.S., Guilford, P.J., (2014). E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition. *BMC cancer*, 14, 552.
- Chen, C., Li, S., Xue, J., Qi, M., Liu, X., Huang, Y., Hu, J., Dong, H., Ling, K., (2021). PD-L1 tumor-intrinsic signaling and its therapeutic implication in triple-negative breast cancer. *JCI Insight*, 6(8), e131458.
- Chen, C., Zhang, Q., Kong, B., (2023). miRNA-576-5p promotes endometrial cancer cell growth and metastasis by targeting ZBTB4. *Clinical and Translational Oncology*, 25(3), 706–20.

- Chen, J., Wang, L., Matyunina, L.V., Hill, C.G., McDonald, J.F., (2011). Overexpression of miR-429 induces mesenchymal-to-epithelial transition (MET) in metastatic ovarian cancer cells. *Gynecologic Oncology*, 121(1), 200–5.
- Chen, J., Zhou, Z., Zheng, C., Liu, Y., Hao, R., Ji, X., Xi, Q., Shen, J., Li, Z., (2022). Chitosan oligosaccharide regulates AMPK and STAT1 pathways synergistically to mediate PD-L1 expression for cancer chemoimmunotherapy. *Carbohydrate Polymers*, 277, 118869.
- Chen, L., Gibbons, D.L., Goswami, S., Cortez, M.A., Ahn, Y.H., Byers, L.A., Zhang, X., Yi, X., Dwyer, D., Lin, W., Diao, L., Wang, J., Roybal, J., Patel, M., Ungewiss, C., Peng, D., Antonia, S., Mediavilla-Varela, M., Robertson, G., Suraokar, M., Qin, F.X., (2014). Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nature Communications*, 5, 5241.
- Chen, L., Xiong, Y., Li, J., Zheng, X., Zhou, Q., Turner, A., Wu, C., Lu, B., Jiang, J., (2017). PD-L1 expression promotes epithelial to mesenchymal transition in human esophageal cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 42(6), 2267–80.
- Chen, L., Zeng, Y., Zhou, S.F., (2018). Role of apoptosis in cancer resistance to chemotherapy. *InTechopen*. doi: 10.5772/intechopen.80056.
- Chen, X., Guo, X., Zhang, H., Xiang, Y., Chen, J., Yin, Y., Cai, X., Wang, K., Wang, G., Ba, Y., Zhu, L., Wang, J., Yang, R., Zhang, Y., Ren, Z., Zen, K., Zhang, J., Zhang, C.Y., (2009). Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene*, 28(10), 1385–92.
- Chen, Y., Liu, W., Li, D., Cao, Y., Wang, W., Li, C., An, R., (2022). MiRNA-148a inhibits cell growth and drug resistance by regulating WNT10a expression in renal cell carcinoma. *Translational Andrology and Urology*, 11(7), 996–1006.
- Chen, Y., Song, Y., Wang, Z. et al., (2010). Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. *The Journal of Gastrointestinal Surgery*, 14, 1170–79.
- Cheng, C.C., Chao, W.T., Shih, J.H., Lai, Y.S., Hsu, Y.H., Liu, Y.H., (2021). Sorafenib combined with dasatinib therapy inhibits cell viability, migration, and angiogenesis synergistically in hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*, 88(1), 143–53.
- Cheung, K.J., Ewald, A.J., (2016). A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters. *Science*, 352(6282), 167–69.
- Cheung, K.J., Gabrielson, E., Werb, Z., Ewald, A.J., (2013). Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. *Cell*, 155(7), 1639–51.
- Chhikara, B.S., Parang, K., (2022). Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chemical Biology Letters*, 10(1): 451.
- Chikuma S, Terawaki S, Hayashi T, Nabeshima R, Yoshida T, Shibayama S, Okazaki T, Honjo T., (2009). PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8<sup>+</sup> T cell anergy *in vivo*. *Journal of Immunology*, 182:6682–89.
- Chinai J.M, Janakiram M, Chen F, Chen W, Kaplan M, Zang X., (2015). New immunotherapies targeting the PD-1 pathway. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36:587–95.

- Choi, P.W., Yang, J, S.K., Feltmate, C., Muto, M.G., Hasselblatt, K., Lafferty-Whyte, K., JeBailey, L., MacConaill, L., Welch, W.R., Fong, W.P., Berkowitz, R.S., Ng, S.W., (2016). Loss of E-cadherin disrupts ovarian epithelial inclusion cyst formation and collective cell movement in ovarian cancer cells. *Oncotarget*, 7(4), 4110–21.
- Choi, Y., Kim, J., Chae, J., Hong, J., Park, J., Jeong, E., Kim, H., Tanaka, M., Okochi, M., Choi, J., (2022). Surface glycan targeting for cancer nano-immunotherapy. *The Journal of Controlled Release*, 342, 321–36.
- Clark, C.A., Gupta, H.B., Sareddy, G., Pandeswara, S., Lao, S., Yuan, B., Drerup, J.M., Padron, A., Conejo-Garcia, J., Murthy, K., Liu, Y., Turk, M.J., Thedieck, K., Hurez, V., Li, R., Vadlamudi, R., Curiel, T.J., (2016). Tumor-intrinsic PD-L1 signals regulate cell growth, pathogenesis, and autophagy in ovarian cancer and melanoma. *Cancer Research*, 76(23), 6964–74.
- Coelho, M.A., de Carné Trécesson, S., Rana, S., Zecchin, D., Moore, C., Molina-Arcas, M., East, P., Spencer-Dene, B., Nye, E., Barnouin, K., Snijders, A. P., Lai, W.S., Blackshear, P.J., Downward, J., (2017). Oncogenic RAS signaling promotes tumor immunoresistance by stabilizing PD-L1 mRNA. *Immunity*, 47(6), 1083–99.e6.
- Comşa, Ş., Cîmpean, A.M., Raica, M., (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer Research*, 35(6), 3147–54.
- Cong Y, Qiao G, Zou H, Lin J, Wang X, Li X, et al., (2015). Invasive cribriform carcinoma of the breast: A report of nine cases and a review of the literature. *Oncology Letters*, 9(4):1753-8.
- Cooper A.P., (1840). *The Anatomy of the Breast*. London: Longman, Orme, Green, **Brown and Longmans**. by Sir Astley Paston Cooper, Pp:19.
- Cortez M. A, Anfossi S, Ramapriyan R, et al., (2019). Role of miRNAs in immune responses and immunotherapy in cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 58:244-53.
- Cortez M.A., Ivan C, Valdecanas D, Wang X, Peltier H. J, Ye Y., et al., (2015). PD-L1 regulation by p53 via miR-34. *Journal of the National Cancer Institute*, 108(1): djv303.
- Curtale G., (2018). miRNAs at the crossroads between innate immunity and cancer: focus on macrophages. *Cells*, 7(2):12.
- Dai S, Jia R, Zhang X, Fang Q, Huang L., (2014). The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases. *Cellular Immunology*, 290:72–79.
- Darvin P, Sasidharan Nair V, Elkord E., (2019). PD-L1 expression in human breast cancer stem cells is epigenetically regulated through posttranslational histone modifications. *Journal of Oncology*, 2019:3958908.
- David, J.M., Rajasekaran, A.K., (2012). Dishonorable discharge: the oncogenic roles of cleaved E-cadherin fragments. *Cancer Research*, 72(12), 2917–23.
- Davis-Dusenbery B.N, (2010). Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *The Journal of Biochemistry*, 148:381–92.
- Day C.L, Kaufmann D.E, Kiepiela P, et al., (2006). PD-1 Expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, 443: 350–54.
- de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford G.M., (2020). Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet Global Health*, 8(2):e180-90.

- de Ridder, K., Locy, H., Piccioni, E., Zuazo, M. I., Awad, R. M., Verhulst, S., Van Bulck, M., De Vlaeminck, Y., Lecocq, Q., Reijmen, E., De Mey, W., De Beck, L., Ertveldt, T., Pintelon, I., Timmermans, J. P., Escors, D., Keyaerts, M., Breckpot, K., Goyvaerts, C., (2022). TNF- $\alpha$ -secreting lung tumor-infiltrated monocytes play a pivotal role during anti-pd-11 immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 13, 811867.
- de Rie D, Abugessaisa I, Alam T, Arner E, Arner P, Ashoor H, et al., (2017). An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nature Biotechnology*, 35:872–8.
- Decker, W.K., da Silva, R.F., Sanabria, M.H., Angelo, L.S., Guimarães, F., Burt, B. M., Kheradmand, F., Paust, S., (2017). Cancer immunotherapy: historical perspective of a clinical revolution and emerging preclinical animal models. *Frontiers in Immunology*, 8: 829.
- Demirel M.K., İşeri, Ö.D., Arpacı F., Gündüz U.,(2009). Determination of mechanisms of multiple drug resistance in MCF-7 cell line developed against paclitaxel and vincristine by microarray analysis *The Turkish Journal of Oncology*, 2009, Vol: 24 , No: 4
- Denli A.M, Tops B.B, Plasterk R.H, Ketting R.F, Hannon G.J., (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014):231–35.
- Diener, C., Keller, A., Meese, E., (2022). Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic. *Trends in Genetics*:TIG, 38(6), 613–26.
- do Nascimento, R.G., ve Otoni, K.M., (2020). Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? *Mastology*, 30:1-8.
- Dong H, et al., (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature Medicine*, 5(12):1365–9.
- Dong Y, Sun Q, Zhang X., (2017). PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer. *Oncotarget*, 8:2171– 86.
- Dong, L., Tian, X., Zhao, Y., Tu, H., Wong, A.,Yang, Y., (2022). The Roles of miRNAs (MicroRNAs) in melanoma immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14775.
- Dong, L., Vargas, C.P.D., Tian, X., Chu, X., Yin, C., Wong, A., Yang, Y., (2023). Harnessing the potential of non-apoptotic cell death processes in the treatment of drug-resistant melanoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 10376.
- Doroshov J.H., (2020). ***Approach to the patient with cancer***. In: Goldman L, Schafer AI, eds. Goldman-Cecil Medicine. 26th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, chap 169.
- Drake R.L, Vogl A.W, Tibbitts A.W.M, Gray H., (2005). ***Gray's anatomy for students***. 1st edition, Elsevier/Churchill Livingstone, Philadelphia, pp. 353–356.
- Du, W., Chen, D., Wei, K., Yu, D., Gan, Z., Xu, G., Yao, G. (2023). MiR-10b-5p Impairs TET2-mediated inhibition of PD-L1 transcription thus promoting immune evasion and tumor progression in glioblastoma. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 260(3), 205–14.
- Dua I, Tan A.R., (2017). Immunotherapy for triple-negative breast cancer: a focus on immune checkpoint inhibitors. *American Journal of Hematology Blood Research Journal*, 13(4):20-7.
- Dunn, G.P. et al., (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3: 991–98.

- Durai, R., Davies, M., Yang, W., Yang, S. Y., Seifalian, A., Goldspink, G., Winslet, M., (2006). Biology of insulin-like growth factor binding protein-4 and its role in cancer (review). *International Journal of Oncology*, 28(6), 1317–25.
- Dykxhoorn D.M., (2010). MicroRNAs and metastasis: little RNAs go a long way. *Cancer Research*, 70(16), 6401–06.
- Egea, V., Kessenbrock, K., Lawson, D., Bartelt, A., Weber, C., Ries, C. (2021). Let-7f miRNA regulates SDF-1 $\alpha$ - and hypoxia-promoted migration of mesenchymal stem cells and attenuates mammary tumor growth upon exosomal release. *Cell Death Disease*, 12(6), 516.
- Egeblad M, Nakasone E.S, Werb Z., (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental Cell*, 18(6):884–901.
- Eichmuller S.B, Osen W, Mandelboim O, Seliger B., (2017). Immune modulatory micrnas involved in tumor attack and tumor immune escape. *Journal of National Cancer Institute*, 109(10):10
- Ellis, L. M Hicklin, D. J., (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature Reviews Cancer*, 8(8), 579–91.
- Emens L, Braiteh F, Cassier P, et al., (2015). Inhibition of PD-L1 by MPDL3280A leads to clinical activity in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research* 75(15):2860.
- Feng, J., Hu, S., Liu, K., Sun, G., Zhang, Y., (2022). The role of microRNA in the regulation of tumor epithelial-mesenchymal transition. *Cells*, 11(13), 1981.
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al., (2020). Global cancer observatory: cancer today. Lyon: *International Agency for Research on Cancer*, 2020 (<https://gco.iarc.fr/today>, accessed February 2021).
- Fife B.T., Bluestone J.A., (2008). Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunological Reviews*, 224: 166–82.
- Fink, S.L., Cookson, B.T., (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 73(4), 1907–16.
- Finkelmeier, F., Canli, Ö., Tal, A., Pleli, T., Trojan, J., Schmidt, M., Kronenberger, B., Zeuzem, S., Piiper, A., Greten, F. R., and Waidmann, O., (2016). High levels of the soluble programmed death-ligand (sPD-L1) identify hepatocellular carcinoma patients with a poor prognosis. *European Journal of Cancer*, 59, 152–59.
- Finn, R.S., Qin, S., Ikeda, M., Galle, P.R., Ducreux, M., Kim, T.Y., Kudo, M., Breder, V., Merle, P., Kaseb, A.O., Li, D., Verret, W., Xu, D.Z., Hernandez, S., Liu, J., Huang, C., Mulla, S., Wang, Y., Lim, H.Y., Zhu, A.X., IMbrave150 Investigators, (2020). Atezolizumab plus bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 382(20), 1894–1905.
- Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–19.
- Freeman G.J, Long A.J, Iwai Y, et al., (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine*, 192: 1027–34.
- Freeman G.J, Wherry E.J, Ahmed R, et al., (2006). Reinvigorating exhausted HIV-specific T-cells via PD-1-PD-L1 ligand blockade. *Journal of Experimental Medicine*, 203: 2223–27.

