TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜMÖR HÜCRELERİNDEKİ PD-L1 EKSPRESYONUNUN ANJİYOGENEZ VE İNVAZYON ÜZERİNE ETKİSİ

Cansu BABAHAN

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hakan AKBULUT

ANKARA

2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜMÖR HÜCRELERİNDEKİ PD-L1 EKSPRESYONUNUN ANJİYOGENEZ VE İNVAZYON ÜZERİNE ETKİSİ

Cansu BABAHAN

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hakan AKBULUT

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün BAP-17L0230002 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2017

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Tümör Hücrelerindeki PD-L1 Ekspresyonunun Anjiyogenez ve İnvazyon Üzerine Etkisi" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler ve yorumlar bana aittir.

Yukarda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Cansu BABAHAN

11.08.2017

İmza



KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'nda Cansu BABAHAN tarafından hazırlanan "Tümör Hücrelerindeki PD-L1 Ekspresyonunun Anjiyogenez ve İnvazyon Üzerine Etkisi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11.08.2017

İmza
Prof. Dr. Ahmet DEMİRKAZIK
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Prof. Dr. Hakan AKBULUT
Ankara Üniversitesi
Üye

İmza
Prof. Dr. Ahmet ÖZET
Gazi Üniversitesi
Üye

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

İmza
Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Vekili

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ii
Çizelgeler	vi
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser Epidemiyolojisi	1
1.2. Karsinogenez	2
1.2.1. Tümör Hücrelerinin Özellikleri	4
1.3. Anjiyogenez	7
1.3.1. Tümör Hücrelerinde Anjiyogenez	8
1.3.2. Anjiyogenezde Rol Oynayan Faktörler	10
1.4. İmmün Sistem ve Kanser	16
1.5. Kanser Tedavisi	21
1.5.1. İmmünoterapi	22
1.5.2. Kanserde Anti-Anjiyogenik Tedaviler	24
1.5.3. İmmünoterapi ve Anti-Anjiyogenez Kombine Tedavisi	24
2. GEREÇ ve YÖNTEM	26
2.1. Hücre Kültürü	26
2.2. Akım Sitometrisi ile Tümör Hücrelerinde PD-L1 İfade Tayini	26
2.3. Sitotoksisite Deneyi ile Hücre Canlılığının Ölçülmesi	27
2.4. Belirlenen Dozların Tümör Hücrelerine Uygulanması	28

2.5. Tümör Hücrelerinin Gen İfade Tayini 29

2.5.1. RNA İzolasyonu 29

2.5.2. RNA Konsantrasyonu ve Kalitesi Tayini 29

2.5.3. Genomik DNA Eliminasyonu ve cDNA Sentezi 30

2.5.4. Primer- Prob Tasarımı 30

2.5.5. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR) 31

2.5.6.PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü 32

2.6. İstatistik 32

3. BULGULAR 33

3.1. Akım Sitometrisi ile Tümör Hücrelerinin PD-L1 İfade Tayini Sonuçları 33

3.2. Hücrelere Uygulanan Anti-PD-L1 Monoklonal Antikoru Avelumabın Sitotoksisite Sonuçları 35

3.3. RNA Örneklerinin Saflık ve Konsantrasyonları 37

3.4. Belirlenen Dozlarda Hücrelere Uygulanan Avelumabın Tümör Hücrelerindeki Anjiyogenik Gen İfadeleri Üzerine Etkileri 39

3.4.1. VEGFA Gen İfadesi 39

3.4.1.1. LNCAP Hücrelerindeki VEGFA Gen İfadesi 40

3.4.1.2. MDA-MB-231 Hücrelerindeki VEGFA İfadesi 41

3.4.1.3. DU145 Hücrelerindeki VEGFA Gen İfadesi 42

3.4.1.4 MDA-MB-435 Hücrelerindeki VEGFA Gen İfadesi 44

3.4.2. Hücrelerdeki EGFR Gen İfadesi 45

3.4.2.1. LNCAP Hücrelerindeki EGFR Gen İfadesi 46

3.4.2.2. MDA-MB-231 Hücrelerindeki EGFR Gen İfadesi 47

3.4.2.3. DU145 Hücrelerindeki EGFR Gen İfadesi 49

3.4.2.4. MDA-MB-435 Hücrelerindeki EGFR Gen İfadesi 50

3.4.3. Hücrelerdeki MMP-9 Gen İfadesi 51

3.4.3.1. LNCAP Hücrelerindeki MMP-9 Gen İfadesi 52

3.4.3.2. MDA-MB-231 Hücrelerindeki MMP-9 Gen İfadesi 53
3.4.3.3. DU145 Hücrelerindeki MMP-9 Gen İfadesi 54
3.4.3.4. MDA-MB-435 Hücrelerindeki MMP-9 Gen İfadesi 56
3.4.4. Hücrelerdeki bFGF Gen İfadesi 57
3.4.4.1. LNCAP Hücrelerindeki bFGF Gen İfadesi 58
3.4.4.2. MDA-MB-231 Hücrelerindeki bFGF Gen İfadesi 58
3.4.4.3. DU145 Hücrelerindeki bFGF Gen İfadeleri 59
3.4.4.4. MDA-MD-435 Hücrelerindeki bFGF Gen İfadesi 60
3.4.5. Hücrelerdeki TGF-beta Gen İfadesi 62
3.4.5.1. LNCAP Hücrelerindeki TGF-beta Gen İfadesi 62
3.4.5.2. MDA-MB-231 Hücrelerindeki TGF-beta Gen İfadesi 63
3.4.5.3. DU145 Hücrelerindeki TGF-beta Gen İfadesi 64
3.4.5.4. MDA-MB-435 Hücrelerindeki TGF-beta Gen İfadesi 66
3.4.6. Hücrelerdeki CDH1 Gen İfadesi 67
3.4.6.1 LNCAP Hücrelerindeki CDH1 Gen İfadesi 68
3.4.6.2 MDA-MB-231 Hücrelerindeki CDH1 Gen İfadesi 69
3.4.6.3 DU145 Hücrelerindeki CDH1 Gen İfadesi 69
3.4.6.4 MDA-MB-435 Hücrelerindeki CDH1 Gen İfadesi 70
3.5. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü 71
4. TARTIŞMA 72
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 75
ÖZET 76
SUMMARY 77
KAYNAKLAR 78
ÖZGEÇMİŞ 84

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında immün sistem kontrol noktalarından biri olan PD-L1'i baskılayarak immün sistemi aktive eden anti-PD-L1 antikoru ile anjiyogenez arasındaki bağlantı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tümöre karşı geliştirilebilecek yeni tedavi seçenekleri tartışılmıştır. Bu araştırma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün BAP-17L0230002 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tamamen tesadüfler sonucu gelip başvuruda bulunduğum Tümör Biyolojisi yüksek lisans programı sürecinde desteğini, anlayışını, bilgisini ve iyiliğini esirgemeyip bana çok şanslı olduğumu hissettiren ve eğitim süresi boyunca pratik ve doğru düşünebilmemi sağlayan sayın hocam ve danışmanım Prof. Dr. Hakan AKBULUT'a ne kadar teşekkür etsem az kalır.

Laboratuvara geldiğim günden beri güler yüzünü, desteğini ve sevgisini esirgemeyen Nalan AKGÜN'e çok teşekkür ederim. Yüksek lisansa başladığım günden beri tüm bilgilerini hiç sıkılmadan, büyük bir sabırla benimle paylaşan ve tez döneminde ettikleri yardımlar için edebileceğim tüm teşekkürleri ettiğim ve büyük bir minnet duyduğum can arkadaşlarım Gizem SONUGÜR ve Müge ÖÇAL'a tekrar tekrar çok teşekkür ederim. Zorlu tez sürecinde umutsuzluğa kapıldığım zamanlarda bana destek olup birlikte umutsuzlandığım, kendi deneyleriymiş gibi titizlenerek yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen can arkadaşım Samira ABDİ ABGARMİ'ye çok teşekkür ederim.

Daha iyiyi, daha güzeli arama yolunda hep arkamda olan, umutsuzluğa kapıldığımda geri adım atmamı engelleyip beni hep gönüllerinin merkezinde tutan ve haklarını ömrüm boyunca ödeyemeyeceğim canım babam Mehmet Emin BABAHAN'a, canım annem Nazire BABAHAN'a, canım ablam Derya BABAHAN'a ve canım kardeşim Ahmet BABAHAN'a minnetle, sevgiyle teşekkür ederim. İyi ki varsınız…

SİMGELER VE KISALTMALAR

BRCA1,2	Breast Cancer Susceptibility A 1, 2
DDT	Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane
EBV	Epstein-Barr Virüsü
HBV	Hepatit B Virüsü
HPV	Human Papilloma Virus
TERT	Telomeraz Reverse Transkriptaz
TNF-a	Tümör Nekroz Faktör – alfa
PD-L1	Programlı Ölüm Ligandı-1
PD-1	Programlı Ölüm-1 Reseptörü
PF-4	Platelet Faktör 4
TSP-1	Trombospondin-1
VEGF	Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü
VEGFR-1	Vasküler Endoteliyal Büyüme faktörü Reseptörü-1
Ang1, 2	Angiopoietin 1, 2
PECAM	Platelet Endoteliyal Hücre Adezyon Molekülü
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
PDGF-BB	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
TGF-β	Transforme edici Büyüme Faktörü- β
PAI-1	Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1
GM-CSF	Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
PIGF-1,2	Plasental Büyüme Faktörü-1, 2
Treg	Baskılayıcı T hücre
MDSC	Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücre
ECM	Hücre Dışı Matriks
EMT	Epitelyal Mezenkimal Geçiş
MMP-9	Matriks Metalloproteinaz-9
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
MAPK	Mitojen Aktice Edici Protein Kinaz
PI3K	Fosfatidilinozitol-3 kinaz
PKC	Protein Kinaz C
IL-10	İnterlökin-10
PGE2	Prostoglandin E2
APC	Antijen Sunan Hücre (ASH)
MHC	Major Histocompatibility Complex
TCR	T Hücre Reseptörü
CTLA-4	Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen-4
FBS	Fötal Sığır Serumu
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit

DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
MEM-Eagle	Minimum Essential Media- Eagle
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Türkiye'de erkeklerde en sık görülen 10 kanser türünün yaşa bağlı hızları	2
Şekil 1.2.	Türkiye'de kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün yaşa bağlı hızları	2
Şekil 1.3.	Tümör oluşumunu etkileyen faktörler	4
Şekil 1.4.	Tümör hücrelerinin temel özellikleri	7
Şekil 1.5.	Tümör hücrelerinde meydana gelen damar oluşum basamakları	10
Şekil 1.6.	İmmün sistemde rol alan elemanlar	17
Şekil.1.7.	Tümör hücrelerinin immün sistemden kaçış basamakları	18
Şekil 1.8.	T hücrelerinin aktive olabilmesi için ihtiyaç duyduğu sinyaller	20
Şekil 3.1.	Akım sitometri analizi sonrasında saptanan MDA-MB-435, DU145, G361 ve A-375 hücrelerindeki düşük düzeydeki PD-L1 ifadeleri	34
Şekil 3.2.	Akım sitometri analizi sonrasında saptanan MDA-MB-468, WM115, A549 ve MCF-7 hücrelerindeki orta düzeydeki PD-L1 ifadeleri	34
Şekil 3.3.	Akım sitometri analizi sonrasında saptanan HT-29, LNCAP ve MDA-MB-231 hücrelerindeki yüksek düzeydeki PD-L1 ifadeleri	35
Şekil 3.4.	MDA-MB-435 hücrelerine uygulanan dokuz Avelumab dozunun hücre canlılığı üzerine etkisi	36
Şekil 3.5.	MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan dokuz Avelumab dozunun hücre canlılığı üzerine etkisi	36
Şekil 3.6.	DU145 hücrelerine uygulanan dokuz Avelumab dozunun hücre canlılığı üzerine etkisi	37
Şekil 3.7.	LNCAP hücrelerine uygulanan dokuz Avelumab dozunun hücre canlılığı üzerine etkisi	37
Şekil 3.8.	24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki VEGFA gen ifade oranlar.	41
Şekil 3.9.	72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki VEGFA gen ifade oranları	41
Şekil 3.10.	24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MD- MB-231 hücrelerindeki VEGFA gen ifade oranları	42
Şekil 3.11.	72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki VEGFA gen ifade oranları	42
Şekil 3.12.	24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki VEGFA gen ifade oranları	43

Şekil 3.13. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki VEGFA gen ifade oranları 44
Şekil 3.14. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki VEGFA gen ifade oranları 45
Şekil 3.15. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki VEGFA gen ifade oranları. 45
Şekil 3.16. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki EGFR gen ifade oranları. 47
Şekil 3.17. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki EGFR gen ifade oranları. 47
Şekil 3.18. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki EGFR gen ifade oranları. 48
Şekil 3.19. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki EGFR gen ifade oranları 48
Şekil 3.20. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki EGFR gen ifade oranları 49
Şekil 3.21. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki EGFR gen ifade oranları 50
Şekil 3.22. 24 saat saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki EGFR gen ifade oranları 51
Şekil 3.23. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki EGFR gen ifade oranları 51
Şekil 3.24. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki MMP-9 gen ifade oranları. 52
Şekil 3.25. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki MMP-9 gen ifade oranları. 53
Şekil 3.26. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki MMP-9 gen ifade oranları 54
Şekil 3.27. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki MMP-9 gen ifade oranları 54

