



**TÜMÖR İMMÜNİTESİNDE WWOX PROTEİNİNİN ROLÜ**

**Elif SERDAL**

**TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman**

**Doç. Dr. Bahadır BATAR**

**Tez No: 2021/119**

**TEKİRDAĞ**

T.C.  
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TÜMÖR İMMÜNİTESİNDE WWOX PROTEİNİNİN  
ROLÜ**

**Elif SERDAL**  
**1188209102**

**TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Bahadır BATAR**

**Tez No: 2021/119**

**TEKİRDAĞ-2021**



## TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim boyunca bilimsel ve manevi yönden yetişmemde büyük payı olan Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Başkanımız Sn. Prof. Dr. Burhan TURGUT'a,

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen; yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren, en temelden başlayarak bu günlere gelmem için beni yetiştiren ve sonsuz sabırla beni her zaman çalışmaya teşvik eden danışman hocam Sn. Doç. Dr. Bahadır BATAR'a,

Tez çalışmamdaki çeşitli analizleri yapmamda destek ve yardımcı olan verileri değerlendirmemde engin tecrübe ve bilgilerini paylaşmaktan kaçınmayan değerli hocalarım Sn. Dr. Öğr. Üyesi Birol TOPÇU'ya, Sn. Prof. Dr. Türker BİLGİN'e ve Sn. Öğr. Gör. Duygu KORUCU'ya,

Araştırmalarım boyunca emeğini ve bilgisini benden esirgemeyen, verdiği bilgilerle beni aydınlatan, güler yüzü ve tatlı dilini hiç esirgemeyen tanımaktan çok mutlu olduğum çok kıymetli hocalarım Sn. Dr. Öğr. Üyesi Mazhar ÖZKAN'a, Sn. Dr. Öğr. Üyesi Berna ERDAL'a ve Sn. Dr. Öğr. Üyesi Elif POLAT'a,

Tüm yaşamım boyunca manevi desteklerini benden hiç esirgemeyen canım babam İlhan SERDAL'a ve kıymetli annem Sevgi SERDAL'a,

Her zaman destekleri ile motivasyonumu yükselten Berkay YILDIZ'a, Doktora öğrencileri Bahar YILMAZ'a, Şeyma VARINCA YILDIZ'a ve Hande AKALAN'a, Yüksek Lisans öğrencisi Bensu BAYLAN'a ve değerli ekip arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Serdal, E. Tümör İmmünitesinde WWOX Proteininin Rolü, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, 2021.** WWOX protein ifadesi çoğu insan kanserlerinde sıklıkla kaybolur veya azalır. WWOX protein ifadesi kaybı üçlü negatif meme kanserlerinde sık görülmektedir. İmmün sistem meme kanseri gelişiminde, ilerlemesinde ve kontrolünde aktif rol oynamaktadır. Programlanmış hücre ölüm ligandı 1 (PD-L1), immün sistemden kaçışa katılan önemli immün kontrol noktası molekülüdür. PD-L1 çeşitli immün hücrelerde ve meme kanseri de dâhil olmak üzere birçok farklı tümör tiplerinde ifade edilir. STAT3, PD-L1 ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. PD-L1'in, JAK aracılı STAT3 fosforilasyonu ve aktivasyonu nedeniyle meme kanseri hücre hatlarında ifadesi yüksektir. Kanser hücrelerinde STAT3 sinyal yolağı, IFN- $\gamma$ 'nın atipik bir sinyal ileticisi olarak aktive edilir. WWOX proteini IL-6 / JAK2 / STAT3 sinyal iletim yolağı üzerinden kanser hücrelerinin büyümesini ve metastazını STAT3'e bağlı olarak baskılamaktadır. WWOX'un aşırı ifadesi bazal meme kanseri hücrelerinde STAT3 aktivitesini inhibe eder. Tüm bu bulgular, WWOX'un PD-L1 ifadesinin düzenlenmesinde olası bir rol oynayacağını ve böylece meme kanserinin ilerlemesinde ve metastazında potansiyel bir baskılayıcı olarak görev yapacağını göstermektedir. Bu tezin amacı WWOX'un MDA-MB-231 insan üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde bazal düzeyde ve/veya IFN- $\gamma$  ile uyarılmış PD-L1 ifadesi üzerindeki etkilerini araştırmaktır. MDA-MB-231 hücrelerinde WWOX'u aşırı ifade etmek için geçici transfeksiyonlar gerçekleştirildi. Wwox proteininin aşırı ifadesi western blot ile değerlendirildi. PD-L1 ifadesi flow sitometri sistemi ile analiz edildi. IFN- $\gamma$  uygulanmamış, WWOX ifade eden hücrelerde WWOX ifade etmeyen hücelere göre istatistiksel olarak anlamlı artmış PD-L1 ifadesi saptandı (p=0,05). Bu bulgulara ek olarak, IFN- $\gamma$  uygulanmış, WWOX ifade eden hücrelerde WWOX ifade etmeyen hücelere göre istatistiksel olarak anlamlı artmış PD-L1 ifadesi saptandı (p=0,05). Sonuç olarak, WWOX ifade etmeyen MDA-MB-231 hücreleri ile karşılaştırıldığında MDA-MB-231 hücrelerinde WWOX ifadesinin artırılması IFN- $\gamma$  varlığında veya yokluğunda PD-L1 ifadesini anlamlı olarak azaltmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** WWOX, programlanmış hücre ölüm ligandı 1, IFN- $\gamma$ , immün sistem.

## ABSTRACT

**Serdal, E. The Role of WWOX Protein in Tumor Immunity, Tekirdağ Namık Kemal University Institute of Health Sciences, Department of Tumor Biology and Immunology, Master Thesis, Tekirdağ, 2021.** WWOX protein expression is often lost or reduced in most human cancers. Loss of Wwox protein expression is common in triple negative breast cancers. The immune system plays an active role in the development, progression and control of breast cancer. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) is an important immune checkpoint molecule involved in escape from the immune system. PD-L1 is expressed in a variety of immune cells and many different tumor types, including breast cancer. STAT3 plays an important role in the regulation of PD-L1 expression. PD-L1 is overexpressed in breast cancer cell lines due to JAK-mediated STAT3 phosphorylation and activation. The STAT3 signaling pathway is activated as an atypical signal transmitter of IFN- $\gamma$  in cancer cells. WWOX suppresses growth and metastasis of cancer cells through the IL-6 / JAK2 / STAT3 signal transduction pathway, depending on STAT3. Overexpression of WWOX inhibits STAT3 activity in basal breast cancer cells. All these findings suggest that WWOX can play a possible role in the regulation of PD-L1 expression and thus act as a potential suppressor in the progression and metastasis of breast cancer. The aim of this thesis is to investigate the effects of WWOX on PD-L1 expression at basal level and / or IFN- $\gamma$  stimulated in MDA-MB-231 human triple negative breast cancer cells. Transient transfections were performed to overexpress WWOX in MDA-MB-231 cells. Overexpression of the WWOX protein was assessed by western blotting. PD-L1 expression was analyzed by flow cytometry system. A statistically significant increase in expression of PD-L1 was found in cells expressing WWOX compared to cells not expressing WWOX ( $p=0.05$ ). In addition to these findings, a statistically significant increase in expression of PD-L1 was found in cells expressing WWOX in IFN- $\gamma$  treated cells compared to cells not expressing WWOX ( $p=0.05$ ). As a result, the increase of WWOX expression in MDA-MB-231 cells significantly decreased PD-L1 expression levels in the presence or absence of IFN- $\gamma$  compared to MDA-MB-231 cells not expressing WWOX.

**Key words:** WWOX, programmed cell death ligand 1, IFN- $\gamma$ , immune system.

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser Hücreleri.....	3
2.2. İmmün Sistem ve Kanser.....	5
2.3. Genetik değişiklikler ve Kanser.....	7
2.4. WWOX Geni.....	8
2.5. WWOX ve Kanser.....	9
2.6. Kanser hücrelerinde PD-1 ve PD-L1.....	11
2.7. Kanser hücrelerinde IFN- $\gamma$ etkisi ve PD-L1 Düzeyleri.....	14
2.8. WWOX ve STAT3 yolağı ilişkisi.....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar .....	18
3.2. Hücre Hatları.....	19
3.3. Hücrelerin Pasajlanması.....	19
3.4. LB Agar Hazırlanması.....	20
3.5. Bakteriyel Transformasyon.....	20
3.6. Koloni Kültürü.....	20
3.7. Plazmid DNA İzolasyonu.....	21
3.8. Plazmid Transfeksiyonu.....	23
3.9. Protein İzolasyonu.....	26
3.10. Western Blot.....	28

3.11. IFN- $\gamma$ Uygulaması .....	30
3.12. PD-L1 Hazırlanışı.....	30
3.13. Flow Sitometri Analizi.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. pCMV-WWOX veya pCMV-EV transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerde PD-L1 ifadesi seviyeleri.....	34
4.2. IFN- $\gamma$ uygulanan pCMV-WWOX veya pCMV-EV transfekte edilmiş hücrelerde PD-L1 ifadesi seviyeleri.....	37
5. TARTIŞMA.....	42
KAYNAKLAR.....	48
EKLER.....	61
Ek 1 ETİK KURUL ONAYI .....	61



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.1. Tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları.....	4
Şekil 2.1.2. Tüm yaş gruplarındaki kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları.....	4
Şekil 2.1.3. Kanser risk faktörleri.....	5
Şekil 2.4.1. WWOX proteini bölgeleri.....	8
Şekil 2.6.1. T hücreleri (yeşil) ve hedef hücreler (kırmızı) tarafından ifade edilen uyarıcı ve inhibe edici reseptörler.....	12
Şekil 3.2.1. MDA-MB-231 hücre hatlarının invert ışık mikrosafı.....	19
Şekil 3.6.1. pCMV-WWOX kolonileri.....	21
Şekil 3.6.2. pCMV-EV kolonileri.....	21
Şekil 3.7.1. pCMW-WWOX plazmid DNA konsantrasyonu ve saflığı.....	23
Şekil 3.7.2. pCMW-EV plazmid DNA konsantrasyonu ve saflığı.....	23
Şekil 3.8.1. Plazmid transfeksiyonu öncesi hücre yoğunluğu.....	24
Şekil 3.8.2. 6 kuyucuklu plakaların çalışma grubuna bağılı olarak dağılımı.....	25
Şekil 3.8.3. pCMV-WWOX ve pCMV-EV plazmid transfeksiyonu protokolü.....	25
Şekil 3.8.4. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücre yoğunluğu.....	26
Şekil 3.9.1. BSA standart eğrisi.....	27
Şekil 3.10.1. Ponceau S boyaması.....	29
Şekil 3.10.2. MDA-MB-231 hücrelerinde WWOX proteininin western blot görüntüsü (transfeksiyon yok, pCMV-WWOX plazmid ile transfeksiyon ve pCMV-EV ile transfeksiyon).....	30
Şekil 4.1.1. IFN- $\gamma$ uygulanmamış, pCMV-WWOX veya pCMV-EV transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerde PD-L1 ifadesi seviyeleri.....	34
Şekil 4.1.2. pCMV-WWOX transfekte edilmiş hücrelerde flow sitometrik histogramlar.....	35
Şekil 4.1.3. pCMV-EV transfekte edilmiş hücrelerde flow sitometrik histogramlar.....	36
Şekil 4.2.1. IFN- $\gamma$ uygulanan, pCMV-WWOX veya pCMV-EV transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerde PD-L1 ifadesi seviyeleri.....	37

Şekil 4.2.2. IFN- $\gamma$ uygulanan, pCMV-WWOX transfekte edilmiş hücrelerde flow sitometrik histogramlar.....	38
Şekil 4.2.3. IFN- $\gamma$ (-) ve IFN- $\gamma$ (+) pCMV-WWOX transfekte edilmiş hücrelerde PD-L1 ifadesi seviyesi.....	39
Şekil 4.2.4. IFN- $\gamma$ uygulanan, pCMV-EV transfekte edilmiş hücrelerde flow sitometrik histogramlar.....	40
Şekil 4.2.5. IFN- $\gamma$ (-) ve IFN- $\gamma$ (+) pCMV-EV transfekte edilmiş hücrelerde PD-L1 ifadesi seviyesi.....	41



**TABLolar DİZİNİ**

Tablo 2.5.1. Kanselerde WWOX ifadesi düzeylerinde azalma veya kayıplar.....	9
Tablo 3.1.1. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	18
Tablo 3.9.1. BSA standardı (mg/ml).....	27
Tablo 3.9.2. pCMV-WWOX veya pCMV-EV transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerde protein konsantrasyonları.....	28
Tablo 3.10.1. Western blotta kullanılan tamponlar, çözeltiler ve içerikleri.....	28
Tablo 3.13.1. Toplam hücre sayıları.....	31
Tablo 3.13.2. Flow sitometri analizi için gerekli hücre sayısının hesaplanması.....	32
Tablo 3.13.3. Flow sitometri analiz grupları.....	32
Tablo 4.1.1. pCMV-WWOX veya pCMV-EV transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerde PD-L1 ifadesi seviyeleri.....	34
Tablo 4.2.1. IFN- $\gamma$ uygulanan, pCMV-WWOX veya pCMV-EV transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerde PD-L1 ifadesi seviyeleri.....	37

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

- AML:** Akut miyeloid lösemi
- APC:** Profesyonel antijen sunan hücreler
- ASH:** Antijen sunan hücreler
- BSA:** Sığır serum albümini
- CO<sub>2</sub>:** Karbondioksit
- CTL:** Sitotoksik T lenfosit
- CML:** Kronik miyeloid lösemi
- DCs:** Dendritik hücreler
- DPBS:** Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
- FBS:** Fetal Sığır Serumu
- FHIT:** Frajil Histidin Triad Protein
- IFN- $\gamma$ :** İnterferon-gamma
- LOH:** Heterozigotluk kaybı
- Mb:** Megabaz
- MHC I:** Büyük doku-uyumluluk kompleksi I
- MM:** Multipl miyeloma
- NK:** Doğal öldürücü
- PBS:** Fosfat tuz tamponu
- PD-1:** Programlanmış hücre ölüm proteini 1
- PD-L1:** Programlanmış hücre ölüm ligandı 1
- PI:** Propidium Iodide
- RPMI:** Roswell Park Memorial Institute
- RPM:** Dakikadaki devir sayısı
- SDR:** Kısa zincirli dehidrogenaz/redüktaz
- SDS:** Sodyum dodesil sülfat
- SOCs:** Sitokin sinyal proteinlerinin baskılayıcısı
- TCR:** T hücresi reseptörü
- TME:** Tümör mikro çevresi
- TNBC:** Üçlü negatif meme kanseri
- JAK:** Janus kinaz
- WVVOX:** WV alanı içeren oksidoredükta

## 1. GİRİŞ

Kanser, dünya genelinde önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Meme kanserinin akciğer kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanser olduğu tahmin edilmektedir (1,7 milyon vaka, %11,9), ancak nispeten olumlu prognozu nedeniyle ölüm nedeni olarak 5. sıradadır (522.000, %6,4) (Ferlay ve diğ. 2015).

İmmüiteden sorumlu çeşitli hücreler ve proteinler immün sistemi oluştururlar ve kendinden olmayan maddelere karşı etkileri immün yanıt olarak bilinir (McComb ve diğ. 2019). Bir patojen konak sisteme saldırdığında, immün sisteminin iki farklı, fakat birbiriyle ilişkili iki yanıtı aktif olmaktadır. Bunlar; spesifik olmayan/doğuştan gelen ve spesifik/adaptif immün yanıtıdır. Bu sistemlerin her ikisi de konağın yabancı maddeleri tanımasını ve bunları etkisiz hale getirmesini, yok etmesini veya metabolize etmesini sağlayan belirli fizyolojik mekanizmalara sahiptir (Tomar ve De 2014). İmmün düzenlemenin sadece tümör gelişimini önlemeyi değil, aynı zamanda gelişen tümörlerin immünojenitesini şekillendiren aktif bir süreci meydana getirdiği kabul edilmektedir (Kuby ve diğ. 2003).

Tümör hücreleri immün kontrolden kaçabilir ve sınırsız bir şekilde çoğalarak klinik olarak belirgin tümörlere yol açabilir. Bu immün kontrolden kaçışa, azalmış immün tanıma, immün hücreleri tarafından saldırıya karşı artan direnç veya bir bağışıklık baskılayıcı tümör mikroçevre gelişimi gibi çeşitli mekanizmalar aracılık edebilir (Mittal ve diğ. 2014).

Tümör baskılayıcı genler, DNA hasarı veya onkogenler gibi hücrel sinyaller tarafından aktive edilir. Hücre döngüsünün durması ve apoptoz dahil olmak üzere hücrelerdeki çekirdek stres tepkilerini yönetir (Chaffer ve Weinberg 2015). Bu tümör baskılayıcı genler genellikle mutasyona uğrayarak işlevlerinde kayıplar veya ifadelerinde azalmalar meydana gelir. Meydana gelen diğer genetik değişikliklerle birlikte bu süreç hücrel ilerlemeyi kanserli bir duruma sokabilir (Weinberg 2014).

WFOX tümör baskılayıcı geni kromozom 16q23'de bulunmaktadır. Tümör baskılayıcı WFOX geni meme kanserinde yaygın olarak değiştirilen yaygın bir kırılğan bölge olan FRA16D'yi kapsar (Aldaz ve Hussain 2020). WFOX kodlama dizisi içindeki delesyonlar meme kanseri vakalarının %80'ine varan oranlarda gözlenir, bu da onu bu tümör tipindeki en yaygın genetik değişikliklerden biri yapar.

WFOX geninin meme kanserinde rol oynadığı bilinmektedir. WFOX proteini hücre çoğalmasını inhibe eder ve tümör büyüme oranlarını azaltır (Chang ve diğ. 2018).

Kanserlerde immün kontrol noktaları genellikle tümör hücreleri tarafından adaptif bir kaçış mekanizması olarak kullanılmaktadır (Pardoll 2012). Keşfedilen immün kontrol noktaları arasında programlanmış hücre ölüm proteini 1 (PD-1) ve programlanmış hücre ölüm ligandı 1 (PD-L1) arasındaki etkileşim, kanserde kritik bir immün baskılayıcı mekanizma olarak tanımlanmıştır. Tümör hücreleri, immün kontrol noktası tepkisini ortaya çıkarmak için T hücreleri üzerindeki PD-1 reseptörü ile etkileşime giren PD-L1 yüzey ifadesi seviyelerini attırarak immün gözetiminden kaçır (Dong ve diğ. 2002; Chen ve Han 2015).

İnterferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), CD8-T hücrelerinin işlevini baskılayan ve tümör büyümesini kolaylaştıran PD-L1'in ifadesini artırır (Xiao ve diğ. 2009). İnsan melanoma, akciğer ve meme kanserleri hücrelerinden gelen ve hücre dışı veziküllerde çoğunlukla eksozomlar şeklinde immünosupresif PD-L1 bulunur ve seviyeleri bazı hücrelerde IFN- $\gamma$ 'lar tarafından yüksetilir (Chen ve diğ. 2018a). Tümörlü yapılarda tedavi etkinliğini artırmak için PD-L1 aracılı immün kaçış sisteminin daha iyi anlaşılması gerekir.

STAT3, tümör aracılı immün baskılanmanın güçlü bir düzenleyicisidir (Wang ve diğ. 2018a) ve PD-L1 ifadesinin düzenlenmesinde de önemli rol oynar (Sasidharan Nair ve diğ. 2018). WFOX proteini IL-6 / JAK2 / STAT3 sinyal iletim yolağı üzerinden kanser hücresi büyümesini ve metastazı STAT3'e bağlı bir şekilde baskılamaktadır. WFOX 'un aşırı ifadesi bazal meme kanseri hücrelerinde STAT3 aktivitesini inhibe eder (Chang ve diğ. 2018). STAT3 sinyal yolağı, IFN- $\gamma$ 'nın atipik bir sinyal ileticisi olarak aktive edilir.

Tüm bu bilgiler, WFOX'un PD-L1 ifadesinin düzenlenmesinde olası bir rol oynayacağını ve böylece meme kanserinin ilerlemesinde ve metastazında potansiyel bir baskılayıcı olarak görev yapacağını göstermektedir. Bu tez amacı WFOX'un insan üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde bazal düzeyde ve/veya IFN- $\gamma$  ile uyarılmış PD-L1 ifadesi üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser Hücreleri

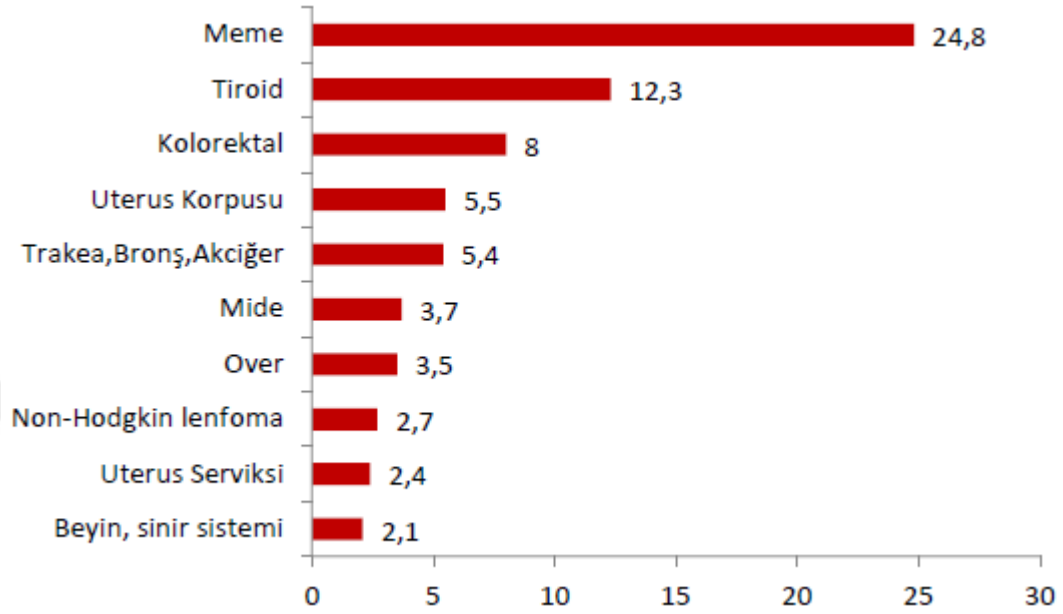
Hücrelerin kontrollü büyümeleri ve bölünmeleri hücre yüzeyinden aldıkları sinyal ile gerçekleşir. Hücre bölünmesinin başlayabilmesi için besin ve yüzey alanı uygunluğunun sağlanması gerekmektedir, eğer şartlar uygunsa hücre büyümeye ve bölünmeye başlar. Bu süreç hücrelerin birbirlerine temas etmeleri ile son bulur, bu duruma temasa bağlı büyümenin durması (kontakt inhibisyon) denir. Hücrede herhangi bir hasar olması durumunda büyümesi ve bölünmesi durdurulur. Hasarın onarılması halinde hücre yaşamını devam ettirir. Fakat hasar onarımı gerçekleştirilemezse hücre programlı hücre ölümüne (apoptoza) gönderilir veya immün sistem hücreleri hasarlı hücreyi yok eder.