- Freitas, J.T., Jozic, I., Bedogni, B., (2021). Wound healing assay for melanoma cell migration. *Methods in Molecular Biology*, 2265, 65–71.
- Friedlander M.R, Lizano E, Houben A.J, Bezdan D, Banez-Coronel M, Kudla G, et al., (2014). Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biology*, 15: R57.
- Fritz P, Bendrat K, Sonnenberg M, Trautmann C, Ott G, Heidemann E, et al., (2014). Tubular breast cancer. A retrospective study. *Anticancer Research*, 34(7):3647-56.
- Fulda S., (2009). Tumor resistance to apoptosis. *International Journal of Cancer*, 124(3), 511–515.
- Gao, J.J., Swain, S.M., (2018). Luminal a breast cancer and molecular assays: a review. *The Oncologist*, 23(5), 556–65.
- Gao, L., Guo, Q., Li, X., Yang, X., Ni, H., Wang, T., Zhao, Q., Liu, H., Xing, Y., Xi, T., Zheng, L., (2019). MiR-873/PD-L1 axis regulates the stemness of breast cancer cells. *EBio Medicine*, 41, 395–407.
- Gardner, T.A., Elzey, B.D., Hahn, N. M., (2012), Sipuleucel-T (Provenge) autologous vaccine approved for treatment of men with asymptomatic or minimally symptomatic castrate-resistant metastatic prostate cancer. *Human Vaccines Immunotherapeutics*, 8(4), 534–539.
- Garon E.B, Rizvi N.A, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder J.P, Patnaik A, Aggarwal C, Gubens M, Horn L, Carcereny E, Ahn M.J, Felip E, et al., KEYNOTE-001 Investigators., (2015). Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 372:2018–28.
- Ge Y., Xi H., Ju S., Zhang X., (2013). Blockade of PD-1/PD-L1 immune checkpoint during DC vaccination induces potent protective immunity against breast cancer in hu-SCID mice. *Cancer Letter*, 336:253–59.
- Geindreau, M., Ghiringhelli, F., Bruchard, M., (2021). Vascular endothelial growth factor, a key modulator of the anti-tumor immune response. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4871.
- Geum, D.H., Hwang, D.S., Lee, C.H., Cho, S.D., Jang, M.A., Ryu, M.H., Kim, U.K., (2022). PD-L1 Expression correlated with clinicopathological factors and Akt/Stat3 pathway in oral SCC. *Life*, 12(2), 238.
- Ghanekar SA, Bhatia S, Ruitenberg J.J, et al., (2007). Phenotype and in vitro function of mature MDDC generated from cryopreserved PBMC of cancer patients are equivalent to those from healthy donors. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines*, 5:7.
- Ghebeh, H., Tulbah, A., Mohammed, S., Elkum, N., Bin Amer, S. M., Al-Tweigeri, T., Dermime, S., (2007). Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67-expressing tumor cells. *International Journal of Cancer*, 121(4), 751–58.
- Giancchetti E, Delfino D.V, Fierabracci A., (2013). Recent insights into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity. *Autoimmun Reviews*, 12:1091–100.
- Glodek, Cass, Ph.D., (1990). "A history of the michigan cancer foundation, *the Beginnings and Growth of Detroit's Anticancer Movement*," 68, Michigan Cancer Foundation, Detroit.
- Going J.J, Mohun T.J., (2006). Human breast duct anatomy, the 'sick lobe' hypothesis and intraductal approaches to breast cancer. *Breast Cancer Research*, 97:285–291.

- Greene, R.M., Pisano, M. M., (2010). Palate morphogenesis: current understanding and future directions. *Birth Defects Research. C Embryo Today*, 90(2), 133–54.
- Grivennikov S.I, Greten F.R, Karin M., (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140:883-99.
- Groner B, von Manstein V., (2017). Jak Stat signaling and cancer: opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 451:1–14.
- Gudaviciene, D., Steponaviciene, L., Meskauskas, R., Smailyte, G. Aleknavicius, E., (2015). Rare types of breast carcinoma. *Open Medicine*, 10(1).
- Gulhati, P., Bowen, K.A., Liu, J., Stevens, P.D., Rychahou, P.G., Chen, M., Lee, E.Y., Weiss, H. L., O'Connor, K.L., Gao, T., Evers, B.M. (2011). mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer Research* 71(9), 3246–56.
- Gunay, G., Kirit, H.A., Kamatar, A., Baghdasaryan, O., Hamsici, S., Acar, H., (2020). The effects of size and shape of the ovarian cancer spheroids on the drug resistance and migration. *Gynecologic Oncology*, 159(2), 563–72.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., Bartel, D.P., (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466(7308), 835–40.
- Guo, Q. J., Mills, J. N., Bandurraga, S. G., Nogueira, L. M., Mason, N. J., Camp, E. R., Larue, A. C., Turner, D. P., and Findlay, V. J. (2013). MicroRNA-510 promotes cell and tumor growth by targeting peroxiredoxin1 in breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*, 15(4), R70.
- Guo, X., Li, Y., Che, X., Hou, K., Qu, X., Li, C., (2022). microRNA-569 inhibits tumor metastasis in pancreatic cancer by directly targeting NUSAP1. *Aging*, 14(8), 3652–65.
- Ha M, Kim V.N., (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 15:509–24.
- Haghshenas M.R., Naeimi S, Talei A, Ghaderi A, Erfani N., (2011). Program death 1 (PD1) haplotyping in patients with breast carcinoma. *Molecular Biology Reports*, 38:4205–10.
- Hajibabaei S, Sotoodehnejadnematalahi F, Nafisi N, Zeinali S, Azizi M. (2022). Inhibitory effect of miRNA-145 on PD-L1 expression in breast cancer cell line. *International Journal of Behavioral Development*. 14 (4):45-61.
- Hamam, R., Hamam, D., Alsaleh, K. et al., (2017). Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. *Cell Death and Disease*, 8; e3045.
- Hamanishi J, Konishi I., (2014). Targeting the PD-1/PD-L1 immune checkpoint signal- a new treatment strategy for cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*, 41:1071–76.
- Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, et al., (2007). Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-in filtrating CD8T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA*, 104: 3360–65.
- Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, Abiko K, Baba T, Konishi I., (2016). PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. *The International Journal of Clinical Oncology*, 21:462–73.
- Han R., Chen X., Li Y., Zhang S., Li R., Lu L., (2019). MicroRNA-34a suppresses aggressiveness of hepatocellular carcinoma by modulating E2F1, E2F3, and Caspase-3. *Cancer Management and Research*, 11, 2963-76.

- Han R., Zhao J., Lu L., (2020). MicroRNA-34a expression affects breast cancer invasion *in vitro* and patient survival via downregulation of E2F1 and E2F3 expression. *Oncology Reports*, 43, 2062–72.
- Han, Y., Liu, D., ve Li, L., (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American Journal of Cancer Research*, 10(3), 727–42.
- Hanafy, M.S., Hufnagel, S., Tremontozzi, A.N., Sakran, W., Stachowiak, J.C., Koleng, J.J., Cui, Z. (2021). PD-1 siRNA-encapsulated solid lipid nanoparticles downregulate pd-1 expression by macrophages and inhibit tumor growth : PD-1 siRNA-encapsulated solid lipid nanoparticles. *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 22(2), 60.
- Hashimoto Y, Akiyama Y, Yuasa Y., (2013). Multiple-to-multiple relationships between microRNAs and target genes in gastric cancer. Suzuki H, editor. *PloS One*, 8: e62589.
- Hass, R., Bertram, C., (2009). Characterization of human breast cancer epithelial cells (HBCEC) derived from long term cultured biopsies. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 28(1), 127.
- Hayes J, Peruzzi P.P., (2014). Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 20:460–9.
- He B, Zhao Z, Cai Q, Zhang Y, Zhang P, Shi S, Xie H, Peng X, Yin W, Tao Y, Wang X., (2020). miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 16(14):2628-47.
- He C, Li Z, Chen P, Huang H, Hurst L.D, Chen J., (2012). Young intragenic miRNAs are less coexpressed with host genes than old ones: implications of miRNA-host gene coevolution. *Nucleic Acids Research* 40:4002–4012.
- Heer, E., Harper, A., Escandor, N., Sung, H., McCormack, V., Fidler-Benaoudia, M.M., (2020). Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study. *The Lancet. Global health*, 8(8); e1027–37.
- Henry N.L, Cannon-Albright L., (2019). Breast Cancer Histologic Subtypes Show Excess Familial Clustering. *Wiley Cancer*, 125(18):3131-8.
- Hitit, M., Kurar, E., Güzelöglu, A., (2014). MikroRNA Biyogenezi. Atatürk Üniversitesi *Antakya Veteriner Bilimleri Dergisi* 2015; 10(3): 211-18.
- Hollestelle, A., Peeters, J.K., Smid, M., Timmermans, M., Verhoog, L.C., Westenend, P.J., Heine, A.A., Chan, A., Sieuwerts, A.M., Wiemer, E.A., Klijn, J.G., van der Spek, P.J., Foekens, J.A., Schutte, M., den Bakker, M.A., Martens, J.W., (2013). Loss of E-cadherin is not a necessity for epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer. *Breast Cancer Research*, 138(1), 47–57.
- Homet Moreno B, Ribas A., (2015). Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers. *British Journal of Cancer*, 112:1421–27.
- Hu, R., Zhai, Q., Liu, W. Liu, X., (2001). "An insight into the mechanism of cytotoxicity of ricin to hepatoma cell: roles of bcl-2 family proteins, caspases, Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases and protein kinase C" *Journal of Cellular Biochemistry*, 81, 583-93.
- Huang W., (2017). MicroRNAs: biomarkers, diagnostics, and therapeutics. *Methods in Molecular Biology*, 1617:57–67.
- Huang Z, Su W, Lu T, Wang Y, Dong Y, Qin Y, Liu D, Sun L., Jiao W., (2020). First-line immune-checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: Current landscape and future progress. *Frontiers in Pharmacology*, 11:578091.

- Huang, H., Sikora, M.J., Islam, S., Chowdhury, R.R., Chien, Y.H., Scriba, T.J., Davis, M.M., Steinmetz, L.M. (2019). Select sequencing of clonally expanded CD8<sup>+</sup> T cells reveals limits to clonal expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 116 (18), 8995–9001.
- Huang, X., McGann, J.C., Liu, B.Y., Hannoush, R.N., Lill, J.R., Pham, V., Newton, K., Kakunda, M., Liu, J., Yu, C., Hymowitz, S.G., Hongo, J.A., Wynshaw-Boris, A., Polakis, P., Harland, R.M., Dixit, V.M., (2013). Phosphorylation of dishevelled by protein kinase RIPK4 regulates Wnt signaling. *Science*, 339 (6126), 1441–45.
- Hughes, C.E., Nibbs, R.J.B., (2018). A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS journal*, 285 (16), 2944–71.
- Igarashi, T., Tajiri, Y., Sakurai, M., Sato, E., Li, D., Mukai, K., Suematsu, M., Fukui, E., Yoshizawa, M., Matsumoto, H., (2009). Tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 is expressed in extraembryonic tissues and interacts with laminin 1 in the Reichert membrane at postimplantation in the Mouse. *Biology of Reproduction*, 81(5), 948–55.
- Ilina, O., Gritsenko, P.G., Syga, S. et al., (2020). Cell–cell adhesion and 3D matrix confinement determine jamming transitions in breast cancer invasion. *Nature Cell Biology* 22, 1103–15.
- Iorio M.V., Ferracin M, Liu C.G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo J.P, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin G.A, Querzoli P, Negrini M, Croce C.M., (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research*, 65 (16):7065–70.
- Iorio, M. V., Casalini, P., Piovan, C., Di Leva, G., Merlo, A., Triulzi, T., Ménard, S., Croce, C. M., Tagliabue, E., (2009). microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. *Cancer Research*, 69(6), 2195–200.
- Iqbal M.A, Arora S, Prakasam G, Calin G.A, Syed M.A., (2019). MicroRNA in lung cancer: role, mechanisms, pathways and therapeutic relevance. *Molecular Aspects of Medicine*, 70:3–20.
- Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, et al., (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO Journal*, 11: 3887–95.
- Ishikura, N., Sugimoto, M., Yorozu, K., Kurasawa, M., Kondoh, O. (2022). Anti-VEGF antibody triggers the effect of anti-PD-L1 antibody in PD-L1 low and immune desert-like mouse tumors. *Oncology Reports*, 47(2), 36.
- Ito, M., Oshima, Y., Yajima, S., Suzuki, T., Nanami, T., Shiratori, F., Funahashi, K., Nemoto, T., Shimada, H., (2018). Is high serum programmed death ligand 1 level a risk factor for poor survival in patients with gastric cancer? *Annals of Gastroenterological Surgery*, 2(4), 313–18.
- Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, et al., (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA*, 99: 12293–97.
- Jabbari, N., Reavis, A.N., McDonald, J.F., (2014). Sequence variation among members of the miR-200 microRNA family is correlated with variation in the ability to induce hallmarks of mesenchymal-epithelial transition in ovarian cancer cells. *Journal of Ovarian Research*, 7, 12.