Şekil 3.28. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki MMP-9 gen ifade oranları 55
Şekil 3.29. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki MMP-9 gen ifade oranları 55
Şekil 3.30. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki MMP-9 gen ifade oranları 56
Şekil 3.31. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki MMP-9 gen ifade oranları 57
Şekil 3.32. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki bFGF gen ifade oranları 58
Şekil 3.33. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki bFGF gen ifade oranları 59
Şekil 3.34. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki bFGF gen ifade oranları 60
Şekil 3.35. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki bFGF gen ifade oranları 60
Şekil 3.36. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki bFGF gen ifade oranları 61
Şekil 3.37. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki bFGF gen ifade oranları 61
Şekil 3.38. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki TGF-beta gen ifade oranları 63
Şekil 3.39. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki TGF-beta gen ifade oranları 64
Şekil 3.40. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki TGF-beta gen ifade oranları 64
Şekil 3.41. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki TGF-beta gen ifade oranları 65
Şekil 3.42. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki TGF-beta gen ifade oranları 65

Şekil 3.43. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki TGF-beta gen ifade oranları 66
Şekil 3.44. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki TGF-beta gen ifade oranları 67
Şekil 3.45. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki CDH1 gen ifade oranları 68
Şekil 3.46. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki CDH1 gen ifade oranları 69
Şekil 3.47. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki CDH1 gen ifade oranları 70
Şekil 3.48. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki CDH1 gen ifade oranları 70
Şekil 3.49. EZ-PZR amplifikasyonu yapılan örneklerin %2'lik jelde yürütülmesi 71

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Dizaynı yapılan primer ve prob dizileri	31
Çizelge 2.2.	qPZR reaksiyonları	31
Çizelge 3.1.	DU145 hücrelerinin spektrofotometre ile ölçülen saflık ve konsantrasyon değerleri	38
Çizelge 3.2.	LNCAP hücrelerinin spektrofotometre ile ölçülen saflık ve konsantrasyon değerleri	38
Çizelge 3.3.	MDA-MB-435 hücrelerinin spektrofotometre ile ölçülen saflık ve konsantrasyon değerleri	38
Çizelge 3.4.	MDA-MB-231 hücrelerinin spektrofotometre ile ölçülen saflık ve konsantrasyon değerleri	39
Çizelge 3.5.	Avelumab verilen hücrelerdeki VEGFA gen ifadesi oranları	40
Çizelge 3.6.	Avelumab verilen hücrelerdeki EGFR gen ifadesi oranları	46
Çizelge 3.7.	Avelumab verilen hücrelerdeki MMP-9 gen ifadesi oranları	52
Çizelge 3.8.	Avelumab verilen hücrelerdeki bFGF gen ifadesi oranları	57
Çizelge 3.9.	Avelumab verilen hücrelerdeki TGF-beta gen ifadesi oranları	62
Çizelge 3.10.	Avelumab verilen hücrelerdeki CDH1 gen ifadesi oranları	67

1. GİRİŞ

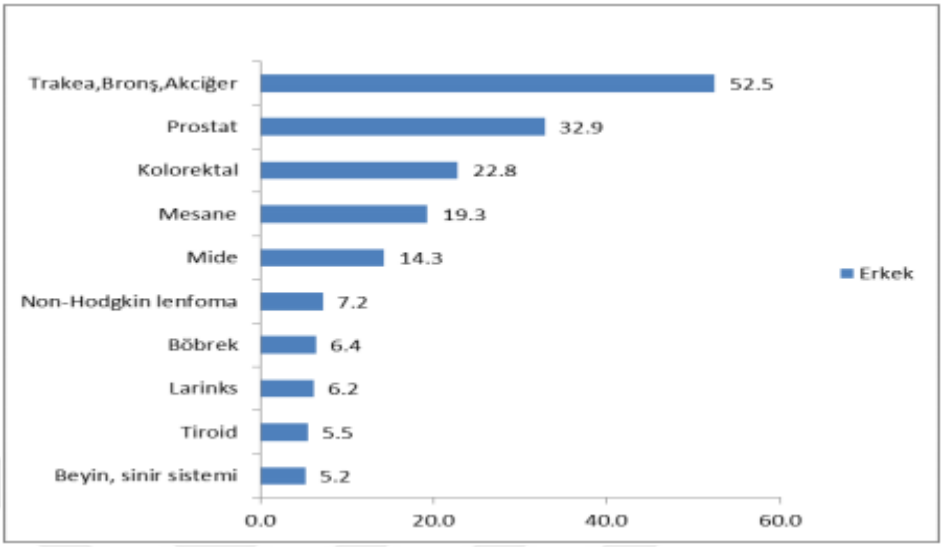
1.1. Kanser Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2011 verilerine göre kanser tüm dünyada en sık görülen kalp ve dolaşım sistemi hastalıklarından daha fazla ölüme sebep olmaktadır (Ferlay et al., 2015). 2012 yılı verilerine göre dünyada 14,1 milyon yeni kanser tanısı konulmuş olup ayrıca 8,2 milyon kansere bağlı ölüm meydana gelmiştir. Önümüzdeki 20 yıllık süreçte yeni vaka sayısının yaklaşık %50 artması beklenmektedir (Torre ve ark., 2015).

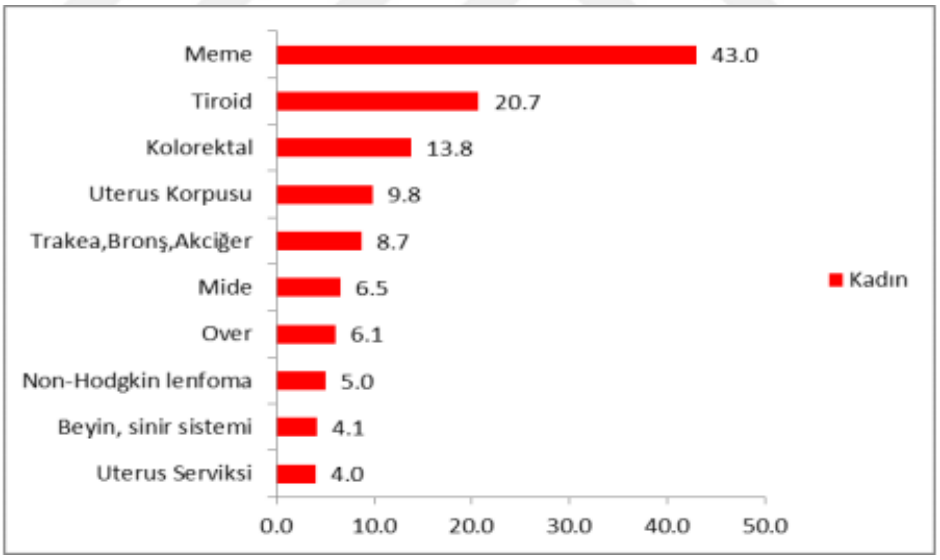
Akciğer ve meme kanserinin tüm dünyada en sık görülen kanser türleri olmasının yanında, erkekler ve kadınlarda kansere bağlı ölümler en fazla bu iki kanser türünde meydana gelmektedir. Gelişmiş ülkelerde prostat kanseri erkekler arasında en sık rastlanan kanser türüdür ve akciğer kanseri kadınlarda kansere bağlı ölümlerin başlıca sebebidir. Dünya genelinde sıklıkla karşılaşılan diğer kanser türleri erkeklerde karaciğer, mide ve kolon iken kadınlarda mide, serviks ve kolon kanseridir. Gelişmiş ülkelerde erkeklerde mesane kanseri ve kadınlarda rahim kanseri de sık karşılaşılan kanser türlerindendir. Az gelişmiş ülkelerde erkeklerde karaciğer ikinci ve mide kanseri üçüncü en sık karşılaşılan kanser türleridir ve kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenleridir (Torre ve ark., 2015).

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu verilerine göre, Türkiye'de kanser insidansının erkeklerde dünya insidansının üzerinde bir seyir izlediği ve kadınlarda dünya insidansından bir miktar daha düşük olduğu görülmektedir. Türkiye'deki kanser gelişim hızının, gelişmişlik düzeyi Türkiye'den daha yüksek olan Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika gibi ülkelere göre kanser gelişiminin hem kadınlarda hem de erkeklerde daha düşük bir hızda olduğu gösterilmiştir. Ülkemizde görülen ilk beş kanser türü oranlarının, dünyadaki ve diğer gelişmiş ülkelerde görülen oranlar ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Erkeklerde trakea, bronş ve akciğer kanseri, kadınlarda ise meme kanseri en sık görülen kanser türleridir. Şekil 1.1 ve 1.2'de

Türkiye'deki erkekler ve kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün yaşa göre standardize edilmiş hızları gösterilmiştir (kanser.gov, 2017).



Şekil 1.1. Türkiye'de erkeklerde en sık görülen 10 kanser türünün yaşa bağlı hızları (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 kişide) (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014) (kanser.gov, 2017)



Şekil 1.2. Türkiye'de kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün yaşa bağlı hızları (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 kişide) (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014) (kanser.gov, 2017)

1.2. Karsinogenez

Kanser hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve hücresel homeostazı kontrol eden genlerde meydana gelen mutasyonların bir sonucudur.

Mutasyona uğrayarak kanserin oluşmasına neden olan başlıca iki gen grubu vardır. Bunlar onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olarak isimlendirilmektedir. Onkogenler, normal proto-onkogenlerin nokta mutasyonları, kromozom yeniden düzenlenmeleri veya amplifikasyonu sonucunda fonksiyon kazanmasıyla meydana gelirler. Tümör baskılayıcı genler ise, normal hücresel düzenleyici genlerin kaybı veya inaktivasyonu sonucu oluşurlar. Onkogenlerin aşırı ifade olması ve/veya tümör baskılayıcı genlerin kaybı tümör oluşumunun asıl sürükleyicisidir (Guo ve ark., 2014).

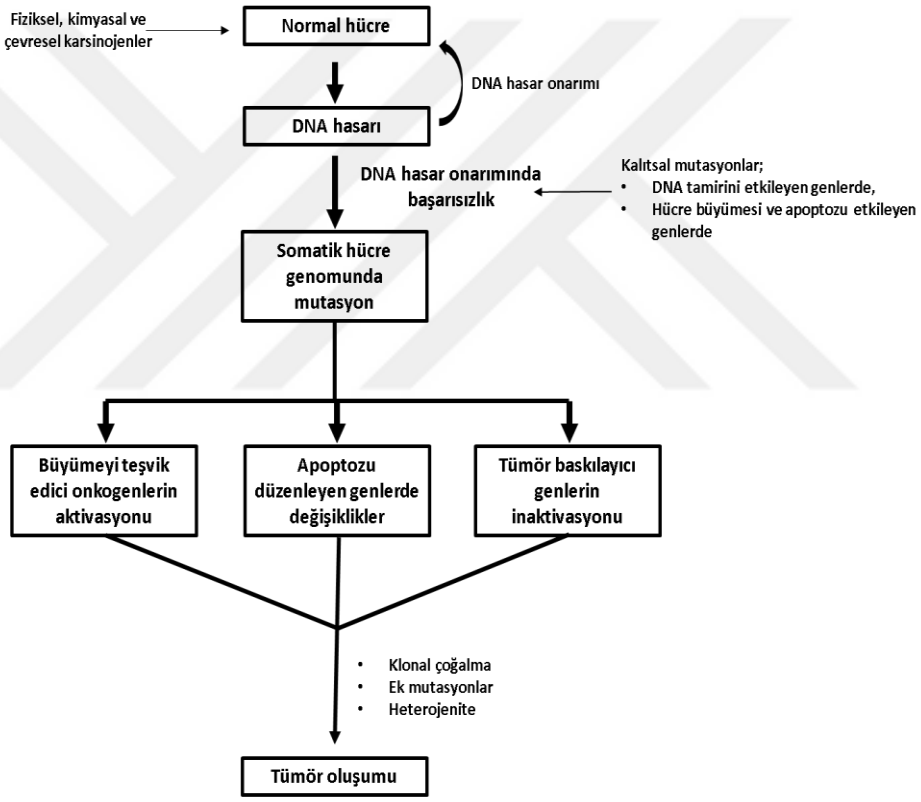
Retinoblastoma ve TP53 gibi klasik tümör baskılayıcı genler normalde hücre çoğalması ile ilgili kararları vermede, yaşlılık veya apoptoza girme olaylarında kritik roller oynadıkları için hücrenin bekçileri olarak adlandırılmaktadırlar. BRCA1 ve BRCA2 gibi onkogenler ise genomun bütünlüğünün devamını sağladıkları için ise bakıcı genler olarak adlandırılmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kanserlerin %85-90'ında somatik mutasyonlar etkili olurken, %10-15'inde germ hücrelerinden gelen (kalıtılan) mutasyonlar ön plandadır. Kalıtım yoluyla meydana gelen kanserlerde onkogenlerin aktivasyonundan çok, tümör baskılayıcı genler inaktive olmaktadır (Romero-Laorden ve Castro, 2017).