Kanserli hücreler hücre yüzeyinden normalden çok daha fazla sinyal gönderirler. Kanserli hücrelerde otonom sinyal iletimi sayesinde kontrolsüz çoğalma meydana gelir, hücre bölünmesi durdurulamaz ve sonuç olarak kanserli hücreler büyümeye ve çoğalmaya devam eder. Kanser hücreleri besin kaynağı olarak glukozu kullanır, ihtiyaç duydukları besin ve oksijen kaynağı için kendilerine ait yeni damar sistemi oluşturabilirler, apoptozdan kaçabilirler ve metastaz yapabilirler.

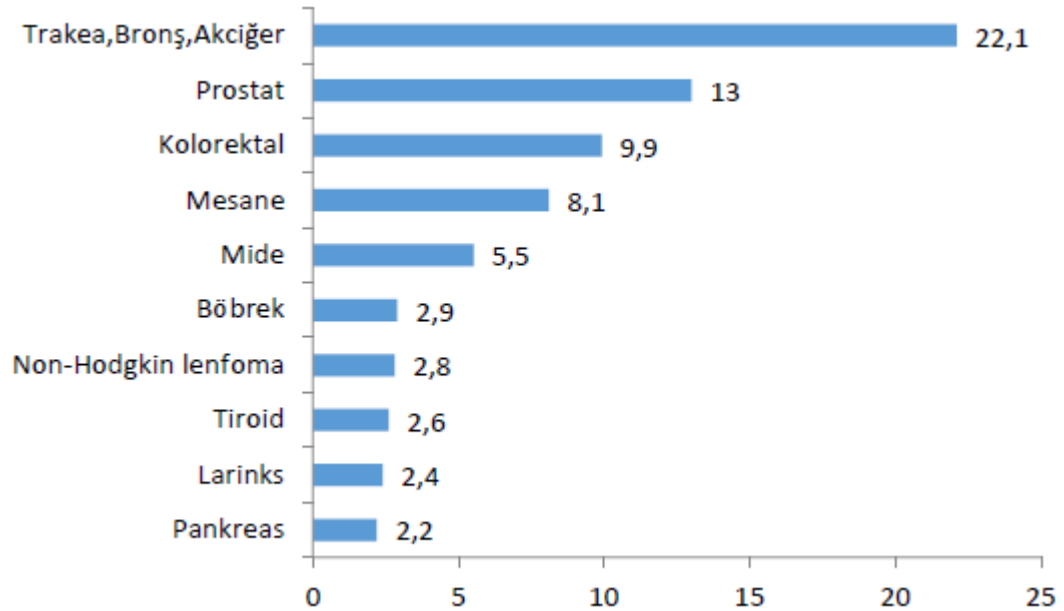
Kanser hücreleri vücutta sürekli olarak bulunurlar. İmmün sistemi oluşturan hücreler kendisine yabancı olan ve hastalık oluşturan bu hücreleri tanıyarak yok ederler. Son yıllarda değişen yaşam tarzımız ve alışkanlıklarımız nedeniyle kanser görülme sıklığı endişe verecek düzeyde artış göstermektedir. Birçok kontrol noktası bulunmasına ve hasar onarım mekanizmaları olmasına rağmen kanser insanlar arasında yüksek sıklıkta görülmektedir(de Visser ve diğ. 2006). Kanser zamanla gelişimi canlı organizma için büyük bir tehdit oluşturmaktadır.

Amerikan Kanser Derneği, kadınları en çok etkileyen kanser türlerinin meme, kolorektal, endometrial, akciğer, servikal, deri ve ovaryum kanserleri olduğunu bildirmiştir. Amerikan Kanser Derneği, erkekleri en çok etkileyen kanserlerden bazılarını ise prostat, kolorektal, akciğer ve deri kanserleri olarak bildirmiştir.

Tüm yaş gruplarındaki kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu gruplar içindeki yüzde dağılımları Şekil 2.1.1 ve Şekil 2.1.2’de gösterilmiştir (Sağlık Bakanlığı 2020).



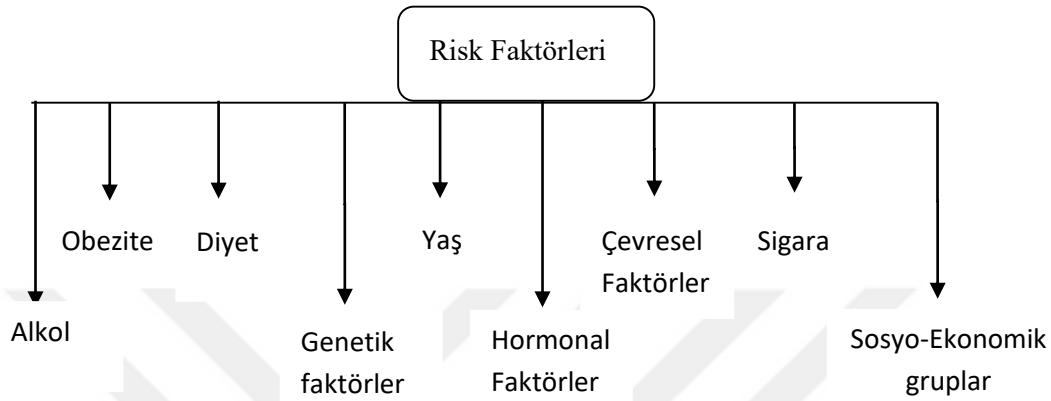
**Şekil 2.1.1.** Tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (Sağlık Bakanlığı 2020).



**Şekil 2.1.2.** Tüm yaş gruplarındaki kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (Sağlık Bakanlığı 2020).



Kanser türlerinde bir tek faktörden söz etmek mümkün değildir. Her toplumda farklılık ve değişkenlik gösteren belirli gruplara ait risk faktörleri vardır (Şekil 2.1.3) (Pinar ve diğ. 2008). Bu risk faktörlerinin bilinmesi kansere bağlı tedavinin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır.



Şekil 2.1.3. Kanser risk faktörleri (Pinar ve diğ. 2008; Afreen ve Dermime 2014).

## 2.2. İmmün Sistem ve Kanser

Çok hücreli tüm canlılar kendilerine zarar verebilecek veya hastalık oluşturabilecek mikroorganizmalara karşı kendilerini koruma eğilimi göstermektedirler. İmmünite (bağışıklık), vücuda zarar verebilecek ve kendisine yabancı olan virüs, bakteri, protein, mantar ve benzeri her türlü hastalık oluşturabilecek ajanlara karşı oluşturulan yanıtı tanımlayan genel bir terimdir (Delves 2000).

İmmünite, antijen veya immünojen olarak adlandırılan yabancı ve/veya zararlı olabilecek her türlü maddeye karşı organizmanın kendisini savunması olarak tanımlanır. Doğal (innate) ve edinsel (adaptif) olmak üzere iki farklı mekanizma ile immün yanıt sağlanır. İmmün sistem, canlıyı hastalık ve enfeksiyonlara karşı koruyan, kendisine yabancı olan patojenleri tanıyıp yok etme özelliği olan bir savunma sistemidir. Bu savunma sisteminin en önemli özelliği kendisinden olmayanı tanımadır (Baxter 2007).

İmmün sistem, canlının savunma mekanizmasında organize halde hücre ve molekülleri kullanma şeklindedir. İmmün sistemin yapısı canlının gelişmişlik düzeyine bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Gelişmişlik düzeyi ne kadar fazla ise immün

sistemi de o kadar gelişmiş ve karmaşık bir yapı halini almıştır. Örneğin, bakteriler gibi tek hücreli basit bir yapıya sahip canlıları bile viral ajanlara karşı koruyan bir enzim sistemi varken, daha kompleks yapıya sahip omurgalılarda oldukça özelleşmiş yapıya sahip doğal ve edinsel koruma sistemleri bulunmaktadır.

Doğal immünite antijen ve immünojenlere karşı özgül olmayan öncelikli savunma sistemidir. Bu savunma mekanizmasının bileşenleri; fagositik hücreler (nötrofiller, makrofajlar, eozinofiller ve bazofiller), dendritik hücreler, doğal öldürücü (NK) hücreler, diğer doğal lenfoid hücreler, fiziksel ve kimyasal bariyerler ve trombositlerdir.

Edinsel immünite ise doğal immünitinin tam tersidir. Enflamasyon oluşumunu başlatan ajana karşı spesifik olarak savunma sağlar. Bu bağışıklık formunun enflamasyona bir cevap olarak gelişmesi ve/veya enfeksiyona adaptasyonu nedeniyle uyarlanabilir immünite (özgül veya kazanılmış bağışıklık) adı verilir.

Doğal immünite, genetik olarak belirlenir ve gelen uyarıların tekrarlanması sonucu bir değişiklik meydana getirmez. Fagositler ve doğal öldürücüler kadar savunmanın ilk aşamasında akut faz proteinleri, lizozom ve kompleman sistemi gibi çözünebilen faktörler de bulunmaktadır (Baxter 2007). Doğal immün sistem özgül özellik göstermemektedir. Diğer bir yandan, edinilmiş immünite ilk uyarı ile karşılaştıktan sonra gelişim gösterir ve uyarıların tekrarlanması halinde savunmada güçlenme gösterir (Power ve Foster 1996).

Memelilerin immün sisteminin temelinde, vücudu bulaşıcı ve istilacı patojenlere karşı korumak ve savunmak, hasarlı ya da hasar oluşturacak hücreleri ortadan kaldırmak ve doku homeostazını denetlemek bulunmaktadır. Malign tipte olan hücrelerin immün sistem tarafından kontrolünün sağlanması ve bu kontrol sonucu ortadan kaldırılması immün gözetim olarak ifade edilmektedir. Bu immün gözetim sayesinde tümör hücrelerinin büyümesi engellenmektedir (Vesely ve diğ. 2011).

Kanser, anormal yapıya sahip hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması olarak tanımlanan; genetik ve çevresel faktörlerin içinde bulunduğu kompleks bir hastalıktır. Kanser, dünya ve ülkemiz açısından giderek artış gösteren önemli bir sağlık problemidir (Abbott ve Ustoyev 2019).

Çevresel etkenler ile beraber beslenme yoluyla alınan maddelerin bazıları genlerde mutasyona sebep olabilir bu durumda hücre kanserleşebilir. Bu çevresel

etkenlere karşı vücudu koruyan savunma mekanizması immün sistemdir. İmmün sistemde bulunan lenfosit ve makrofaj gibi savunma hücreleri bu maddelerin ortadan kaldırılarak yok edilmesinde görevlidirler. İmmün sistemin aktivitesini kaybetmesi durumunda bu savunma sistemini oluşturan hücreler görevlerini yeterince yerine getiremezler ve böylece kanserin görülme oranı artar. İmmün sistemin yeterince güçlü olmaması nedeniyle kanserlerin yaşlılarda ve immün sistemi doğuştan yetersiz olan hastalarda görülmesi belirtilen duruma örnek verilebilir (Yılmaz ve Atak 2014).

Kanser ile kronik enflamasyon arasındaki ilişki klinik, deneysel ve epidemiyolojik tanımlayıcı çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda kanser gelişimi riskinde uzun süreli enflamatuvar ortamının varlığı doğrudan ilişkilendirilmiştir (Keibel ve diğ. 2009).

Hücrelerin kontrolsüzce çoğalması kanserin bir tanımıdır. Bu çoğalma ile birlikte kanser hücrelerinin yapısında ve işlevinde bozukluklar meydana gelir. Bu hücreler bulunduğu doku ve organları istila ederek hasara uğratırlar. Kanser hücreleri kan ve lenf dolaşım sistemi ile buldukları dokudan başka doku ve organlara geçerek yayılım gösterebilirler. Bu olay metastaz olarak isimlendirilmektedir (Lee ve diğ. 2018).

Kanser tipleri köken aldıkları doku veya organa göre adlandırılır. Uygulanacak tedavide buna bağlı kanserin çeşidine göre değişim göstermektedir.

### **2.3. Genetik Değişiklikler ve Kanser**

Kanserin oluşabilmesi için çeşitli genetik ve/veya epigenetik değişikliklerin meydana gelmesi gerekmektedir. Kanserin oluşumunda; tümör baskılayıcı genler ve protoonkogenler en büyük etkiye sahip gen gruplarıdır.

Hücre bölünmesini ve çoğalmasını kontrol altında tutan genler tümör baskılayıcı genlerdir. Tümör baskılayıcı proteinler, hücre döngüsü sırasında bir hasar meydana gelmesi durumunda hücre döngüsünün devam etmesini engellerler, gerektiğinde hücreleri apoptoza yönlendirirler, hücre içerisinde DNA onarımını ve replikasyonunu kontrol altında tutarlar ve meydana gelebilecek olan mutasyon oranlarının en düşük seviyede tutulmasını sağlarlar (Byler ve diğ. 2014). Genlerde meydana gelen delesyon ve nokta mutasyonu gibi hasarlar veya kromozomların düzgün ayrılamamasından kaynaklanan problemler, tümör baskılayıcı genlerin

işlevinin bozulmasına sebep olabilir. Bu bozulma hücre döngüsü kontrolünün kaybı ile birlikte karsinogeneze neden olmaktadır (Byler ve diğ. 2014; Zaimy ve diğ. 2017).

Hücrelerin normal büyüme ve farklılaşmasını sağlayan genlerden olan protoonkogenler herhangi bir neden ile mutasyona uğrarlarsa onkogenlere dönüşürler. Onkogenler kanser oluşturan gen sınıfındadırlar. Bu genlerin bir kısmı hücreyi programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan apoptozdan korurken diğer bir kısmı da büyüme faktörü ihtiyacını azaltarak hücrenin sürekli farklılaşmasını ve çoğalmasını sağlarlar (Lodish ve diğ. 2000).

## 2.4. WWOX Geni

İnsan genomunda 1 Mb'dan büyük ortalama 40 gen bulunmaktadır. WW bölge içeren oksidoredüktaz (WWOX) geni, 1,2 Mb büyüklüğü ile bu genler arasında 33. sırada yer alır. WWOX tümör baskılayıcı bir genidir. WWOX geni 2.2 kilobaz büyüklüğünde bir transkript ve 414 amino asitten oluşan 46 kDa'luk bir protein kodlar (Bednarek ve diğ. 2000). WWOX proteini N terminal bölgede iki WW bağlanma bölgesi ve merkezde bir kısa zincir dehidrogenaz/redüktaz (SDR) bölgesi içermektedir (Aldaz vd., 2014) (Şekil 2.4.1). WW bölgeleri, transkripsiyonel düzenleme ve protein kararlılığı gibi çeşitli hücresel süreçlerde yer alan sinyal yollarıyla ilişkili komplekslere aracılık ederler.



**Şekil 2.4.1.** WWOX proteini bölgeleri (Aldaz ve diğ. 2014).

WWOX proteini normal dokularda dokuz ekzon ve sekiz intron içerir. WWOX mRNA'sının birçok alternatif kırılması mevcuttur, bu kırılmalar sayesinde yedi farklı transkript üretilir. Bu transkriptler 5.6.7.8. ve 9. ekzonlardaki çeşitli delesyonlar sayesinde oluşmaktadır (Del Mare ve diğ. 2009).

İnsan WWOX geni kromozomal olarak 16q23.3-16q24.2 bölgesinde bulunur. Bu bölge içerisinde FRA16D olarak bilinen yaygın kromozomal frajil bölge (CFS) yer

alır (Ried ve diğ. 2000). FRA16D bölgesi translokasyonların, homozigot delesyonların ve kardeş kromatid değişimi gibi değişimlerin gözleendiği DNA hasarına oldukça duyarlı bir bölgedir. FRA16D, meme, ovaryum, akciğer, akciğer ve pankreas kanserleri gibi çok sayıda kanser ile ilişkilidir (Baryla ve diğ. 2015).

## 2.5. WWOX ve Kanser

DNA hasarı yanıt proteinlerinin (p53, BRCA1,  $\gamma$ H2AX, pChk2), DNA hasarına duyarlı tümör baskılayıcılarının (WWOX, Fhit), WWOX-etkileşimli proteinlerin (Ap2- $\alpha$  ve  $\gamma$ , ERBB4) değişken ifadeleri kanser alt tipleri ve klinik faktörler ile ilişkilidir. BRCA1 nükleer ifadesi, FHIT ve WWOX ile ilişkilidir ve WWOX'un yokluğu, FHIT ifadesi ve sitoplazmik ERBB3 kaybı ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (Pospiech ve diğ. 2018b).

WWOX, kromozom 16 bölgesinde yer alan yeni tanımlanmış tümör baskılayıcı bir gen olması ile birlikte ikinci en sık görülen kromozomal kırılgen gen bölgesi olarak kabul edilmiştir. WWOX geni bir milyondan fazla baz çiftini kapsar ve bu nedenle farklı kanserlerde gözlenen birçok kromozomal yeniden düzenlemeye eğilimlidir (Ludes-Meyers ve diğ. 2003).

WWOX geni FRA16D bölgesi yüksek heterozigotluk kaybı (LOH) nedeniyle çalışmaların oldukça fazla yapıldığı bir bölgedir (Pospiech ve diğ. 2018a).

WWOX proteini ifadesi düzeyleri kanser hücrelerinde normal hücrelere kıyasla azalmaktadır (Aqeilan ve diğ. 2004; Guler ve diğ. 2004; Park ve diğ. 2004; Nunez ve diğ. 2005a; Nunez ve diğ. 2005b; Pimenta ve diğ. 2006; Qin ve diğ. 2006; Donati ve diğ. 2007). Tablo 2.5.1'de kanserlerdeki WWOX protein ifadesi düzeylerindeki azalmalar veya kayıplar gösterilmiştir (Aqeilan and Croce 2007).

**Tablo 2.5.1.** Kanselerde WWOX protein ifadesi düzeylerinde azalma veya kayıplar (Aqeilan ve Croce 2007).

<b>Kanser Türü</b>	<b>Azalma veya Kayıp</b>
Akciğer	% 85
Skvamöz hücreli karsinomlar	% 59
Adenokarsinomlar	% 39
Prostat	% 84
Mide	% 65
Meme	% 63
Hepatoselüler	% 72

WWOX geni promotor bölgesi hipermetilasyonu gibi diğer mekanizmalar, insan tümörlerindeki WWOX proteini ifadesinin azalmasından da sorumludur. Tümör hücrelerinde WWOX ifadesi kaybı genetik veya epigenetik değişikliklere bağlıdır (Kuroki ve diğ. 2004; Park ve diğ. 2004; Iliopoulos ve diğ. 2007).

WWOX, meme kanseri gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynamaktadır (Ekizoglu ve diğ. 2012). WWOX geninin kodlayan dizisi içindeki delesyonlar, meme kanseri vakalarının yaklaşık %80'inde gözlenir, bu da onu bu tümör tipindeki en yaygın genetik değişikliklerden biri yapar. WWOX geninin meme kanserinde rol oynadığı bilinmektedir: WWOX hücre çoğalmasını inhibe eder, tümör büyüme oranlarını azaltır, ancak aynı zamanda bazal membrandan hücre göçünü artırır ve üç boyutlu (3D) matris bazlı hücre kültürlerindeki morfolojik değişikliklere katkıda bulunur (Pospiech ve diğ. 2018b).

Kanselerde kopya sayısı değişikliklerinin araştırıldığı çalışmalarda WWOX'un insan kanserleri arasında üçüncü en yaygın delesyona uğrayan gen olduğu tanımlanmıştır (Aqeilan vd., 2008; Bignell vd., 2011). Meme kanserlerinin büyük bir bölümünde ve çok çeşitli insan kanserlerinde WWOX lokusunda heterozigotluk kaybı (LOH), WWOX promotor hipermetilasyonu ve bunun sonucu olarak WWOX ifadesi kaybı veya azalması bildirilmiştir (Beroukhim vd., 2010). WWOX lokusundaki allel

kaybı en sık meme, ovaryum ve prostat kanserleri gibi hormonal olarak düzenlenmiş kanserlerde gözlenmiştir (Karras vd., 2016). WWOX protein eksikliği genellikle daha agresif kanserler ve daha kötü klinik sonuçlar ile ilişkilidir (Nunez vd., 2005; Guler vd., 2009). WWOX protein eksikliği ve kanser gelişimi arasındaki ilişkiyi bildiren kanıtlar bulunmasına rağmen, WWOX'un tümör baskılayıcı fonksiyonu henüz tam olarak açığa kavuşmamıştır.

Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda en sık görülen kanserdir (Salah vd., 2010). Meme kanseri, kanser hücrelerinin hayati organlara metastaz ile yayılması nedeniyle yüksek ölüm oranına neden olur (Scully vd., 2012).