- Jabri, B., Sollid, L.M., (2017). T cells in celiac disease. *The Journal of Immunology* 198(8): 3005–14.
- Janse van Rensburg, H.J., Azad, T., Ling, M., Hao, Y., Snetsinger, B., Khanal, P., Minassian, L.M., Graham, C.H., Rauh, M.J., Yang, X., (2018). The hippo pathway component taz promotes immune evasion in human cancer through PD-L1. *Cancer Research*, 78(6), 1457–70.
- Jardim, D.L., de Melo Gagliato, D., Giles, F.J., Kurzrock, R., (2018). Analysis of drug development paradigms for immune checkpoint inhibitors. *Clinical Cancer Research*, 24(8), 1785–94.
- Jeon, H.S., Choi, Y.Y., Fukuoka, J., Fujii, M., Lyakh, L.A., Song, S.H., Travis, W. D., Park, J.Y., Jen, J., (2013). High expression of SNIP1 correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer and SNIP1 interferes with the recruitment of HDAC1 to RB *in-vitro*. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 82(1): 24–30.
- Ji W, Sun B, Su C., (2017). Targeting microRNAs in cancer gene therapy. *Genes (Basel)*, 8:21.
- Ji Y, Hocker J.D, Gattinoni L., (2016). Enhancing adoptive T cell immunotherapy with microRNA therapeutics. *Seminars in Immunology*, 28:45-53.
- Ji, Y., Han, Z., Shao, L., Zhao, Y., (2016). Evaluation of in vivo antitumor effects of low-frequency ultrasound-mediated miRNA-133a microbubble delivery in breast cancer. *Cancer Medicine*, 5(9), 2534–43.
- Jiao, H.K., Xu, Y., Li, J. et al, (2015). Prognostic significance of Cbx4 expression and its beneficial effect for transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma. *Cell Death and Disease*, 6: e1689.
- Jin H.T., Ahmed R, Okazaki T., (2011). Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 350:17–37.
- Jin, H.Y., Gonzalez-Martin, A., Miletic, A.V., Lai, M., Knight, S., Sabouri-Ghomi, M., Head, S.R., Macauley, M.S., Rickert, R.C., Xiao, C., (2015). Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. *Frontiers in Genetics*, 6, 340.
- John, P., Pulanco, M.C., Galbo, P.M., Jr, Wei, Y., Ohaegbulam, K.C., Zheng, D., and Zang, X. (2022). The immune checkpoint B7x expands tumor-infiltrating Tregs and promotes resistance to anti-CTLA-4 therapy. *Nature communications*, 13(1), 2506.
- Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., Slack, F.J., (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120(5), 635–47.
- Jung K, Choi I., (2013). Emerging co-signaling networks in T cell immune regulation. *Immune Network*, 13: 184–193.
- Jurči P, Kruslin B, Gatalica Z, Sanati S, Vranic S., (2016). Breast carcinoma with neuroendocrine features: a brief review. *Endocrine Oncology and Metabolism*, 2(2):138-45.
- Kandalaf L.E, Powell D.J Jr, Coukos G., (2012). A phase I clinical trial of adoptive transfer of folate receptor-alpha redirected autologous T cells for recurrent ovarian cancer. *Journal of Translational Medicine*, 10:157.
- Kang, J., (2014). The Characterization of tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 as a secreted metastasis suppressor in breast cancer. Princeton University, USA.

- Kanwal, S., Fardini, Y., Pagesy, P., N'tumba-Byn, T., Pierre-Eugène, C., Masson, E., Hampe, C., Issad, T., (2013). O-GlcNAcylation-inducing treatments inhibit estrogen receptor  $\alpha$  expression and confer resistance to 4-OH-tamoxifen in human breast cancer-derived MCF-7 cells. *PloS One*, 8(7): e69150.
- Kao, S.C., Cheng, Y.Y., Williams, M., Kirschner, M.B., Madore, J., Lum, T., Sarun, K.H., Linton, A., McCaughan, B., Klebe, S., van Zandwijk, N., Scolyer, R. A., Boyer, M.J., Cooper, W.A., Reid, G., (2017). Tumor suppressor microRNAs contribute to the regulation of PD-L1 expression in malignant pleural Mesothelioma. *Journal of Thoracic Oncology*, 12(9), 1421–33.
- Kashyap, A.S., Schmittnaegel, M., Rigamonti, N., Pais-Ferreira, D., Mueller, P., Buchi, M., Ooi, C.H., Kreuzaler, M., Hirschmann, P., Guichard, A., et al., (2020). Optimized antiangiogenic reprogramming of the tumor microenvironment potentiates CD40 immunotherapy. *Proceedings of The National Academy of Sciences*. USA, 117, 541–51.
- Kato, A., Kondo, N., Wanifuchi-Endo, Y., Fujita, T., Asano, T., Hisada, T., Uemoto, Y., Terada, M., Kato, H., Komura, M., Okuda, K., Takahashi, S., Toyama, T., (2022). Low TINAGL1 expression is a marker for poor prognosis in breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 10.1007/s00432-022-04394-3.
- Kaufman, H.L., Andtbacka, R.H.I., Collichio, F.A., Wolf, M., Zhao, Z., Shilkrut, M., Puzanov, I., and Ross, M. (2017). Durable response rate as an endpoint in cancer immunotherapy: insights from oncolytic virus clinical trials. *Journal for Immunotherapy of cancer*, 5(1), 72.
- Kawahara Y, Mieda-Sato A., (2012). TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA* 109:3347–52.
- Keir M.E, Butte M.J, Freeman G.J, et al., (2008). PD-1 and its ligands intolerance and immunity. *Annual Review of Immunology*, 26: 677–704.
- Keir M.E, et al., (2006). Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, 203(4):883–95.
- Khunger, M., Hernandez, A.V., Pasupuleti, V., Rakshit, S., Pennell, N.A., Stevenson, J., Mukhopadhyay, S., Schalper, K., Velcheti, V., (2017). Programmed cell death 1 (PD-1) ligand (PD-L1) expression in solid tumors as a predictive biomarker of benefit from PD-1/PD-L1 axis inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *JCO Precision Oncology*, 1,1–15.
- Kim J, et al., (2005). Constitutive and inducible expression of b7 family of ligands by human airway epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 33(3):280–9.
- Kim Y.K., Kim B., Kim V.N., (2016). Re-evaluation of the roles of DROSHA, Export in 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 113: E1881–9.
- Kim, J.M., Chen, D.S., (2016). Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: seven steps to success (or failure). *Annals of Oncology*, 27(8), 1492–1504.
- Kinter A.L, Godbout E.J, McNally J.P, Sereti I, Roby G.A, O'Shea M.A, Fauci A S., (2008). The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *The Journal of Immunology*, 181:6738–46.

- Kitel, R., Czarnecka, J., Rusin, A., (2013). Three-dimensional cell cultures. Applications in basic science and biotechnology. *Postepy Biochemii*, 59(3), 305–14.
- Kodumudi K.N, Siegel J, Weber A.M, et al., (2016). Immune checkpoint blockade to improve tumor infiltrating lymphocytes for adoptive cell therapy. *PLoS One*, 11: e0153053.
- Koyuncu, I., Tülüce, Y., Slahaddin Qadir, H., Durgun, M., ve Supuran, C. T., (2019). Evaluation of the anticancer potential of a sulphonamide carbonic anhydrase IX inhibitor on cervical cancer cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 703–11.
- Krogsgaard M, Li QJ, Sumen C, et al., (2005). Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. *Nature*, 434:238.
- Krutilina, R., Sun, W., Sethuraman, A., Brown, M., Seagroves, T.N., Pfeffer, L.M., Ignatova, T., Fan, M., (2014). MicroRNA-18a inhibits hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  activity and lung metastasis in basal breast cancers. *Breast Cancer Research: BCR*, 16(4), R78.
- Kummerow C, Junker C, Kruse K, et al., (2009). The immunological synapse controls local and global calcium signals in T lymphocytes. *Immunological Reviews*, 231:132.
- Kwak P.B, Iwasaki S, Tomari Y., (2010). The microRNA pathway and cancer. *Cancer Science*, 101(11):2309–15
- Labelle, M., Hynes, R.O., (2012). The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discovery*, 2(12), 1091–99.
- Lai, X., Eberhardt, M., Schmitz, U., Vera, J., (2019). Systems biology-based investigation of cooperating microRNAs as monotherapy or adjuvant therapy in cancer. *Nucleic Acids Research*, 47(15), 7753–66.
- Laitinen, P., Väänänen, M.A., Kolari, I.L., Mäkinen, P.I., Kaikkonen, M.U., Weinberg, M.S., Morris, K.V., Korhonen, P., Malm, T., Ylä-Herttuala, S., Roberts, T.C., Turunen, M.P., Turunen, T.A. (2022). Nuclear microRNA-466c regulates VEGF-A expression in response to hypoxia. *PloS One*, 17(3), e0265948.
- LaMorte, W.W., (2016). The biology of cancer. boston university school of public health date last modified: March 30, 2016. [https://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mphodules/ph/ph709\\_cancer/PH709\\_Cancer5.html](https://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mphodules/ph/ph709_cancer/PH709_Cancer5.html). (Erişim tarihi: 4.11.2021).
- Lang, L., Tao, J., Yang, C., Li, W., (2022). Tumor suppressive role of microRNA-4731-5p in breast cancer through reduction of PAICS-induced FAK phosphorylation. *Cell Death Discovery*, 8(1), 154.
- Latchman Y, Wood C.R., Chernova T, et al., (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*, 2: 261-68.
- Laviolette, L.A., Hodgkinson, K.M., Minhas, N., Perez-Iratxeta, C., Vanderhyden, B.C., (2014). 17 $\beta$ -estradiol upregulates GREB1 and accelerates ovarian tumor progression *in-vivo*. *The International Journal of Cancer*, 135(5), 1072–84.
- Ledford, H., et al., (2018). Cancer immunologists scoop medicine Nobel prize, *Nature*, 562, pp. 20-21.

- Lee et.al., (2019). Pharmaceutical composition for foreign patent documents treating cancer comprising microrna as active ingredient. U.s. Patent No.US.010351849B2.  
<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2016137235>. Erişim tarihi:24.12.2021).
- Lee J, Zhuang Y, Wei X, Shang F, Wang J, Zhang Y, Liu X, Yang Y, Liu L, Zheng Q., (2009). Contributions of PD-1/PDL1 pathway to interactions of myeloid DCs with T cells in atherosclerosis. *The Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46:169–76.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, (1993). The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with anti- sense complementarity to lin-14. *Cell*. 75: 843-54.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K.H, Lee S, Baek S.H. et al., (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal*, 23:4051-60.
- Lee, B.S., Park, D.I., Lee, D.H., Lee, J.E., Yeo, M.K., Park, Y.H., Lim, D.S., Choi, W., Lee, D.H., Yoo, G., Kim, H.B., Kang, D., Moon, J.Y., Jung, S.S., Kim, J. O., Cho, S.Y., Park, H.S., Chung, C., (2017). Hippo effector YAP directly regulates the expression of PD-L1 transcripts in EGFR-TKI-resistant lung adenocarcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 491(2), 493–99.
- Lee, D.W., Kim, Y.T., Kim, J.H., Kim, S., Kim, S.W., Nam, E.J., Kim, J.W., (2010). Clinical significance of tumor volume and lymph node involvement assessed by MRI in stage IIB cervical cancer patients treated with concurrent chemoradiation therapy. *Journal of Gynecologic Oncology*, 21(1), 18–23.
- Lewis-Tuffin L.J., Rodriguez F., Giannini C., Scheithauer B., Necela B.M., Sarkaria J.N., Anastasiadis P. Z., (2010). Misregulated E-cadherin expression associated with an aggressive brain tumor phenotype. *PloS One*, 5: e13665.
- Li S., C, Chan W. C, Hu L. Y, Lai C. H, Hsu C. N, Lin W.C., (2010). Identification of homologous microRNAs in 56 animal genomes. *Genomics*, 96:1–9.
- Li Y, Du F, Zhu W, Xu B., (2017). Neuroendocrine carcinoma of the breast: A review of 126 cases in China. *Chinese Journal of Cancer Research*, 36(1):45.
- Li, D., Mukai, K., Suzuki, T., Suzuki, R., Yamashita, S., Mitani, F., Suematsu, M., (2007). Adrenocortical zonation factor 1 is a novel matricellular protein promoting integrin-mediated adhesion of adrenocortical and vascular smooth muscle cells. *The FEBS journal*, 274(10), 2506–22.
- Li, F., Wang, F., Wu, J., (2017). Sorafenib inhibits growth of hepatoma with hypoxia and hypoxia-driven angiogenesis in nude mice. *Neoplasia*, 64(5), 718–24.
- Li, J., Li, X., Kong, X., Luo, Q., Zhang, J., Fang, L., (2014). MiRNA-26b inhibits cellular proliferation by targeting CDK8 in breast cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(3), 558–65.
- Li, Q., An, J., Liu, X., Zhang, M., Ling, Y., Wang, C., Zhao, J., Yu, L., (2012). SNIP1: a new activator of HSE signaling pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 362(1-2), 1–6.
- Li, Y., Chen, X., Wang, Z., Zhao, D., Chen, H., Chen, W., Zhou, Z., Zhang, J., Zhang, J., Li, H., Chen, C., (2013b). The HECTD3 E3 ubiquitin ligase suppresses cisplatin-induced apoptosis via stabilizing MALT1. *Neoplasia*, 15(1), 39–48.
- Li, Y., Kong, Y., Zhou, Z., Chen, H., Wang, Z., Hsieh, Y.C., Zhao, D., Zhi, X., Huang, J., Zhang, J., Li, H., Chen, C., (2013a). The HECTD3 E3 ubiquitin ligase facilitates cancer cell survival by promoting K63-linked polyubiquitination of