Biyolojik, fiziksel ve kimyasal olmak üzere üç gruba ayrılan karsinojenler, genlerde mutasyonların oluşmasına neden olmaktadır. Fiziksel karsinojenlere ultraviyole (UV) ve iyonize radyasyon örnek verilebilir. Bunlara maruz kalan bir hücre DNA'sında timidin dimerleri, tek veya çift zincir kırıklıkları ve proteinler ile DNA'nın çapraz bağlanması meydana gelerek melanomlara neden olduğu bilinmektedir (Sample ve He, 2017). Biyolojik karsinojenlere örnek olarak Human Papilloma Virüs (HPV)'nin serviks kanserine ve bazı deri kanserlerine, Epstein-Barr Virus (EBV)'nin Burkitt Lenfoma'ya ve nazofarenjial kanserlere, Hepatit B Virüsü (HBV)'nin karaciğer kanserine neden olduğu bilinmektedir (Devi, 2004; Fowler ve Bhimji, 2017 ve zur Hausen, 2009). Kimyasal karsinojenlere örnek olarak, böcek ilaçlamalarında kullanılan Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)'nin karaciğer kanseri riskini arttırdığı (Li ve Jennings, 2017), asbeste maruz kalmanın mezotelyoma neden olduğu

(Chen ve ark., 2017) ve sigaranın akciğer kanserine neden olan başlıca etkenlerden biri olduğu bilinmektedir (Dunn ve Kramer, 2016).

Hücrede meydana gelen bir mutasyonun, DNA tamir mekanizmalarındaki mutasyonlar nedeniyle onarılamamasından dolayı geri dönüşümsüz genetik değişiklikler meydana gelir. Mutasyona uğrayan bu hücrelerin çoğalması ve ek mutasyonların oluşmasıyla sonuçta kötü huylu ve invaziv tümör hücreleri oluşur (Devi, 2004). Şekil 1.3.'de tümör oluşumunun kısa bir özeti yapılmıştır.



Şekil 1.3. Tümör oluşumunu etkileyen faktörler

1.2.1. Tümör Hücrelerinin Özellikleri

Normal dokularda büyümeyi teşvik edici sinyallerin üretimi ve salınımı kontrollü bir şekilde yapılmaktadır. Hücreler belli bir büyüme kapasitesine ulaştıklarında büyümeyi engelleyici sinyaller devreye girer ve hücre büyümesi durur. Bu kontrol

sayesinde normal dokuların yapı ve fonksiyonunun devamlılığı sağlanmış olur. Kanser hücreleri büyümeyi engelleyici bu sinyalleri azaltarak sürekli çoğalabileceği bir ortam yaratır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kanser hücreleri devamlı çoğalabilmek için çeşitli yollara başvurmaktadır. Büyüme faktörü ligandlarını üreterek otokrin proliferatif uyarıya sürekli cevap verebilmekte ve çoğalma sinyallerinin devamını sağlayabilmekte, stromada bulunan normal hücrelere sinyaller gönderip onları uyararak kendi için gerekli büyüme faktörlerini sentezletebilmektedir. Ayrıca yüzey reseptörlerini arttırarak liganddan bağımsız proliferasyonu sağlayabilmektedir. Böylece normal hücrelerin büyümek için çevresinden aldığı büyüme sinyallerini kendi üreterek kontrolsüz bir şekilde çoğalır.

Tümör hücrelerinin büyümeyi teşvik edici sinyalleri sürekli aktif edebilmesinin yanında hücre çoğalmasını negatif bir şekilde düzenlemeye yarayan tümör baskılayıcı genlerin aktivitesini de engellemektedir (Burkhart ve Sage, 2008).

Normal dokularda meydana gelen apoptoz, hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengeyi ayarlar ve böylece doku homeostazisi korunmuş olur. Ancak kanser hücreleri, apoptozu teşvik eden pro-apoptotik proteinleri (Bcl-2 vb.) bozarak veya ekspresyonlarını azaltarak hücrelerin ölüme gitmesini engelleyebilir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kromozomların uçları, bu bölgeleri rekombinasyondan ve degredasyondan koruyan ve telomer adı verilen özel kromatin yapıları ile kaplıdır. Omurgalılardaki telomerler, spesifik proteinlerle bağlı tekrarlı TTAGGG dizilerinden oluşur (Blasco, 2005). Her hücre bölünmesinde bu telomerlerin TTAGGG tekrarları kısalır. Telomerlerler kısaldıkça kromozomlar korunamayacağından kromozomal instabilite meydana gelir ve hücre yaşlanmaya gider (Blackburn, 2001). Telomeraz, telomeraz reverse transkriptaz (Tert) tarafından kodlanan bir reverse transkriptaz enzimidir ve kromozom uçlarındaki telomerlere TTAGGG nükleotid tekrarları ekleyerek hücrenin yaşlanmasını önlemektedir. Sadece germ hücreleri ve bazı kanser hücreleri kritik telomer kısalmasını önleyen ve hücre canlılığını devam ettiren telomerazı yüksek

oranda eksprese ederler. Böylece tümörler yaşlanmadan canlı kalıp sürekli çoğalma yeteneği kazanırlar (Blasco, 2005).

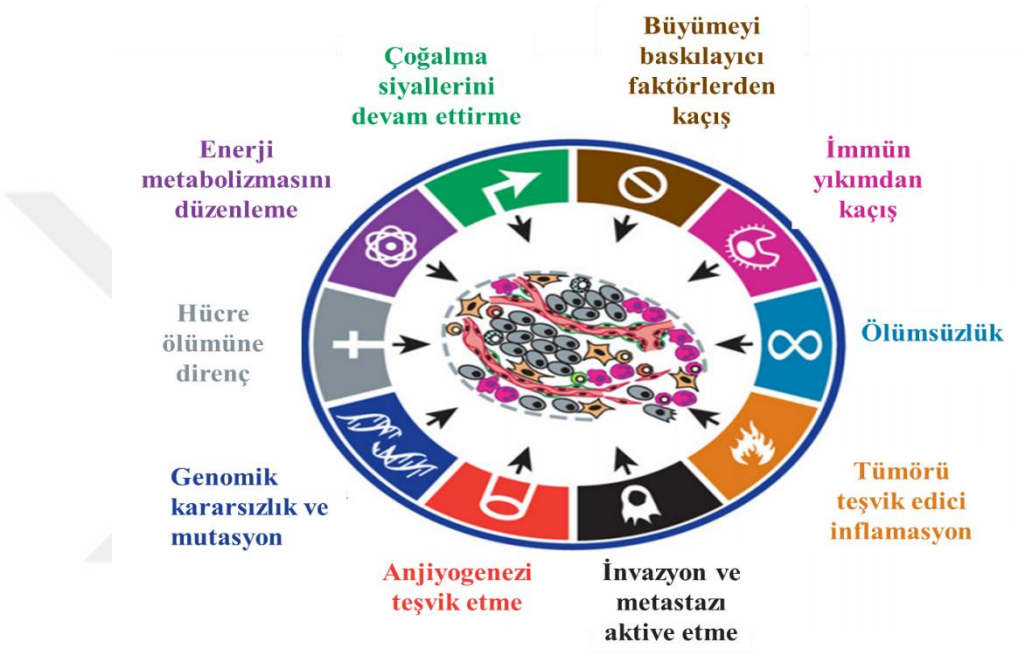
Normal dokular gibi tümörlerin de hayatta kalabilmek için besin ve oksijeni alıp, metabolik atıkları ve karbondioksiti atması gerekmektedir. Bu ihtiyaçlarını karşılayabilmek için de yeni damar oluşturması gerekmektedir. Embriyogenez boyunca damarlanma, yeni endotelyal hücrelerinin oluşmasını, tüp içerisinde birleşmelerini ve var olan damarlardan yeni damarların oluşmasını içermektedir. Bu morfogenez sonrasında normal damarlanma çok nadir meydana gelir. Erişkin dönemde yara iyileşmesi ve kadınlarda menstrüal döngü gibi fizyolojik durumlarda anjiyogenez geçici bir süreliğine meydana gelir. Buna karşılık tümörlerde anjiyogenez hemen her zaman aktiftir (Hanahan ve Folkman, 1996).

Tümör hücreleri lokal invazyon ve uzak metastaz yapabilmek için epitel hücre yapılarını mezenkimal yapıya dönüştürerek (epitelyal mezenkimal geçiş) ve epitel hücrelerini bir arada tutan E-kaderin molekülünün ekpresyonun azaltarak dokular arası geçişi kolaylaştırır (Singhai ve ark., 2011).

Normal hücreler oksijen varlığında sitoplazmada glukozu glikoliz aracılığıyla piruvata dönüştürdükten sonra mitokondride karbondioksite dönüştürür. Bu işleme oksidatif fosforilasyon denmektedir. Oksijenin olmadığı durumlarda ise anaerobik glikoliz tercih edilir ve oksijenli ortamdakine göre daha az piruvat, oksijeni fazlaca tüketen mitokondriye gönderilir. Tümör hücreleri çok hızlı çoğaldıklarından, artan enerji ve biyosentez ihtiyaçlarını karşılayabilmek için oksijen varlığında bile anaerobik glikoliz yaparak enerji metabolizmalarını yeniden düzenlemişlerdir. Çünkü anaerobik glikoliz, oksidatif fosforilasyona göre daha hızlı ATP üretmektedir. Aerobik glikoliz adı verilen bu program, tümör hücrelerine özellikle uygun olmayan koşullarda bile yaşamını devam ettirebilme imkanını sağlar (Jones ve Thompson, 2009).

İmmün sistem tümörlerin gelişmesine karşı vücudu koruyan en önemli savunma mekanizmasıdır. Tümör hücreleri immün sisteme yakalanmamak için çeşitli mekanizmalara sahiptir. Bazı tümörler, immün sistemin tanıyıp yok edebileceği

antijenleri eksprese etmeyi durdurarak veya dendritik hücrelerin tümör antijenlerini, tümör hücrelerini öldüren sitotoksik T hücrelerine sunmasını engelleyerek kendini immün sistemden koruyabilmektedir. Bazı tümörler ise immün sistemi baskılayacak TNF-α, PD-L1 gibi molekülleri üreterek canlılıklarını devam ettirebilmektedirler (Hanahan ve Weinberg, 2011).



Şekil 1.4. Tümör hücrelerinin temel özellikleri (Hanahan ve Weinberg ,2011)

1.3. Anjiyogenez

Var olan kan damarlarından yeni kan damarlarının oluşması süreci olan anjiyogenez organizmanın normal gelişimi ve büyümesi için elzemdir (Raica ve ark., 2009).

Normal hücreler anjiyogenik değildirler, anjiyogenetik faktörlerden çok anjiyogenez inhibitörleri (anjiostatin, interferonlar, interlökin -1, -12, retinoik asit, protamin, platelet faktör 4 (PF-4), trombospondin-1 (TSP-1), doku metalloproteinaz inhibitörü) salgılarlar. Dolayısıyla normal bir hücrenin malign dönüşüme uğrarken aynı zamanda anjiyogenik fenotip de kazanması gerekmektedir. Normalde

anjiyogenezi teşvik eden pro-anjiyogenik moleküller ile anjiyogenezi inhibe eden anti-anjiyogenik moleküller anjiyogenik dönüşüm adı verilen bir mekanizmayla denge durumundadır. Düşük oksijen ve pH gibi metabolik stresler, çoğalan hücrelerin baskı yapması gibi mekanik stresler, immün/inflamatuvar cevaplar ve anjiyogenezi düzenleyicilerin üretimini kontrol eden tümör baskılayıcı genlerin inhibe olmasına veya onkogenlerin aktive olmasına neden olan genetik mutasyonlar gibi çeşitli sinyaller bu dönüşümü tetiklemektedir (Kerbel, 2000).

Anjiyogenezi uyardığı ve inhibe ettiği iyi bilinen faktörler sırasıyla vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve trombospondin-1 (TSP-1)'dir. TSP-1, anjiyogenik dönüşümün anahtar bir dengesidir ve endotelyal hücreler üzerindeki transmembran reseptörlere bağlanarak anjiyogenez uyarılarını baskılayacak sinyal oluşumuna neden olur (Kazerounian ve ark., 2008).

1.3.1. Tümör Hücrelerinde Anjiyogenez

Tümör hücreleri anjiyogenezi arttırmak için VEGF ekspresyonunu arttırır ve anjiyogenezi inhibe eden TSP-1'in ekpsresyonunu azaltır (Folkman, 2006).

Her tümör hücresi başlangıçta anjiyogenik özelliğe sahip değildir. Kılcal damarlar etrafında damara en fazla 200-300 mikron mesafe olacak şekilde dizilirler ve gerekli besinleri ve oksijeni difüzyonla temin ederler. Bulundukları bölgede yeni damar oluşumuna gerek kalmadan 2-3 mm kadar büyüyebilirler (Folkman, 2006). Ancak büyüyüp çoğalabilmeleri ve başka organa metastaz yapabilmeleri için yeni kan damarlarına ihtiyaç duyarlar (Carmeliet ve Jain, 2000).