Klinik olarak, meme kanseri başlıca dört moleküler alt tip içerisinde kategorize edilir: Luminal A, Luminal B, Her2 pozitif ve üçlü negatif. Üçlü negatif meme kanseri (TNBC) tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %20'sini oluşturur ve tüm alt tiplerin en agresif olanıdır (Jemal vd., 2011).

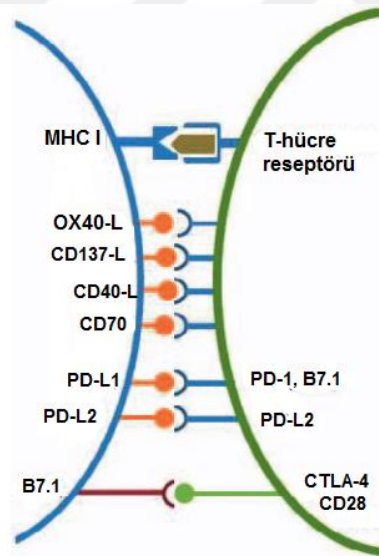
WWOX proteini epitel hücrelerinde, p73, AP-2 $\gamma$  ve ERBB4 proteinleri ile etkileşerek gen transkripsiyonunu modüle eder (Pospiech ve diğ. 2018a). WWOX proteini ile etkileşime giren yapılara bakıldığında, WWOX 'un ilk WW alanı aracılığıyla, p73, AP2 $\gamma$  ve Jun gibi bir dizi transkripsiyon faktöründe bulunan prolin açısından zengin ligand PPxY ile ilişkili olduğu ortaya çıkmaktadır (Aqeilan ve diğ. 2004; Gaudio ve diğ. 2006). WWOX, sitoplazmadaki hedefleri ile etkileşir ve çekirdeğe translokasyonunu önler, böylece transkripsiyonel aktivitelerini düzenler. WWOX 'un apoptozu indüklemeye yeteneğini arttırdığı bilinmektedir (Aqeilan ve diğ. 2004).

WWOX proteini ligandlarını bağlar ve etkileşen proteinlerin çekirdeğe girmesini engeller, böylece transkripsiyonel aktivasyonu veya baskılanmayı etkiler. WWOX proteini farklı sinyal iletim yollarında merkezi bir rol oynamaktadır. Sahip olduğu transkripsiyonel baskılamanın, büyüme ve apoptoz gibi hücrel süreçlerde etkili olduğunu göstermiştir. Birçok tümör tipinde WWOX protein ifadesi kaybolduğu ya da azaldığı için, etkili olduğu hücrel süreçlerin düzensizleşmesine yol açmaktadır (Aqeilan ve Croce 2007).

## 2.6. Kanser hücrelerinde PD-1 ve PD-L1

Programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD-1), immün efektör hücrelerin yüzeyinde ifade edilen bir immün kontrol noktası inhibitörüdür. Esas olarak tüm insan hücreleri tarafından ifade edilebilen PD-L1 tarafından aktive edilir. PD-1 / PD-L1 yolu, periferik T-lenfosit toleransının sürdürülmesinde ve enflamasyonun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Kanserlerde PD-L1 ifadesi, başlıca immün kaçış mekanizmalarından biri gibi görünmektedir. Birçok çalışma, pembrolizumab veya atezulizumab gibi spesifik antikorlarla PD-1 veya PD-L1'i bloke etmenin etkinliğini göstermiştir.

Şekil 2.6.1'de T hücreleri ve hedef hücreler tarafından ifade edilen reseptörler gösterilmiştir. Meme kanserinde, metastatik üçlü negatif meme kanserlerinde potansiyel yanıt gösterilmiştir (Schütz ve diğ. 2017).



**Şekil 2.6.1.** T hücreleri (yeşil) ve hedef hücreler (kırmızı) tarafından ifade edilen uyarıcı ve inhibe edici reseptörler (Schütz ve diğ. 2017).

T hücresi reseptörleri (TCR), büyük doku uyumluluk kompleksi I (MHC I) üzerinde sunulan yabancı antijenler tarafından aktive edilir.

Programlanmış hücre ölümü-1 (PD-1), T hücreleri üzerinden uyarılabilen, immün yanıtları sınırlamada ve normal konakçı dokuda otoimmün veya otoenflamatuvar aktiviteyi önlemede önemli bir rol oynayan kontrol noktası proteindir.



PD-1, 288 aminoasitten meydana gelen bir protein olup CD28 ailesine aittir (Balar ve Weber 2017). PD-1'in bağlanması için B7 süper ailesine ait iki ligand, PD-L1 ve PD-L2, tanımlanmıştır. PD-1'in PD-L1 ile etkileşimi, otoreaktif T ve B hücrelerini negatif olarak düzenleyebilir ve toleransın korunmasında kritik işlevlere sahip olabilir böylece çeşitli otoimmün hastalıklar başlayabilir (Latchman ve diğ. 2001).

PD-1, T hücrelerinin, B hücrelerinin, doğal öldürücü T hücrelerinin, monositlerin ve dendritik hücrelerin yüzeyinde ifade edilen bir inhibitör bağışıklık kontrol noktası inhibitörüdür. PD-1 yolu, periferik T lenfosit toleransının sürdürülmesinde ve enflamasyonun düzenlenmesinde kritik bir rol oynar (Boussiotis ve diğ. 2014).

PD-1 orijinal olarak T hücresi reseptör aktivasyonu ile indüklenen hücre ölümüne maruz kalan bir T hücresi hibridomundan izole edilmiştir, dolayısıyla adı programlanmış hücre ölümü proteini 1'dir (Ishida ve diğ. 1992). Adına rağmen PD-1, hücre ölümünü doğrudan indüklemeyebilir, ancak hücre büyüme faktörlerinin yanı sıra hayatta kalma sinyallerini de azaltır. PD-1, 2 ligandı bağlar, PD-L1 (B7-H1) ve PD-L2 (B7-DC) (Freeman ve diğ. 2006; Keir ve diğ. 2008). PD-1'in PD-L1 veya -L2 ile aktivasyonu, T hücre aktivitesinin aşağı regülasyonunu, azalmış sitokin üretimini, T hücre lizisini ve antijenlere tolerans indüksiyonunu uyarır (Butte ve diğ. 2007) (Latchman ve diğ. 2001; Rodig ve diğ. 2003).

PD-1, aktif T hücrelerinin yüzeyinde bir inhibitör reseptör olarak ifade edilirken, PD-L1 ve PD-L2 ligandları esas olarak antijen sunan hücrelerde (ASH) ve tümör hücrelerinde ifade edilir (Yao ve Chen 2014; Wang ve diğ. 2018b). Liganda bağlanma gerçekleştikten sonra PD-1, T hücresi oluşacak yanıtları yukarı yönde düzenler. İmmün hücrelerde PD-1'in dokuyu immün ataktan koruma, tümör bağışıklığı ve enfeksiyöz bağışıklığı azaltma, periferik immün toleransın indüksiyonu ve sürdürülmesi fonksiyonları yer almaktadır (Peng ve diğ. 2012).

PD-1 ifadesi hücre ölümü ve lenfosit aktivasyonu ile de ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda baskılayıcı sinyal ürettiği düşünülen bir kostimülatör molekül olduğu kabul edilmiştir (Okazaki ve diğ. 2002).

T hücrelerine aracılık eden hücresel immünite, içinde bulundurduğu birçok uyarıcı ve baskılayıcı protein tarafından kontrol altındadır. İmmün kontrol noktaları olarak da adlandırılan baskılayıcı reseptörleri bulunmaktadır. Bu reseptörler sitotoksik

T lenfosit (CTL) aktivasyonunu ve efektör fonksiyonlarını kendi kendine toleransı sürdürmek ve patojenik invazyona karşı immün tepkisinin bir sonucu olarak sonraki doku hasarını en aza indirmek için düzenler (Pardoll 2012). Hem PD-1 hem de PD-L1'i hedefleyen immün kontrol noktası inhibitörleri, kanser hücrelerine karşı çalışmak için sitotoksik T hücrelerini yeniden aktive edebilir. Bir T hücresinin T hücresi reseptörü, MHC varlığında antijenleri ayırt ettiğinde, immün kontrol noktası molekülü, sinyali arttırmak için CD28 gibi yardımcı uyarıcı faktörlerin sinyalini modüle ederken, bununla birlikte inhibitör molekülleri baskılayabilir (Freeman ve diğ. 2000; Ott ve diğ. 2013; Topalian ve diğ. 2016).

Ayrıca, PD-L1 ve PD-L2, Th1 ve Th2 hücreleri tarafından farklı şekilde düzenlenirler. PD-L1 ifadesinin "primed" makrofajların önemli bir belirteci olduğu ileri sürülmektedir ve PD-L1 ifadesi monositlerde / makrofajlarda düşük dozlarda interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) ile uyarılır (Allison 2003; Brown ve diğ. 2003; Liang ve diğ. 2003). Bu nedenle, PD-L1 aktive T hücrelerinin down regülasyonunda genel bir rol oynar. Tümör hücreleri üzerindeki PD-L1 ifadesi genellikle negatif bir prognostik faktör olarak kabul edilirken, PD-1 / PD-L1 bloke edici antikörlerle tedavi için pozitif bir sonuç ile açıkça ilişkilidir (Balar ve Weber 2017).

Kanser hastalarında PD-1 ifadesi, tümör mikro çevresindeki (TME) T hücrelerinde çok yüksektir ve birincil ligandı olan PD-L1, tümör hücreleri ve tümörler içindeki antijen sunan hücreler üzerinde değişken bir şekilde ifade edilir ve tümör içinde güçlü bir baskılayıcı etki sağlar.

## **2.7. Kanser hücrelerinde IFN- $\gamma$ etkisi ve PD-L1 düzeyleri**

Tümör hücrelerinin çoğu antitümör immün yanıtlardan kaçmak için önemli mekanizmalar kullanmaktadırlar. Bunlar arasında, programlanmış hücre ölüm proteini 1'i(PD-1) ve ligandı PD-1 ligandını (PD-L1 veya B7H1) hedefleyen inhibitörler, çalışmalarda en etkileyici etkinliği göstermiştir (Brahmer ve diğ. 2012; Topalian ve diğ. 2012). PD-L1 ifadesi, inflamatuvar sitokinler, özellikle IFN tarafından uyarılırsa birçok hücre üzerinde yukarı regüle edilebilir (Blank ve diğ. 2004).

İmmün sistem karşılaşılan stresi karakterize etmek için hem doğal hemde uyarılabilir etkin yanıtı oluşturmaktadır (Matzinger 2002). Hücre içinde oluşan enfeksiyonlar sırasında, enfekte olan hücreler çoğalmayı apoptoza neden olarak veya

immün sistem hücreleri tarafından yok edilmesi ile durdurulur. Daha sonra yabancı antijenlerin belirlenmesi için meydana gelen hasar immün hücreleri tarafından incelenir (Tam ve Jacques 2014). Burada, IFN'lar immün ve immün olmayan hücreler arasında bağ kurarak merkezi bir rol oynamaktadırlar. Özellikle de tip II IFN (IFN- $\gamma$ ) gibi zararlı immün yanıtların oluşumuna ve immün hücrelerinin toksisitesine sebep olacağı kabul edilmiştir. Tümörler açısından en kapsamlı çalışılan sitokinler, hemen hemen tüm hücreler tarafından ifade edilebilen ve antitümör yanıtlarında önemli roller oynayan tip I IFN'lerdir (Smyth ve diğ. 2004).

IFN- $\gamma$ 'nın en bilinen özelliği immünitinin efektör fazı sırasındaki işlevleridir. IFN- $\gamma$  immünitinin meydana getirmiş olduğu yanıtların ilk aşamalarında NK hücreleri (doğal öldürücüler), bazı makrofaj ve dendritik hücreler (DCs) tarafından üretilmektedir (Frucht ve diğ. 2001; Kursunel ve Esendagli 2016). İmmün sistem, tümör hücrelerini yok etmek için hücre içinde bulunan ve mikroplarla enfekte olmuş hücrelere uygulanan yok etme yöntemine benzer bir yol izlemektedir (Dunn ve diğ. 2004; Zitvogel ve diğ. 2006). Tümör hücreleri IFN- $\gamma$  dahil olmak üzere hücre içinde hasar verecek araçlara yanıt olarak normal vücut hücreleri tarafından immünopatolojik etkilerini hafifletmek için immün sistemi düzenleyici program başlatırlar (Matzinger 2002; Gilroy ve De Maeyer 2015). İmmün yanıtın ilk evrelerinde, makrofajlar, NK, NK-T veya T hücreleri ve ayrıca CD'ler gibi doğal immün hücreleri tarafından IFN- $\gamma$  üretimi, immün yanıtın oluşumu için gerekli sinyalleri oluşturur bu sinyaller stresli dokuların belirlenmesini sağlamaktadır (Schoenborn ve Wilson 2007; Kursunel ve Esendagli 2016).

IFN- $\gamma$  profesyonel antijen sunan hücreler üzerindeki sınırlı ekspresyona sahip birçok hücre tipinde sınıf II MHC moleküllerini indüklemektedir (Gosselin ve diğ. 1993; Thelemann ve diğ. 2014). IFN- $\gamma$ 'nın etkisiyle fagosit hücreler ve makrofajlar tarafından yakalanan cisimlerin yok edilmesiyle ilgili mekanizmalar uyarılır (Frucht ve diğ. 2001; Kursunel ve Esendagli 2016). Ayrıca, IFN- $\gamma$  enflamasyon içinde monositler/makrofajlar ve T hücrelerini uyarır ve gerekli üretimi gerçekleştirilir. IFN- $\gamma$  ile uyarılan genler ayrıca enflamasyon ve anti-tümör reaksiyonlarında NF-kB aracılığında da rol oynar (Labeur ve diğ. 2008; Karin ve Wildbaum 2015).

Çeşitli inhibitör moleküllerin ifadesi IFN- $\gamma$ 'ya maruz bırakıldıktan sonra değişiklik gösterir. IFN- $\gamma$  etkisi ile artan prototipik inhibitör moleküller; PD-1

reseptörü, PD-L1 ve PD-L2 ligandlarıdır. PD-1, aktive olmuş T hücreleri üzerinden upregüle edilir ve TCR inhibitör sinyalleri üretir, B lenfositler, NK ve NK-T hücreleri ve CD'lerde de immün düzenleyici reseptör olarak görev yapabilirler (Keir ve diğ. 2008; Yao ve Chen 2014; Juno ve diğ. 2015). PD-L1'in regülasyonu immün sistemde bulunan her tip hücrenin, IFN- $\gamma$  ve bazı enflamatuvar sitokinlere yanıtı olarak upregüle edilir (Keir ve diğ. 2008).

Ana transkripsiyon faktörü olarak kabul edilen ve IFN- $\gamma$  tarafından aktive edilen STAT1 olmasına rağmen bununla birlikte STAT 3 ve NF-kB'da indüklenir. Bu faktörler PD-L1 geninin promotör bölgesindeki elementlere bağlanmaktadır (Fang ve diğ. 2014; Ritprajak ve Azuma 2015). IFN- $\gamma$  üretimini sağlayan Th1 hücreleriyle veya CTL'lerle etkileşime girilmesiyle birlikte, kanser hücreleri hızla PD-L1'in *de novo* sentezi için başlatma yapabilir ve birkaç saat içerisinde immün sistemi baskılayıcı hale gelebilir (Dolen ve Esendagli 2013; Karasar ve Esendagli 2014). Bu sistem "adaptive rezistans (direç)" olarak adlandırılan yani tümör hücreleri kullanılarak immün sisteminden kaçma olarak ifade edilen bir yöntemin örneğidir (Yao ve Chen 2013).

PD-1 veya PD-L1'in bloke edilmesi immün müdahale tedavisinde başarılı olduğu kanıtlandığı için PD-1 aracılı kaçış tümörlerin alt sınıfları için hassas bir nokta haline gelmiştir (Tumeh ve diğ. 2014; Kursunel ve Esendagli 2016; Lim ve diğ. 2016).

PD-1 ve ligandı PD-L1, kanser gelişimi sırasında immün sistemin baskılanmasında önemli bir rol oynar ve bu nedenle immünoterapi hedefi olarak kullanılabilir. Bazı *in vivo* çalışmalar, PD-1 / PD-L1 yolunun bloke edilmesinin T hücrelerinin antitümör aktivitesini eski haline getirebileceğini göstermiştir (Afreen ve Dermime 2014).

Daha spesifik olarak, aktive edilmiş STAT3'ün PD-L1 promotörüne bağlandığı ve daha sonra PD-L1'in transkripsiyonunu desteklediği gösterilmiştir. Janus kinaz (JAK) / STAT3, çeşitli kanserlerin başlamasında, gelişmesinde ve ilerlemesinde kritik bir rol oynayan klasik (kanonikal) bir sinyal yoludur (Wölfle ve diğ. 2011).

## **2.8. WWOX ve STAT3 yolağı ilişkisi**

WWOX 'un aşırı ifadesi bazal meme kanseri hücrelerinde STAT3 aktivitesini inhibe etmektedir. WWOX bazal benzeri meme kanseri hücreleri tarafından tümör büyümesini ve metastazını engellemektedir. Ayrıca, WWOX'un JAK2

fosforilasyonunu inhibe ettiği bununla birlikte JAK2'nin STAT3 ile etkileşimini engellediği ve böylece STAT3 fosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Chang ve diğ. 2018).

WWOX ifadesi çoklu malign kanserlerde sıklıkla azalmaktadır veya kaybolmaktadır (Baryla ve diğ. 2015). Azalmış WWOX ifadesi bazal kanser hücrelerinde TNBC dokularında yüksek derecede aktive olmuş STAT3 ile anlamlı şekilde ilişkilidir (Chang ve diğ. 2018).

Kalıcı STAT3 aktivasyonu, sıklıkla proliferasyon, invazyon ve metastaz dahil olmak üzere daha kötü huylu kanser davranışlarıyla bağlantılıdır. Anormal JAK2 / STAT3 sinyalizasyonu, çeşitli tümör tiplerinde tespit edilmiştir, bu da STAT3 inhibitörlerinin antikanser tedaviler gibi yaygın olarak etkili olabileceğini gösterir (Bollrath ve Greten 2009; Marotta ve diğ. 2011). STAT3 aktivitesi, fosforilasyon aktivatörleri ve fosforilasyon inhibitörleri tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Aktive STAT'ların protein inhibitörleri ve Sitokin sinyal proteinlerinin baskılayıcıları (SOCs'ler), daha fazla JAK / STAT sinyal aktivasyonunu önlemek için negatif geri besleme regülatörleri olarak işlev görürler (Shuai ve Liu 2003).

WWOX, JAK2'nin STAT3 ile ilişkisini engellemekte, böylece STAT3 fosforilasyonunu ve p-STAT3'e bağlı kanser hücresi büyümesini *in vivo* inhibe etmektedir. WWOX 'un *in vivo* tümör büyümesini baskılama yeteneği STAT3 aktivasyonuna bağlıdır (Chang ve diğ. 2018).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

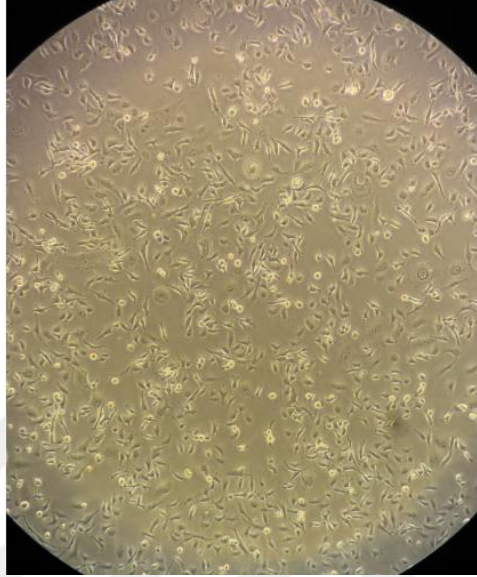
Bu tez çalışması Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmada kullandığımız cihazlar Tablo 3.1.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.1.1.** Çalışmada kullanılan cihazlar

<b>Cihaz</b>	<b>Marka</b>
Analitik Hassas Terazi	RADWAG
Power Blotter XL	İnvitrogen
Soğutmalı Santrifüj Micro 200R	Hettich
Güç Kaynağı	Bio-RAD
Mini Gel Tank	İnvitrogen
Vortex	İsolab
Farklı Hacimlerde Otomatik Mikro Pipetler	Eppendorf
Manyetik Isıtıcı	Scilogex
Nano-100 Micro-Spectrophotometer	AllSheng
Biyogüvenlik Kabini	Biobase
İnvert Işık Mikroskobu	Olympus CKx53
Işık Mikroskobu	Olympus
CO <sub>2</sub> 'li İnkübatör	Heal Force/ HF90 Smart cell
Otoklav	HMC
Su Banyosu	Nüve
Flow Sitometri	BD FACSCalibur

### 3.2. Hücre Hatları

MDA-MB-231 insan üçlü negatif meme kanseri hücre hatları %10 inaktive edilmiş Fetal Sığır Serumu (FBS) ve 100 ug/ml Gentamicin antibiyotiği ile desteklenmiş Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1649) besiyerinde %5 CO<sub>2</sub> ve %95 havadan oluşan nemli bir atmosferde 37°C'de inkübe edildi (Şekil 3.2.1).



Şekil 3.2.1. MDA-MB-231 hücre hatlarının invert ışık mikroskobu fotoğrafı.

### 3.3. Hücrelerin Pasajlanması

Flask yüzeyine tutunan ve yeterli yoğunluğa ulaşan hücreleri yeni bir büyüme ortamına aktarmak için hücreler pasajlandı. Serolojik pipet yardımıyla besiyeri kültür ortamından uzaklaştırıldı. Hücreler 3 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Gibco, 14190-094) ile yıkandı ve DPBS kültür ortamından uzaklaştırıldı. T75'lik flask içerisinde yeterli yoğunluğa ulaşan hücrelere 0,5 ml %0,25 Tripsin/EDTA çözeltisi eklendi ve hücreler 37°C'de inkübatörde 1-1,5 dk. bekletildi. İnkübasyon sonunda hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılması sağlandı. Tripsin/EDTA'nın etkisinin inhibe edilmesi için hücrelere 3 ml RPMI 1640 besiyeri eklendi. Hücreler pipetaj yapılarak yeni besiyerine alındı. Hücrelerin yoğunluğu invert ışık mikroskobunda kontrol edildi. Pasajlanan hücreler T75'lik flaskta 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edildi. Takip edecek çalışmalar için belirli aralıklarla hücrelerin takibi sağlandı.