- caspase-8. *Cell Death and Disease*, 4(11): e935.
- Li, Y., Zhou, T., Cheng, X., Li, D., Zhao, M., Zheng, W.V., (2022). microRNA-378a-3p regulates the progression of hepatocellular carcinoma by regulating PD-L1 and STAT3. *Bioengineered*, 13(3), 4730–43.
- Liang, X., Zheng, M., Jiang, J., Zhu, G., Yang, J., Tang, Y., (2011). Hypoxia-inducible factor-1 alpha, in association with TWIST2 and SNIP1, is a critical prognostic factor in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 47(2): 92–7.
- Liao, Y., Chen, L., Feng, Y., Shen, J., Gao, Y., Cote, G., Choy, E., Harmon, D., Mankin, H., Hornicek, F., Duan, Z., (2017). Targeting programmed cell death ligand 1 by CRISPR/Cas9 in osteosarcoma cells. *Oncotarget*, 8(18), 30276–287.
- Lin, J., Wang, S., Shen, H., Zheng, B., (2022). The Expression Profile of miRNA in Glioma and the Role of miR-339-5p in Glioma. *BioMed Research International*, 4085039.
- Lin, Y.Z., Liu, S.H., Wu, W.R., Shen, Y.C., Wang, Y.L., Liao, C.C., Lin, P.L., Chang, H., Liu, L.C., Cheng, W.C., Wang, S.C. (2021). miR-4759 suppresses breast cancer through immune checkpoint blockade. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 241–51.
- Lin, Z.Y., Huang, Y.Q., Zhang, Y.Q., Han, Z.D., He, H.C., Ling, X.H., Fu, X., Dai, Q.S., Cai, C., Chen, J.H., Liang, Y.X., Jiang, F.N., Zhong, W.D., Wang, F., Wu, C.L., (2014). MicroRNA-224 inhibits progression of human prostate cancer by downregulating TRIB1. *The International Journal of Cancer*, 135(3):541–50.
- Ling, H., Fabbri, M., Calin, G.A., (2013). MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12, 847–65.
- Liu J, Carmell M.A, Rivas F.V, Marsden C.G, Thomson J.M, Song J.J, Hammond S.M, Joshua- Tor L, Hannon G.J., (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305 (5689):1437–41.
- Liu L, Shen Y, Zhu X, Lv R, Li S, Zhang Z, Shi Y. G, Tan L., (2018). ER alpha is a negative regulator of PD-L1 gene transcription in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 505:157–61.
- Liu S, Chen S, Yuan W, Wang H, Chen K, Li D, Li D., (2017). PD-1/PD-L1 interaction up-regulates MDR1/P-gp expression in breast cancer cells via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways. *Oncotarget*, 8:99901–12.
- Liu, C., Seeram, N.P., Ma, H., (2021). Small molecule inhibitors against PD-1/PD-L1 immune checkpoints and current methodologies for their development: a review. *Cancer Cell International*, 21, 239.
- Liu, W., Liu, R., Yuan, R., Wang, X., (2021). MicroRNA-4458 Regulates PD-L1 Expression to Enhance Anti-tumor Immunity in NSCLC via Targeting STAT3. *Molecular Biotechnology*, 63(12), 1268–79.
- Liu, Y., Li, Y., Wang, Y., Lin, C., Zhang, D., Chen, J., Ouyang, L., Wu, F., Zhang, J., Chen, L., (2022). Recent progress on vascular endothelial growth factor receptor inhibitors with dual targeting capabilities for tumor therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 15(1), 89.
- Liu, Y., Tamimi, R.M., Collins, L.C., Schnitt, S.J., Gilmore, H.L., Connolly, J.L., Colditz, G.A., (2011). The association between vascular endothelial growth factor expression in invasive breast cancer and survival varies with intrinsic subtypes and use of adjuvant systemic therapy: results from the nurses' health study. *Breast*

- Cancer Research and Treatment*, 129(1), 175–84.
- Livak K.J., Schmittgen T.D., (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25: 402-8.
- Ljunggren H.G, Jonsson R., Hoglund P., (2018). Seminal immunologic discoveries with direct clinical implications: the 2018 nobel prize in physiology or medicine honours discoveries in cancer immunotherapy. *The Scandinavian Journal of Immunology*, 88: e12731.
- Longati, P., Jia, X., Eimer, J., Wagman, A., Witt, M.R., Rehnmark, S., Verbeke, C., Toftgård, R., Löhr, M., Heuchel, R.L., (2013). 3D pancreatic carcinoma spheroids induce a matrix-rich, chemoresistant phenotype offering a better model for drug testing. *BMC Cancer*, 13, 95.
- Lotfinejad, P., Kazemi, T., Safaei, S., Amini, M., Roshani Asl, E., Baghbani, E., Sandoghchian Shotorbani, S., Jadidi Niaragh, F., Derakhshani, A., Abdoli Shadbad, M., Silvestris, N., Baradaran, B., (2021). PD-L1 silencing inhibits triple-negative breast cancer development and upregulates T-cell-induced pro-inflammatory cytokines. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 138, 111436.
- Lou, Y., Preobrazhenska, O., auf dem Keller, U., Sutcliffe, M., Barclay, L., McDonald, P.C., Roskelley, C., Overall, C.M., Dedhar, S. (2008). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is not sufficient for spontaneous murine breast cancer metastasis. *Developmental Dynamics*, 237(10), 2755–68.
- Lovitt, C.J., Shelper, T.B., Avery, V.M., (2014). Advanced cell culture techniques for cancer drug discovery. *Biology*, 3(2), 345–67.
- Lu J, Getz G, Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert B.L, Mak R.H., Ferrando A.A., Downing J.R., Jacks T, Horvitz H.R, Golub T.R., (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043):834–38.
- Lu P., Weaver V.M., Werb Z., (2012). The Extracellular Matrix: A Dynamic Niche in Cancer Progression. *Journal of Cell Biology* 196(4):395–406.
- Lu, S., Yu, Y., Yang, Y., (2019). Retrospect and Prospect for Lung Cancer in China: Clinical Advances of Immune Checkpoint Inhibitors, *The Oncologist*, 24(1): S21–S30,
- Luciano D.J, Mirsky H., Vendetti N.J, Maas S., (2004). RNA editing of a miRNA precursor. *RNA*, 10:1174–77.
- Lucibello, G., Mograbi, B., Milano, G., Hofman, P., Brest, P., (2021). PD-L1 regulation revisited: impact on immunotherapeutic strategies. *Trends in Molecular Medicine*, 27(9), 868–81.
- Luo, Q., Wei, C., Li, X., Li, J., Chen, L., Huang, Y., Song, H., Li, D., Fang, L., (2014). MicroRNA-195-5p is a potential diagnostic and therapeutic target for breast cancer. *Oncology Reports*, 31(3), 1096–1102.
- Lyons, S.M., Alizadeh, E., Mannheimer, J., Schuamberg, K., Castle, J., Schroder, B., Turk, P., Thamm, D., Prasad, A. (2016). Changes in cell shape are correlated with metastatic potential in murine and human osteosarcomas. *Biology Open*, 5(3), 289–99.
- Ma, Y., Huang, Y., Chen, Y., (2017). miRNA-34a-5p downregulation of VEGFA in endometrial stem cells contributes to the pathogenesis of endometriosis. *Molecular Medicine Reports*, 16, 8259-64.

- Ma, Y., Marinkova, R., Nenkov, M., Jin, L., Huber, O., Sonnemann, J., Peca, N., Gaßler, N., Chen, Y., (2022). Tumor-Intrinsic PD-L1 Exerts an Oncogenic Function through the Activation of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11031.
- Machesky L.M., (2008). Lamellipodia and filopodia in metastasis and invasion. *FEBS letters*, 582(14), 2102–11.
- Maguire, T.M., Shering, S.G., McDermott, E.W., O'Higgins, N., Fennelly, J.J., Crown, J., Duffy, M.J., (1997). Assay of E-cadherin by ELISA in human breast cancers. *The European Journal of Cancer* 1990, 33(3), 404–8.
- Mahoney K.M., Freeman G.J., McDermott D.F., (2015). The next immune-checkpoint inhibitors: PD-1/PD-L1 blockade in melanoma. *Clinical Therapeutics*, 37:764–82.
- Makarova J.A, Shkurnikov M.U, Wicklein D, Lange T, Samatov T.R, Turchinovich A.A, et al., (2016). Intracellular and extracellular microRNA: an update on localization and biological role. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 51:33–49.
- Makki J., (2015). Diversity of breast carcinoma: histological subtypes and clinical relevance. *Clinical Medicine Insights: Pathology*, 8(1):23-31.
- Makrilia, N., Kollias, A., Manolopoulos, L., Syrigos, K., (2009). Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. *Cancer Investigation*, 27(10), 1023-37.
- Mani, C., Acharya, G., Saamarthy, K., Ochola, D., Mereddy, S., Pruitt, K., Manne, U., Palle, K., (2023). Racial differences in RAD51 expression are regulated by miRNA-214-5P and its inhibition synergizes with olaparib in triple-negative breast cancer. *Breast cancer research, BCR*, 25(1), 44.
- Mapletoft, J.P.J., St-Onge, R.J., Guo, B., Butler, P., Masilamani, T.J., D'costa, L., Pritzker, L.B., Parissenti, A.M., (2020). The RNA disruption assay is superior to conventional drug sensitivity assays in detecting cytotoxic drugs. *Scientific Reports*, 10(1), 8671.
- Maqbool, M., Bekele, F., ve Fekadu, G., (2022). Treatment Strategies Against Triple-Negative Breast Cancer: An Updated Review. *Breast cancer*, 14: 15–24.
- Marconcini, R., Spagnolo, F., Stucci, L.S., Ribero, S., Marra, E., Rosa, F., Picasso, V., Di Guardo, L., Cimminiello, C., Cavalieri, S., Orgiano, L., Tanda, E., Spano, L., Falcone, A., Queirolo, P., ve Italian Melanoma Intergroup (IMI), (2018). Current status and perspectives in immunotherapy for metastatic melanoma. *Oncotarget*, 9(15): 12452–70.
- Martens-de Kemp, S.R., Nagel, R., Stigter-van Walsum, M., van der Meulen, I. H., van Beusechem, V.W., Braakhuis, B.J., Brakenhoff, R.H., (2013). Functional genetic screens identify genes essential for tumor cell survival in head and neck and lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(8): 1994–2003.
- Martin, A., Nirschl, C., Polanczyk, M., Bell, W., Nirschl, T., Harris-Bookman, S., Phallen, J., Hicks, J., Martinez, D., Ogurtsova, A., et al. (2018). PD-L1 Expression in Medulloblastoma: An Evaluation by Subgroup. *Oncotarget*, 9, 19177–191.
- Martin, M., Wei, H., Lu, T., (2016). Targeting microenvironment in cancer therapeutics. *Oncotarget*, 7(32), 52575–583.

- Mashidori, T., Shirataki, H., Kamai, T., Nakamura, F., Yoshida, K., (2011). Increased alpha-taxilin protein expression is associated with the metastatic and invasive potential of renal cell cancer. *Biomedical Research*, 32(2): 103–10.
- Masood S., (2016). Breast cancer subtypes: morphologic and biologic characterization. *Womens Health*, 12(1):103-19.
- Massari F, Santoni M, Ciccicarese C, Santini D, Alfieri S, Martignoni G, Brunelli M, Piva F, Berardi R, Montironi R, Porta C, Cascinu S, Tortora G., (2015). PD-1 blockade therapy in renal cell carcinoma: current studies and future promises. *Cancer Treatment Reviews*, 41:114–21.
- Matsuzaki J, Gnjjatic S, Mhawech-Fauceglia P, et al., (2010). Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8 T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 107:7875–80.
- Mazzaschi, G., Minari, R., Zecca, A., Cavazzoni, A., Ferri, V., Mori, C., Squadrilli, A., Bordi, P., Buti, S., Bersanelli, M., Leonetti, A., Cosenza, A., Ferri, L., Rapacchi, E., Missale, G., Petronini, P.G., Quaini, F., Tiseo, M., (2020). Soluble PD-L1 and circulating CD8+PD-1+ and NK cells enclose a prognostic and predictive immune effector score in immunotherapy treated NSCLC patients. *Lung Cancer* (Amsterdam, Netherlands), 148, 1–11.
- McArthur H.,L., (2016). Checkpoint inhibitors in breast cancer: hype or promise? *Clinical Advances in Hematology & Oncology*, 14(6):392-95.
- McClanahan F, Hanna B, Miller S, Clear A. J, Lichter P, Gribben J. G, Seiffert M., (2015). PD-L1 checkpoint blockade prevents immune dysfunction and leukemia development in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 126:203–11.
- McGuire A, Brown J.A.L, Malone C., et al., (2015). Effects of age on the detection and management of breast cancer. *Cancers*, 7: 908-929.
- Menon, S., Shin, S., ve Dy, G., (2016). Advances in cancer immunotherapy in solid tumors. *Cancers*, 8(12), 106.
- Mergener, S., Peña-Llopis, S.A., (2022). New perspective on immune evasion: escaping immune surveillance by inactivating tumor suppressors. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7: 15.
- Messenheimer D.J, Jensen SM, Afentoulis M.E, Wegmann K.W, Feng Z, Friedman D.J, Gough M.J, Urba W.J., Fox B.A., (2017). Timing of PD-1 blockade is critical to effective combination immunotherapy with anti-OX40. *Clinical Cancer Research*, 23: 6165-77.
- Mezei, G., Chang, E.T., Mowat, F.S., Moolgavkar, S.H., (2021). Comments on a recent case-control study of malignant mesothelioma of the pericardium and the tunica vaginalis testis. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 47(1), 85–86.
- Miao, J., Hsu, P.C., Yang, Y.L., Xu, Z., Dai, Y., Wang, Y., Chan, G., Huang, Z., Hu, B., Li, H., Jablons, D. M., You, L., (2017). YAP regulates PD-L1 expression in human NSCLC cells. *Oncotarget*, 8(70), 114576–87.
- Michaille, J.J., Awad, H., Fortman, E.C., Efanov, A.A., Tili, E., (2019). miR-155 expression in antitumor immunity: The higher the better?. *Genes Chromosomes and Cancer*, 58(4), 208–18.
- Miliotis, C., Slack, F.J. (2021). miR-105-5p regulates PD-L1 expression and tumor