Tümör içerisindeki kan damarları, ortamda anjiyogenezi uyaran sinyallerin aşırı derecede olmasından dolayı anjiyogenezi sürekli aktive ederler. Tümörlerde damarlanma; daha kısa sürede meydana gelmiş kapiller çıkıntılara, karmaşık ve aşırı damar dallanmalarına, oransız ve genişlemiş damarlara, düzensiz kan akışına ve sızıntılı bir yapıya sahiptir (Nagy ve ark., 2010).

Yapılan çalışmalarda anjiyogenezin insanlardaki ve hayvan modellerindeki invaziv kanserlerin gelişiminin erken evrelerinde oluşmaya başladığı gösterilmiştir. Çeşitli organlarda ortaya çıkan displazi ve in situ karsinoma içeren premalign, invaziv olmayan lezyonların histolojik analizlerinde anjiyogenik dönüşümün oluşmaya başladığı gösterilmiştir (Hanahan ve Folkman,1996; Raica ve ark., 2009).

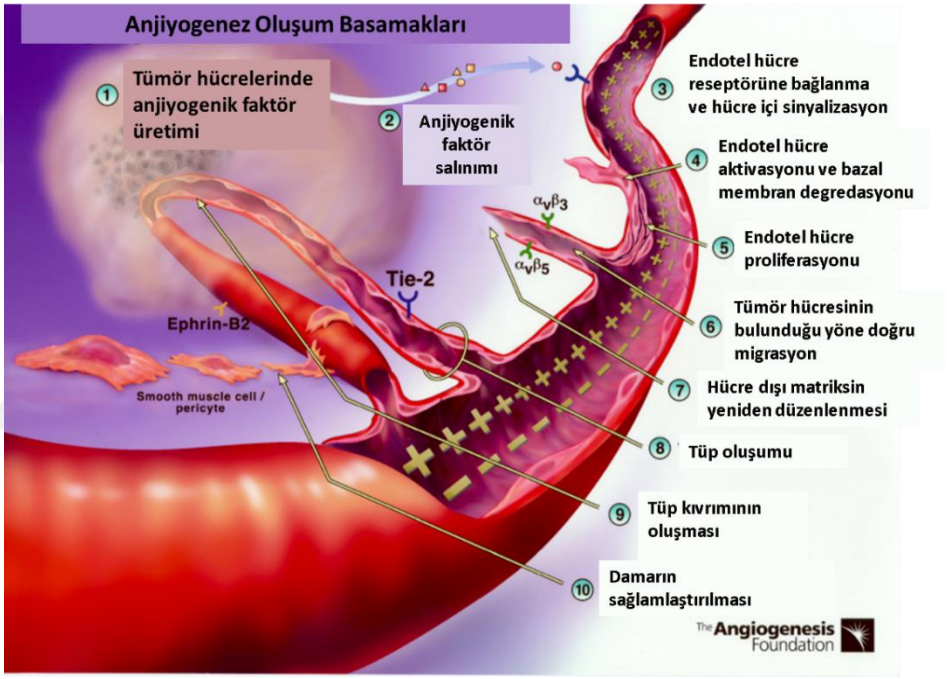
Çeşitli tümörlerde farklı modellerde damarlanmaların meydana geldiği gözlenmiştir. Örneğin, pankreatik duktal adenokarsinomlar gibi aşırı derecede agresif tümör tipleri içeren bazı tümörlerde damarlanma azdır ve büyük oranda avasküler ve etkin bir şekilde anti-anjiyogenik olan stromal elemanları ile dolu iken, insan renal ve pankreatik nöroendokrin karsinomaları içeren diğer birçok tümör anjiyogenik kapasitesinin yüksek olmasından dolayı yoğun damarlı bir yapıya sahiptir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Tümör damarlarının tomurcuklanma, yarılma yoluyla veya kemik iliği kökenli endotelyal öncü hücrelerin birleşmesiyle gelişebilmesine ek olarak tümör hücreleri var olan damarlar ile de işbirliği yapabilir. Tomurcuklanma yoluyla anjiyogenez sırasında, damarlar VEGF'ye cevap olarak genişleyerek sızıntılı bir yapıya dönüşür. Anjiyogenezin başarıyla gerçekleşmesi için Ang1, birleşme molekülü VE-kaderin ve platelet endotelyal hücre adezyon molekülü (PECAM) damarları sıkılaştırır. Ang2 ve proteinazlar var olan bazal membranın ve doku içi matriksin eritilmesine aracılık ederler.

Yeni oluşan damarların olgunlaşması için perisitlere ve düz kas hücrelerine ihtiyaçları vardır. Platelet kökenli büyüme faktörü- BB (PDGF-BB) düz kas hücrelerinin ortama gelmesine yardımcı olurken, transforme edici büyüme faktörü-b1 (TGF-b1) ve Ang1/Tie2 endotelyal ve düz kas hücreleri arasındaki etkileşimi kuvvetlendirmektedir. PAI-1 gibi proteinaz inhibitörleri yeni oluşan damarların etrafındaki geçici hücre dışı matriksin parçalanmasını önlemektedir (Yancopoulos ve ark., 2000).

VEGF, bFGF, granülosit makrofaj-koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve angiopoietinlerin endotelyal öncü hücrelerin hareketinde etkileri olduğu bulunmuştur (Carmeliet ve Jain, 2000).

VEGF'nin VEGFR-1 ve nörofilin-1 gibi çözünür VEGF reseptörlerine bağlanması sonucu VEGF'nin anjiyogenik aktivitesi azalmaktadır. Birçok anjiyogenez inhibitörünün tümör anjiyogenezini baskıladığı bilinmektedir ancak bunların normal damar gelişimindeki rolleri hala bilinmemektedir.



Şekil 1.5. Tümör hücrelerinde meydana gelen damar oluşum basamakları (angio.org, 2008)

1.3.2. Anjiyogenezde Rol Oynayan Faktörler

1.3.2.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-A (VEGFA)

Endotel hücrelerinin aktivasyonunda esas rolü oynayan faktör VEGF'dir. Ligandları olan VEGF-A, B, C, D ve E ve plasental büyüme faktörü 1 ve 2 (PIGF-1,2), damar ve lenfatiklerdeki endotel hücreleri üzerinde bulunan reseptörlerine

bağlanırlar. Bu reseptörler tirozin kinaz grubuna ait olup VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR, FLK-1) ve VEGFR-3 (Flt-4) olarak isimlendirilmektedirler.

VEGFR-1 endotel hücreleri ile bazı tümör hücrelerinde eksprese edilir ve esas olarak VEGF'nin endotel migrasyonunu uyarıcı etkisine aracılık eder. VEGFR-2 endotel hücreleri, primitif hematopoietik kök hücreler ve bazı tümör hücreleri ile az sayıda erişkin hücresinde eksprese edilir ve VEGF ligandlarının (VEGF, VEGF-C ve VEGF-D) endotel hücrelerinin proliferasyonu, sağ kalımı ve damar geçirgenliği etkilerine aracılık eder. VEGFR-3 esas olarak VEGF-C ve VEGF-D'yi bağlar, lenfatik ve tümör endotel hücrelerinde eksprese edilir ve anjiyogenezin gelişmesinden sorumludur.

Tümör anjiyogenezinden başlıca sorumlu VEGFR-2 aracılı sinyal iletim yoludur. VEGFR-2'nin bloke edilmesi sonucunda hücre proliferasyonu, migrasyonu, sağkalımı ve damar permeabilitesi azalmaktadır (Ott ve ark., 2015).

VEGF-A geni, embriyonik ve postnatal gelişim sırasında ve sonrasında endotelyal hücrelerin homeostatik sağkalımında ve erişkinlerdeki fizyolojik ve patolojik durumlarda yeni damar gelişimini yönetmede görevli ligandları kodlar (Ferrara, 2009). Ayrıca endotel hücrelerin göçünü, proliferasyonunu, damarsal geçirgenliği ve tüp oluşumunu da sağlamaktadır.

VEGF ayrıca baskılayıcı T hücreler (Treg) ve miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC) gibi inhibitör immün hücre alt tiplerini teşvik ederek ve geliştirerek, dendritik hücre olgunlaşmasını baskılayarak, efektör T hücre cevaplarını azaltarak ve lenfositlerin gelişimini ve trafiğini değiştirerek çeşitli seviyelerdeki antitümör immüniteyi azaltmaktadır (Ohm ve Carbone, 2001).

Tümör hücre büyümesini ve immün baskılamayı kolaylaştırmada tümör anjiyogenezi, tümör ile ona karşı oluşan immün cevap arasındaki önemli bir bağlantıdır. Bu nedenle anjiyogenezin hedeflenmesi, başlıca T hücresel

immünoterapinin etkinliğini arttırmada efektif bir strateji olabilir. Çeşitli kanserlerde etkili tedavi sonuçları sağlayan VEGF blokajı, antitümör immün cevaplarının oluşmasını sağlamasına ek olarak tümör damarlanmasını da doğrudan inhibe etmektedir (Ott ve ark., 2015).

Daha önceki çalışmalarda anti-anjiyogenik tedavinin antitümör immüniteyi ortaya çıkardığı veya geliştirdiği buna karşılık immün sistemin anjiyogeneze neden olabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle antianjiyogenik ajanlar ile immünoterapi arasında iki yönlü bir bağlantı olduğu düşünülmektedir.

1.3.2.2. Fibroblast Büyüme Faktörü-2 (bFGF)

Fibroblast büyüme faktörü (FGF) ailesi, mitojenler üzerinde etkili 23 adet FGF sinyal polipeptidi içermektedir. FGF ailesi embriyonik gelişimde, erişkin organ sistemlerinin devamlılığında, doku yenilenmesinde, yara iyileşmesinde ve hematopoiezde önemli roller üstlenmektedir.

FGF-2, FGF ailesinin en çok çalışılan bir üyesidir ve aynı zamanda basic FGF (bFGF) olarak da adlandırılmaktadır. FGF-2, fizyolojik ve patolojik durumlarda hücrelerin büyümesi ve farklılaşmasında önemli bir düzenleyicidir (Akl ve ark., 2016).

FGF-2 çok güçlü bir pro-anjiyogenik büyüme faktörüdür. Endotel hücrelerindeki anjiyogenezi uyarıcı etkisini, hücre dışı matriksten (ECM), stromal hücrelerden veya tümör hücrelerinden salındıktan sonra bir parakrin yol aracılığıyla gerçekleştirmektedir. FGF-2 aynı zamanda endotel hücrelerinde otokrin roller de oynamaktadır.

FGF-2 ve reseptörü olan FGFR sinyali, tümör hücrelerinde patogenezi teşvik edecek şekilde bozukluğa uğramıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda FGF-2'nin tümör mikroçevresindeki tümörü teşvik eden anahtar molekül olduğu gösterilmiştir.

FGF-2 MEK/Erk sinyal yolağını aktive ederek epitelyal mezenkimal geçişi (EMT) arttırır. EMT'yi arttırdığı bilinen diğer bir faktör olan TGF-β ile FGF-2'nin kombinasyonu daha güçlü bir şekilde EMT'yi uyaracaktır. Çünkü TGF-β, FGF reseptörünün isoform dönüşümünü teşvik ederek reseptörün FGF-2'ye olan hücresel hassasiyetini arttırmaktadır (Kurimoto ve ark., 2016).

FGF-2'nin invaziv mesane kanserinin bir alt grubunda aşırı eksprese olduğu ve bu ekspresyonun da kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur. FGF eksprese eden bu kanser türlerinin, immün sistemin kontrol noktası inhibitörleri olan CTLA-4, PD-1 ve PD-L1' i yüksek seviyelerde ifade ettiği bulunmuştur. Hem FGF-2'nin etkisi hem de immün sistemin inhibe edilmesinden dolayı kolaylaşan EMT'nin, mesane kanserlerindeki kötü prognozun sorumlusu olduğu düşünülmektedir (McNiel ve Tsichlis, 2017).

Sağlıklı gönüllüler ile kanser hastalarındaki FGF-2 serum seviyeleri ile yapılan çalışmalarda, serumdaki FGF ifadesinin kanser hastalarında büyük oranda arttığı bulunmuştur. Endometriyal, kolorektal, özofagal, baş ve boyun, karaciğer, böbrek ve testis kanserlerinde yüksek FGF-2 ifadesi ile tümör evresi, büyüklüğü ve metastazı arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Ancak mesane, meme, akciğer ve prostat kanserlerinde böyle bir ilişki bulunamamıştır. Bu çalışmalar ışığında FGF-2'nin önemli bir tümör biyobelirteci ve potansiyel tedavi hedefi olabileceği üzerinde durulmaktadır (Akl ve ark., 2016).

1.3.2.3. Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9)

Matriks metalloproteinazlar çinko bağımlı endopeptidazların bir ailesidir. Doku yeniden şekillenmesi ve organ gelişimi gibi çeşitli fizyolojik işlemlerde, inflamatuvar işlemlerin düzenlenmesinde ve kanser gibi hastalıklarda kritik bir rol oynamaktadır. Günümüze kadar insanlarda toplam 23 adet MMP tanımlanmıştır (Kessenbrock ve ark., 2010).

Matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9), avasküler tümörlerdeki anjiyogenik anahtarın çevrilmesini sağlayarak tümör anjiyogenezi ve metastazında önemli bir rol oynar (Deryugina ve ark., 2014).