### 3.4. LB Agar Hazırlanması

LB Agar (Lennox) (İnvitrogen, cat no:2270025) hassas terazide 3,2 gram (gr) tartılarak erlen mayer'e konuldu, üzerine 100 ml distile su eklendi. Sterilizasyonunun sağlanması için LB agar besiyeri 121°C'de 1 atm basınçta 15 dk. otoklavlandı. Daha sonra Bek alevi altında 15 ml'lik hacimlere bölünerek üzerine 35 µg/ml son konsantrasyonda ampisilin eklendi ve +4°C'de saklandı.

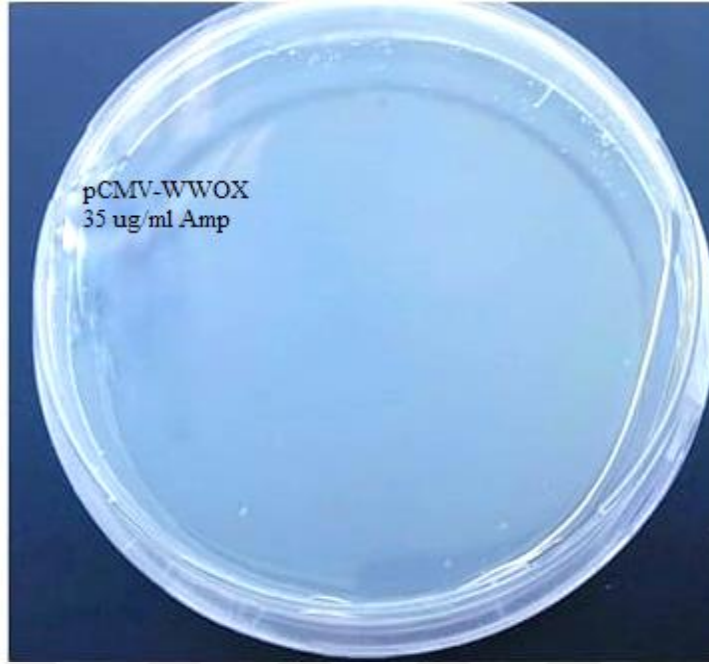
### 3.5. Bakteriyel Transformasyon

Bakteriyel transformasyon, One Shot Top 10 competent *Escherichia coli* (İnvitrogen) kullanılarak gerçekleştirildi. Bakteri hücreleri 2µl pCMV-WWOX rekombinant plazmid ve pCMV-empty vektör (pCMV-EV) ile muamele edildi. pCMV-WWOX ve pCMV-EV Prof. Dr. Kay Huebner tarafından hediye edildi (The Ohio State University, Columbus, ABD). Daha sonra bakteri hücreleri buz üzerinde 30 dk. ve takiben su banyosunda 42°C'de 30 sn. inkübasyon gerçekleştirildi. 250 µl S.O.C medium (invitrogen, cat no: 15544-034) besiyerinde 37°C ve 225 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

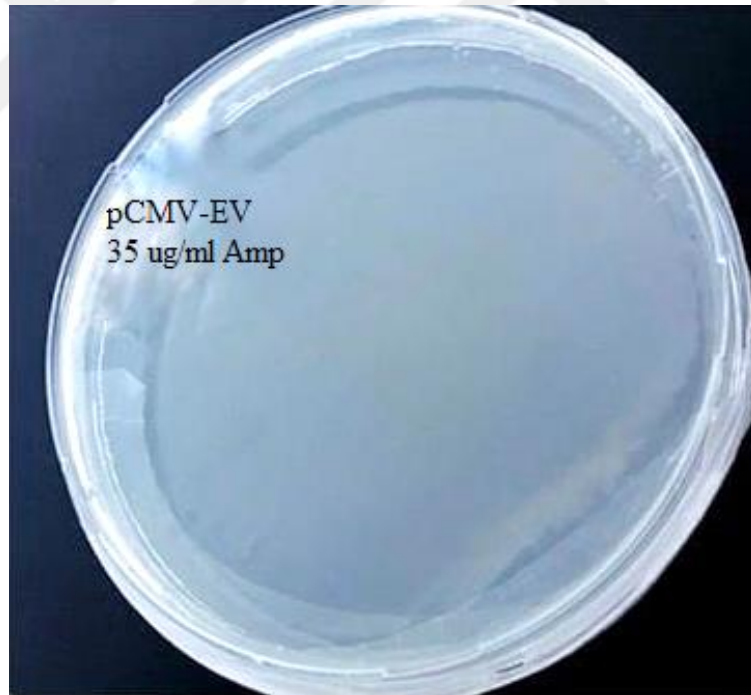
### 3.6. Koloni Kültürü

Transforme bakteri hücreleri (100 µl) LB Agar (Lennox L agar) plakalar üzerine ekildi. 37°C'de etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tek koloniler belirlendi. LB-Broth high salt (sigma-aldrich, cat no: 51208-500G-F) hassas terazide 2,5 gr tartılarak erlen mayer'e konuldu ve üzerine 100 ml distile su eklendi. Sterilizasyonunun sağlanması için besiyeri 121°C'de 1 atm basınçta 15 dk. otoklavlandı. Daha sonra toplanan her bir pCMV-WWOX kolonisi (Şekil 3.6.1) ve pCMV-EV kolonisi (Şekil 3.6.2) ayrı olarak 5 ml LB-Broth içerisinde 37°C'de 225 rpm'de 24 saat inkübe edildi.





Şekil 3.6.1. pCMV-WWOX kolonileri.



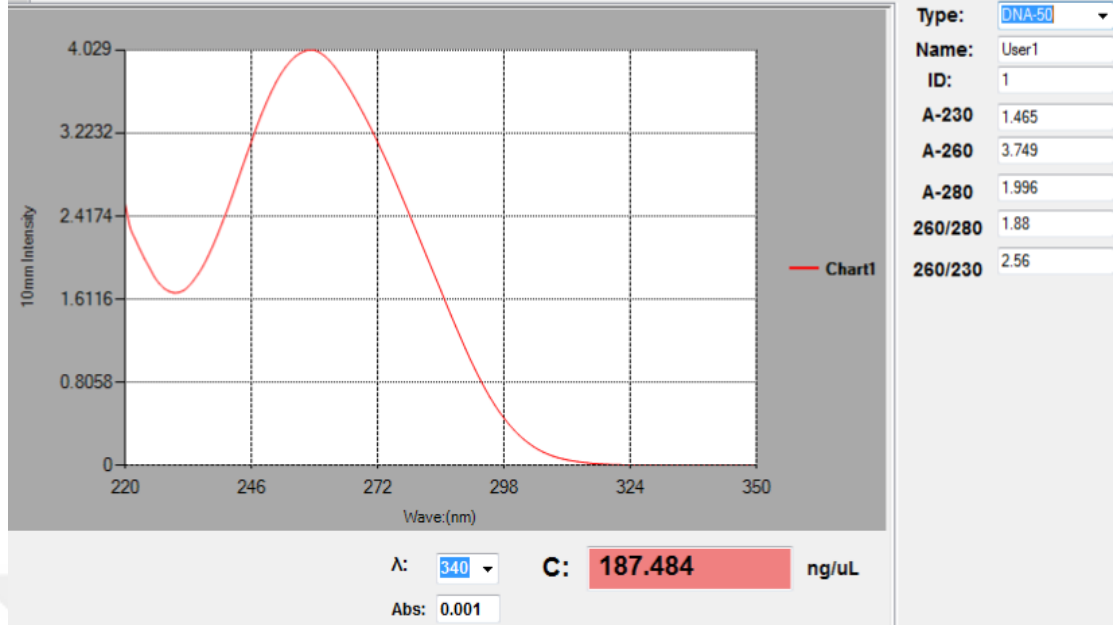
Şekil 3.6.2. pCMV-EV kolonileri.

### 3.7. Plazmid DNA İzolasyonu

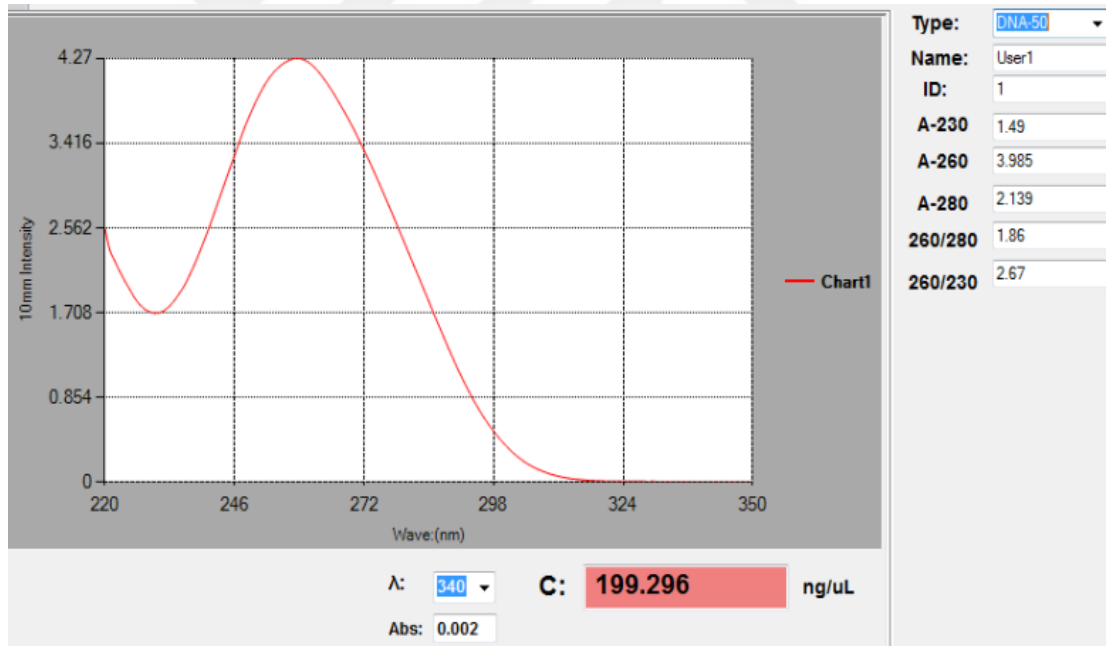
Plazmid DNA izolasyonu PureLink HiPure Plazmid Miniprep Kit (İnvitrogen, Cat #K210002) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildi:

1. 100 ml LB Broth, high salt (Fluka Analytical, Cat No: 51028-500G-F) içerisinde 37°C ve 230 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
2. 50 ml falcon tüpler 3500 x g'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant tamamen ortamdaki uzaklaştırıldı.
3. EQ1 (Equilibration Buffer) 2 ml Mini Columns tüpleri üzerine eklenerek süzülmesi sağlandı.
4. Pellet üzerine 400µl R3 (Resuspension Buffer) eklendi ve homojenize edildi.
5. 600µl L7(Lysis Buffer) eklendi ve vortex yapmadan homojenize edilerek 5 dk inkübasyona bırakıldı.
6. Tüplere 400 µl N3 (Precipitation Buffer) eklendi ve 2 ml 'lik ependorf tüplere alındı.
7. 12.000 x g'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısmı Mini Columns tüplerine aktarıldı.
8. 2,5 ml W8 (Wash Buffer) eklendi ve bu işlem 2 kez tekrarlandı.
9. Mini Columns tüpü ependorf tüp üzerine aktararak 900 µl E4 (Elution Buffer) eklendi.
10. Ependorf tüpe 630 µ izopropil alkol eklendi ve DNA gözlemlendi.
11. 30 dk 12000 x g'de, 30 dk maksimum devirde +4°C'de santrifüjlendi.
12. 1ml %70'lik etanol eklendi
13. Maksimum devirde 5 dk +4°C'de santrifüjlendi, süpernatant tamamen uzaklaştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dk tüp açık halde inkübasyona bırakıldı
14. 25 µl TE Buffer eklendi.

Plazmid DNA konsantrasyonları (ng/µl) ve 260/280 saflık oranları nanodropspektrofotometre (Nano-100, Allsheng) kullanılarak ölçüldü (Şekil 3.7.1 ve Şekil 3.7.2).



Şekil 3.7.1. pCMW-WWOX plazmid DNA konsantrasyonu ve saflığı.

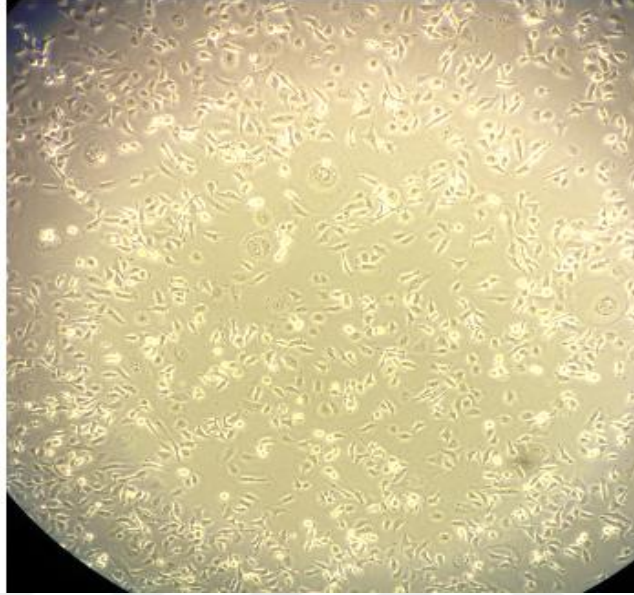


Şekil 3.7.2. pCMW-EV plazmid DNA konsantrasyonu ve saflığı.

### 3.8. Plazmid Transfeksiyonu

Plazmid transfeksiyonundan bir gün önce MDA-MB-231 hücreleri 6 kuyucuklu plaklarda antibiyotik içeren besiyerinde kültüre edildi. Transfeksiyon

gününde kültür ortamı 3 ml antibiyotiksiz besiyeri ile değiştirildi. 3 saatlik inkübasyon süresinin sonunda transfeksiyon işlemi yapıldı. Transfeksiyon yaklaşık %80-85 yoğunluktaki hücrelerde gerçekleştirildi (Şekil 3.8.1).

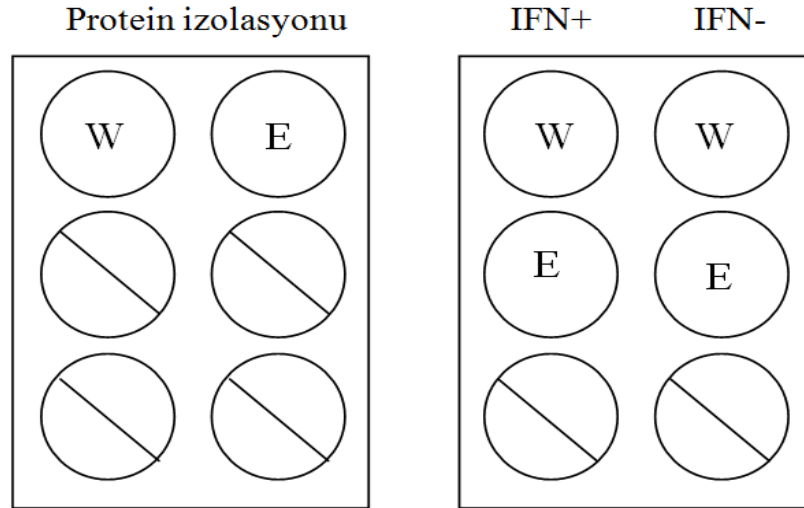


**Şekil 3.8.1.** Plazmid transfeksiyonu öncesi hücre yoğunluğu.

Plazmid transfeksiyonu için 6 kuyucuklu plakalara yaklaşık  $3 \times 10^5$  hücre ekildi. Plazmid transfeksiyonu iki adet 6 kuyucuklu plakada gerçekleştirildi.

Çalışmanın gerçekleştirildiği 6 kuyucuklu plakaların grupsal dağılımı aşağıda detaylı bir şekilde anlatılmış ve Şekil 3.8.2'de gösterilmiştir.

Birinci 6 kuyucuklu plakada pCMW-WWOX (W olarak gösterilmiştir) ve pCMW-EV (E olarak gösterilmiştir) plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilerek 24 saat sonunda protein izolasyonu yapıldı. İkinci 6 kuyucuklu plakada pCMW-WWOX ve pCMW-EV plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilerek 24 saat sonunda 48 saatlik IFN- $\gamma$  uygulaması yapıldı.



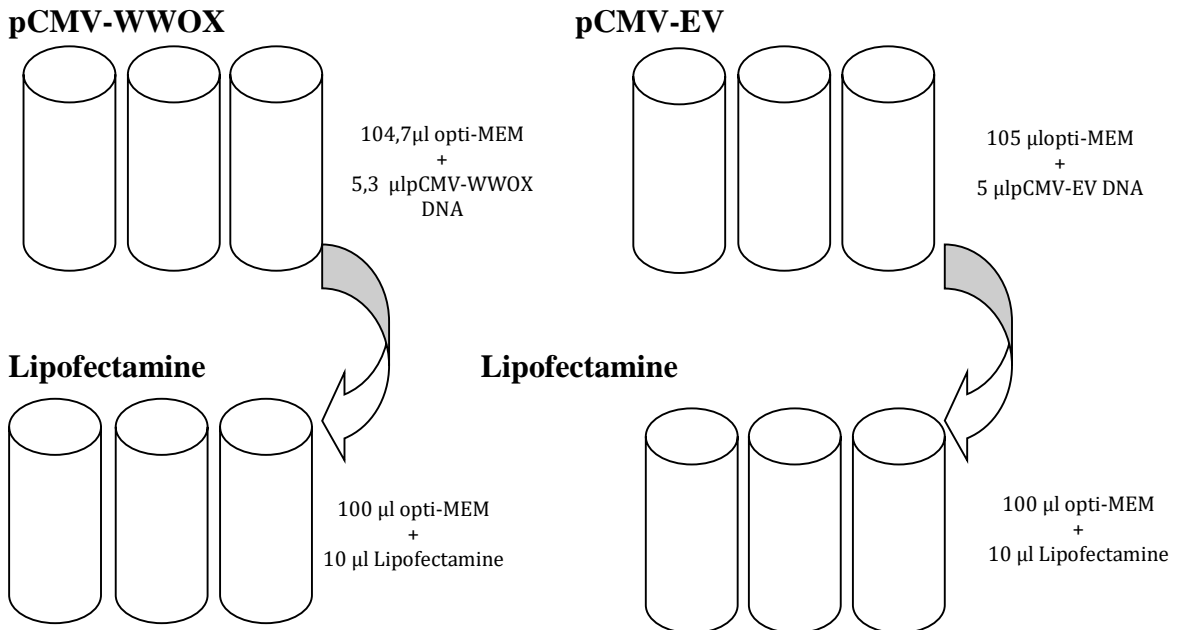
**Şekil 3.8.2.** 6 kuyucuklu plakaların çalışma grubuna bağlı olarak dağılımı.

pCMV-WWOX rekombinant plazmidleri ve pCMV-EV, Lipofectamine 2000 (İnvitrogen, Cat no: 11668-030) transfeksiyon reaktifi kullanılarak (Şekil 3.8.3) WWOX ifade etmeyen MDA-MB-231 hücre hatlarına transfekte edildi.

Ölçülmüş olan konsantrasyon değerlerinden  $1\mu\text{g}$  DNA alınacak şekilde hesaplaması yapıldı. Buna göre;

pCMV-WWOX;  $187,4\text{ ng/ul}$   $\longrightarrow$   $1\mu\text{g}$  için;  $5,3\text{ ul}$

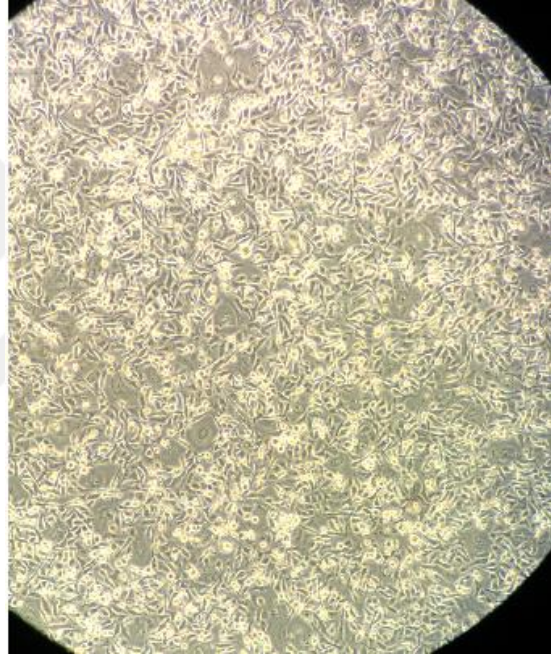
pCMV-EV;  $199,2\text{ ng/ul}$   $\longrightarrow$   $1\mu\text{g}$  için;  $5\text{ ul}$



**Şekil 3.8.3.** pCMV-WWOX ve pCMV-EV plazmid transfeksiyonu protokolü.

Ependorf tüplere belirlenen hacimlerde opti-MEM, lipofectamine ve plazmid DNA'ları eklendikten sonra 5 dk. inkübasyona bırakıldı. İçerisinde plazmid DNA bulunan tüpler, lipofectamine bulunan tüplere aktarıldı ve oda sıcaklığında 15 dk. inkübasyona bırakıldı. Yoğunluğu yaklaşık %85-90 olan hücre hatları 1 µg pCMV-WWOX veya 1 µg pCMV-EV plazmid içeren Lipofectamine 2000 ile ayrı olarak transfekste edildi.