- immunogenicity in gastric cancer. *Cancer Letter*, 518, 115–26.
- Mittendorf E, Philips A, Meric-Bernstam F, et al., (2014). PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunology Research*, 2: 361–370.
- Miyoshi, K., Miyoshi, T., Siomi, H., (2010). Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Molecular Genetics and Genomics*, MGG, 284(2), 95–103.
- Mortezaee, K., (2020). Immune escape: a critical hallmark in solid tumors. *Life Sciences*, 258:118110.
- Muenst S, Soysal S.D, Gao F, et al., (2013). The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 139: 667.
- Muenst, S., Läubli, H., Soysal, S.D., Zippelius, A., Tzankov, A., Hoeller, S., (2016). The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *The Internal Medicine Journal*, 279(6): 541–62.
- Muralidharan, S., Sehgal, M., Soundharya, R., Mandal, S., Majumdar, S.S., Yeshwanth, M., Saha, A., Jolly, M.K., (2022). PD-L1 activity is associated with partial EMT and metabolic reprogramming in carcinomas. *Current Oncology*, 29(11), 8285–8301.
- Murphy K.M., Travers P, Walport M., (2007). *Janeway's Immunobiology*. New York and London: Garland Science, Seventh
- Musetti, S.N., Huang, L., (2021). Tinagl1 gene therapy suppresses growth and remodels the microenvironment of triple negative breast cancer. *Molecular Pharmacology*, 18(5), 2032–38.
- Na, T.Y., Schecterson, L., Mendonsa, A.M., Gumbiner, B.M., (2020). The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 117(11), 5931–37.
- Nadiminty, N., Tummala, R., Lou, W., Zhu, Y., Shi, X.B., Zou, J.X., Chen, H., Zhang, J., Chen, X., Luo, J., deVere White, R.W., Kung, H.J., Evans, C.P., Gao, A.C., (2012). MicroRNA let-7c is downregulated in prostate cancer and suppresses prostate cancer growth. *PloS One*, 7(3), e32832.
- Nagato T, Ohkuri T, Ohara K, Hirata Y, Kishibe K, Komabayashi Y, Ueda S, Takahara M, Kumai T, Ishibashi K, Kosaka A, Aoki N, Oikawa K, et al., (2017). Programmed deathligand 1 and its soluble form are highly expressed in nasal natural killer/T-cell lymphoma: a potential rationale for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 66:877–90.
- Nair, V.S., Maeda, L.S., Ioannidis, J.P., (2012). Clinical outcome prediction by microRNAs in human cancer: a systematic review. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(7), 528–40.
- Nakayama, Y., Mimura, K., Tamaki, T., Shiraishi, K., Kua, L.F., Koh, V., Ohmori, M., Kimura, A., Inoue, S., Okayama, H., Suzuki, Y., Nakazawa, T., Ichikawa, D., Kono, K., (2019). Phospho-STAT1 expression as a potential biomarker for anti-PD-1/anti-PD-L1 immunotherapy for breast cancer. *International Journal of Oncology*, 54(6), 2030–38.
- Nath, S., Devi, G.R., (2016). Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology and Therapeutics*, 163, 94–108.
- Nelson, C.M., Khauv, D., Bissell, M.J., Radisky, D.C., (2008). Change in cell shape is required for matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition of mammary epithelial cells. *The Journal of Cellular Biochemistry*, 105(1), 25–

- 33.
- Nguyen T.A, Jo M.H, Choi Y.G, Park J, Kwon S.C, Hohng S. et al., (2015). Functional anatomy of the human microprocessor. *Cell*, 161:1374-87.
- Nishimura H, et al., (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 11(2):141–51.
- Nishimura H, Nose M, Hiai H, et al., (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 11: 141–51.
- Noë, V., Fingleton, B., Jacobs, K., Crawford, H.C., Vermeulen, S., Steelant, W., Bruyneel, E., Matrisian, L.M., Mareel, M., (2001). Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *Journal of Cell Science*, 114(1), 111–8.
- Nounou M.I, Amrawy F, Ahmed N, Abdelraouf K, Goda S, Syed-Sha-Qhattal H., (2015). Breast cancer: Conventional diagnosis and treatment modalities and recent patents and technologies. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 9(2):17-34.
- Nurieva R, et al., (2006). T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *EMBO Journal*, 25(11):2623–33.
- Nyhan, M.J., O'Donovan, T.R., Boersma, A.W., Wiemer, E.A., McKenna, S.L., (2016). MiR-193b promotes autophagy and non-apoptotic cell death in oesophageal cancer cells. *BMC Cancer*, 16, 101.
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C., (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9.
- Oh, S.Y., Kim, S., Keam, B., Kim, T.M., Kim, D.W., Heo, D.S., (2021). Soluble PD-L1 is a predictive and prognostic biomarker in advanced cancer patients who receive immune checkpoint blockade treatment. *Scientific Report*, 11(1), 19712.
- Ohashi, K. et al., (2013). Characteristics of lung cancers harboring NRAS mutations. *Clinical Cancer Research*, 19(9):2584–91.
- Ohtomo, N., Tomiya, T., Tanoue, Y., Inoue, Y., Nishikawa, T., Ikeda, H., Fujiwara, K., (2010). Expression of  $\alpha$ -taxilin in hepatocellular carcinoma correlates with growth activity and malignant potential of the tumor. *International Journal of Oncology*, 37: 1417-23.
- Oiseth S.J., Aziz M.S., (2017). Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *The Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 3:250-61.
- Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, et al., (2003). Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nature Medicine*, 9: 1477–1483.
- Orouji, E., Orouji, A., Gaiser, T., Larribère, L., Gebhardt, C., ve Utikal, J., (2016). MAP kinase pathway gene copy alterations in NRAS/BRAF wild-type advanced melanoma. *The International Journal of Cancer*, 138(9): 2257–62.
- Ota K, Azuma K, Kawahara A, Hattori S, Iwama E, Tanizaki J, Harada T, Matsumoto K, Takayama K, Takamori S, Kage M, Hoshino T, Nakanishi Y, Okamoto I., (2015). Induction of PD-L1 Expression by the EML4-ALK Oncoprotein and Downstream Signaling Pathways in Non Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 21:4014–21.
- Owen R.E, Sinclair E, Emu B, et al., (2007). Loss of T cell responses following long-

- term cryopreservation. *Journal of Immunological Methods*, 326:93-115.
- Padmanaban, V., Krol, I., Suhail, Y., Szczerba, B.M., Aceto, N., Bader, J.S., Ewald, A. J., (2019). E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer. *Nature*, 573(7774), 439–44.
- Padmanabhan, R., Kheraldine, H., Gupta, I., Meskin, N., Hamad, A., Vranic, S., Al Moustafa, A.E., (2022). Quantification of the growth suppression of HER2+ breast cancer colonies under the effect of trastuzumab and PD-1/PD-L1 inhibitor. *Frontiers in Oncology*, 12, 977664.
- Pal, P., Jana, S., Biswas, I., Mandal, D.P., and Bhattacharjee, S., (2022). Biphasic effect of the dietary phytochemical linalool on angiogenesis and metastasis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 477(4): 1041–52.
- Palucka A.,K, Coussens L.,M., (2016). The Basis of Oncoimmunology. *Cell*, 164:1233–47.
- Pardoll, D.M., (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12, 252–64.
- Park H.J, Park J.S, Jeong Y.H, Son J, Ban Y.H, Lee B.H, Chen L, Chang J, Chung D.H, Choi I, Ha S.J., (2015). Correction: PD-1 Upregulated on Regulatory T Cells during Chronic Virus Infection Enhances the Suppression of CD8+ T Cell Immune Response via the Interaction with PD-L1 Expressed on CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology*, 195:5841–42.
- Park, S.Y., Shin, J.H., Kee, S.H., (2017). E-cadherin expression increases cell proliferation by regulating energy metabolism through nuclear factor- $\kappa$ B in AGS cells. *Cancer Science*, 108(9), 1769–77.
- Paschos, N.K., Brown, W. E., Eswaramoorthy, R., Hu, J.C., Athanasiou, K.A. (2015). Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(5), 488–503.
- Pathania, A.S., Prathipati, P., Olwenyi, O.A., Chava, S., Smith, O.V., Gupta, S.C., Chaturvedi, N.K., Byrareddy, S.N., Coulter, D.W., Challagundla, K.B. (2022). miR-15a and miR-15b modulate natural killer and CD8+T-cell activation and anti-tumor immune response by targeting PD-L1 in neuroblastoma. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 25, 308–29.
- Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, Langthasa M, Rahman M, Bari M, et al., (2018). Interplay between miRNAs and human diseases. *The Journal of Cellular Physiology*, 233:2007–18.
- Pećina-Šlaus, N., Kafka, A., Tomas, D., Marković, L., Okštajner, P. K., Sukser, V., Krušlin, B., (2014). Wnt signaling transcription factors TCF-1 and LEF-1 are upregulated in malignant astrocytic brain tumors. *Histology and Histopathology*, 29(12): 1557–64.
- Pesce S, Squillario M, Greppi M, Loiacono F, Moretta L, Moretta A. et al., (2018). New miRNA signature heralds human NK cell subsets at different maturation steps: involvement of miR-146a-5p in the regulation of KIR expression. *Frontiers in Immunology*, 9:2360.
- Petrovic N, Ergun S., (2018). miRNAs as potential treatment targets and treatment options in cancer. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 22:157–68.
- Petrovic N, Ergün S, Isenovic E.R., (2017). Levels of microRNA heterogeneity in cancer biology. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 21:511–23
- Petrović, N., Nakashidze, I. ve Nedeljković, M., (2021). Breast Cancer Response to Therapy: Can microRNAs Lead the Way? *Journal of Mammary Gland Biology*

- and Neoplasia, 26:157–178.
- Pinto, B., Henriques, A.C., Silva, P.M.A., Bousbaa, H., (2020). Three-Dimensional Spheroids as *In Vitro* Preclinical Models for Cancer Research. *Pharmaceutics*, 12(12), 1186.
- Poncette, L., Bluhm, J., Blankenstein, T., (2022). The role of CD4 T cells in rejection of solid tumors. *Current Opinion in Immunology*, 74: 18–24.
- Postow M.A, Callahan M.K, Wolchok J.D., (2015). Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 33(17): 1974-82.
- Protopsaltis, N. J., Liang, W., Nudleman, E., Ferrara, N., (2019). Interleukin-22 promotes tumor angiogenesis. *Angiogenesis*, 22, 311–23.
- Provenzano E, Ulaner G.A, Chin S.F., (2018). Molecular classification of breast cancer. *PET Clinics*, 13(3):325-38.
- Putzke A.P., Ventura A.P., Bailey A.M., Akture C., Opoku-Ansah J., Çeliktaş M., Hwang M.S., Darling D.S., Coleman I.M., Nelson P.S., (2011). Metastatic progression of prostate cancer and e-cadherin: regulation by Zeb1 and Src family kinases. *The American Journal of Pathology*, 179:400–10.
- Qin T, Zeng Y. D, Qin G, Xu F, Lu J. B, Fang W. F, Xue C, Zhan J. H, Zhang X. K, Zheng Q. F, Peng R. J, Yuan Z. Y, Zhang L, Wang S. S., (2015b). High PD-L1 expression was associated with poor prognosis in 870 chinese patients with breast cancer. *Oncotarget*, 6:33972–81.
- Qin, S., et al., (2019). Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Molecular Cancer*, 18: 155.
- Qin, W., Hu, L., Zhang, X., Jiang, S., Li, J., Zhang, Z., Wang, X., (2019). The diverse function of PD-1/PD-L pathway beyond cancer. *Frontiers in Immunology*, 10, 2298.
- Qing Y, Li Q, Ren T, Xia W, Peng Y, Liu G., L, Luo H, Yang Y.X., Dai X.Y., Zhou S.F, Wang D., (2015). Upregulation of PD-L1 and APE1 is associated with tumorigenesis and poor prognosis of gastric cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, 9:901–09.
- Quan Z, Yang Y, Zheng H, Zhan Y, Luo J, Ning Y. et al., (2022). Clinical implications of the interaction between PD-1/PD-L1 and PI3K/AKT/mTOR pathway in progression and treatment of non-small cell lung cancer. *Journal of Cancer*, 13:3434–43.
- Querzoli, P., Coradini, D., Pedriali, M., Boracchi, P., Ambrogi, F., Raimondi, E., La Sorda, R., Lattanzio, R., Rinaldi, R., Lunardi, M., Frasson, C., Modesti, F., Ferretti, S., Piantelli, M., Iacobelli, S., Biganzoli, E., Nenci, I., Alberti, S., (2010). An immunohistochemically positive E-cadherin status is not always predictive for a good prognosis in human breast cancer. *British Journal of Cancer*, 103(12), 1835–39.
- Qureshi, S., Chan, N., George, M., Ganesan, S., Toppmeyer, D., Omene, C. (2022). Immune checkpoint inhibitors in triple negative breast cancer: the search for the optimal biomarker. *biomark. Insights* 17, 11772719221078774.
- Rae, J.M., Johnson, M.D., Cordero, K.E., Scheys, J.O., Larios, J.M., Gottardis, M. M., Pienta, K. J., ve Lippman, M. E., (2006). GREB1 is a novel androgen-regulated gene required for prostate cancer growth. *The Prostate*, 66(8): 886–94.
- Ramos-Silva, A., Tavares-Carreón, F., Figueroa, M., De la Torre-Zavala, S., Gastelum-Arellanez, A., Rodríguez-García, A., Galán-Wong, L. J., Avilés-Arnaut, H., (2017). Anticancer potential of thevetia peruviana fruit methanolic extract. *BMC*

- Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 241.
- Raskov, H., Orhan, A., Christensen, J.P., et al., (2021). Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells in cancer and cancer immunotherapy. *British Journal of Cancer* 124: 359–67.
- Rasoolnezhad, M., Safaralizadeh, R., Hosseinpourfeizi, M.A., Banan-Khojasteh, S. M., Baradaran, B., (2021). MiRNA-138-5p: A strong tumor suppressor targeting PD-L1 inhibits proliferation and motility of breast cancer cells and induces apoptosis. *The European Journal of Pharmacology*, 896, 173933.
- Reck, M., Mok, T.S.K., Nishio, M., Jotte, R.M., Cappuzzo, F., Orlandi, F., Stroyakovskiy, D., Nogami, N., Rodríguez-Abreu, D., Moro-Sibilot, D., Thomas, C.A., Barlesi, F., Finley, G., Lee, A., Coleman, S., Deng, Y., Kowanetz, M., Shankar, G., Lin, W., Socinski, M.A., Impower150 Study Group, (2019). Atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in non-small-cell lung cancer (IMpower150): key subgroup analyses of patients with EGFR mutations or baseline liver metastases in a randomised, open-label phase 3 trial. *The Lancet Respiratory Medicine*, 7(5), 387–401.
- Reddy P., Liu L., Ren C., Lindgren P., Boman K., Shen Y., Lundin E., Ottander U., Rytinki M., Liu K., (2005). Formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion activates AKT and mitogen activated protein kinase via phosphatidylinositol 3 kinase and ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells. *Molecular Endocrinology*, 19:2564–78.
- Ren, Q., Zhu, P., Zhang, H., Ye, T., Liu, D., Gong, Z., Xia, X. (2020). Identification and validation of stromal-tumor microenvironment-based subtypes tightly associated with PD-1/PD-L1 immunotherapy and outcomes in patients with gastric cancer. *Cancer Cell International*, 20, 92.
- Renehan, A.G., Booth, C., Potten, C.S., (2001). What is apoptosis, and why is it important? *BMJ (Clinical research ed.)*, 322(7301), 1536–38.
- Rex, D.A.B., Keshava Prasad, T.S., Kandasamy, R.K., (2022). Revisiting regulated cell death responses in viral infections. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7023.
- Rezaei, R., Baghaei, K., Hashemi, S.M., Zali, M.R., Ghanbarian, H., Amani, D., (2021). Tumor-derived exosomes enriched by miRNA-124 promote anti-tumor immune response in CT-26 tumor-bearing mice. *Frontiers in Medicine*, 8, 619939.
- Ribatti D., (2017). The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget*, 8(4), 7175–80.
- Rodig N., Ryan T, Allen J.A., et al., (2003). Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8<sup>+</sup> T cell activation and cytotoxicity. *European Journal of Immunology*, 33: 3117– 26.
- Rodríguez-Hernández, M.A., Chapresto-Garzón, R., Cadenas, M., Navarro-Villarán, E., Negrete, M., Gómez-Bravo, M.A., Victor, V.M., Padillo, F.J., Muntané, J., (2020). Differential effectiveness of tyrosine kinase inhibitors in 2D/3D culture according to cell differentiation, p53 status and mitochondrial respiration in liver cancer cells. *Cell Death and Disease*, 11(5), 339.
- Romero, Y., Wise, R., Zolkiewska, A., (2020). Proteolytic processing of PD-L1 by ADAM proteases in breast cancer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy CII*, 69(1), 43–55.
- Roshani Asl, E., Rasmi, Y., Baradaran, B., (2021). MicroRNA-124-3p suppresses PD-L1 expression and inhibits tumorigenesis of colorectal cancer cells via

- modulating STAT3 signaling. *The Journal of Cellular Physiology*, 236(10), 7071–87.
- Rossing, M., Pedersen, C.B., Tvedskov, T. et al., (2021). Clinical implications of intrinsic molecular subtypes of breast cancer for sentinel node status. *Scientific Reports*, 11: 2259.
- Rotte, A., (2019). Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38, 255.
- Ruby J.G, Jan C.H, Bartel D.P., (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448:83-6.
- Rugamba, A., Kang, D.Y., Sp, N., Jo, E.S., Lee, J.M., Bae, S.W., Jang, K.J., (2021). Silibinin regulates tumor progression and tumorsphere formation by suppressing PD-L1 expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. *Cells*, 10(7), 1632.
- Rupaimoole, R., Slack, F.J., (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(3), 203–22.
- Rye, I.H., Huse, K., Josefsson, S.E., Kildal, W., Danielsen, H.E., Schlichting, E., Garred, Riis, M.L., Osbreac, Lingjaerde, O.C., Myklebust, J.H., ve Russnes, H.G., (2021). Breast cancer metastasis: immune profiling of lymph nodes reveals exhaustion of effector T cells and immunosuppression. *Molecular Oncology*, 16(1): 88–103.
- Sabatier R, Finetti P, Mamessier E, et al., (2015). Prognostic and predictive value of PD-L1 expression in breast cancer. *Oncotarget*, 6: 5449–5464.
- Salmaninejad A., Valilou S. F., Shabgah A.G., Aslani S, Alimardani M, Pasdar A., Sahebkar A., (2019). PD-1/PD-L1 pathway: basic biology and role in cancer immunotherapy. *The Journal of Cellular Physiology*, 234: 16824-37.
- Salmond R.J., Filby A., Qureshi I., et al., (2009). T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunological Reviews*, 228:9.
- Sancho-Garnier, H., Colonna, M., (2019). Épidémiologie des cancers du sein. *Presse Medicale*, 48(10), 1076–84.
- Sant, S., Johnston, P.A., (2017). The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. drug discovery today. *Technologies*, 23, 27–36.
- Saraste, A., Pulkki, K., (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45(3), 528–537.
- Sato, Y., Kawashima, K., Fukui, E., Matsumoto, H., Yoshizawa, F., Sato, Y., (2022). Functional analysis reveals that Tinagl1 is required for normal muscle development in mice through the activation of ERK signaling. *Biochimica et biophysica acta. Molecular Cell*, 1869(9), 119294.
- Schütz, F., Stefanovic, S., Mayer, L., von Au, A., Domschke, C., Sohn, C., (2017). PD-1/PD-L1 Pathway in Breast Cancer. *Oncology Research and Treatment*, 40(5): 294–97.
- Schwartz T.L., Mogal H., Papageorgiou C., Veerapong J., Hsueh E.C., (2013). Metaplastic breast cancer: Histologic characteristics, prognostic factors and systemic treatment strategies. *Experimental Hematology and Oncology*, 2(1):31.
- Sefidgar, M., Soltani, M., Raahemifar, K., Bazmara, H., Nayinian, S.M., Bazargan, M., (2014). Effect of tumor shape, size, and tissue transport properties on drug delivery to solid tumors. *Journal of Biological Engineering*, 8, 12.

- Seidel, J., Otsuka, A., Kabashima, K., (2018). Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Frontiers in Oncology*, 8, 86.
- Sflomos, G., Dormoy, V., Metsalu, T., Jeitziner, R., Battista, L., Scabia, V., Raffoul, W., Delaloye, J-F., Treboux, A., (2016). "A preclinical model for er $\alpha$ -positive breast cancer points to the epithelial microenvironment as determinant of luminal phenotype and hormone response". *Cancer Cell*, 29 (3): 407–22.
- Shamir, E.R., Pappalardo, E., Jorgens, D. M., Coutinho, K., Tsai, W.T., Aziz, K., Auer, M., Tran, P.T., Bader, J.S., Ewald, A.J., (2014). Twist1-induced dissemination preserves epithelial identity and requires E-cadherin. *Journal of Cell Biology*, 204(5), 839–56.
- Shan, N., Shen, L., Wang, J., He, D., Duan, C., (2015). MiR-153 inhibits migration and invasion of human non-small-cell lung cancer by targeting ADAM19. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(1): 385–91.
- Shan, Z.G., Sun, Z.W., Zhao, L.Q., Gou, Q., Chen, Z.F., Zhang, J.Y., Chen, W., Su, C.Y., You, N., Zhuang, Y., Zhao, Y.L., (2021). Upregulation of tubulointerstitial nephritis antigen like 1 promotes gastric cancer growth and metastasis by regulating multiple matrix metalloproteinase expression. *The Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 36(1), 196–203.
- Sharpe A.H., (2009). Mechanisms of costimulation. *Immunological Reviews*, 229:5.
- Shen, M., Jiang, Y.Z., Wei, Y., Ell, B., Sheng, X., Esposito, M., Kang, J., Hang, X., Zheng, H., Rowicki, M., Zhang, L., Shih, W.J., Celià-Terrassa, T., Liu, Y., Cristea, I., Shao, Z.M., Kang, Y., (2019). Tinagl1 Suppresses Triple-Negative Breast Cancer Progression and Metastasis by Simultaneously Inhibiting Integrin/FAK and EGFR Signaling. *Cancer Cell*, 35(1), 64–80.e7.
- Sheng, J., Fang, W., Yu, J., Chen, N., Zhan, J., Ma, Y., Yang, Y., Huang, Y., Zhao, H., Zhang, L., (2016). Expression of programmed death ligand-1 on tumor cells varies pre and post chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Scientific Reports*, 6, 20090.
- Shi L, Zhang S, Wu H, Zhang L, Dai X, et al., (2013). MiR-200c Increases the radiosensitivity of non-small-cell lung cancer cell line A549 by targeting VEGF-VEGFR2 pathway. *PloS One*, 8:(10): e78344.
- Shi, M.H., Xing, Y.F., Zhang, Z.L., Huang, J.A., Chen, Y.J., (2013). Zhonghua zhong liu za zhi. *Chinese Clinical Oncology*, 35(2), 85–88.
- Shi, W., Gerster, K., Alajez, N.M., Tsang, J., Waldron, L., Pintilie, M., Hui, A.B., Sykes, J., P'ng, C., Miller, N., McCready, D., Fyles, A., and Liu, F.F., (2011). MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer Research*, 71(8), 2926–37.
- Shin S.J, Jeon Y.K, Cho Y.M, Lee J.L, Chung D.H, Park J.Y, Go H. (2015a). The association between PD-L1 expression and the clinical outcomes to vascular endothelial growth factor- targeted therapy in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Oncologist*.20:1253–60.
- Shinde, S.S., Ahmed, S., Malik, J.A., Hani, U., Khanam, A., Ashraf Bhat, F., Ahmad Mir, S., Ghazwani, M., Wahab, S., Haider, N., Almhizia, A.A., (2023). Therapeutic delivery of tumor suppressor miRNAs for breast cancer treatment. *Biology*, 12(3), 467.

- Shu, J., Xia, Z., Li, L., Liang, E.T., Slipek, N., Shen, D., Foo, J., Subramanian, S., Steer, C. J., (2012). Dose-dependent differential mRNA target selection and regulation by let-7a-7f and miR-17-92 cluster microRNAs. *RNA Biology*, 9(10), 1275–87.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Fuchs, H.E., Jemal, A., Cancer Statistics, (2021). cancer statistics, 2021. CA: a *Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), 7–33..
- Singh, G., Thulkar, S., Seith, A., Parshad, R., Kumar, P., (2008). An approach for assessment of tumor volume from mammography in locally advanced breast cancer. *The Malaysian Journal of Medical Sciences*, 15(1), 37–41.
- Slaby, O., Svoboda, M., Michalek, J., Vyzula, R., (2009). MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Molecular Cancer*, 8, 102.
- Smith, S.M., Wachter, K., Burris, H.A., III Schilsky, R.L., George, D.J., Peterson, D.E., Johnson, M.L., Markham, M.J., Mileham, K.F., Beg, M.S., (2021). Clinical cancer advances 2021: ASCO's Report on progress against cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 39, 1165–84.
- Song, N., Ma, X., Li, H., Zhang, Y., Wang, X., Zhou, P., Zhang, X. (2015). microRNA-107 functions as a candidate tumor suppressor gene in renal clear cell carcinoma involving multiple genes. *Journal of Urologic Oncology*, 33(5).
- Soubeyrand, S., Naing, T., Martinuk, A., McPherson, R., (2013). ERK1/2 regulates hepatocyte Trib1 in response to mitochondrial dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(12): 3405–14.
- Soule, H.D., Vazquez J., Long A., Albert S., Brennan M., (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma". *Journal of the National Cancer Institute*, 51 (5): 1409–16.
- Stanczak, M.A., Läubli, H., (2023). Siglec receptors as new immune checkpoints in cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 90, 101112.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., Yu, Q., (2015). MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget*, 6(11), 8474–90.
- Suda, K., Rozeboom, L., Rivard, C.J., Yu, H., Ellison, K., Melnick, M.A.C., Hinz, T.K., Chan, D., Heasley, L.E., Politi, K., Mitsudomi, T., Hirsch, F.R., (2017). Therapy-induced E-cadherin downregulation alters expression of programmed death ligand-1 in lung cancer cells. *Lung cancer* (Amsterdam, Netherlands), 109, 1–8.
- Sun C, Mezzadra R, Schumacher T.N., (2018). Regulation and function of the PD-L1 checkpoint. *Immunity*, 48(3):434–52.
- Sun W.Y., Lee Y.K., Koo J.S., (2016). Expression of PD-L1 in triple-negative breast cancer based on different immunohistochemical antibodies. *Journal of Translational Medicine*, 14(1):173-85.
- Sun, L., Dong, Z., Gu, H., Guo, Z., Yu, Z., (2019). TINAGL1 promotes hepatocellular carcinogenesis through the activation of TGF- $\beta$  signaling-mediated VEGF expression. *Cancer Management and Research*, 11, 767–75.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., 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. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249. Erişim tarihi: 03.11.2021. Erişim adresi : <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