Matriks parçalayıcı enzim olan matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) tümör mikroçevresinde türetilmiş ve tümör hücreleri arasındaki matriks elemanlarınca bağlanmış olan VEGF'yi serbest bırakarak anjiyogenezi destekler. Bu enzimler ayrıca matriksi parçaladığı için açılan boşluklarda endotel hücrelerinin yeni damar tomurcukları ve kapiller tüpleri oluşturmasını da kolaylaştırır (Nakamura ve ark. 2007).

Yapılan bir çalışmada MMP-9 inhibitörlerinin tümördeki anjiyogenez geçişini zayıflattığı, tümör sayısını ve büyümesini azalttığı gösterilmiştir (Kessenbrock ve ark., 2010).

1.3.2.4. Transforme Edici Büyüme Faktörü-β (TGF-β)

Transforme edici büyüme faktörü- β yara iyileşmesi, immün sistemle ilişkili işlemler ve hücre proliferasyonu gibi birçok fizyolojik işlemlerde görev alan pleiotropik bir sitokindir.

TGF-β doku homeostazisinin devamlılığını sağlar ve hücresel proliferayonu, farklılaşmayı, sağkalımı, adezyonu ve hücresel mikroçevreyi düzenleyerek malign oluşumların tümör oluşturmasını engellemektedir (Young ve ark., 2015). Ancak tümör geliştikçe TGF-β genomunda mutasyonların birikmesinden dolayı, tümör hücreleri TGF-β'nın tümör baskılayıcı özelliğinden kurtulur. TGF-β'nın patolojik formu, tümör büyümesi ve invazyonuna, tümörlerin immün gözetimden kaçmasına ve tümör hücrelerinin bulunduğu bölgeden ayrılıp metastaz yapmasına neden olmaktadır (Massague, 2008).

İnaktif TGF-β, genellikle inflamatuvar hücrelerde ifade olan furin veya MMP-9 gibi diğer proteinazlar tarafından aktif formuna dönüşür (Kessenbrock ve ark., 2010). Tümör hücrelerinin TGF-β'nın tümör baskılayıcı etkisine karşı cevapsız kalmasının, MMP'ler tarafından aktive edilmesi ve dolayısıyla tümör invazyon ve metastazının kolaylaşması sonucuna bağlı olduğu düşünülmektedir.

Yapılan bir çalışmada TGF-β tedavisinin, sağlıklı monositler üzerindeki PD-L1 yüzey proteinini belirgin bir şekilde baskıladığı bulunmuştur (Ou ve ark., 2012). Yapılan başka bir çalışmada $CD8^+$ T hücrelerinin aktive ettiği TGF- β'nın fare proksimal tübüler epitel hücreleri üzerinde eksprese olan PD-L1'i baskıladığı bulunmuştur (Starke ve ark., 2007).

1.3.2.5. E-kaderin (CDH1)

CDH1 geninin kodladığı E-kaderin proteini, kalsiyum bağımlı hücre-hücre adezyonundan sorumlu ve epitelyal doku üzerinde ifade olan bir transmemran glikoproteinidir (Berx ve ark., 1995). E-kaderin proteini hücreler arası adezyon kompleksleri aracılığıyla epitelyanın farklılaşması ve polarizasyonunda ve devamlılığının sağlanmasında kritik bir rol oynayarak bir hücre adezyon baskılayıcısı gibi davranmaktadır. E-kaderinin tümör hücrelerini baskılama etkisinden dolayı bir tümör baskılayıcı gen olarak kabul edilmektedir.

Anormal E-kaderin aktivitesi hücre adezyon kaybına neden olarak tümörün hücre hareketi ve metastaz kabiliyeti kazanmasına yol açar (Corso ve ark., 2016). Tümör hücreleri invazyon ve metastaz yapabilmek için E-kaderin ekspresyonunu inhibe ederler. Özafagus, over ve mide kanserlerin agresif tümörlerinde E-kaderin ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir (Singhai ve ark., 2011).

1.3.2.6. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)

Epidermal büyüme faktörü reseptörü ERbB/Her ailesi üyesidir. Bu aile yapısal olarak ilişkili dört transmembran proteinden oluşmaktadır: EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (Her3) ve ErbB4 (Her4) (Linggi ve Carpenter, 2006). EGFR, mitojen aktive eden protein kinaz (MAPK), fosfatidilinozitol-3 kinaz (PI3K/AKT), JAK/STAT ve protein kinaz C (PKC) gibi birçok hücre içi sinyal yolağını aktive ettiği için onkojenik büyüme faktörü reseptörü olarak düşünülmektedir (Concha-Benavente ve Ferris, 2017).

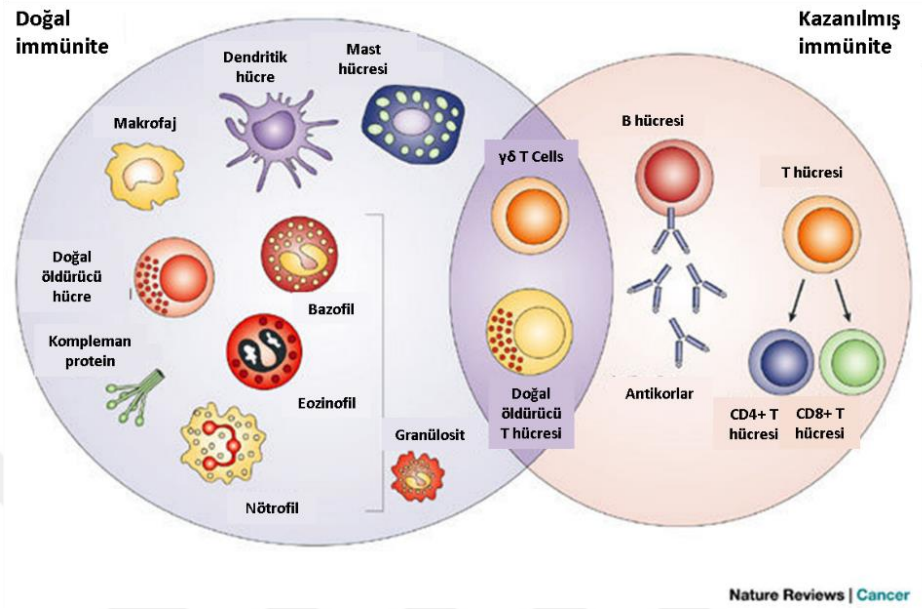
EGFR'nin aşırı eksprese olması, tümör hücrelerinde proliferasyonun ve sağkalımın artmasına, büyüme inhibisyonuna, apoptoza direnç gelişimine ve invazyon ve metastazın artmasına neden olmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Meme, akciğer, baş ve boyun kanseri skuamoz hücre karsinomu ve glioblastoma gibi kanser türleri ile yapılan çalışmalarda EGFR sinyalinin tümör progresyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

EGFR'nin hücre içi onkojenik potansiyelinin yanında, tümör hücrelerinin immün gözetimden kaçmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. EGFR'nin bu önemli etkilerinden dolayı sadece EGFR'nin hedeflenmesi değil, tümör mikroçevresindeki PD-L1/PD-1 veya TGFβ gibi hücresel immün cevapları düzenleyen moleküller ile kombine edilmesi, immün cevapların arttırılmasına ve kombinasyonda kullanılan moleküllerin etkinliğinin arttırılmasına yarar sağlayacaktır (Concha-Benavente ve Ferris, 2017).

1.4. İmmün Sistem ve Kanser

İmmün sistem organizmanın varlığının devamının sağlanmasında konağı dış ve iç tehditlere karşı korumakla görevli birçok hücre, sitokin ve proteinlerden oluşan kompleks ve organize bir sistemdir. Doğal ve kazanılmış olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Doğal immünite, vücuda giren mikroplar ile mücadele ilk tepkiyi veren ve yanıtı genelde spesifik olmayan bir sistemdir. Kazanılmış immünite daha spesifik

yanıtlar veren, antijeni tanıma repertuvarı daha geniş ancak daha geç ortaya çıkan bir sitemdir. Şekil 1.6'da immün sistemde rol alan elemanlar gösterilmiştir.

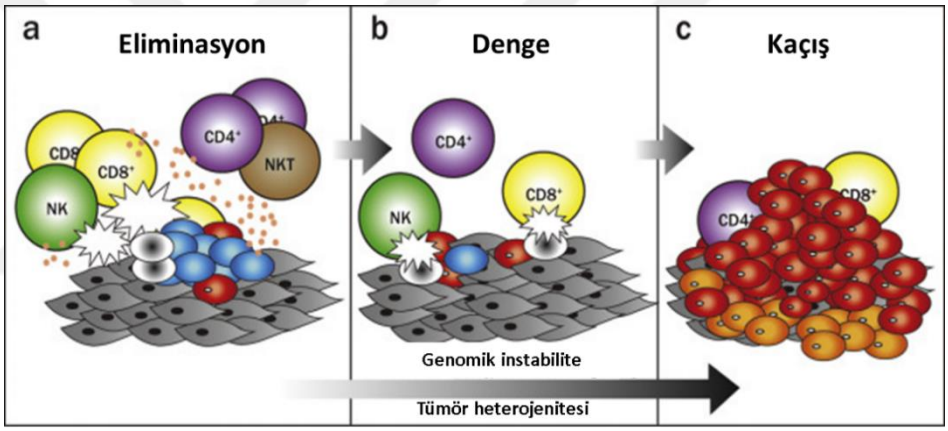


Şekil 1.6. İmmün sistemde rol alan elemanlar (Dranoff, 2004)

İmmün sistemin tümör hücreleri üzerinde ikili bir rolü vardır. İlki immün gözetim denen bir mekanizmadır. Bu mekanizmada immün sistem tümör hücrelerini tanıyarak ortadan kaldırır. Bu işlem, doğal ve adaptif immün sistemin ana hücresel efektörleri olan doğal öldürücü hücreler, doğal öldürücü T hücreleri, T hücreler ve interferon gibi tümör mikroçevresinde artan proimmün humoral faktörler tarafından yapılmaktadır. İkinci mekanizma olan immün düzenlemede, immün sistem tümörü yok etmeye çalışırken tümörün de immün sistemi şekillendirmesini içeren karşılıklı bir etkileşim meydana gelmektedir.

İmmün düzenleme üç fazdan oluşmaktadır. Eliminasyon fazında immün sistem etkin bir şekilde aktiftir ve tümör hücrelerine üstün gelir. Bu durum genel olarak pre-malign lezyonlarda gözlenir ancak bu evreden kaçabilen tümör hücreleri çoğalmaya devam ederek bir sonraki faz olan denge fazına doğru ilerlerler. Bu faz aynı zamanda immün gözetim mekanizması olarak sayılmaktadır. Denge fazında tümör ve immün sistemin ikisi de aktiftir. İmmün sistem tümör hücrelerini tanıyıp yok etmeye çalışırken, tümör hücreleri de tümörün içinde bulunduğu mikroçevreyi, ürettiği

sitokinlerin yardımıyla kendisi için uygun hale getirmeye çalışır. İnterlökin-10 (IL-10), Prostoglandin E2 (PGE2), transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-β) gibi ürettiği sitokinler ile immün hücrelerini bazı dönüşümlere (T helper2, Treg, MDSC, tümör ilişkili makrofajlar) zorlayarak immün yanıtı etkisizleştirip inflamatuvar yanıtı ortadan kaldırmaya çalışırlar. Denge fazı yıllarca sürebilen bir süreçtir ve sonrasında ya immün sistem üstün gelerek tümörü yok eder, ya da tümörün karşı atağı üstün gelir ve kontrolü ele alır. Son faz olan kaçış fazında tümör hücreleri kontrolü ele almış durumdadır. Dokudaki immün hücrelerin çoğu etkisiz hale gelmiştir. Tümör böylece, immün sistem engeli olmadan büyümeye devam eder (Abul K Abbas, 2014).Bu arada tümörde oluşmaya devam eden genetik mutasyonlar ve onkogenezin ilerleyişi de tümörü immün sisteme karşı güçlendirir.