Transfeksiyondan 8 saat sonra antibiyotiksiz besiyeri 100 ug/ml Gentamicin ile desteklenmiş tam besiyeri ile değiştirilerek 24 saat inkübasyona devam edildi (Şekil 3.8.4).



**Şekil 3.8.4.** Transfeksiyondan 24 saat sonra hücre yoğunluğu.

Transfeksiyonun etkinliğinin, yani artmış WWOX ifadesinin analizi için protein izolasyonunu takiben Western blot gerçekleştirildi.

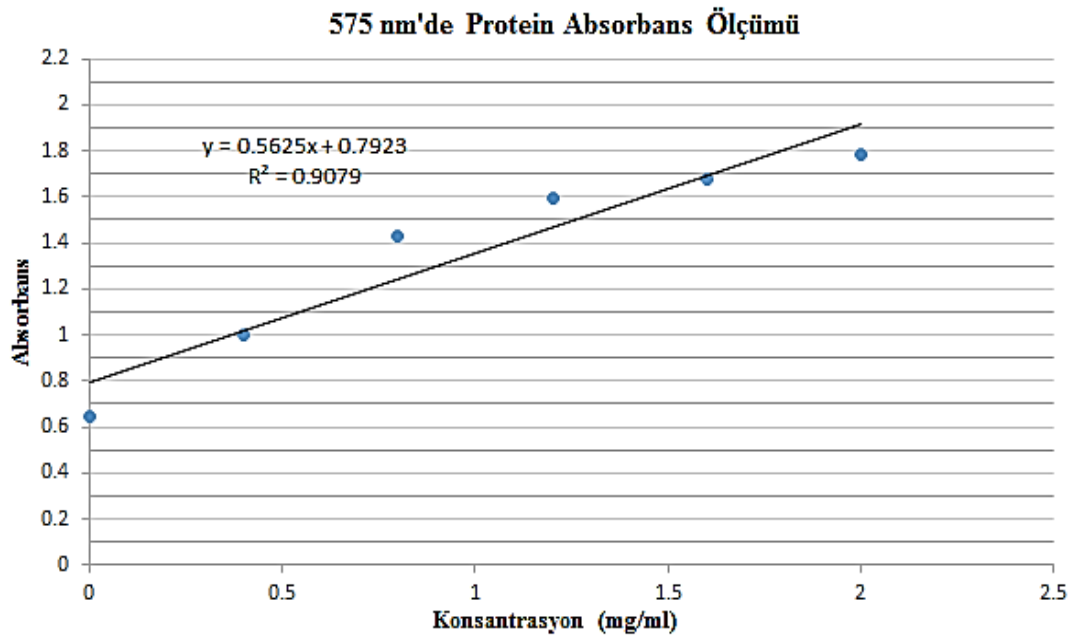
### **3.9. Protein İzolasyonu**

Öncelikle, 150 µl Pierce RIPA Buffer (Thermo Scientific, Cat no: 89900) içerisine 1,5 µl Halt Protease Inhibitör (Thermo Scientific, Cat No: 815-968-0747) eklenerek liziz tampon hazırlandı. Besiyeri kültür ortamından uzaklaştırıldı. Transfekte hücreler 2 ml DPBS ile yıkandı. DPBS ortamdan tamamen uzaklaştırıldıktan sonra kültür plakaları buz üzerine alındı. Pierce RIPA Buffer + Halt Protease Inhibitörü 6 kuyucuklu plakalara eklendi ve homojen dağılımı sağlandı.

Hücre kazıyıcı ile yüzeye tutunan hücreler ortamdaki uzaklaştırılarak ependorf tüpe alındı. Hücreler vortekslendi (15-20 sn) ve 10 dk. buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, liziz hücreler +4°C'de maksimum devirde 10 dk. santrifüjlendi. Protein içeren süpernatant temiz bir ependorf tüpe alındı ve protein standartları (Tablo 3.9.1) ve standart bir eğri (Şekil 3.9.1) kullanılarak Bradford testi ile protein konsantrasyonları hesaplandı (Tablo 3.9.2).

**Tablo 3.9.1.** BSA standardı (mg/ml).

Absorbans 575 nm	BSA standardı (mg/ml)		Ortalama Değer
	1. Ölçüm	2. Ölçüm	
0	0,632	0,659	0,645
0,4	0,983	1,024	1,003
0,8	1,423	1,43	1,427
1,2	1,643	1,546	1,595
1,6	1,759	1,591	1,675
2	1,786	1,782	1,784



**Şekil 3.9.1.** BSA standart eğrisi.

**Tablo 3.9.2.** pCMV-WWOX ve pCMV-EV transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerde protein konsantrasyonları

<b>Protein</b>	<b>Konsantrasyon (mg/ml)</b>
pCMW-WWOX	7,02
pCMW-EV	4,96

### 3.10. Western Blot

Western blot yönteminde kullanılan tamponlar ve içerikleri Tablo 3.10.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 3.10.1.** Western blotta kullanılan tamponlar, çözeltiler ve içerikleri

<b>10x TBE (250 ml)</b>	<b>Transfer Buffer (500ml)</b>	<b>%0,01 Ponceau S</b>	<b>1 X Running Buffer</b>
27 gr Tris	7,2 gr Glycine	0,01 gr Ponceau S	25 ml 10x Running Buffer
13,8 gr	1,5 gr Tris	5 ml Acetic acid	475 ml dH <sub>2</sub> O
Boric Acid			
1,45 gr EDTA	0,5 gr SDS	95 ml dH <sub>2</sub> O	
	⇒ 200 ml transfer buffer + 50 ml methanol		

Membran yıkamaları %50 Tween 20 (Novex, Cat No:003005) ile desteklenmiş phosphate buffered saline (Sigma, Cat no: P4417-100TAB) tamponu (PBST) kullanılarak gerçekleştirildi.

Western blot yönteminin adımları aşağıda belirtilmiştir:

1. Western blot yönteminde pCMV-WWOX veya pCMV-EV transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerde WWOX proteini ifadesinin doğru bir şekilde belirlenmesi için protein konsantrasyonları eşitlendi (20 µg).
2. Proteinler, yükleme tamponu ile 20 ul’lik hacime tamamlandı.



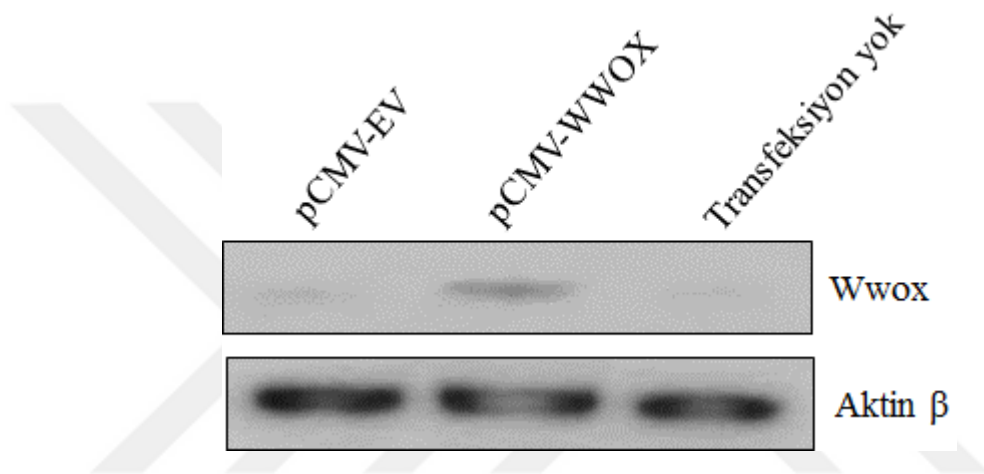
3. Protein ve yükleme tamponu karışımı 10 dk. manyetik ısıtıcıda 100°C inkübasyona bırakıldı.
4. Karışım, 2000 rpm'de 10 sn. santrifüj edildikten sonra %4-12 Bis-Tris Gel (Invitrogen, cat no: NP0321BOX)'e yüklemesi yapıldı, ilk kuyuya Prestained protein ladder (Thermo scientific, cat no: 815-968-0474) eklendi ve 100V'da 1 saat SDS jel elektroforezinde yürütüldü.
5. Jelin üzerine transfer buffer ve metanol ile muamele edilmiş nitroselüloz membran konuldu ve Power Blotter XL cihazında 15 V ve 2,5A'de 40 dk. proteinlerin jelden membrana transferi (blotlama) gerçekleştirildi.
6. Membrana aktarılan total proteinleri görünür hale getirmek için Ponceau S Sodium Salt (BioShop, Cat no:6226-79-5) ile membran boyandı (Şekil 3.10.1).



**Şekil 3.10.1.** Ponceau S boyaması.

7. PBST ile boya ortamdan uzaklaştırıldı.
8. Membran, %5 bloklama tamponu (0,5 gr süt tozu+ 10 ml PBST) ile 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta 225 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
9. Membran, 1:2000 oranında WWOX Rabbit primer antikoru (ABclonal, Cat no:A12653) veya 1:3000 oranında Beta Aktin Poliklonal antikoru (Invitrogen) ile +4°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
10. Membran, PBST ile 10 dk. oda sıcaklığında 3 kez yıkandı.

11. Membran, 1:3000 oranında hazırlanan goat anti-rabbit IgG(H+L) horseradish peroxidase conjugate (invitrogen, Cat no:G21234) sekonder antikoruna ile 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
12. Membran, PBST ile 10 dk. oda sıcaklığında 3 kez yıkandı.
13. Membran, kemilüminesans substrat (Thermo scientific, Cat no: 34577) içerisinde 3 dk. inkübe edildi ve X-ışını kasedine yerleştirildi.
14. Karanlık odada Developer ve fikser kullanılarak X-ışını filmlerinde WWOX veya Actb protein ifadeleri belirlendi (Şekil 3.10.2).



**Şekil 3.10.2.** MDA-MB-231 hücrelerinde WWOX proteininin western blot görüntüsü (transfeksiyon yok, pCMV-WWOX plazmid ile transfeksiyon ve pCMV-EV ile transfeksiyon).

### 3.11. IFN- $\gamma$ Uygulaması

Rekombinant insan IFN- $\gamma$  (R&D Systems, Cat No: 285-IF) üreticinin talimatlarına göre steril dH<sub>2</sub>O ile çözüldürüldü (0,2 mg/ml) ve belirlenen konsantrasyonda (10 ng/ml) hazırlandı. pCMV-WWOX veya pCMV-EV transfekte edilmiş hücrelerin bulunduğu 6 kuyucuklu plakalara 15  $\mu$ l IFN- $\gamma$  eklendi ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ortamında 48 saat inkübasyon gerçekleştirildi.

### 3.12. PD-L1 Hazırlanışı

PE Mouse Anti-Human CD274 (PD-L1) Clone MIH1 (RUO) (BD Biosciences, Cat No: 557924) monoklonal antikoruna  $\leq$  % 0,09 sodyum azit içeren sulu tampon çözeltisinde 0,2 mg/ml konsantrasyonda stok olarak hazırlandı. IFN- $\gamma$  pozitif

veya IFN- $\gamma$  negatif uygulamaların yapıldığı hücreler santrifüj ile toplandıktan sonra hücrelere 1ml PBS eklendi. Daha sonra, her bir hücre örneğine 20 ul PD-L1 uygulandı ve 1 saat +4°C'de inkübasyona bırakıldı.

### 3.13. Flow Sitometri Analizi

İnkübasyon sonrasında hücreler soğuk PBS ile yıkandı. 100 $\mu$ l % 0,25 Tripsin-EDTA eklenerek etüve kaldırıldı. Hücreler üzerindeki tripsin etkisinin baskılanması için 1,5 ml RPMI besiyeri eklendi ve 1200 rpm'de 3 dk. oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti üzerine 1ml besiyeri eklenerek trypan mavisi ile thoma lamında, Olympus CX21 ışık mikroskopunda 10X büyütmede sayım gerçekleştirildi.

Thoma lamında sayımı aşağıda belirtilen formül ile hesaplandı:

$$\text{Total hücre sayısı (ml)} = 4 \text{ karede sayılan hücre sayısı} \times 4 \times \text{Seyreltme faktörü} \times 10^4$$

Tablo 3.13.1'de flow sitometri analizi öncesindeki toplam hücre sayıları gösterilmiştir.

**Tablo 3.13.1.** Toplam hücre sayıları.

	4 karede sayılan hücre sayısı	Toplam hücre
pCMV-WWOX IFN- $\gamma$ +	11	880.000
pCMV-EV IFN- $\gamma$ +	11	880.000
pCMV-WWOX IFN- $\gamma$ -	10	800.000
pCMV-EV IFN- $\gamma$ -	14	1.120.000

Flow sitometri analizi için her bir tüpe  $1,3 \times 10^5$  hücre alınması hesap edildi (Tablo 3.13.2).

**Tablo 3.13.2.**Flow sitometri analizi için gerekli hücre sayısının hesaplanması.

	<b>6 tüp için hücre miktarı</b>	<b>MI</b>
pCMV-WWOX IFN- $\gamma$ +	780.000	886
pCMV-EV IFN- $\gamma$ +	780.000	886
pCMV-WWOX IFN- $\gamma$ -	780.000	975
pCMV-EV IFN- $\gamma$ -	780.000	690

Sayımı gerçekleştirilen hücreler 15 ml'lik falkon tüplere alınarak 1200 rpm'de 3 dk. oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant tamamen uzaklaştırıldı ve 1,5 ml PBS ile pipetaj yapıldı, takiben 1200rpm'de 3 dk. oda sıcaklığında tekrardan santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 600  $\mu$ l PBS eklenerek flow sitometri tüplerine 100 $\mu$ l homojen bir şekilde dağılımı gerçekleştirildi. Hücreler 1  $\mu$ l propidium Iodide (PI) (İnvitrogen, Ref: P1304MP) ve 20  $\mu$ l FITC Mouse Anti-Human CD274 (BD Pharmingen, Cat no: 558065) ile işaretlendi.

Tablo 3.13.3'de belirtildiği gibi WWOX IFN- $\gamma$ +, EV IFN- $\gamma$ +, WWOX IFN- $\gamma$ - ve EV IFN- $\gamma$ - grupları için çalışma tüpleri hazırlandı.

**Tablo 3.13.3.** Flow sitometri analiz grupları.

<b>ÇalışmaTüpleri</b>
1. 100 $\mu$ l hücre + Soğuk PBS + 400 $\mu$ l PBS
2. 100 $\mu$ l hücre + 1 $\mu$ l PI + 400 $\mu$ l PBS
3. 100 $\mu$ l hücre + 20 $\mu$ l FITC CD274 + 400 $\mu$ l PBS
4. 100 $\mu$ l hücre + 1 $\mu$ l PI + 20 $\mu$ l FITC CD274 + 400 $\mu$ l PBS
5. 100 $\mu$ l hücre + 1 $\mu$ l PI + 20 $\mu$ l FITC CD274+ 400 $\mu$ l PBS
6. 100 $\mu$ l hücre + 1 $\mu$ l PI + 20 $\mu$ l FITC CD274+ 400 $\mu$ l PBS

Flow sitometri analizi BD FACSCalibur cihazında gerçekleştirildi.

### 3.14. İstatistiksel Analiz

Verilerin elde edilmesinde, bilgisayar ortamına aktarılmasında ve istatistiksel analizlerin yapılması aşamalarında SPSS istatistik paket programı kullanıldı. Değişkenler tablo ve grafik ile ifade edildi. Değişkenler için normallik testi kontrol edildi. Değişkenlerin normal dağılım göstermediği varsayımı altında analizler yapıldı. İki grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel olarak  $p < 0,05$  değeri anlamlı kabul edildi.



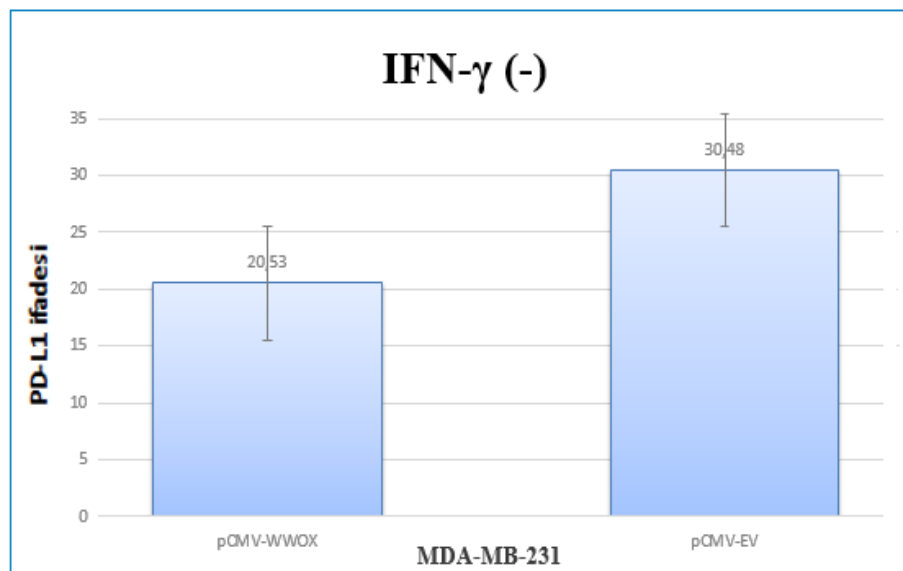
## 4. BULGULAR

### 4.1. pCMV-WWOX veya pCMV-EV transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerde PD-L1 ifadesi seviyeleri

IFN- $\gamma$  uygulanmamış, pCMV-WWOX veya pCMV-EV plazmid transfekte edilmiş MDA-MB-231 insan üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında PD-L1 (CD274) ifadesi seviyeleri analiz edildi. pCMV-WWOX ile karşılaştırıldığında pCMV-EV hücrelerde artmış PD-L1 ifadesi saptandı (Tablo 4.1.1) (Şekil 4.1.1). Bu bulgular istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p \leq 0,05$ ).

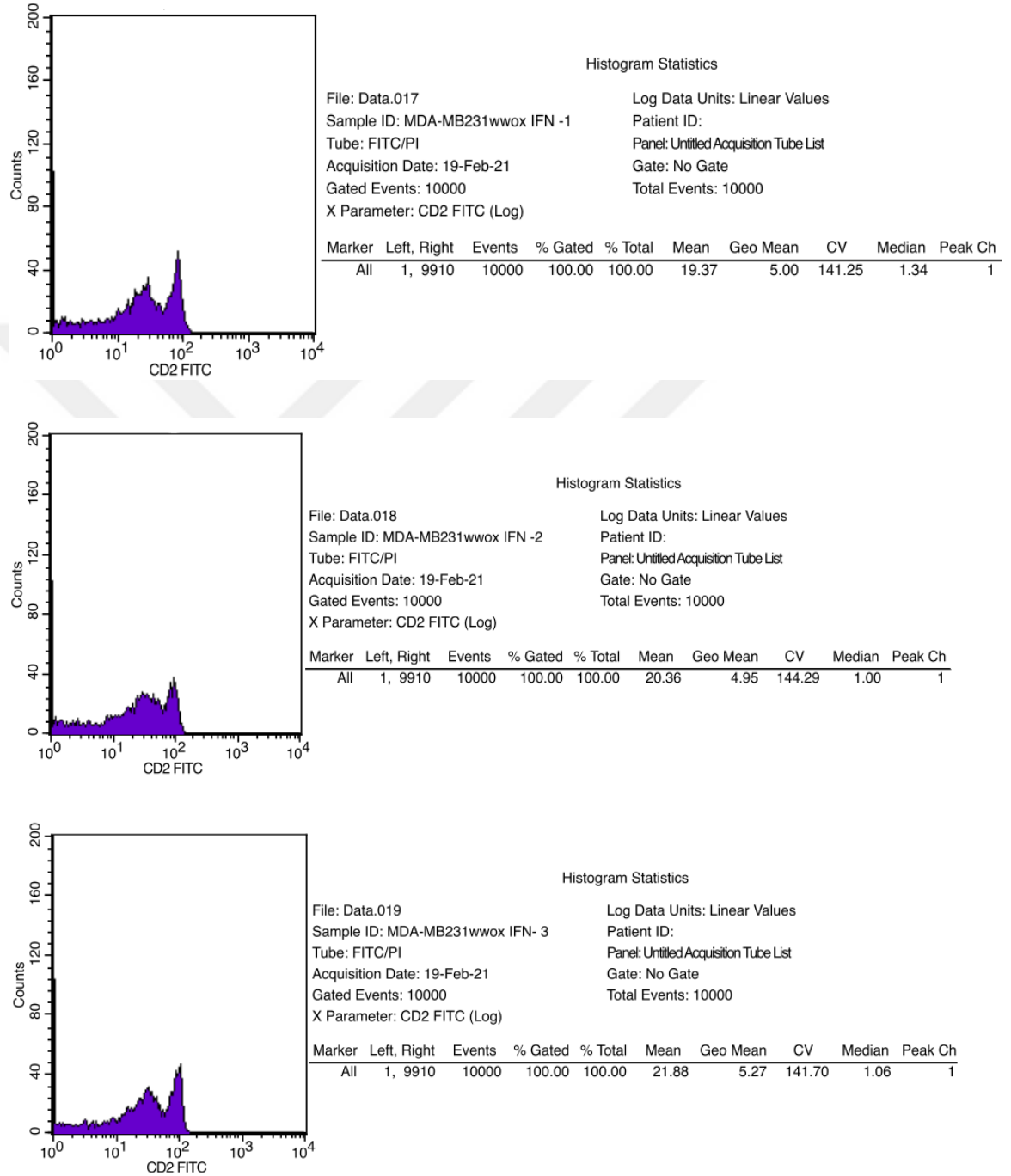
**Tablo 4.1.1.** pCMV-WWOX veya pCMV-EV transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerde PD-L1 ifadesi seviyeleri.