- Suyal, G., Pandey, P., Saraya, A., Sharma, R., (2022). Tumour suppressor role of microRNA-335-5p in esophageal squamous cell carcinoma by targeting TTK (Mps1). *Experimental and Molecular Pathology*, 124, 104738.
- Svoronos A.A, Engelman D.M, Slack F.J., (2016). OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of microRNAs in cancer. *Cancer Research*, 76:3666–70.
- Symowicz, J., Adley, B.P., Gleason, K.J., Johnson, J.J., Ghosh, S., Fishman, D.A., Hudson, L.G., Stack, M.S., (2007). Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. *Cancer Research*, 67(5), 2030–39.
- Tada, Y., Togashi, Y., Kotani, D., Kuwata, T., Sato, E., Kawazoe, A., Doi, T., Wada, H., Nishikawa, H., Shitara, K., (2018). Targeting VEGFR2 with Ramucirumab strongly impacts effector/ activated regulatory T cells and CD8+ T cells in the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother*, 6(1), 106.
- Tanaka, K., Kim, S.E., Yano, H., Matsumoto, G., Ohuchida, R., Ishikura, Y., Araki, M., Araki, K., Park, S., Komatsu, T., Hayashi, H., Ikematsu, K., Tanaka, K., Hirano, A., Martin, P., Shimokawa, I., Mori, R. (2017). MiR-142 is required for staphylococcus aureus clearance at skin wound sites via small GTPase-mediated regulation of the neutrophil actin cytoskeleton. *The Society for Investigative Dermatology*, 137(4), 931–40.
- Tang, L., Chen, H.Y., Hao, N. B., Tang, B., Guo, H., Yong, X., Dong, H., Yang, S. M., (2017). microRNA inhibitors: Natural and artificial sequestration of microRNA. *Cancer Letters*, 407, 139–47.
- Tang, S., Ning, Q., Yang, L., Mo, Z., Tang, S., (2020). Mechanisms of immune escape in the cancer immune cycle. *International Immunopharmacology*, 86, 106700.
- Tang, Y., Zong, S., Zeng, H., Ruan, X., Yao, L., Han, S., Hou, F., (2021). MicroRNAs and angiogenesis: a new era for the management of colorectal cancer. *Cancer Cell International*, 21(1), 221.
- Thakuri, P.S., Gupta, M., Plaster, M., Tavana, H., (2019). Quantitative size-based analysis of tumor spheroids and responses to therapeutics. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 17(3), 140–49.
- Thomas M, Kelly E.D, Abraham J, Kruse M., (2019). Invasive lobular breast cancer: A review of pathogenesis, diagnosis, management, and future directions of early stage disease. *Seminars in Oncology*, 46(2):121-32.
- Topalian S.L, Drake C.G, Pardoll D.M., (2015a). Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*, 27(4): 450- 61.
- Topalian S.L, Hodi F.S, Brahmer J.R, et al., (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *The New England Journal of Medicine*, 366: 2443–54.
- Topalian S.L, Drake C.G, Pardoll D.M., (2012). Targeting the PD-1/ B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Current Opinion in Immunology*, 24:207–12.
- Topalian S.L, Drake C.G, Pardoll D.M., (2015b). Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*, 27:450–61.
- Tripathi S, Guleria I., (2015). Role of PD1/PD-L1 pathway, and Th17 and Treg cells in maternal tolerance to the fetus. *Biomedical Journal*, 38: 25–31.
- Tsai K.K, Zarzoso I, Daud A.I., (2014). PD-1 and PD-L1 antibodies for melanoma. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 10:3111–16.

- Tsang, Julia Y. S. PhD; Tse, Gary M. FRCPC (2020). Molecular classification of breast cancer, *Advances in Anatomic Pathology*, 27(1):27-35.
- Tsutsumi, S., Saeki, H., Nakashima, Y., Ito, S., Oki, E., Morita, M., Oda, Y., Okano, S., Maehara, Y., (2017). Programmed death-ligand 1 expression at tumor invasive front is associated with epithelial-mesenchymal transition and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Science*, 108(6), 1119–27.
- Turan, N., Ergen, H.A., Arikan, S., Yaylım, İ., İşbir, T., (2012). Mmp-3 ve E-Kaderin polimorfizmlerinin meme tümörlerindeki rolü-the role Of Mmp-3 and E-Cadherin polymorphisms in breast tumours. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi* ,2; 30-7.
- Turcotte, S., ve Rosenberg, S.A., (2011). Immunotherapy for metastatic solid cancers. *Advances in Surgery*, 45: 341–360.
- Turvey S.E, Broide D.H., (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125 (2): S24-32.
- Tülüce, Y., Lak, P., Koyuncu, İ., Kılıç, A., Durgun, M., Özkol, H., (2017). The apoptotic, cytotoxic and genotoxic effect of novel binuclear boron-fluoride complex on endometrial cancer. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology*, *Biochemia Medica*, 30(6):933–44.
- Tülüce, Y., Masseh, H.D.I., Koyuncu, İ., Kiliç, A., Durgun, M., Özkol, H., (2019). Novel fluorine boron hybrid complex as potential antiproliferative drugs on colorectal cancer cell line. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 19:(5), 627–37.
- Ueno, K., Hirata, H., Majid, S., Yamamura, S., Shahryari, V., Tabatabai, Z. L., Hinoda, Y., Dahiya, R., (2012). Tumor suppressor microRNA-493 decreases cell motility and migration ability in human bladder cancer cells by downregulating RhoC and FZD4. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(1): 244–253.
- Varadé, J., Magadán, S., González-Fernández, Á. Human immunology and immunotherapy: main achievements and challenges. *Cellular and Molecular Immunology*, 18, 805–28 (2021).
- Vasudevan S., (2012). Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 3(3), 311–30.
- Venhuizen, J. Jacobs, F.J.C., Span, P.N., Zegers, M.M., (2020). P120 and E-cadherin: Double-edged swords in tumor metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, 60, 107–20.
- Vibhakar R, Juan G, Traganos F, et al., (1997). Activationinduced expression of human programmed death-1 gene in T-lymphocytes. *Experimental Cell Research*, 232: 25–28.
- Vinay, D.S., Ryan, E.P., Pawelec, G., Talib, W.H., Stagg, J., Elkord, E., Lichtor, T., Decker, W.K., Whelan, R.L., Kumara, H., Signori, E., Honoki, K., Georgakilas, A.G., Amin, A., Helferich, W.G., Boosani, C.S., Guha, G., Ciriolo, M.R., Chen, S., Mohammed, S.I., Kwon, B.S. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, 35; S185–S198.
- Vis, M., Ito, K., Hofmann, S., (2020). Impact of Culture Medium on Cellular Interactions in *in-vitro* Co-culture Systems. *Front. Bioeng. Biotechnol*, 8: 911.
- 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(1):9-11.

- Vranic S., Schmitt F., Sapino A., Costa J.L., Reddy S., Castro M., et.al., (2013). Apocrine carcinoma of the breast: A comprehensive review. *Histology and Histopathology*, 28(11):1393-409.
- Walker, A., (1980). *Activity and Selectivity in the Field*, Chap. 8. Interactions Between Herbicides and the Soil (Editor: R. J. Hance). Academic Press, London. 349.
- Walker, M. D. (2014). MicroRNAs and long non-coding RNAs in pancreatic beta cell function. in cellular endocrinology in health and disease (pp. 379-392). *Academic Press*.
- Wang H, Zhang Y, Wu X, Wang Y, Cui H, Li X. et al., (2018). Regulation of human natural killer cell IFN- $\gamma$  production by MicroRNA-146a via targeting the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Frontiers in Immunology*, 9:293.
- Wang J, Chen J, Sen S., (2016). MicroRNA as biomarkers and diagnostics. *The Journal of Cellular Physiology*, 231:25–30.
- Wang J, Yoshida T, Nakaki F, et al., (2005). Establishment of NOD-Pdcd1<sup>-/-</sup>-mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, 102: 11823–828.
- Wang Z., (2011). The guideline of the design and validation of MiRNA mimics. *Methods in Molecular Biology*, 676, 211–23.
- Wang, J., Wang, Q., Guan, Y., Sun, Y., Wang, X., Lively, K., Wang, Y., Luo, M., Kim, J.A., Murphy, E.A., 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(19), e157248.
- Wang, J., Yuan, R., Song, W., Sun, J., Liu, D., Li, Z., (2017). PD-1, PD-L1 (B7-H1) and tumor-site immune modulation therapy: the historical perspective. *Journal of Hematology and Oncology*, 10(1): 34.
- Wang, L.Q., Kumar, S., Calin, G.A., Li, Z., Chim, C.S., (2020). Frequent methylation of the tumour suppressor miR-1258 targeting PDL1: implication in multiple myeloma-specific cytotoxicity and prognostification. *British Journal of Haematology*, 190(2): 249–61.
- Wang, X., Teng, F., Kong, L., Yu, J., (2016). PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *OncoTargets and Therapy*, 9, 5023–39.
- Warrington, R., Watson, W., Kim, H.L. et al., (2011). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 7, S1.
- Wheelock, M.J., Buck, C.A., Bechtol, K.B., Damsky, C.H., (1987). Soluble 80-kd fragment of cell-CAM 120/80 disrupts cell-cell adhesion. *Journal of cellular biochemistry*, 34(3), 187–202.
- Wilson R.C, Tambe A., Kidwell M. A., Noland C.L, Schneider C.P., Doudna J.A., (2015). Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Molecular Cell*, 57:397-407
- Winter J., Jung S., Keller S., Gregory R. I., Diederichs S., (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 11(3):228–34.
- Wyllie, A.H., (1980). "Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation" *Nature*, 284 (5756), 555-56.
- Xia, H., Hui, K.M., (2012). MicroRNAs involved in regulating epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells as molecular targets for cancer therapeutics.

- Cancer Gene Therapy*, 19(11), 723–30.
- Xing Y.F., Zhang Z.L., Shi M.H., Ma Y., Chen Y.J., (2012). The level of soluble programmed death-1 in peripheral blood of patients with lung cancer and its clinical implications. *Chinese journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 35(2):102–106.
- Xu D., Han Q., Hou Z., Zhang C., Zhang J., (2017). MiR-146a negatively regulates NK cell functions via STAT1 signaling. *Cellular and Molecular Immunology*:712-20.
- Xu, P., Wang, Y., Deng, Z., Tan, Z., Pei, X., (2022). MicroRNA-15a promotes prostate cancer cell ferroptosis by inhibiting GPX4 expression. *Oncology Letters*, 23(2), 67.
- Xu, R., Zhou, F., Yu, T., Xu, G., Zhang, J., Wang, Y., Zhao, L., Liu, N., (2019). MicroRNA-940 inhibits epithelial-mesenchymal transition of glioma cells via targeting ZEB2. *American Journal of Translational Research*, 11(12), 7351–63.
- Yabroff, K.R., Wu, X.C., Negoita, S., Stevens, J., Coyle, L., Zhao, J., Mumphrey, B.J., Jemal, A., Ward, K.C., (2022). Association of the COVID-19 pandemic with patterns of statewide cancer services. *Journal of the National Cancer Institute*, 114(6), 907–909.
- Yaman, Y.T., Akbal, O., Abaci, S. (2019). Development of clay-protein based composite nanoparticles modified single-used sensor platform for electrochemical cytosensing application. *Biosensors and Bioelectronics*, 132, 230–37.
- Yan, X.L., Luo, Q.Y., Zhou, S.N., Pan, W.T., Zhang, L., Yang, D.J., Qiu, M.Z., (2021). MicroRNA-375 reverses the expression of PD-L1 by inactivating the JAK2/STAT3 signaling pathways in gastric cancer. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 45(5), 101574.
- Yang, J., Weinberg, R.A., (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental Cell*, 14(6), 818–29.
- Yang, Y., Chen, X., Ma, C., (2020). Insulin receptor is implicated in triple-negative breast cancer by decreasing cell mobility. *Journal of Biomedical Research*, 35(3), 189–96.
- Yao, D., Chen, X., (2023). MiRNA-145-5p Restrains malignant behaviors of breast cancer cells via downregulating H2AFX Expression. *Iranian Journal of Biotechnology*, 21(3), 33-43.
- Yarrow, J.C., Perlman, Z.E., Westwood, N.J., Mitchison, T.J., (2004). A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnology*, 4, 21.
- Yeom K.H, Lee Y, Han J, Suh M.R, Kim V.N., (2006). Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Research*, 34: 4622–29.
- Yeonhwa S., Seo H., (2016). Establishment of multicellular tumor spheroids-based assay for screening of novel therapeutics. *Cancer Research*., 76:363.
- Youngnak P., Kozono Y., Kozono H., Iwai H., Otsuki N., Jin H., Omura K., Yagita H., Pardoll D.M., Chen L., Azuma M., (2003). Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 307:672–77.
- Yu, W., Hua, Y., Qiu, H., Hao, J., Zou, K., Li, Z., Hu, S., Guo, P., Chen, M., Sui, S., Xiong, Y., Li, F., Lu, J., Guo, W., Luo, G., Deng, W. (2020). PD-L1 promotes tumor growth and progression by activating WIP and  $\beta$ -catenin signaling