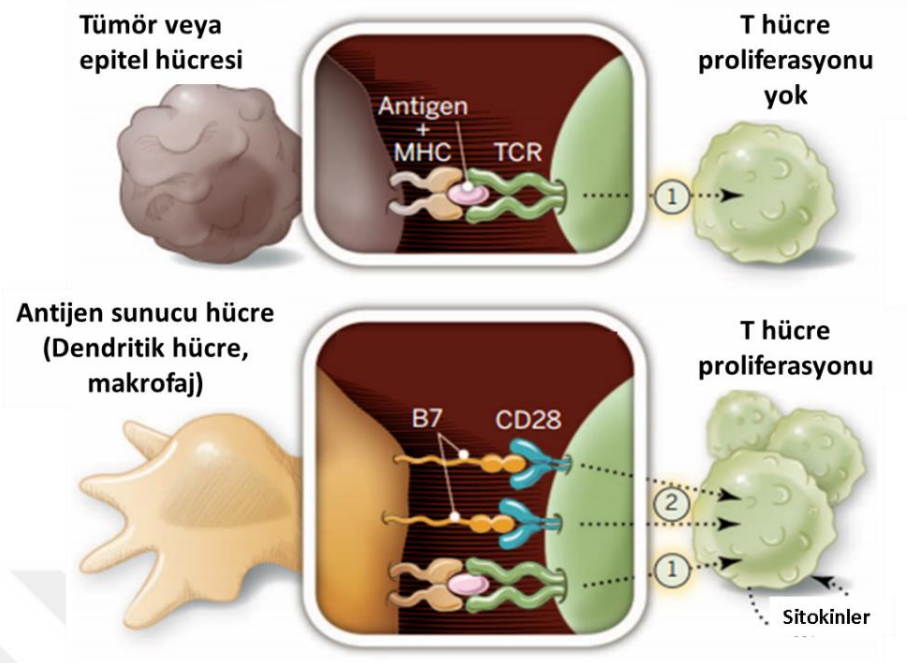
Şekil.1.7. Tümör hücrelerinin immün sistemden kaçış basamakları (Pennell, 2015)

Tümör hücreleri immün sistem tarafından potansiyel olarak tanınabilen neoantijenleri üreten birtakım genetik ve epigenetik değişiklikler içerir (de Guillebon ve ark., 2015). İmmün sistem, tümör hücreleri üzerindeki bu antijenleri hedefleyerek tümörü ortadan kaldırabilir. Bu antijenler sadece tümöre özgü olabileceği gibi normal hücrelerde bulunabilmektedir. Bundan dolayı antijenler, tümöre özgü antijenler ve tümör ile ilişkili antijenler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bu antijenler genelde mutasyona uğramış genlerin, aşırı derecede ifade olmuş normal genlerin veya viral proteinleri kodlayan genlerin ürünleridir (Criscitiello, 2012). Tümör ile ilişkili antijenler ise başlıca melanosit farklılaşma antijenleri gibi farklılaşmış antijenleri, p53 gibi mutasyona uğramış antijenleri, HER2 gibi aşırı ifade olmuş hücresel antijenleri,

insan papilloma virüs proteinleri gibi viral antijenleri ve MAGE ve NY-ESO-1 gibi testis ve ovaryumun germ hücrelerinde eksprese olan ancak normal somatik hücrelerde sessiz olan kanser testis antijenlerini içermektedir (Criscitiello, 2012).

İmmün sistemin gözcüsü olarak görev yapan makrofaj ve dendritik hücreler karşılaştıkları yabancı antijen veya hücreyi yakalayıp ve olgunlaşma fazına girerler. Böylece hareket kabiliyetleri artar ve ko-sitümülatör (eş-uyaran) proteinler üretebilen profesyonel antijen sunan hücrelere (ASH ya da APC) dönüşürler. Adını onlarca saçaksı çıkıntısından alan dendritik hücreler, T hücresine antijen sunmakla görevli profesyonel ASH'lardır. Bu hücreler, antijenik yükleriyle birlikte tümörle karşılaştıkları yerden bölgesel lenf noduna doğru göç etmeye başlarlar. Bu arada fagosite ettikleri antijenik proteinleri proteolitik olarak parçalayıp işleyerek küçük bir peptid parça elde ederler. Bunu da endoplazmik retikulumda üretilen MHC proteinlerinin 'cep' kısmına takarak hücre yüzeyine çıkarırlar. Bu yapıya MHC-peptid kompleksi denir. Antijeni MHC sınıf I proteinlerine bağlayarak $CD8^+$ T hücrelere, MHC sınıf II reseptörlerine bağlayarak $CD4^+$ T hücrelerine sunarlar. T hücrelerinin büyük bir kısmı protein yapıdaki antijenleri sadece ASH'ler tarafından MHC molekülleri aracılığıyla sunulduğunda tanıyabildikleri için antijen sunumu aşaması T hücre aktivitesi için elzemdir (Dranoff, 2004).

T hücre antijen reseptörü tarafından antijen-MHC komplekslerinin tanınması, aktive olmamış (naive) T hücrelerinin aktive edilmesi için yeterli olmamaktadır. T hücreleri aktive olabilmek için iki sinyale ihtiyaç duyar. İlk sinyal, tümör hücrelerini yakalayan dendritik hücrelerinin tümör antijenini işleyip antijeni MHC kompleksi ile birlikte yüzeyinde sunması sonucu T hücrelerinin üzerinde bulunan T hücre reseptörünün (TCR), MHC kompleksine bağlanması ile oluşur. İkinci sinyal ise, T hücreleri üzerinde bulunan CD28 molekülü ile dendritik hücreleri üzerindeki B7 moleküllerinin bağlanmasıdır (Sharma ve Allison, 2015). Şekil 1.8'de T hücrelerinin aktive olması için gerekli sinyaller gösterilmiştir.



Şekil 1.8. T hücrelerinin aktive olabilmesi için ihtiyaç duyduğu sinyaller (Sharma and Allison, 2015)

Tümör antijeninin T hücreleri tarafından tanınması sonucu tümöre spesifik T hücreler, tümörün bulunduğu bölgeye gidip tümör hücreleri ile savaşır. Ancak tümör hücreleri stromayı, regülatör T hücrelerini, miyeloid kökenli baskılayıcı hücreleri, inhibitör sitokinleri ve tümör mikroçevresindeki diğer hücreleri kendi lehine kullanarak antitümör immün cevaplarının azalmasını sağlar (Sharma ve Allison, 2015).

Normal fizyolojik koşullar altında, T hücrelerinin immün cevabını uygun bir seviyede tutarak çevredeki normal dokuya hasarı en aza indirgeyen ve otoimmün reaksiyonları engelleyen immün kontrol noktaları bir denge durumundadır (He ve ark., 2015). İmmün kontrol noktaları, immün sistemin yabancı maddelere karşı gösterdiği immün cevabın aşırıya kaçmasını önler ve vücudun kendi antijenlerine tolerans göstermesine katkıda bulunur (McDermott ve Atkins, 2013).

İmmün kontrol noktası molekülleriyle ilgili yapılan çalışmalarda Sitotoksik T Lenfosit-İlişkili Antijen 4 (CTLA-4), Programlanmış Ölüm Antijeni 1 (PD-1) ve PD-1'in ligandları olan PD-L1 (B7-H1) ve PD-L2 (B7-DC) üzerine yoğunlaşılmıştır. CTLA-4 T hücre aktivitesini çoğunlukla erken evrede düzenlerken, PD-1 tümör

mikroçevresindeki T hücre aktivitesini esas olarak tümör gelişiminin geç evresinde sınırlamaktadır. Bu nedenle PD-1 ve ligandları etkili immünoterapinin geliştirilmesinde kullanılabilecek en önemli hedef haline gelmiştir. PD-1'in ligandına bağlanması sonucu T hücreleri inaktive olduğu için uyarıya karşı immün cevap sınırlanır ve böylece immün sistem baskılanır (Scarpace, 2015).

PD-1 reseptörü sitotoksik T hücreleri, B hücreleri, monositler, doğal öldürücü hücreler, dendritik hücreler, tümör infiltre eden lenfositler ve baskılayıcı T hücreleri üzerinde bulunabilir ve inflamasyon veya periferal dokularda enfeksiyon durumunda T hücreleri aktifleştiğinde ifade olur. PD-1, PD-L1 (B7H1, CD274) ve PD-L2 (B7DC, CD273) olmak üzere koinhibitör iki liganda sahiptir. PD-L1 aktif olmayan T hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreleri, makrofaj, damar endotelyal hücreleri ve pankreatik adacık hücreleri üzerinde ifade olur. PD-L2 ifadesi ise sadece makrofajlar ve dendritik hücrelerde görülmektedir PD-L2 ifadesinin T hücrelerinin hazırlanmasında ve polarizasyonunun düzenlenmesinde bir rolü varken, PD-L1 ifadesinin çevredeki dokuların aşırı inflamasyondan korunmasını içeren çok daha kapsamlı bir rolü vardır.

1.5. Kanser Tedavisi

Kanser tedavisinde geleneksel olarak kullanılan tedavi yöntemleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Cerrahi tedavi genellikle hastalığın erken evresinde ve küratif amaçla yapılan tedavi şeklidir. Ancak ilerlemiş kanserli hastalarda da semptomatik iyileşme sağlamak için gereken durumlarda başvurulabilir. Radyoterapi esas olarak lokal ileri evredeki kanserlerde sıklıkla başvurulan lokal bir tedavi şeklidir. Meme kanseri, rektum kanseri gibi bazı kanserlerde erken dönemde yapılan cerrahi sonrası hastalık nüksünü azaltmak için de adjuvan amaçla uygulanmaktadır. Tıpkı cerrahide olduğu gibi ilerlemiş kanserli hastalarda hastaların semptomlarını gidermek için de palyatif amaçlı olarak kullanılmaktadır.

1950'li yıllarda kanser tedavisine kemoterapi ilaçları girmiş ve günümüzde hormonal tedaviler, hedefe yönelik küçük moleküllü ajanlar, monoklonal antikorları

da alarak daha genel bir ifadeyle ilaç tedavisi olarak adlandırılmaya başlanmıştır. Kanserde ilaç tedavisi germ hücre tümörleri, lenfoma ve lösemi gibi birkaç tümör tipi dışında küratif amaçla uygulanmamaktadır. İlaç tedavisi erken evredeki hastalarda kür şansını arttırmak için adjuvan amaçlı, cerrahi tedaviyi kolaylaştırmak için neoadjuvan amaçlı ve ileri evredeki hastalarda da yaşam süresini uzatmak ya da semptomları rahatlatmak için palyatif amaçlı olarak kullanılmaktadır.

Kanserde ilaç tedavileri klasik olarak kullanılan ve sitotoksik etki gösteren kemoterapinin yanı sıra hormonal ajanlar ve son yıllarda daha yaygın olarak kullanılmaya başlanan hedefe yönelik küçük moleküllü ajanlar, monoklonal antikorlar ve immünoterapiler ile gittikçe artan bir çeşitlilik göstermektedir. Özellikle son 10 yılda popülarite kazanan hedefe yönelik tedavi ajanlarından anit-anjyogenik ilaçlar ve immünoterapiler günümüzde çok yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

1.5.1. İmmünoterapi

Tümör hücreleri konağın immün sistemi tarafından yok edilmemek için immün denetimden kaçabilmekte ve kendi yararına kullanabilmek için konağın immün kontrol noktalarını çeşitli yöntemlerle bozabilmektedir. Tümör hücreleri immün saldırıya cevap olarak çok miktarda PD-L1 ve PD-L2 üretir. Bu ligandlar T hücre üzerindeki PD-1 reseptörüne bağlanarak T hücrelerinin aktivasyonunu önler. Böylece T hücre saldırısını baskılar ve tümörün immün sistemden kaçışını kolaylaştırır. Tümör hücreleri böylece kendisine uygun bir tümör mikroçevresi oluşturarak çoğalmaya devam eder (Black ve ark., 2016). Tümörlerde PD-L2 ifadesi, PD-L1'e göre çok daha az izlenmektedir. Bu nedenle çalışmalarda daha çok PD-L1 üzerine yoğunlaşılmıştır. PD-L1'in akciğer, kolon, melanom, böbrek, over, mesane kanserleri dahil birçok kanser türünde aşırı ifade olduğu gösterilmiştir. PD-L1'in bu ifadesi çoğu zaman kötü prognozun ve kanserin ilerlediğinin bir göstergesidir (Alme ve ark., 2016).

Tümör hücrelerinin immün kaçışında, sitotoksik T lenfositlerinin üzerinde bulunan PD-1 ile tümör hücreleri ve diğer konakçı immün hücreleri üzerinde bulunan PD-L1 arasındaki etkileşim önemli bir rol oynamaktadır (Black ve ark., 2016).

Sonuç olarak PD-1 ve PD-L1'in tümör immün kaçışında anahtar bir rol oynadığı ve tümör mikroçevresinin oluşumunun, tümör oluşumu ve gelişimi ile çok yakından ilişkili olduğu bulunmuştur. PD-1/PD-L1 yolağının bloke edilmesi ile tümör mikroçevresi gerileyebilmekte ve endojen antitümör immün cevapları arttırılabilmektedir. Artan deneyler ve klinik araştırmalar, kontrol noktalarını antagonistik antikorlar kullanarak bloke eden immünoterapötik yaklaşımların kanseri engellediğini ve antitümör aktiviteyi kolaylaştırdığını göstermektedir (He ve ark., 2015). Son yıllarda CTLA-4 ve PD-1 gibi immün denetim noktalarını bloke eden antikorların tedaviye girmesiyle başta melanom olmak üzere, bazı solid tümörlerde ve lenfomalarda önemli başarılar elde edilmeye başlanmıştır. PD-L1 ligandını bağlayan Atezolizumab başta akciğer kanseri olmak üzere birçok solid tümörde rutin kullanım için onay almış ve yeni endikasyonlarda da onay almak üzeredir (Xia ve Herbst, 2016).

Anti-PD-L1 antikoru olan Avelumab, tümör dokusundaki antijen sunan hücreler ve tümör hücreleri yüzeyindeki PD-L1'e bağlanarak ligandın T hücrelerindeki PD-1'e bağlanmasını engelleyerek inhibe olmalarının önüne geçer ve immün sistemin aktif kalmasını sağlar. Bu gibi antikorlar, metastatik kanser hastalarının az bir kısmında uzun süreli sağ kalım sağlamalarına karşın önemli bir hasta grubunda etkileri olmamakta ve yüksek maliyetleri nedeniyle de ülke ekonomileri için ciddi yük oluşturmaktadırlar. Bu antikorların başta kolit olmak üzere ciddi otoimmün yan etkiler göstermesi de yine önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.