MDA-MB-231	PD-L1 seviyeleri
pCMV-WWOX	20,36
	21,88
	19,37
pCMV-EV	30,48
	30,94
	30,03



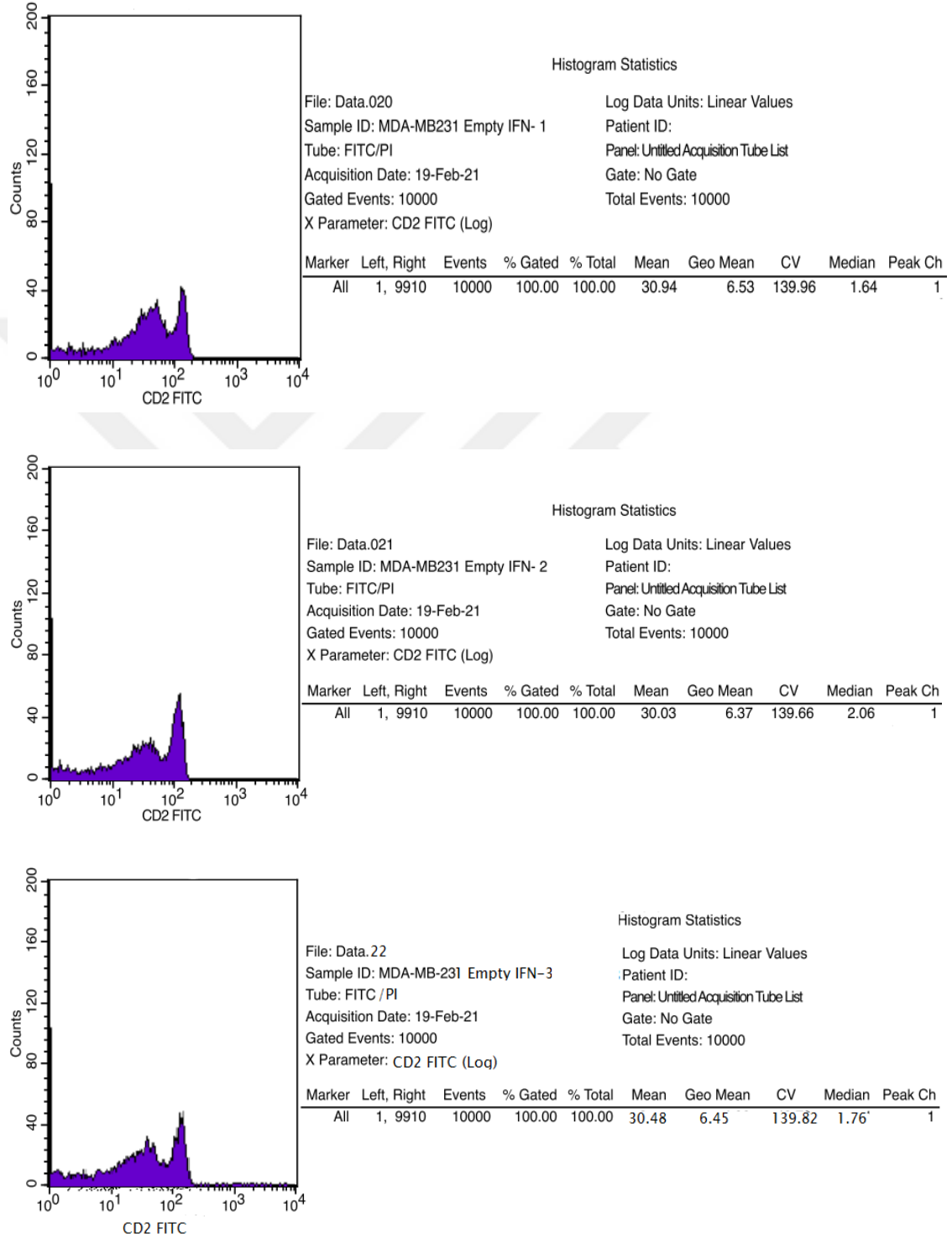
**Şekil 4.1.1.** IFN- $\gamma$  uygulanmamış, pCMV-WWOX veya pCMV-EV transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerde PD-L1 ifadesi seviyeleri.

pCMV-WWOX transfekte edilmiş hücrelerde flow sitometrik histogramlar Şekil 4.1.2’de gösterilmiştir. Histogram grafikleri üzerinde meydana gelen pik yoğunluğuna bakıldığında  $10^2$  eşik noktası olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1.2. pCMV-WWOX transfekte edilmiş hücrelerde flow sitometrik histogramlar.

pCMV-EV transfekte edilmiş hücrelerde flow sitometrik histogramlar Şekil 4.1.3’de gösterilmiştir. Histogram grafikleri üzerinde meydana gelen pik yoğunluğuna bakıldığında  $10^2$  eşik noktası olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1.3. pCMV-EV transfekte edilmiş hücrelerde flow sitometrik histogramlar.

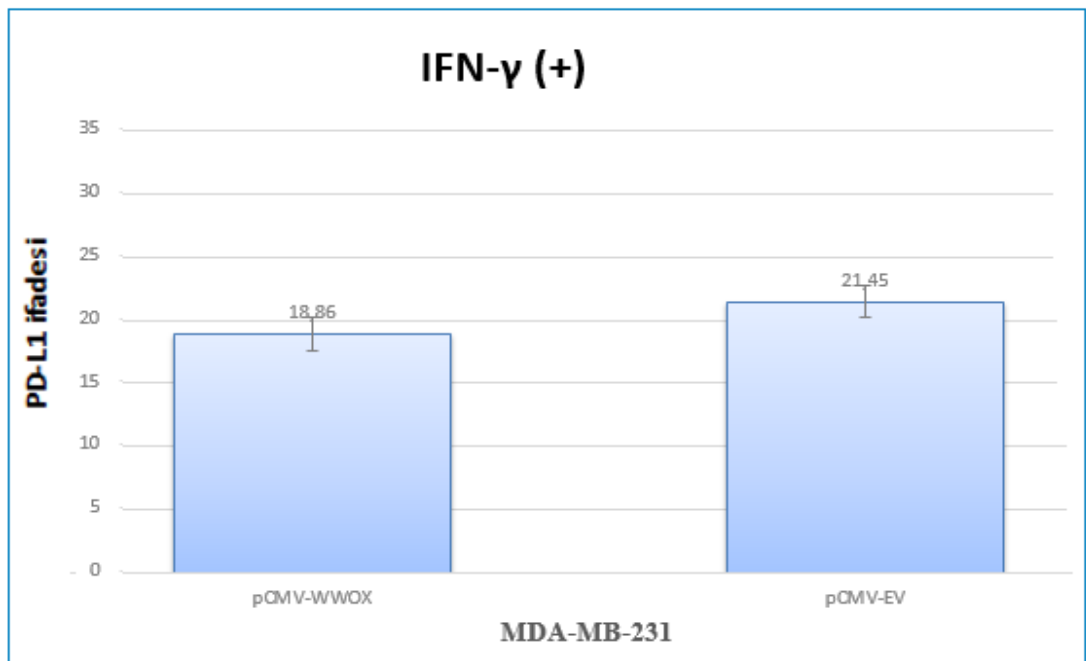


#### 4.2. IFN- $\gamma$ uygulanan pCMV-WWOX veya pCMV-EV transfekte edilmiş hücrelerde PD-L1 ifadesi seviyeleri

pCMV-WWOX veya pCMV-EV plazmid transfekte edilmiş MDA-MB-231 insan üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında 10 ng/ml konsantrasyonda 48 saat IFN- $\gamma$  uygulaması sonrasında PD-L1 (CD274) ifadesi seviyeleri analiz edildi. pCMV-WWOX ile karşılaştırıldığında pCMV-EV hücrelerde artmış PD-L1 ifadesi saptandı (Tablo 4.2.1) (Şekil 4.2.1). Bu bulgular istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p=0,05$ ).

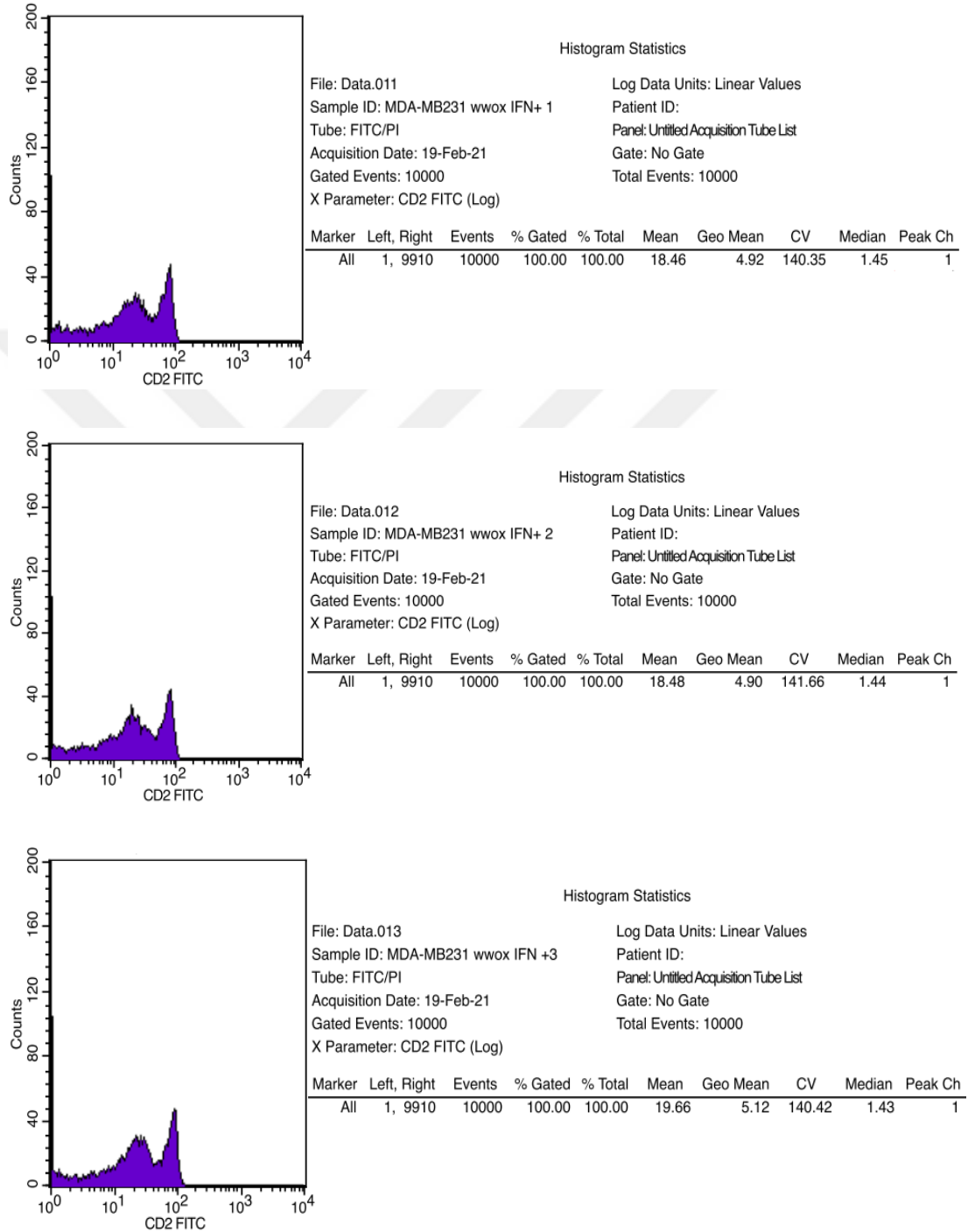
**Tablo 4.2.1.** IFN- $\gamma$  uygulanan, pCMV-WWOX veya pCMV-EV transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerde PD-L1 ifadesi seviyeleri.

MDA-MB-231	PD-L1 seviyeleri
pCMV-WWOX	19,66
	18,48
	18,46
pCMV-EV	21,59
	19,89
	22,89



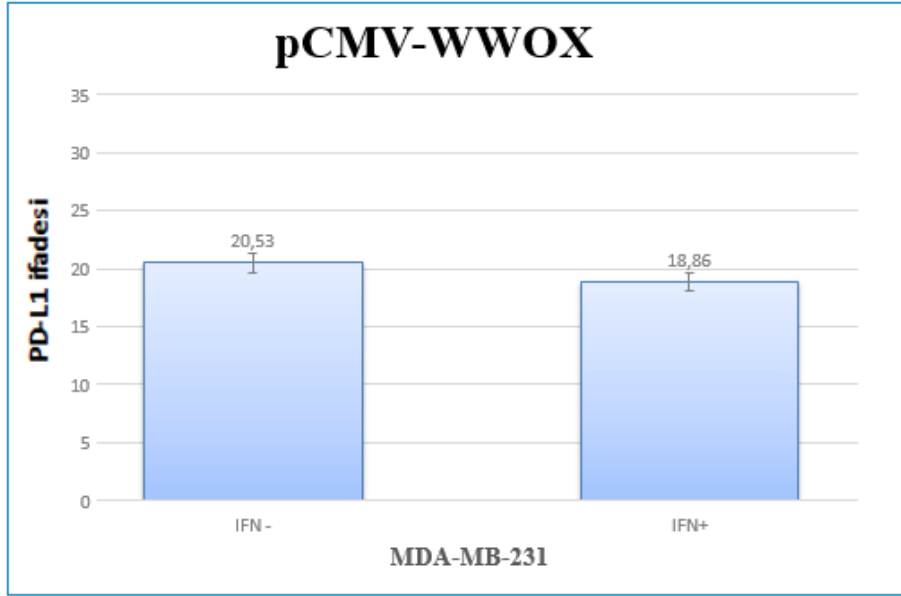
**Şekil 4.2.1.** IFN- $\gamma$  uygulanan, pCMV-WWOX veya pCMV-EV transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerde PD-L1 ifadesi seviyeleri.

IFN- $\gamma$  uygulanan, pCMV-WWOX transfekte edilmiş hücrelerde flow sitometrik histogramlar Şekil 4.2.2'de gösterilmiştir. Histogram grafikleri üzerinde meydana gelen pik yoğunluğuna bakıldığında  $10^2$  eşik noktası olarak belirlenmiştir.



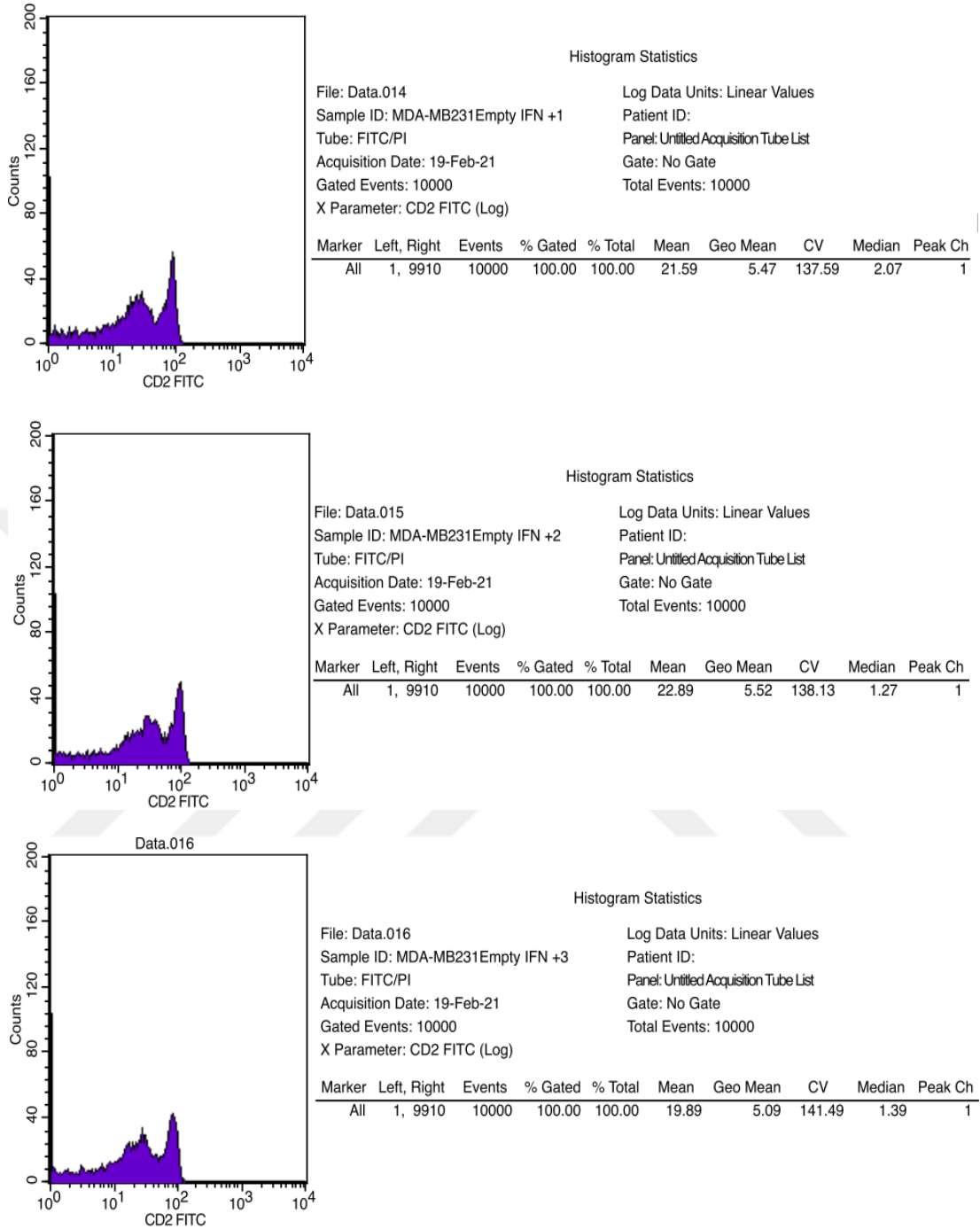
Şekil 4.2.2. IFN- $\gamma$  uygulanan, pCMV-WWOX transfekte edilmiş hücrelerde flow sitometrik histogramlar.

pCMV-WWOX transfekte edilmiş hücrelerde IFN- $\gamma$  uygulaması yapılmadan meydana gelen PD-L1 seviyesi 20,5'tir. IFN- $\gamma$  uygulaması yapıldıktan sonra meydana gelen PD-L1 seviyesi %10 azalarak 18,9'a düşmüştür (p=0,127) (Şekil 4.2.3).



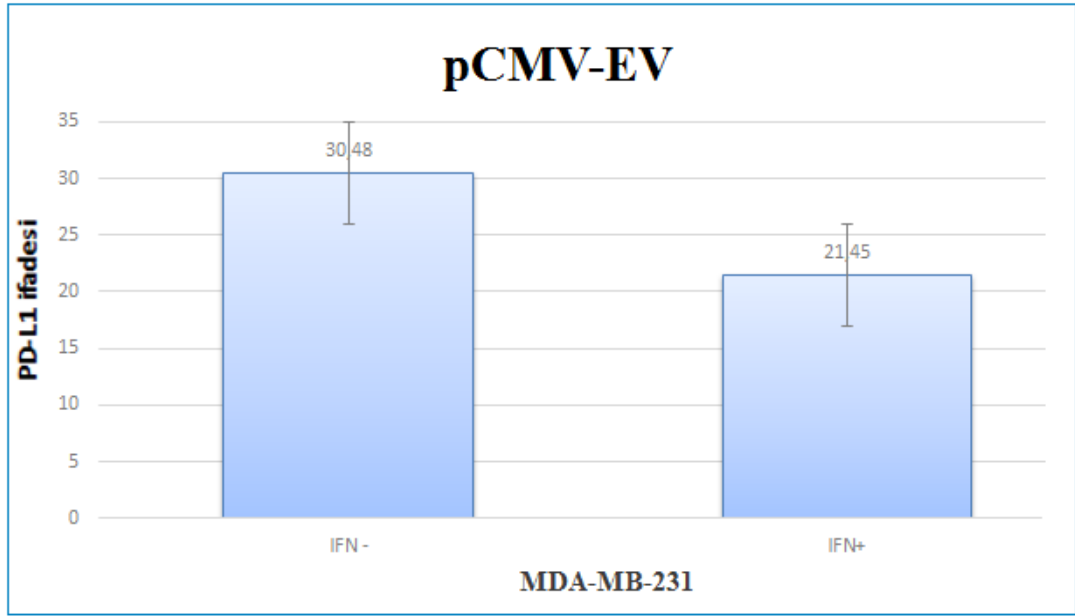
**Şekil 4.2.3.** IFN- $\gamma$  (-) ve IFN- $\gamma$  (+) pCMV-WWOX transfekte edilmiş hücrelerde PD-L1 ifadesi seviyesi.

IFN- $\gamma$  uygulanan pCMV-EV hücrelerde flow sitometrik histogramlar Şekil 4.2.4'de gösterilmiştir. Histogram grafikleri üzerinde meydana gelen pik yoğunluğuna bakıldığında  $10^2$  eşik noktası olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.2.4.** IFN- $\gamma$  uygulanan, pCMV-EV transfekte edilmiş hücrelerde flow sitometrik histogramlar.

pCMV-EV plazmid transfekte edilen hücrelerde ortalama PD-L1 seviyesi 30,5'tür. IFN- $\gamma$  uygulaması yapıldıktan sonra meydana gelen PD-L1 seviyesi %30 azalarak ortalama 21,5'e düşmüştür( $p=0,05$ ) (Şekil 4.2.5).



**Şekil 4.2.5.** IFN- $\gamma$  (-) ve IFN- $\gamma$  (+) pCMV-EV transfekte edilmiş hücrelerde PD-L1 ifadesi seviyesi.

Sonuç olarak, WWOX ifade etmeyen MDA-MB-231 hücreleri ile karşılaştırıldığında MDA-MB-231 hücrelerde WWOX ifadesinin artırılması IFN- $\gamma$  varlığında veya yokluğunda PD-L1 ifadesi seviyesi anlamlı olarak azalmaktadır.