- pathways and predicts poor prognosis in lung cancer. *Cell Death and Disease*, 11(7), 506.
- Yun Xing, Wang, Z., Lu, Z., Jie Xia, Zhangjuan Xie, Mengxia Jiao, Ronghua Liu, Yiwei Chu, (2021). MicroRNAs: immune modulators in cancer immunotherapy, *Immunotherapy Advances*, 1(1), Itab006.
- Zangouri V., Akrami M., Tahmasebi S., Talei A., Hesarooieih A.G., (2018). Medullary breast carcinoma and invasive ductal carcinoma: A review study. *The Iranian Journal of Medical Sciences*, 43(4):365-71.
- Zanoni, M., Pignatta, S., Arienti, C., Bonafè, M., Tesei, A., (2019). Anticancer drug discovery using multicellular tumor spheroid models. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14(3), 289–301.
- Zare, M., Pemmada, R., Madhavan, M., Shailaja, A., Ramakrishna, S., Kandiyil, S. P., Donahue, J.M., Thomas, V., (2022). Encapsulation of miRNA and siRNA into nanomaterials for cancer therapeutics. *Pharmaceutics*, 14(8), 1620.
- Zhang J., Gao J., Li Y., Nie J., Dai L., Hu W., Chen X., Han J., Ma X., Tian G., Wu D., Shen L., Fang J., (2015). Circulating PD-L1 in NSCLC patients and the correlation between the level of PD-L1 expression and the clinical characteristics. *Thoracic Cancer*, 6:534–38.
- Zhang W.W., Wu S.G., Ling Y.H., Sun J.Y., Long Z.Q., Hua X., et al., (2018). Clinicopathologic characteristics and clinical outcomes of pure type and mixed type of tubular carcinoma of the breast: A single institution cohort study. *Cancer Management and Research*, 10(1):4509- 15.
- Zhang Y., Li X., Zhang J., Liang H., (2020). Natural killer T cell cytotoxic activity in cervical cancer is facilitated by the LINC00240/microRNA-124-3p/STAT3/MICA axis. *Cancer Letters*, 474:63-73.
- Zhang, D.J., Fu, Z.M., Guo, Y.Y., Guo, F., Wan, Y.N., Guan, G.F., (2023). Circ0000052/miR-382-3p axis induces PD-L1 expression and regulates cell proliferation and immune evasion in head and neck squamous cell carcinoma. *The Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 27(1), 113–26.
- Zhang, H., Chen, J., (2018). Current status and future directions of cancer immunotherapy. *Journal Cancer*, 9(10), 1773–81.
- Zhang, J., Gao, J., Li, Y., Nie, J., Dai, L., Hu, W., Chen, X., Han, J., Ma, X., Tian, G., Wu, D., Shen, L., Fang, J., (2015). Circulating PD-L1 in NSCLC patients and the correlation between the level of PD-L1 expression and the clinical characteristics. *Thoracic cancer*, 6(4), 534–38.
- Zhang, J., Zhang, Q., Lou, Y., Fu, Q., Chen, Q., Wei, T., Yang, J., Tang, J., Wang, J., Chen, Y., et al., (2018). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ /interleukin-1 $\beta$  signaling enhances hepatoma epithelial-mesenchymal transition through macrophages in a hypoxic-inflammatory microenvironment. *Hepatology*, 67, 1872–89.
- Zhang, Q., Yu, L., Qin, D., Huang, R., Jiang, X., Zou, C., Tang, Q., Chen, Y., Wang, G., Wang, X., Gao, X., (2015). Role of microRNA-30c targeting ADAM19 in colorectal cancer. *PloS One*, 10(3): e0120698.
- Zhang, Y., Wu, J., Zhao, C., Zhang, S., Zhu, J., (2023). Recent Advancement of PD-L1 detection technologies and clinical applications in the era of precision cancer therapy. *Journal Cancer*, 14(5), 850–73.
- Zhang, Z., Richmond, A., Yan, C., (2022). Immunomodulatory properties of PI3K/AKT/mTOR and MAPK/MEK/ERK inhibition augment response to immune checkpoint blockade in melanoma and triple-negative breast cancer.

- International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7353.
- Zhao M., LI F., Wang., Peng-yin, LI J., XU H., (2021). Research Progress of Dual-target Blocking Therapy of PD-L1 and VEGF. *China Biotechnology*, 41(9): 71-7.
- Zhao, L., Yu, H., Yi, S., Peng, X., Su, P., Xiao, Z., Liu, R., Tang, A., Li, X., Liu, F., Shen, S., (2016). The tumor suppressor miR-138-5p targets PD-L1 in colorectal cancer. *Oncotarget*, 7(29), 45370–84.
- Zhou, H., Jia, W., Lu, L., Han, R., (2023). MicroRNAs with multiple targets of immune checkpoints, as a potential sensitizer for immune checkpoint inhibitors in breast cancer treatment. *Cancers*, 15(3), 824.
- Zhou, Y., Xu, M., Zhao, K., Liu, B., (2023). Construction and validation of a tumor mutational burden and immune-related prognostic model for predicting the prognosis of patients with lung squamous cell carcinoma. *Journal of Thoracic Disease*, 15(3), 1319–34.
- Zhu X., Lang J., (2017). Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget*, 8: 97671-682.
- Zielinski C., Knapp S., Mascaux C., et al., (2013). Rationale for targeting the immune system through checkpoint molecule blockade in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 24: 1170–79.
- Zinselmeyer B.H., Heydari S., Sacristan C., et al., (2013). PD-1 promotes immune exhaustion by inducing antiviral T cell motility paralysis. *Journal of Experimental Medicine*, 210: 757–74.
- Zou W., Chen L., (2008). Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*, 8:467–77.
- Zou, C., Xu, Q., Mao, F., Li, D., Bian, C., Liu, L. Z., Jiang, Y., Chen, X., Qi, Y., Zhang, X., Wang, X., Sun, Q., Kung, H. F., Lin, M. C., Dress, A., Wardle, F., Jiang, B. H., Lai, L., (2012). MiR-145 inhibits tumor angiogenesis and growth by N-RAS and VEGF. *Cell Cycle*, 11(11), 2137–45.



## ÖZ GEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Sedat KÖSTEKÇİ  
E-posta Adresi :

### Eğitim Bilgileri

Lisans : Biyoloji  
Üniversite : Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi  
Fakülte : Fen Edebiyat Fakültesi  
Bölüm : Biyoloji Bölümü ABD  
Mezuniyet Yılı : 2011

Yüksek Lisans :  
Üniversite : Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi  
Enstitü : Fen Bilimleri Enstitüsü  
Anabilim Dalı : Biyoloji Anabilim Dalı  
Mezuniyet Yılı : 2014

### Akademik Yayınlar

- Arslan A., Çelik Ö., Keser S., Kostekçi S., Kıyak T., Aslantaş M., 4 Turcmos 2013 International Turkish Congress on molecular Spectroscopy Synthesis, Structural Characterization, Thermal and Biological Analyses of (C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) Cu+2(C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>SO<sub>3</sub>) Complex. **4th National Crystallographic Meeting with International Participation**, 105-106pp., 17-19 May 2014, Dicle University, Diyarbakır.
- Aygan A., Köstekci S., Sariturk S., Comlekcioglu N., Production and properties of Alkaline Cellulase Free Xylanase from Bacillus sp. ASX42 and comparison of some known methods for purification of enzyme. **6 th International Molecular Biology and Biotechnology Congress** (22-25 December 2017). Konya- Turkey, Sayfa No: 67.
- Aygan A., Sariturk, S., Kostekci, S., Tanis H., Production and characterization of alkaliphilic alpha-amylase from Bacillus subtilis A10 isolated from soils of Kahramanmaras, Turkey. 2014. *African J. Microbiol. Res.* 8(21): 2168-2173.
- Çömlekcioglu N., Kutlu M., Aygan A., Kocabaş Y., Z., Köstekçi S., 2014. Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. **1. Ulusal Botanik/Bitki Bilimi Kongresi**. Ulusal Kongre (25-28 Ekim), Sayfa No:68-69. Antalya-Türkiye.
- Dıraz E., Karaman Ş., Durdu H., Aygan A., Köstekci S., 2017. Seasonal Variations and Antimicrobial Activity of Essential Oil Composition of Orthurus heterocarpus (Boiss.) Juz. from Turkey. 2017. *Dicle Uni. Fen Bilimleri Ens. Derg.* 6(1).
- Köstekci, S., Aygan, A., Cömlekcioglu, N., Saritürk, S., (2022). Alkaline cellulase free xylanase from bacillus sp. Asx42: properties, purification and its effect on seed germination. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 12(1).
- Köstekci S., Taşdemir Ş., 2015. Kahramanmaraş'ta Karşılaşılan Kanser Türleri ve Bu Kanser Türleri Üzerine Çeşitli Faktörlerin Etkisi'' **Turkey National Cancer Week Applied Short Course in Cancer Epidemiology** 1-3 April 2015, Ankara-Turkey.

- Sarıtürk S., Aygan A., Köstekci S, Çömlekçioğlu N., 2017, Alkaline cellulase free xylanase from Bacillus sp.ASX42. **6th International Congress on Molecular Biology and Biotechnology**. Afyon, TURKEY. December 22-25, 2017.
- Tülüce Y., Alhamud H., Keleş A.Y., Köstekci S. 2021. Sodyum Deoksikolat Maddesinin Meme Kanseri Hücre Hattında Apoptotik, Sitotoksik ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi **XVI. TıbbiBiyoloji ve Genetik Kongresi**, Ankara, Türkiye, 28-31. Ekim, 2021, cilt.52, sa.21479488, ss.424-426.
- Tülüce Y., Keleş A.Y., Köstekci S., Özkol H., 2021. Çeşitli Mantar Ekstraktlarının Kolorektal Kanseri Hücre Hatlarında Genotoksik, Apoptotik, Sitotoksik ve Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi. **XVI. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi**, Ankara, Türkiye, 28-31. Ekim, 2021, cilt.52, sa.21479488, ss.281-283.
- Tülüce Y., Köstekci S., 2022. Rho-A Genini Hedefleyen Kitosan Kaplı siRNA Lipozomal Formülasyonun Geliştirilmesi ve Meme Kanseri Hücre Hatlarında Gen Susturma Veriminin ve Diğer Parametreler Üzerine Etkisinin Araştırılması, **Düşünden Gerçeğine Proje Pazarı** (25-27 Mayıs 2022). KTUPRJ-015, ss: 15, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, Türkiye.
- Tülüce Y., Köstekci S., Tunçyürekli M., 2020. Docetaxel'in Lipozomal Formülasyonunun Geliştirilmesi ve MCF-7 Kanseri Hücre Kültüründeki Sitotoksik Etkisinin Araştırılması. **Doğu Anadolu Bölgesel Kariyer Fuarı (DAKAF'2020) Proje Pazarı** (5-6 Mart 2020.) Erzurum Atatürk Üniversitesi, ERZURUM.
- Tülüce Y., Köstekci S., Tunçyürekli M., Keleş A., Y., Baydar B., 2021. Çeşitli Kanseri Hücre Hatlarına Karşı Monoklonal Antikor Üretimi ve Kullanım Alanlarının Araştırılması'' Zonguldak (Bülent Ecevit Üniversitesi) BEÜ FARABI. **VII. Farabi Ar-Ge ve İnovasyon Proje Pazarı** (24 Mayıs 2021). ZONGULDAĞ.
- Tülüce, Y., Keleş, A. Y., Köstekci, S. (2023). Assessment of redox homeostasis via genotoxicity, cytotoxicity, apoptosis and NRF-2 in colorectal cancer cell lines after treatment with Ganoderma lucidum extract. *Drug and Chemical Toxicology*, 1–16. Advance online publication. *Drug and chemical toxicology*, 1–17.
- Tülüce, Y., Köstekci S. 2022. Development of a liposomal form of docetaxel and Investigation of its cytotoxic activity in various cancer cell Cultures. **Online 1 st International Health Sciences Research Days Congress**, 14-16 September 2022, Oral Presentation, Abstract Book E-ISBN: 978-625-7783-56-9, ss:50. İstanbul, Türkiye.
- Yılmaz Baran N., Demir, O., H., Kostekci S., Sacak M., Baran Y., 2015. Poly-2-[(4-methylbenzylidene) amino] phenol: Investigation of thermal degradation and antimicrobial properties." *Journal of Applied Polymer Science*132.14.

**VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU**

Tarih 07/02/2024

**Tez Başlığı: Enkapsüle Edilmiş miR-3670, miR-8078 Temelli Tedavi Yaklaşımının Meme Kanserinin İmmünoterapisindeki Etkinliğinin Araştırılması**

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışmamın, kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç bölümlerinden oluşan toplam 140 (Yüz kırk) sayfalık kısmına ilişkin, 07/02/2024 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre tezimin benzerlik oranı %9 (dokuz) dur.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

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

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Tarih ve İmza  
07.02.2024

Adı Soyadı: Sedat Köstekci

Öğrenci No: 18910001330

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Statüsü: ( ) Yüksek lisans (X) Doktora

**DANIŞMAN**

**ENSTİTÜ ONAYI**

UYGUNDUR

UYGUNDUR