Tümör dokusunda PD-L1 ekspresyonu yüksek olan melanoma, mesane ve akciğer tümörleri gibi tümörlerde bu anti-PD-L1 antikorları daha etkili olmaktadır. Klinik çalışmalarda tümör dokusunda immunohistokimyasal olarak PD-L1 ekspresyonu olduğu gösterilen hastalarda PD-L1'e karşı geliştirilen monoklonal antikorlar ile elde edilen yanıt oranının daha yüksek olabildiği gösterilmiştir (Topalian ve ark., 2012).

Tümörlerdeki PD-L1 ekspresyonunun bu molekülü hedefleyen tedaviler için bir biyobelirteç olabileceği öngörülmektedir.

1.5.2. Kanserde Anti-Anjiyogenik Tedaviler

Tümör dokusundaki anjiyogenezi engellemek ya da var olan damar yapısını bozmak amacıyla yapılması planlanan anti-anjiyogenik tedaviler, anjiyogenezde en önemli molekül olan VEGF'nin hedeflenmesi ile gündeme gelmiştir. VEGF'yi bağlayan bevacizumab adlı monoklonal antikor son 10 yılda dünyada tedavi amacıyla en çok kullanılan ilk 5 antikordan biri olmuştur. Ülkemizde de kolon kanseri, over kanseri ve beyin tümörlerinde kullanımı onaylıdır. Yine VEGF'yi hedefleyen bir peptid yapılı ilaç olan Aflibercept de kullanılmaktadır. VEGFR'yi hedefleyen bir monoklonal antikor olan Ramicirumab da çok yakın zamanda mide kanserli hastaların tedavisinde kullanılmak üzere ülkemizde kullanım onayı almıştır.

Kanserde anjiyogenezi hedeflemede VEGF-VEGFR yolağında yer alan tirozin kinaz enzim aktivitesine sahip molekülleri hedefleyen Sunitinib, Sorafenib, Aksitinib gibi küçük molekül ilaçlar gittikçe artan bir sıklıkta kullanılmaya başlanmıştır. Bu ilaçlar esas olarak VEGF-VEGFR sinyal yolağını baskılayarak anjiyogenezi engellemek suretiyle anti-tümoral etki gösterirler.

1.5.3. İmmünoterapi ve Anti-Anjiyogenez Kombine Tedavisi

Erken klinik çalışmalarda anti-PD-L1 antikorları ile anjiyogenez inhibitörlerinin kombine kullanımının tedavi etkinliğini arttırdığına ilişkin sonuçlar bildirilmektedir. Halen devam etmekte olan bir faz III çalışmasında bir grup hastaya anti-PD-L1 antikoru olan Atezolizumab ile anti-VEGF antikoru olan Bevacizumab'ın, diğer gruba ise sadece anjiyogenezde rol oynayan reseptörlerin tirozin kinazlarını inhibe eden Sunitinib'in verilmesinin etkinlikleri karşılaştırılmakta olup henüz sonuçlanmamıştır (Clinicaltrials.gov, 2015b). Halen devam etmekte olan bir başka faz II çalışmada yine renal hücre karsinomlu hastalarda Avelumab ile Axitinib'ın kombine tedavisi

uygulanmaktadır (clinicaltrials.gov, 2015c). Henüz sonuçları yayınlanmamış olan bu klinik çalışmaların, anti-PD-L1 tedavisi ile anti-anjiyojenik tedavi kombinasyonunun etkinliği hakkında fikir vermesi beklenmekle birlikte tümör hücrelerinde PD-L1 ile VEGF yolağı ilişkisi iyi bilinmemektedir. Özellikle PD-L1 ifadesinin monoklonal antikorlar ile baskılanmasının VEGF yolağında neden olacağı olası değişiklikler son yıllarda artan bir oranda kullanılmaya başlanan anti-PD-L1 antikorlarına direnç gelişmesi ve bu ilaçların daha rasyonel kullanımı konusunda yol gösterici olacaktır.

İmmün kontrol noktası inhibitörleri hastaların bir kısmında başarılı olabildiği için daha etkili bir tedavi için biyomarker arayışına girilmiştir. Klinik çalışmalarda tümör dokusunda immunohistokimyasal olarak PD-L1 ekspresyonu olduğu gösterilen hastalarda PD-L1'e karşı geliştirilen monoklonal antikorlar ile elde edilen yanıt oranının daha yüksek olabildiği gösterilmiştir. Tümörlerdeki PD-L1 ekspresyonunun, bu molekülü hedefleyen tedaviler için bir biyobelirteç olabileceği öngörülmektedir.

Bu çalışmada immün denetim noktalarını hedefleyen tedavilere direnç gelişimininin hücre kültürü düzeyinde araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmamız ile biyomarker olduğu düşünülen PD-L1'i baskılayarak immün sistemi aktive eden anti-PD-L1 antikoru ile anjiyogenez arasında bir bağlantı olup olmadığı araştırılacak ve çalışma sonunda PD-L1 ifadesi yüksek tümör hücreleri ile anjiyogenik faktörler arasında anlamlı bir sonuç çıkması durumunda tümöre karşı yeni tedavi seçenekleri geliştirilebilecek ve immün kontrol noktası inhibitörlerinden yarar görebilecek hasta sayısı arttırılabilecektir.

Bu amaç ve hedefleri gerçekleştirmek üzere PD-L1 ifade eden ve etmeyen tümör hücrelerinde anti-PD-L1 monoklonal antikor (Avelumab) uygulamasının, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-A (VEGF-A), basic Fibroblastik Büyüme Faktörü (bFGF), Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9), E-Kaderin (CDH1), Transforme edici Büyüme Faktörü-Beta (TGF-β) ve Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) gen ifadeleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan MCF-7 (insan meme kanseri hücre hattı), LNCAP (insan prostat kanseri hücre hattı) ve HT-29 (insan kolon kanseri hücre hattı) hücreleri ticari olarak (ATCC, İngiltere) satın alınmıştır. A-375 (insan malign melanom hücre hattı), A549 (insan akciğer kanseri hücre hattı), G361 (insan malign melanom hücre hattı), WM115 (insan melanom hücre hattı), MDA-MB-435 (insan melanom hücre hattı) hücreleri Yrd. Doç. Dr. Açelya Yılmazer Aktuna'nın (Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği) hediyesidir. MDA-MB-468 (insan meme kanseri hücre hattı), DU-145 (insan prostat kanseri hücre hattı) ve MDA-MB-231 (insan meme kanseri hücre hattı) hücreleri ise Prof. Dr. Hakan Gürdal'ın (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji AD) hediyesidir.

Hücre hatları -150 °C dondurucudan çıkarıldıktan hemen sonra 37 °C su banyosunda eritilip laminar hava akışlı kabin içerisindeki flasklara alınarak üzerlerine %10 fetal sığır serumu (FBS) (Biological Industries, İsrail) ve %1 antibiyotik-antimikotik solüsyonu (Biological Industries, İsrail) içeren hücre kültür besiyerleri (MCF-7, A-375, A549, MDA-MB-435, G361 için Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM (Biological Industries, İsrail); WM115, MDA-MB-468 için Minimum Essential Media – MEM-Eagle (Biological Industries, İsrail); LNCAP, MDA-MB-231, DU-145 için RPMI-1640 (Sigma Aldrich, ABD) ve HT-29 için McCoy's 5A (Lonza, İsviçre)) eklenmiş ve %5 CO_2 içeren 37°C inkübatörde çoğalması için inkübe edilmiştir.

2.2. Akım Sitometrisi ile Tümör Hücrelerinde PD-L1 İfade Tayini

Kültürü yapılıp çoğalan kanser hücre hatlarını tutundukları yüzeyden kaldırmak amacıyla hücre yüzey proteinlerinin en az düzeyde etkilenmesi için hücre kültüründe

rutin kullanılan Tripsin-EDTA yerine enzim içermeyen Cell Disosiyasyon Buffer (Gıbco ThermoFisher, ABD) kullanılmıştır. Serin proteaz ailesine ait olan tripsin enzimi, bazik aminoasitlerden lizin ve arjinini yıkarak peptid yapısını bozmaktadır.

Hücreler yüzeyden kaldırıldıktan sonra thoma lamında hücre sayımı yapıldı ve her bir hücre türünden $1.5x10^6$ alınarak yüzey proteinlerinin boyanma işlemine geçildi. Hücreler, PBS (1X), %2 FBS, %0.09 sodyum azide ve 2 mM EDTA içeren flow buffer ile yıkandıktan sonra 90 µl flow buffer ve 5 µl PE-işaretli anti-PD-L1 antikoru (PE anti-human CD274, Biolegend) ile oda ısında 20 dk inkübe edildi. Daha sonra flow buffer ile 2 kez yıkandı ve minimum 50.000 hücre olacak şekilde akım sitometri cihazı (Beckman Coulter Navias Flow Cytometer) ile tümör hücrelerinin yüzeyinde bulunan PD-L1 ifade oranları saptandı.

Akım sitometrisi ile PD-L1 ifadesi bakılan hücrelerden PDL-1 düzeyi en yüksek olan 2 hücre (MDA-MB-231, %96,42; LNCAP, %63,35) PD-L1 pozitif ve en düşük olan 2 hücre (DU145, %1,52; MDA-MB-435, %0,34) PD-L1 negatif hücreler olarak alınarak sonraki deneylerde kullanılmıştır.

2.3. Sitotoksisite Deneyi ile Hücre Canlılığının Ölçülmesi

Programlanmış hücre ölümü ligandı-1 (PD-L1)'e karşı tasarlanmış insan immünoglobulin G1 (IgG1) monoklonal antikoru olan Avelumab (Merck, Almanya) ilacının tümör hücrelerin üzerine etkisini saptayabilmek için sitotoksisite deneyi yapılmıştır. Daha önceden kültüre edilen hücreler thoma lamı ile sayım yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu plaklarda kuyu başına $5x10^3$ hücre olacak şekilde ekilmiş ve çoğalabilmeleri için 24 saat boyunca 37°C %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında belirlenen Avelumab dozları hücrelere verilerek 72 saat boyunca 37°C %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edilmiştir.

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanan Avelumab'ın insanlarda kullanılması tavsiye edilen dozu 10 mg/kg olduğu için sitotoksisite deneyi bu ilaç

dozunu da içerecek şekilde dokuz ayrı Avelumab dozu (160 µg/ml, 80 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml ve 0.625 µg/ml) belirlendi. Canlılık oranı %100 olması beklenen negatif kontrol için de ilaç uygulanmamış hücreler kullanılmıştır.

Kuyulardaki 72 saatlik inkübasyon sonrasında, canlı hücre oranını saptamak amacıyla hücreler, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide (MTT) (Chemicon International, ABD) ile muamele edilmiştir. Öncelikle ilaç uygulanmış kuyuların besiyerleri aspire edilip, konsantrasyonu 5 mg/ml olan MTT solüsyonundan 20 µl alınıp üzerine her bir hücreye çoğalabileceği besiyerinden 50 µl eklenerek 37°C %5 CO_2 içeren inkübatörde yaklaşık 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında koyu sarı renkli MTT solüsyonunun canlı hücrelerin dehidrogenaz enzimi aktivitesi ile etkileşime girmesiyle koyu mor renkli formazan kristalleri oluşumu gözlenmiştir. Formazan kristallerinin absorbans değerlerini ölçebilmek için çözdürülmesi gerektiği için her bir kuyuya 150 µl dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma, ABD) konulduktan sonra yarım saat çalkalayıcıda bekletilip çözdürüldükten sonra ELIZA plak okuyucuda (Thermo Scientific-Multiskan Go, Almanya) 590 nm ve 620 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

Kontrol grubundaki hücrelerin absorbans değeri %100 alınarak diğer laç uygulanaan kuyucuklardaki hücrelerin canlılık oranları hesaplandı. Sonuçların güvenilirliği için MTT deneyi 2 defa tekrarlanmıştır.

2.4. Belirlenen Dozların Tümör Hücrelerine Uygulanması

MTT sonuçlarımıza göre Avelumab'ın hücre öldürme etkisinin, kemoterapi ilaçlarının hücre öldürme potansiyelinin çok altında olduğu saptanmıştır. Bu nedenle ilacın hücrelerdeki genel etkisine bakılarak bu basamaktan sonraki deneylerde 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 2 µg/ml Avelumab dozlarının hücrelere uygulanmasına karar verilmiştir. Avelumabın 20 µg/ml konsantrasyonu, insanlarda 10 mg/kg dozunda

uygulandığında elde edilen kan avelumab düzeyinin (ortalama 20 µg/ml) (fda.gov, 2017) eşdeğeri olduğu için alınmıştır.