## 5. TARTIŞMA

Tümör oluşumu, onkogenleri aktive eden ve tümör baskılayıcı genleri inaktive eden sık genetik değişiklikleri içeren karmaşık çok adımlı bir süreç olduğu bilinmektedir (Hahn ve Weinberg 2002). Meme, prostat, mide ve diğer en yaygın epitel tümörleri, genellikle 16. kromozomun uzun kolunu (16q) içeren homozigot delesyon ve heterozigotluk kaybı ile karakterize edilir (Latil ve diğ. 1997; Yendamuri ve diğ. 2003). Birçok çalışmada heterozigotluk kaybı, kanser türleri arasındaki ilişkiler doğrultusunda araştırma konusu olmuştur. Heterozigotluk kayıpları yüksek oranda karaciğer karsinomları (%28,7) da dahil olmak üzere birincil tümörlerde gösterilmiştir (Pospiech ve diğ. 2018b).

Primer tümörlerde WWOX geninin homozigot delesyonu nadirdir. Bununla birlikte WWOX lokusunda heterozigotluk kaybı ve WWOX promotor hipermetilasyonu olabilir (Driouch ve diğ. 2002). Sonuç olarak WWOX ifadesinde kayıplar veya azalmalar meydana gelmektedir (Beroukhim ve diğ. 2010).

WW domaini içeren oksidoredüktaz geni (WWOX) birçok kanser türünde heterozigotluk kaybının meydana geldiği 16.kromozomun 16q23.3 ve 16q24.2 bölgelerinde bulunmaktadır. Bu bölge içerisinde kromozomal fragil bölge yer alır ve FRA16D olarak bilinir (Ried ve diğ. 2000). FRA16D bölgesi insan genomunda yer alan en yaygın olarak kırılmalık gösteren ikinci bölgedir. Prostat, over, pankreas, akciğer ve özofagus gibi kanser türlerinde bu bölgede sıklıkla heterozigotluk kaybı ve homozigot delesyonlar olduğu çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (Wistuba ve diğ. 2000; Martincorena ve diğ. 2017). WWOX'un 16q23'teki genomik değişikliklerin kırılma hedefi olduğu ve WWOX ifadesinin çeşitli insan malignitelerinde kaybolduğu veya azaldığı gösterilmiştir (Ludes-Meyers ve diğ. 2003).

Paige ve ark. kromozom 16q23.2 bölgesindeki homozigot delesyonların çeşitli kanser hücre hatlarında WWOX ekzonlarını etkilediğini göstermiştir (Paige ve diğ. 2001). Ayrıca, WWOX gen ifadesi ile hematolojik kanser türleri arasındaki ilişkiler araştırma konusu olmuştur (Aldaz ve Hussain 2020).

WWOX proteini tümör hücresi büyümesini engeller. Ishii ve arkadaşları, kronik miyeloid lösemi (CML), akut miyeloid lösemi (AML) ve multipl miyeloma (MM) türleri dahil olmak üzere çeşitli hematopoietik farklılaşmalarda WWOX geninin

ifadesinde sıklıkla değişimler meydana geldiğini açıklamışlardır ve bu meydana gelen WWOX değişimlerinin sıklığını göstermişlerdir (Ishii ve diğ. 2003).

WWOX'un kanser büyümesindeki etkisini desteklemek için aynı bölgede homozigot kayıpların tespit edilmesine yönelik çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar doğrultusunda meydana gelen delesyonların birçoğunun ovaryum ve diğer kanser hücre hatlarında WWOX ekzonlarını etkilediği sonucuna varılmıştır (Paige ve diğ. 2001).

WWOX geninin, birden fazla kanserde WWOX gen ifadesini etkileyen genomik kararsızlık için bir hedef olduğu ve onu tümör büyümesinin potansiyel bir baskılayıcısı haline getirdiği açıktır. Bednarek ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada WWOX ifadesinin *in vivo* tümör büyümesi üzerindeki etkisi belirlenmiştir (Bednarek ve diğ. 2001).

Aldaz ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalar doğrultusunda WWOX kaybının birçok kanser türünde gen susturulmasına ve kromatin yoğunlaşmasına yol açan histon deasetilasyonu ve promotor hipermetilasyonu ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışmalara göre WW bölgeleri protein kararlılığı ve transkripsiyonel düzenlenme gibi çeşitli hücrenel süreçlerde yer alan sinyal yolları ile ilişkili komplekslere aracılık eder (Aldaz ve diğ. 2014).

MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattının WWOX proteini ifade etmediği bilinmektedir (Pospiech ve diğ. 2018b). Bu yüksek lisans tezi çalışmasında WWOX ifade etmeyen MDA-MB-231 insan üçlü negatif meme kanseri hücrelerine pCMV-WWOX plazmid transfeksiyonu ile bu hücrelerde WWOX protein ifadesinin artırılması ve WWOX'un PD-L1 ifadesi seviyesindeki değişiklikleri üzerine etkisi araştırılmıştır.

Kötü huylu tümör hücreleri tarafından anti-tümör immün sistemine direnmek için çeşitli immün baskılama yöntemlerinin kullanıldığı bilinen bir gerçektir (Guillerey ve diğ. 2016). Bu yöntemlerden biri "immün kontrol noktası" olarak adlandırılan PD-1/PD-L1 yolunun modifiye edilmesidir. İmmün sistem ile kanser arasındaki ilişkilerden biri PD-1 ve PD-L1 arasındaki bağlanma sinyali ile ilgilidir (Fife ve diğ. 2009; Francisco ve diğ. 2009). PD-1/PD-L1 yolu, yalnızca aşırı immün aktivasyonu normal olarak kontrol etmekle kalmaz, aynı zamanda tümörlerin bağışıklık sisteminden kaçması için bir yol gibi görünmektedir (Hamanishi ve Konishi 2014). Bu

yolun aktive olması, tümörlerin immün sistemden kaçışına ve bu tümör hücrelerinin büyümesine sebep olabileceğini destekleyici çalışmalar mevcuttur (Zhang ve diğ. 2015). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattının immün sistem karşısında WWOX proteini ifadesine bağlı olarak nasıl bir PD-L1 seviyesi farkı meydana getireceği tespit edilmesi amaçlanmıştır.

PD-L1'in tümör hücrelerinin farklı bölgelerinde ifade edildiği bilinmektedir. Kanser hücreleri bu sistemi immün sistemden kaçarak sürekliliğini devam ettirmek üzere kullanmaktadır. Deri kanseri (melanoma), mesane karsinomları ve akciğer kanserlerinde PD-1 / PD-L1 inhibitörlerinin değerlendirilmesi ilgi konusu olmuş ve bu yönde araştırmalar yapılmasına yön vermiştir (Chen ve Han 2015). Tümörlerde yüksek oranda PD-L1 ifadesinin meydana gelmesi kanser hastalarında neden kötü prognoza yol açtığını açıklayabilir. Bu alanda immün kontrol noktalarının düzenleyicisi olan PD1/PD-L1'in inhibe edilmesi ileri derecede olan malign melanoma ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi kötü prognozlu malignitelerin çalışmalarında kullanılmış ve iyi sonuçlar elde edilmiştir (Francisco ve diğ. 2009).

PD-L1 ifadesi analizleri meme kanseri de dahil olmak üzere birçok farklı kanser tipinde değerlendirilmiştir. Ghebeh ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada PD-L1 ifadesinin, daha yüksek derece negatif östrojen reseptörü durumu ve T düzenleyici hücreler ile artan infiltrasyon gibi çeşitli olumsuz özelliklerle ilişkili olduğu bildirmiştir (Ghebeh ve diğ. 2006).

Çalışmamız kapsamında IFN- $\gamma$  uygulanmamış MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattında PD-L1 ifadesi seviyesinin pCMV-WWOX transfeksiyonuna bağlı olarak değerlendirilmesi yapılmıştır. Bulgularımızda WWOX protein ifadesi arttırılan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında PD-L1 seviyesinin azaldığı gösterilmiştir.

Ayrıca, çalışmamızda pCMV-WWOX transfeksiyon etkinliği gerçekleştirilen MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattında IFN- $\gamma$  sitokin uygulanmasını takiben bu sitokinin etkisi ile ilişkili olarak PD-L1 ifadesi seviyesinde ne tür değişiklik meydana geldiği analiz edilmiştir.

IFN- $\gamma$ , esas olarak CD8<sup>+</sup> sitotoksik T lenfositleri, doğal öldürücü hücreler ve makrofajlar tarafından üretilen ve doğuştan gelen ve adaptif immünite için kritik olan bir tür sitokin olduğu bilinmektedir (Fang ve diğ. 2014).



IFN- $\gamma$ , çeşitli immün hücrelerin farklılaşmasını ve aynı zamanda efektör fonksiyonunu düzenler. Bununla birlikte kanser hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını inhibe ettiği bilinmektedir (Zaidi ve Merlino 2011). Xiao ve ark. lokal tümör ortamında PD-L1 ifadesinin rolünü araştırmış ve IFN- $\gamma$ 'nın kanser hücrelerinde PD-L1 ifadesinde ve bunun sonucunda tümör hücreleri tarafından immün kaçışta çok önemli bir role sahip olduğunu bulmuştur (Xiao ve diğ. 2009).

Bildiğimiz kadarıyla, çalışmamız MDA-MB-231 insan üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde pCMV-WWOX ve pCMV-EV transfeksiyonu sonrasında konstitütif ve IFN- $\gamma$  uygulamasına bağlı olarak meydana gelebilecek PD-L1 ifadesi seviyelerinin değerlendirilmesi açısından ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Çalışma sonuçlarımız, WWOX ifade etmeyen MDA-MB-231 hücreleri ile karşılaştırıldığında MDA-MB-231 hücrelerde WWOX ifadesinin artmasının IFN- $\gamma$  varlığında veya yokluğunda PD-L1 ifadesi seviyesini anlamlı olarak azalttığını göstermektedir. Kanser hücrelerinde WWOX ifadesi ve PD-L1 ifadesi seviyeleri arasındaki ilişkiyi inceleyen herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Bundan dolayı, bu tez çalışması özgün bir araştırmadır.

Tümör hücrelerinde antitümör immün yanıtta kaçmak için birçok önemli mekanizma kullanıldığı bilinmektedir. PD-1 ve PD-L1'i hedefleyen inhibitörler önemli etki göstermektedirler (Topalian ve diğ. 2012). PD-1, PD-L1 ile aktive edilen ve hücre yüzeyinde ifade edilen bir immün kontrol noktası inhibitörüdür ve tüm insan hücreleri tarafından ifade edilir (Latchman ve diğ. 2001). PD-L1 ifadesi kanserlerde başlıca kaçış mekanizmalarından biri olduğu bilinmektedir.

PD-1/PD-L1 kontrol noktası tümör mikro çevresinde immün baskılamının merkezi bir aracıdır ve temel olarak IFN- $\gamma$  sinyalizasyonu ile ilişkilidir. Tümör veya immün hücreler üzerindeki PD-L1 ifadesini düzenleyen diğer faktörleri karakterize etmek için, TME'de yerleşik sitokinlerin ve yapısal ve sitokin ile indüklenen PD-L1 ifadesinin değerlendirilmesi üzerine yapılan çalışmalar bulunmaktadır (Xiao ve diğ. 2009; Fang ve diğ. 2014).

IFN- $\gamma$  hem immün hem de immün olmayan süreçlerin aktivasyonuna yol açan merkezi bir rol oynar. Tümör hücresinin kendisi, IFN- $\gamma$  aktivitelerinin kritik bir hedefidir (Smyth ve diğ. 2004).

Soliman ve ark. bazal ve luminal meme kanseri hücre hatlarında yaptıkları çalışmada IFN- $\gamma$  etkinliğine bağlı olarak PD-L1 ifadesi seviyesindeki farklılıkları değerlendirmişlerdir (Soliman ve diğ. 2014). Özellikle MDA-MB-231 hücrelerini içeren bazal tip (Bazal B) meme kanserlerinin diğer meme kanseri hücre tiplerine göre konstitütif olarak ve IFN- $\gamma$  uygulaması ile daha yüksek seviyelerde PD-L1 ifade ettiklerini bulmuşlardır.

Kanser hücreleri dâhil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde STAT3 sinyal yolağı, IFN- $\gamma$ 'nın atipik bir sinyal ileticisi olarak aktive edilir (Qing ve Stark 2004; Xiao ve diğ. 2009; Haroun ve diğ. 2017). STAT3 meme kanserlerinde aşırı ifade edilir ve yapısal olarak aktive olur; bu, meme kanserlerinin başlangıcı, ilerlemesi, metastazı ve kemoterapiye direnci ile yakından ilişkilidir (Sirkisoon ve diğ. 2018). STAT3 tümör aracılı immün baskılanmanın güçlü bir düzenleyicisidir (Wang ve diğ. 2018a). STAT3 ayrıca PD-L1 ifadesinin düzenlenmesinde de rol oynar (Sasidharan Nair ve diğ. 2018). PD-L1, ayrıca JAK aracılı STAT3 fosforilasyonu ve aktivasyonu nedeniyle meme kanseri hücre hatlarında fazla ifade edilir (Chen ve diğ. 2018b).

Çoğu hücrede STAT3 aktivitesi, STAT1 tarafından çapraz inhibisyon nedeniyle düşük tutulur. Bu nedenle, STAT3'ün IFN- $\gamma$  işlevine katkısı genellikle sınırlıdır ve en iyi etkisi STAT1 eksikliği olan hücrelerde ortaya çıkar (Qing ve Stark 2004). IFN- $\gamma$  ile aktive olan JAK / STAT sinyalleşmenin yanı sıra çeşitli yollar tümör hücrelerinde PD-L1 ifadesini etkileyebilir. MEK / ERK ve PI3K / AKT gibi proliferatif yollar aracılığıyla sinyalleşme de PD-L1 ifadesini arttırabilir (Hasan ve diğ. 2011; Soliman ve diğ. 2014)

WWOX proteini IL-6 / JAK2 / STAT3 sinyal iletim yolağı üzerinden kanser hücresi büyümesini ve metastazı STAT3'e bağlı bir şekilde baskılamaktadır. WWOX'un aşırı ifadesi bazal meme kanseri hücrelerinde STAT3 aktivitesini inhibe eder (Chang ve diğ. 2018). Ayrıca, WWOX'un JAK2 fosforilasyonunu inhibe ettiği ve JAK2'nin STAT3 ile birleşmesini engellediği ve böylece STAT3 fosforilasyonunun baskılandığı gösterilmiştir (Chang ve diğ. 2018). WWOX 'un düşük ifadesi, bazal kanser hücrelerinde ve TNBC dokularında yüksek derecede aktive olmuş STAT3 ile anlamlı şekilde ilişkilidir (Chang ve diğ. 2018)).

Sonuç olarak, çalışmamızda WWOX ifade etmeyen MDA-MB-231 hücreleri ile karşılaştırıldığında MDA-MB-231 hücrelerde WWOX ifadesinin arttırılmasının

IFN- $\gamma$  varlığında veya yokluğunda PD-L1 ifadesi seviyesini anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. WWOX proteininin kanserlerde immün sistemi üzerindeki kesin rolünü tanımlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



**KAYNAKLAR**

- ABBOTT M, USTOYEV Y. 2019. Cancer and the immune system: The history and background of immunotherapy. In *Seminars in oncology nursing*, Vol 35, p. 150923. Elsevier.
- AFREEN S, DERMIME S. 2014. The immunoinhibitory B7-H1 molecule as a potential target in cancer: killing many birds with one stone. *Hematology/oncology and stem cell therapy***7**: 1-17.
- ALDAZ CM, FERGUSON BW, ABBA MC. 2014. WWOX at the crossroads of cancer, metabolic syndrome related traits and CNS pathologies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer***1846**: 188-200.
- ALDAZ CM, HUSSAIN T. 2020. WWOX Loss of Function in Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. *International journal of molecular sciences***21**: 8922.
- ALLISON JP. 2003. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences***100**: 5336-5341.
- AQEILAN RI, CROCE CM. 2007. WWOX in biological control and tumorigenesis. *Journal of cellular physiology***212**: 307-310.
- AQEILAN RI, KUROKI T, PEKARSKY Y, ALBAGHA O, TRAPASSO F, BAFFA R, HUEBNER K, EDMONDS P, CROCE CM. 2004. Loss of WWOX expression in gastric carcinoma. *Clinical Cancer Research***10**: 3053-3058.
- BALAR AV, WEBER JS. 2017. PD-1 and PD-L1 antibodies in cancer: current status and future directions. *Cancer Immunol Immunother***66**: 551-564.
- BARYŁA I, STYCZEŃ-BINKOWSKA E, BEDNAREK AK. 2015. Alteration of WWOX in human cancer, a clinical view. *Experimental Biology and Medicine***240**: 305-314.
- BAXTER D. 2007. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occupational medicine***57**: 552-556.
- BEDNAREK AK, KECK-WAGGONER CL, DANIEL RL, LAFLIN KJ, BERGSAGEL PL, KIGUCHI K, BRENNER AJ, ALDAZ CM. 2001. WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth. *Cancer research***61**: 8068-8073.

- BEDNAREK AK, LAFLIN KJ, DANIEL RL, LIAO Q, HAWKINS KA, ALDAZ CM. 2000. WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23. 3–24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer research***60**: 2140-2145.
- BEROUKHIM R, MERMEL CH, PORTER D, WEI G, RAYCHAUDHURI S, DONOVAN J, BARRETINA J, BOEHM JS, DOBSON J, URASHIMA M. 2010. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature***463**: 899-905.
- BLANK C, BROWN I, PETERSON AC, SPIOTTO M, IWAI Y, HONJO T, GAJEWSKI TF. 2004. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer research***64**: 1140-1145.
- BOLLRATH J, GRETEN FR. 2009. IKK/NF- $\kappa$ B and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO reports***10**: 1314-1319.
- BOUSSIOTIS VA, CHATTERJEE P, LI L. 2014. Biochemical signaling of PD-1 on T cells and its functional implications. *Cancer journal (Sudbury, Mass)***20**: 265.
- BRAHMER JR, TYKODI SS, CHOW LQ, HWU W-J, TOPALIAN SL, HWU P, DRAKE CG, CAMACHO LH, KAUH J, ODUNSI K. 2012. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *New England Journal of Medicine***366**: 2455-2465.
- BROWN JA, DORFMAN DM, MA F-R, SULLIVAN EL, MUNOZ O, WOOD CR, GREENFIELD EA, FREEMAN GJ. 2003. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *The Journal of Immunology***170**: 1257-1266.
- BUTTE MJ, KEIR ME, PHAMDUY TB, SHARPE AH, FREEMAN GJ. 2007. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity***27**: 111-122.
- BYLER S, GOLDGAR S, HEERBOTH S, LEARY M, HOUSMAN G, MOULTON K, SARKAR S. 2014. Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. *Anticancer research***34**: 1071-1077.

- CHAFFER CL, WEINBERG RA. 2015. How does multistep tumorigenesis really proceed? *Cancer discovery***5**: 22-24.
- CHANG R, SONG L, XU Y, WU Y, DAI C, WANG X, SUN X, HOU Y, LI W, ZHAN X. 2018. Loss of WWOX drives metastasis in triple-negative breast cancer by JAK2/STAT3 axis. *Nature communications***9**: 1-12.
- CHEN G, HUANG AC, ZHANG W, ZHANG G, WU M, XU W, YU Z, YANG J, WANG B, SUN H. 2018a. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature***560**: 382-386.
- CHEN L, HAN X. 2015. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *The Journal of clinical investigation***125**: 3384-3391.
- CHEN M, POCKAJ B, ANDREOZZI M, BARRETT MT, KRISHNA S, EATON S, NIU R, ANDERSON KS. 2018b. JAK2 and PD-L1 amplification enhance the dynamic expression of PD-L1 in triple-negative breast cancer. *Clinical breast cancer***18**: e1205-e1215.
- DE VISSER KE, EICHTEN A, COUSSENS LM. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer***6**: 24-37.
- DEL MARE S, SALAH Z, AQEILAN RI. 2009. WWOX: its genomics, partners, and functions. *Journal of cellular biochemistry***108**: 737-745.
- DELVES P. 2000. J, Roitt I M. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med***343**: 37-49.
- DOLEN Y, ESENDAGLI G. 2013. Myeloid leukemia cells with a B7-2+ subpopulation provoke Th-cell responses and become immuno-suppressive through the modulation of B7 ligands. *European journal of immunology***43**: 747-757.
- DONATI V, FONTANINI G, DELL'OMODARME M, PRATI MC, NUTI S, LUCCHIM, MUSSIA, FABBRIM, BASOLO F, CROCE CM. 2007. WWOX Expression in Different Histologic Types and Subtypes of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical cancer research***13**: 884-891.
- DONG H, STROME SE, SALOMAO DR, TAMURA H, HIRANO F, FLIES DB, ROCHE PC, LU J, ZHU G, TAMADA K. 2002. Tumor-associated B7-H1

promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine***8**: 793-800.

DRIOUCH K, PRYDZ H, MONESE R, JOHANSEN H, LIDEREAU R, FRENGEN E. 2002. Alternative transcripts of the candidate tumor suppressor gene, WWOX, are expressed at high levels in human breast tumors. *Oncogene***21**: 1832-1840.

DUNN GP, OLD LJ, SCHREIBER RD. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity***21**: 137-148.

EKIZOGLU S, MUSLUMANOGLU M, DALAY N, BUYRU N. 2012. Genetic alterations of the WWOX gene in breast cancer. *Medical Oncology***29**: 1529-1535.

FANG W, ZHANG J, HONG S, ZHAN J, CHEN N, QIN T, TANG Y, ZHANG Y, KANG S, ZHOU T. 2014. EBV-driven LMP1 and IFN- $\gamma$  up-regulate PD-L1 in nasopharyngeal carcinoma: Implications for oncotargeted therapy. *Oncotarget***5**: 12189.

FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer***136**: E359-E386.

FIFE BT, PAUKEN KE, EAGAR TN, OBU T, WU J, TANG Q, AZUMA M, KRUMMEL MF, BLUESTONE JA. 2009. Interactions between programmed death-1 and programmed death ligand-1 promote tolerance by blocking the T cell receptor-induced stop signal. *Nature immunology***10**: 1185.

FRANCISCO LM, SALINAS VH, BROWN KE, VANGURI VK, FREEMAN GJ, KUCHROO VK, SHARPE AH. 2009. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine***206**: 3015-3029.

FREEMAN GJ, LONG AJ, IWAI Y, BOURQUE K, CHERNOVA T, NISHIMURA H, FITZ LJ, MALENKOVICH N, OKAZAKI T, BYRNE MC. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine***192**: 1027-1034.

- FREEMAN GJ, WHERRY EJ, AHMED R, SHARPE AH. 2006. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1–PD-1 ligand blockade. *The Journal of experimental medicine***203**: 2223-2227.
- FRUCHT DM, FUKAO T, BOGDAN C, SCHINDLER H, O'SHEA JJ, KOYASU S. 2001. IFN- $\gamma$  production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends in immunology***22**: 556-560.
- GAUDIO E, PALAMARCHUK A, PALUMBO T, TRAPASSO F, PEKARSKY Y, CROCE CM, AQEILAN RI. 2006. Physical association with WWOX suppresses c-Jun transcriptional activity. *Cancer research***66**: 11585-11589.
- GHEBEH H, MOHAMMED S, AL-OMAIR A, QATTANT A, LEHE C, AL-QUDAIHI G, ELKUM N, ALSHABANAH M, AMER SB, TULBAH A. 2006. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia***8**: 190-198.
- GILROY D, DE MAEYER R. 2015. New insights into the resolution of inflammation. In *Seminars in immunology*, Vol 27, pp. 161-168. Elsevier.
- GOSSELIN E, WARDWELL K, RIGBY W, GUYRE P. 1993. Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3. *The Journal of Immunology***151**: 1482-1490.
- GUILLEREY C, HUNTINGTON ND, SMYTH MJ. 2016. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nature immunology***17**: 1025-1036.
- GULER G, UNER A, GULER N, HAN SY, ILIOPOULOS D, HAUCK WW, MCCUE P, HUEBNER K. 2004. The fragile genes FHIT and WWOX are inactivated coordinately in invasive breast carcinoma: Correlations with clinical features. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society***100**: 1605-1614.
- HAHN WC, WEINBERG RA. 2002. Rules for making human tumor cells. *New England Journal of Medicine***347**: 1593-1603.
- HAMANISHI J, KONISHI I. 2014. Targeting the PD-1/PD-L1 immune checkpoint signal-a new treatment strategy for cancer. *Gan to kagaku ryoho Cancer & chemotherapy***41**: 1071-1076.



- HAROUN F, SOLOLA SA, NASSEREDDINE S, TABBARA I. 2017. PD-1 signaling and inhibition in AML and MDS. *Annals of hematology***96**: 1441-1448.
- HASAN A, GHEBEH H, LEHE C, AHMAD R, DERMIME S. 2011. Therapeutic targeting of B7-H1 in breast cancer. *Expert opinion on therapeutic targets***15**: 1211-1225.
- ILIOPOULOS D, FABBRI M, DRUCK T, QIN HR, HAN S-Y, HUEBNER K. 2007. Inhibition of breast cancer cell growth in vitro and in vivo: effect of restoration of WWOX expression. *Clinical cancer research***13**: 268-274.
- ISHIDA Y, AGATA Y, SHIBAHARA K, HONJO T. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal***11**: 3887-3895.
- ISHII H, VECCHIONE A, FURUKAWA Y, SUTHEESOPHON K, HAN S-Y, DRUCK T, KUROKI T, TRAPASSO F, NISHIMURA M, SAITO Y. 2003. Expression of FRA16D/WWOX and FRA3B/FHIT Genes in Hematopoietic Malignancies<sup>11</sup>In part by the Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, by the research funds from the Kato Memorial Bioscience Foundation, the Cell Science Research Foundation, and the Takeda Science Foundation, Japan, and by the USPHS grants PO1, CA77738 from National Cancer Institute. *Molecular cancer research***1**: 940-947.
- JUNO JA, STALKER AT, WARUK JL, OYUGI J, KIMANI M, PLUMMER FA, KIMANI J, FOWKE KR. 2015. Elevated expression of LAG-3, but not PD-1, is associated with impaired iNKT cytokine production during chronic HIV-1 infection and treatment. *Retrovirology***12**: 17.
- KARASAR P, ESENDAGLI G. 2014. T helper responses are maintained by basal-like breast cancer cells and confer to immune modulation via upregulation of PD-1 ligands. *Breast cancer research and treatment***145**: 605-614.
- KARIN N, WILDBAUM G. 2015. The role of chemokines in shaping the balance between CD4<sup>+</sup> T cell subsets and its therapeutic implications in autoimmune and cancer diseases. *Frontiers in immunology***6**: 609.

- KEIBEL A, SINGH V, SHARMA MC. 2009. Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression. *Current pharmaceutical design***15**: 1949-1955.
- KEIR ME, BUTTE MJ, FREEMAN GJ, SHARPE AH. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol***26**: 677-704.
- KUBY J, KINDT J, DSBORNE A, GOLDSBY A. 2003. Kuby's Immunology. *WH Freeman and Company, New York*.
- KUROKI T, YENDAMURI S, TRAPASSO F, MATSUYAMA A, AQEILAN RI, ALDER H, RATTAN S, CESARIR, NOLLI ML, WILLIAMS NN. 2004. The tumor suppressor gene WWOX at FRA16D is involved in pancreatic carcinogenesis. *Clinical cancer research***10**: 2459-2465.
- KURSUNEL MA, ESENDAGLI G. 2016. The untold story of IFN- $\gamma$  in cancer biology. *Cytokine & growth factor reviews***31**: 73-81.
- LABEUR M, REFOJO D, WÖLFEL B, STALLA J, VARGAS V, THEODOROPOULOU M, BUCHFELDER M, PAEZ-PEREDA M, ARZT E, STALLA GK. 2008. Interferon-g inhibits cellular proliferation and ACTH production in corticotroph tumor cells through a novel janus kinases–signal transducer and activator of transcription 1/nuclear factor-kappa B inhibitory signaling pathway. *Journal of endocrinology***199**: 177-189.
- LATCHMAN Y, WOOD CR, CHERNOVA T, CHAUDHARY D, BORDE M, CHERNOVA I, IWAI Y, LONG AJ, BROWN JA, NUNES R. 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology***2**: 261-268.
- LATIL A, CUSSENOT O, FOURNIER G, DRIOUCH K, LIDEREAU R. 1997. Loss of heterozygosity at chromosome 16q in prostate adenocarcinoma: identification of three independent regions. *Cancer research***57**: 1058-1062.
- LEE YT, TAN YJ, OON CE. 2018. Molecular targeted therapy: treating cancer with specificity. *European journal of pharmacology***834**: 188-196.
- LIANG SC, LATCHMAN YE, BUHLMANN JE, TOMCZAK MF, HORWITZ BH, FREEMAN GJ, SHARPE AH. 2003. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *European journal of immunology***33**: 2706-2716.

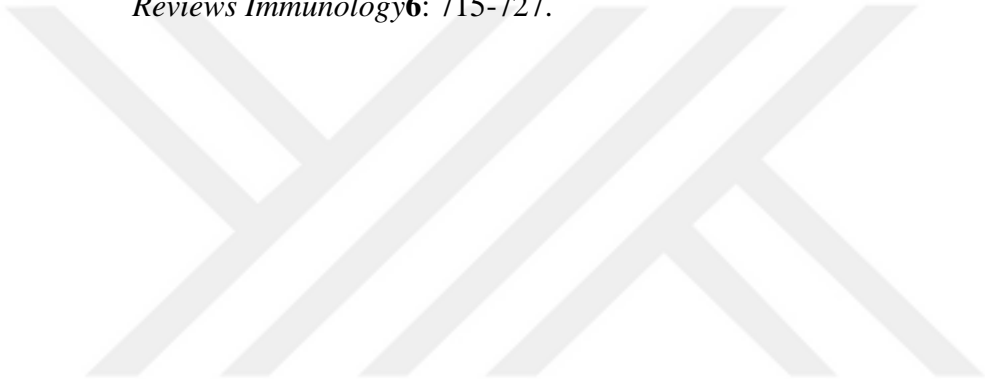
- LIM SH, SUN J-M, LEE S-H, AHN JS, PARK K, AHN M-J. 2016. Pembrolizumab for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert opinion on biological therapy***16**: 397-406.
- LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, MATSUDAIRA P, BALTIMORE D, DARNELL J. 2000. DNA damage and repair and their role in carcinogenesis. In *Molecular Cell Biology 4th edition*. WH Freeman.
- LUDES-MEYERS J, BEDNAREK A, POPESCU N, BEDFORD M, ALDAZ C. 2003. WWOX, the common chromosomal fragile site, FRA16D, cancer gene. *Cytogenetic and genome research***100**: 101-110.
- MAROTTA LL, ALMENDRO V, MARUSYK A, SHIPITSIN M, SCHEMME J, WALKER SR, BLOUSHTAIN-QIMRON N, KIM JJ, CHOUDHURY SA, MARUYAMA R. 2011. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44+ CD24–stem cell–like breast cancer cells in human tumors. *The Journal of clinical investigation***121**: 2723-2735.
- MARTINCORENA I, RAINE KM, GERSTUNG M, DAWSON KJ, HAASE K, VAN LOO P, DAVIES H, STRATTON MR, CAMPBELL PJ. 2017. Universal patterns of selection in cancer and somatic tissues. *Cell***171**: 1029-1041. e1021.
- MATZINGER P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *science***296**: 301-305.
- MCCOMB S, THIRIOT A, AKACHE B, KRISHNAN L, STARK F. 2019. Introduction to the immune system. In *Immunoproteomics*, pp. 1-24. Springer.
- MITTAL D, GUBIN MM, SCHREIBER RD, SMYTH MJ. 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology***27**: 16-25.
- NUNEZ MI, LUDES-MEYERS J, ABBA MC, KIL H, ABBEY NW, PAGE RE, SAHIN A, KLEIN-SZANTO AJ, ALDAZ CM. 2005a. Frequent loss of WWOX expression in breast cancer: correlation with estrogen receptor status. *Breast cancer research and treatment***89**: 99-105.
- NUNEZ MI, ROSEN DG, LUDES-MEYERS JH, ABBA MC, KIL H, PAGE R, KLEIN-SZANTO AJ, GODWIN AK, LIU J, MILLS GB. 2005b. WWOX protein expression varies among ovarian carcinoma histotypes and correlates with less favorable outcome. *BMC cancer***5**: 64.

- OKAZAKI T, IWAI Y, HONJO T. 2002. New regulatory co-receptors: inducible co-stimulator and PD-1. *Current opinion in immunology***14**: 779-782.
- OTT PA, HODI FS, ROBERT C. 2013. CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. AACR.
- PAIGE AJ, TAYLOR KJ, TAYLOR C, HILLIER SG, FARRINGTON S, SCOTT D, PORTEOUS DJ, SMYTH JF, GABRA H, WATSON JV. 2001. WWOX: a candidate tumor suppressor gene involved in multiple tumor types. *Proceedings of the National Academy of Sciences***98**: 11417-11422.
- PARDOLL DM. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer***12**: 252-264.
- PARK S, LUDES-MEYERS J, ZIMONJIC D, DURKIN M, POPESCU N, ALDAZ CM. 2004. Frequent downregulation and loss of WWOX gene expression in human hepatocellular carcinoma. *British journal of cancer***91**: 753-759.
- PENG W, LIU C, XU C, LOU Y, CHEN J, YANG Y, YAGITA H, OVERWIJK WW, LIZÉE G, RADVANYI L. 2012. PD-1 blockade enhances T-cell migration to tumors by elevating IFN- $\gamma$  inducible chemokines. *Cancer research***72**: 5209-5218.
- PIMENTA FJ, GOMES DA, PERDIGAO PF, BARBOSA AA, ROMANO-SILVA MA, GOMEZ MV, ALDAZ CM, DE MARCO L, GOMEZ RS. 2006. Characterization of the tumor suppressor gene WWOX in primary human oral squamous cell carcinomas. *International journal of cancer***118**: 1154-1158.
- PINAR G, ALGIER L, DOĞAN N, KAYA N. 2008. Jinekolojik Kanserli Bireylerde Risk Faktörlerinin Belirlenmesi. *International Journal of Hematology & Oncology/UHOD: Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi***18**.
- POSPIECH K, PLUCIENNIK E, BEDNAREK AK. 2018a. WWOX Tumor Suppressor Gene in Breast Cancer, a Historical Perspective and Future Directions. *Front Oncol***8**: 345.
- POSPIECH K, PLUCIENNIK E, BEDNAREK AK. 2018b. WWOX tumor suppressor gene in breast cancer, a historical perspective and future directions. *Frontiers in oncology***8**: 345.

- POWER W, FOSTER C. 1996. Basic ocular immunology. In *Seminars in Ophthalmology*, Vol 11, pp. 3-9. Taylor & Francis.
- QIN HR, ILIOPOULOS D, SEMBA S, FABBRI M, DRUCK T, VOLINIA S, CROCE CM, MORRISON CD, KLEIN RD, HUEBNER K. 2006. A role for the WWOX gene in prostate cancer. *Cancer research***66**: 6477-6481.
- QING Y, STARK GR. 2004. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon- $\gamma$ . *Journal of Biological Chemistry***279**: 41679-41685.
- RIED K, FINNIS M, HOBSON L, MANGELSDORF M, DAYAN S, NANCARROW JK, WOOLLATT E, KREMMIDIOTIS G, GARDNER A, VENTER D. 2000. Common chromosomal fragile site FRA16D sequence: identification of the FOR gene spanning FRA16D and homozygous deletions and translocation breakpoints in cancer cells. *Human molecular genetics***9**: 1651-1663.
- RITPRAJAK P, AZUMA M. 2015. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral oncology***51**: 221-228.
- RODIG N, RYAN T, ALLEN JA, PANG H, GRABIE N, CHERNOVA T, GREENFIELD EA, LIANG SC, SHARPE AH, LICHTMAN AH. 2003. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytotoxicity. *European journal of immunology***33**: 3117-3126.
- SAĞLIK BAKANLIĞI TC. Kadınlarda kanser türleri ve görülme sıklıkları. <https://hsgm.saglik.gov.tr>. 01.08.2020.
- SASIDHARAN NAIR V, TOOR SM, ALI BR, ELKORD E. 2018. Dual inhibition of STAT1 and STAT3 activation downregulates expression of PD-L1 in human breast cancer cells. *Expert opinion on therapeutic targets***22**: 547-557.
- SCHOENBORN JR, WILSON CB. 2007. Regulation of interferon- $\gamma$  during innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology***96**: 41-101.
- 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**: 294-297.
- SHUAI K, LIU B. 2003. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature Reviews Immunology***3**: 900-911.

- SIRKISOON SR, CARPENTER RL, RIMKUS T, ANDERSON A, HARRISON A, LANGE AM, JIN G, WATABE K, LO H-W. 2018. Interaction between STAT3 and GLI1/tGLI1 oncogenic transcription factors promotes the aggressiveness of triple-negative breast cancers and HER2-enriched breast cancer. *Oncogene***37**: 2502-2514.
- SMYTH MJ, CRETNEY E, KERSHAW MH, HAYAKAWA Y. 2004. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunological reviews***202**: 275-293.
- SOLIMAN H, KHALIL F, ANTONIA S. 2014. PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells. *PloS one***9**: e88557.
- TAM JC, JACQUES DA. 2014. Intracellular immunity: finding the enemy within—how cells recognize and respond to intracellular pathogens. *Journal of leukocyte biology***96**: 233-244.
- THELEMANN C, EREN RO, COUTAZ M, BRASSEIT J, BOUZOURENE H, ROSA M, DUVAL A, LAVANCHY C, MACK V, MUELLER C. 2014. Interferon- $\gamma$  induces expression of MHC class II on intestinal epithelial cells and protects mice from colitis. *PloS one***9**.
- TOMAR N, DE RK. 2014. A brief outline of the immune system. In *Immunoinformatics*, pp. 3-12. Springer.
- TOPALIAN SL, HODI FS, BRAHMER JR, GETTINGER SN, SMITH DC, MCDERMOTT DF, POWDERLY JD, CARVAJAL RD, SOSMAN JA, ATKINS MB. 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *New England Journal of Medicine***366**: 2443-2454.
- TOPALIAN SL, TAUBE JM, ANDERS RA, PARDOLL DM. 2016. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer***16**: 275.
- TUMEH PC, HARVIEW CL, YEARLEY JH, SHINTAKU IP, TAYLOR EJ, ROBERT L, CHMIELOWSKI B, SPASIC M, HENRY G, CIOBANU V. 2014. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature***515**: 568-571.
- VESELY MD, KERSHAW MH, SCHREIBER RD, SMYTH MJ. 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology***29**: 235-271.

- WANG Y, SHEN Y, WANG S, SHEN Q, ZHOU X. 2018a. The role of STAT3 in leading the crosstalk between human cancers and the immune system. *Cancer letters***415**: 117-128.
- WANG Y, WANG H, YAO H, LI C, FANG J-Y, XU J. 2018b. Regulation of PD-L1: emerging routes for targeting tumor immune evasion. *Frontiers in pharmacology***9**: 536.
- WEINBERG RA. 2014. Coming full circle—from endless complexity to simplicity and back again. *Cell***157**: 267-271.
- WISTUBA II, BEHRENS C, VIRMANI AK, MELE G, MILCHGRUB S, GIRARD L, FONDON JW, GARNER HR, MCKAY B, LATIF F. 2000. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Research***60**: 1949-1960.
- WÖLFLE SJ, STREBOVSKY J, BARTZ H, SÄHR A, ARNOLD C, KAISER C, DALPKE AH, HEEG K. 2011. PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. *European journal of immunology***41**: 413-424.
- XIAO M, WANG C, ZHANG J, LI Z, ZHAO X, QIN Z. 2009. IFN $\gamma$  promotes papilloma development by up-regulating Th17-associated inflammation. *Cancer research***69**: 2010-2017.
- YAO S, CHEN L. 2013. Adaptive resistance: a tumor strategy to evade immune attack. *European journal of immunology***43**: 576-579.
- YAO S, CHEN L. 2014. PD-1 as an immune modulatory receptor. *Cancer journal (Sudbury, Mass)***20**: 262.
- YENDAMURI S, KUROKI T, TRAPASSO F, HENRY AC, DUMON KR, HUEBNER K, WILLIAMS NN, KAISER LR, CROCE CM. 2003. WW domain containing oxidoreductase gene expression is altered in non-small cell lung cancer. *Cancer research***63**: 878-881.
- YILMAZ M, ATAK N. 2014. Meme kanseri riskinin beslenme ile ilişkili faktörler açısından değerlendirilmesi. *Turk J Public Health***12**: 51-60.
- ZAIDI MR, MERLINO G. 2011. The two faces of interferon- $\gamma$  in cancer. *Clinical cancer research***17**: 6118-6124.

- ZAIMY M, SAFFARZADEH N, MOHAMMADI A, POURGHADAMYARI H, IZADI P, SARLI A, MOGHADDAM L, PASCHEPARI S, AZIZI H, TORKAMANDI S. 2017. New methods in the diagnosis of cancer and gene therapy of cancer based on nanoparticles. *Cancer Gene Therapy***24**: 233-243.
- ZHANG J, GAO J, LI Y, NIE J, DAI L, HU W, CHEN X, HAN J, MA X, TIAN G. 2015. Circulating PD-L 1 in NSCLC patients and the correlation between the level of PD-L 1 expression and the clinical characteristics. *Thoracic cancer***6**: 534-538.
- ZITVOGEL L, TESNIERE A, KROEMER G. 2006. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews Immunology***6**: 715-727.
- 



## EKLER

## EK 1 ETİK KURUL ONAYI

		GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU				
BAŞVURU BİLGİLERİ	Araştırmanın Açık Adı	Tümör İmmünesinde Wwox Proteininin Rolü				
	Koordinatör / Sorumlu Araştırmacı	Dr. Öğr. Üyesi Bahadır BATAR/ TNKÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji				
	Etik Kurul Toplantı Tarihi	26.11.2019				
	Araştırma Protokol Numarası	2019.205.11.02				
	Araştırma Karar Numarası	02				
	Araştırmanın Türü	Prospektif <input checked="" type="checkbox"/>	Retrospektif <input type="checkbox"/>	Diğer:		
	Araştırmanın Destekleyicisi	TÜBİTAK <input type="checkbox"/>	TNKÜ BAP <input checked="" type="checkbox"/>	Araştırmacı <input checked="" type="checkbox"/>	Diğer:	
	Araştırmanın Bütçesi	14.958 ₺				
	Araştırmanın Merkezi	Tek Merkezli <input checked="" type="checkbox"/>	Çok Merkezli <input type="checkbox"/>			
	KARAR BİLGİLERİ	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının oy birliği ile karar verilmiştir.				
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
Üyvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Araştırma ile İlişki		Katılım *	İmza	
Prof. Dr. ....	Biyofizik	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	imza
Prof. Dr. ....	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	imza
Prof. Dr. ....	Tıbbi Biyokimya	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	imza
Doç. Dr. ....	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	imza
Dr. Öğr. Üyesi ....	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	imza
Dr. Öğr. Üyesi ....	Tıbbi Biyokimya	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	imza
Dr. Öğr. Üyesi ....	Tıbbi Mikrobiyoloji	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	imza
Dr. Öğr. Üyesi L.....	Biyostatistik	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	imza
Dr. Öğr. Üyesi .....	Ortopedi ve Travmatoloji	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	imza
Dr. Öğr. Üyesi .....	İç Hastalıkları	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	imza
Dr. Öğr. Üyesi .....	İç Hastalıkları Hemşireliği	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	imza
*: Toplantıda Bulunma						
Etik Kurul Başkanı Üyvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. .... İmza: imza						