LNCAP, MDA-MB-231, DU145 ve MDA-MB-435 hücreleri, her ilaç dozu ve negatif kontrol için üç tekrar olacak şekilde 6 kuyulu plaklara kuyu başına $5x10^5$ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Plaklar %5 CO2 içeren 37°C'de inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra belirlenen Avelumab dozları taze besiyeri içerisinde kuyulara eklenmiştir. İlaç verilen hücreler 24 ve 72 saat olmak üzere iki ayrı inkübasyon süresinden sonra toplanıp -80°C'ye kaldırılmıştır.

2.5. Tümör Hücrelerinin Gen İfade Tayini

2.5.1. RNA İzolasyonu

Toplanıp -80°C'ye kaldırılan hücre pelletlerinden RNA izolasyonu yapmak için ticari kit (Qiagen RNeasy Mini Kit, Almanya) kullanılmıştır. Kısaca, hücre pelletleri RNAz içermeyen lizis tamponu ile parçalanmış ve homojenize edilmiştir. Oluşan lizat kit tarafından sağlanan kolonlara yüklendi ve total RNA bu kolonlara bağlandı. Daha sonra kitte bulunan yıkama solüsyonu ile RNA dışı tüm partiküllerin ortamdan uzaklaştırıldı ve son aşamada RNAz DNAz içermeyen ultra saf su kullanılarak kolona bağlanan total RNA santrifüjlenerek saflaştırıldı.

2.5.2. RNA Konsantrasyonu ve Kalitesi Tayini

İzolasyonu yapılan RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları spektrofotometre cihazı (Beckman Coulter, DU730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer) ile ölçülmüştür. RNA saflıkları, $2.1 \geq \lambda 260/\lambda 280 \geq 1.8$ arası olan örnekler çalışmaya alınmıştır.

2.5.3. Genomik DNA Eliminasyonu ve cDNA Sentezi

Genlerin mRNA ekspresyonlarını saptayabilmek için önceki basamaklarda elde edilen total RNA'ların komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilmesi gerekmektedir. Bunun için de RNA'sı izole edilen her bir örnekten 500 ng RNA alınacak şekilde hesaplama yapıldıktan sonra ticari olarak satın alınan kit (Qiagen Quantitect Reverse Transcription, Almanya) protokolüne uygun bir şekilde genomik DNA eliminasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Kısaca, iki basamaktan oluşan kit protokolünün ilk basamağında her bir RNA örneğine 2 µl DNaz içerikli solüsyon ve RNaz içermeyen su eklenerek son hacmi 14 µl tamamlandı ve 42 °C'de 2 dk inkübe edildi. Bu basamakta ortamdaki olası DNA kontaminasyonları elimine edilmiştir. Protokolün ikinci basamağında ise her bir RNA örneği için random primerler ve oligo-dT primerlerin bulunduğu karşımdan 1 µl, reverse transkriptaz enziminden 4 µl ve reverse transkriptaz bufferdan 1 µl eklenip bir karışım hazırlandı. Bu karışım, inkübe edilen RNA örneklerinin üzerine eklenerek son hacim 20 µl'ye tamamlandı ve 42 °C 30 dk ve 95 °C 3 dk inkübe edildi. Bu adım sonunda komplementer cDNA'nın sentezi tamamlanmıştır. Reaksiyon sonunda hacmi 20 µl olan cDNA örnekleri, RNaz-DNaz içermeyen su (Qiagen, Almanya) ile 100 µl son hacme tamamlanmıştır.

2.5.4. Primer- Prob Tasarımı

Tümör anjiyogenez sürecinde önemli rolleri olan Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü-A (VEGFA), bazik Fibroblastik Büyüme Faktörü (bFGF), Matriks Metallopeptidaz-9 (MMP-9), E-Kaderin (CDH1), Transforme edici Büyüme Faktörü-Beta (TGF-beta), Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) genleri ve referans geni olarak insan Beta-aktin (HBA) için EZ-PZR deneyinde kullanılmak üzere ileri ve geri primer ve FAM-TAMRA ile boyalı prob tasarımları yapılmıştır.

Primer ve prob tasarımında Primer3web (version 4.0.0) programı kullanılmıştır (Koressaar ve Remm, 2007). Dizaynı yapılan primer ve probların sadece istenilen gene spesifik olup olmadığının kontrolü için Primer-BLAST (Ye ve ark., 2012) ,NCBI Blast (Altschul ve ark., 1990) primerlerin ve probun kendileri veya birbirleriyle olan

homodimer ve heterodimer bağlanmaların hangi düzeyde olduğunun kontrolü için ise IDT OligoAnalyzer 3.1 (Owczarzy ve ark., 2008) ve PerlPrimer (Marshall, 2004) programları kullanılmıştır. Çizelge 2.1'de bu programlarla tasarlanan primer ve prob dizileri gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Dizaynı yapılan primer ve prob dizileri

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Prob
B-Aktin	5'-CCCTGGAGAAGAGCTACGAG-3'	5-AAGGTAGTTTCGTGGATGCC-3'	5'- CCAGCCTTCCTTCCTGGGCA-3'
VEGFA	5'-TGTGAATGCAGACCAAAGAAAGA-3'	5'-GCTTTCTCCGCTCTGAGCAA-3'	5'-AGAGCAAGACAAGAAAATCCCTGTGGGC-3'
bFGF	5'-ACCCCGACGGCCGA-3'	5'-TCTTCTGCTTGAAGTTGTAGCTTGA-3'	5'-TCCGGGAGAAGAGCGACCCTCAC-3'
TGF-β1	5'- GTGGACATCAACGGGTTCACT-3'	5'- TCCGTGGAGCTGAAGCAATAG-3'	5'-CCGGCCTTTCCTGCTTCTCATGG-3'
MMP-9	5'-GTCTTCCCCTTCACTTTCCTG-3'	5'-GAGGAATGATCTAAGCCCAGC-3'	5'-CACCTCGAACTTTGACAGCGACAAGA-3'
CDH1	5'-TCCTGGGCAGAGTGAATTTT-3'	5'-AGGCGTAGACCAAGAAATGG-3'	5'-CCCTCGACACCCGATTCAAA-3'
EGFR	5'-TCCCTCAGCCACCCATATGTAC-3'	5'- GTCTCGGGCCATTTTGGAGAATTC-3'	5'-ATCAACTCACGGAACTTTGGGCGACTATCTGCGTC-3'

2.5.5. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR)

Elde edilen cDNA örnekleri, 96 kuyucuklu platelere çalışılacak her bir gene (HBA, bFGF, TGF-Beta, VEGFA, CDH1, MMP-9 ve EGFR) son hacim 10 µl olacak şekilde kendisine özgü tasarlanan primer çifti, FAM-TAMRA boyalı Taqman probları, qPCR Mix (Solis Biodyne 5x Hot FirePol Probe Mix Plus (No Rox), Estonya) ve RNaz-DNaz içermeyen su (Qiagen, Almanya) eklendikten sonra Çizelge 2.2'da gösterilen reaksiyon koşullarında amplifikasyon yapıldıktan sonra qPCR cihazında (Biorad C1000 Thermal Cycler CFX96 RealTime System) ekspresyon analizleri yapılmıştır. PZR reaksiyonu sonunda elde edilen Cq değerleri ve amplifikasyon eğrileri kaydedilmiştir.

Çizelge 2.2. qPZR reaksiyonları

	Sıcaklık	**Süre**	**Döngü Sayısı**
Polimeraz Aktivasyonu	95 °C	15 dk	1
Denatürasyon	95 °C	20 s	40
Bağlanma- Uzama	60 °C	60 s	
Soğuma	37 °C	10 dk	1

2.5.6.PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü

Kantitatif PZR ile elde edilen ürünlerin amplifiye olup olmadıkları, %2'lik agaroz jelde yürütülerek test edilmiştir. Bunun için 50 bp DNA ladder (Bioron, 304007) ve 5X'lik yükleme boyası (Promega, M791A) kullanılarak jelde yürütülen örnekler daha sonra jel görüntüleme cihazında (Bio-Rad Gel Doc XR, ABD) görüntülenmiştir.

2.6. İstatistik

In vitro sitotoksisite testlerinde Avelumab'ın hücre canlılığı üzerine etkilerinin hesaplanmasında non-lineer regresyon analizi kullanılmıştır.

Kantitatif PZR sırasında her bir hücre üç tekrarlı yapıldığı için elde edilen Cq değerlerinin ortalamaları alınmış ve bu değerlerin ΔΔCt metodu (yaklaşım metodu) ve SPSS programında kullanılmasıyla ilaç verilen hücreler ile kontrol hücreleri arasındaki gen ifade farklılıkları saptanmıştır.

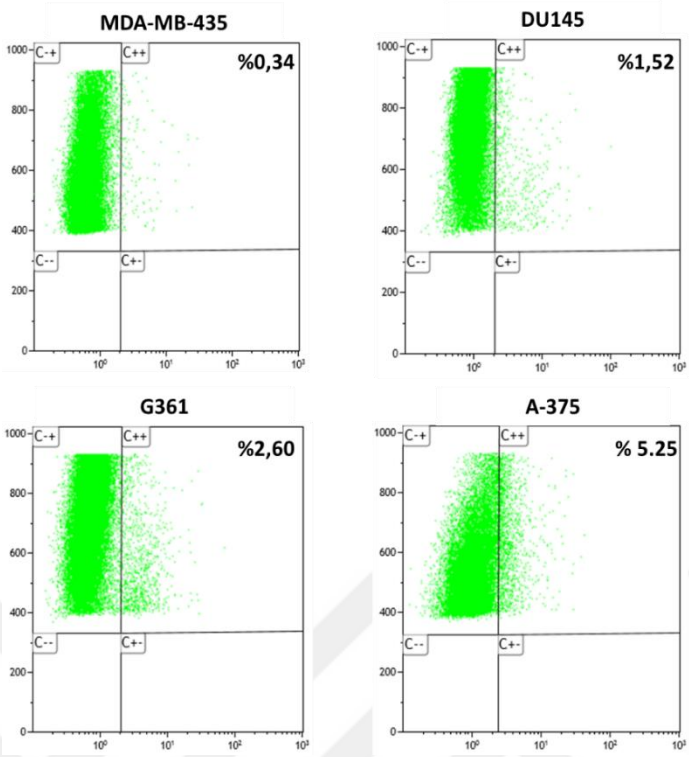
İlaç verilmemiş kontrol hücrelerinin ortalamaları ile farklı dozlarda ilaç verilen hücrelerin ortalamalarının karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA testi, T testi ve Mann-Whitney U testleri kullanılmıştır.

3. BULGULAR

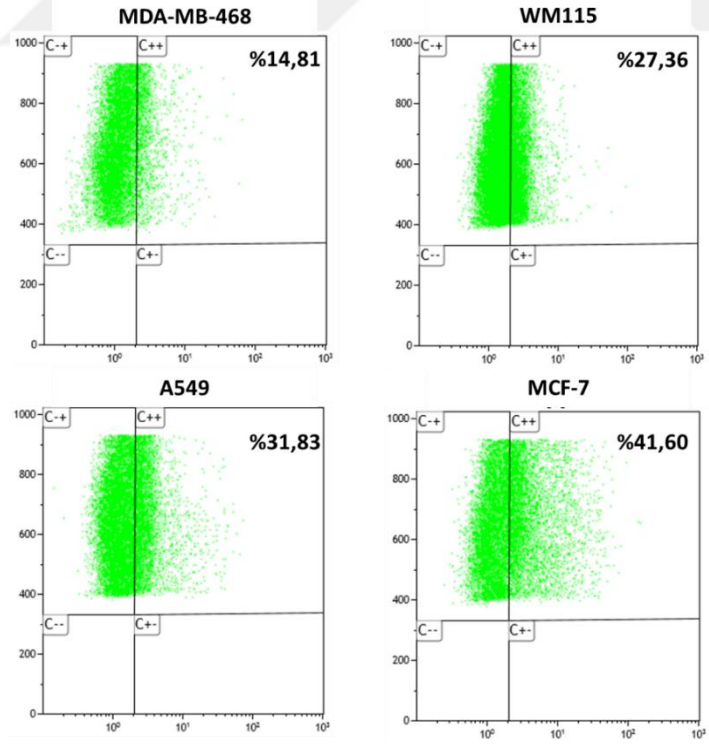
3.1. Akım Sitometrisi ile Tümör Hücrelerinin PD-L1 İfade Tayini Sonuçları

Tez çalışmamızda kullanacağımız PD-L1 pozitif ve negatif tümör hücrelerini belirlemek amacıyla akım sitometrisinde PD-L1 ifadeleri tayin edildi. Bu amaçla toplam 11 hücre kültüre edildikten sonra cell disosiyasyon buffer ile kaldırıldıktan sonra PE-işaretli anti-PD-L1 antikoru ile boyanarak akım sitometrisinde minimum 50.000 hücre sayılarak, PD-L1 pozitiflik oranları tayin edildi. MDA-MB-435, DU-145, G361, A-375 hücrelerinde PD-L1 ifade oranının %5'in altında olduğu (Şekil 3.1), MDA-MB-468, WM115, A549 ve MCF-7 hücrelerinde PD-L1 ifade oranının orta düzeyde (%5-50 arası) olduğu (Şekil 3.2) ve HT-29, LNCAP ve MDA-MB-231 hücrelerinin ise yüksek düzeyde (%50'den fazla) PD-L1 ifade ettiği bulundu (Şekil 3.3).

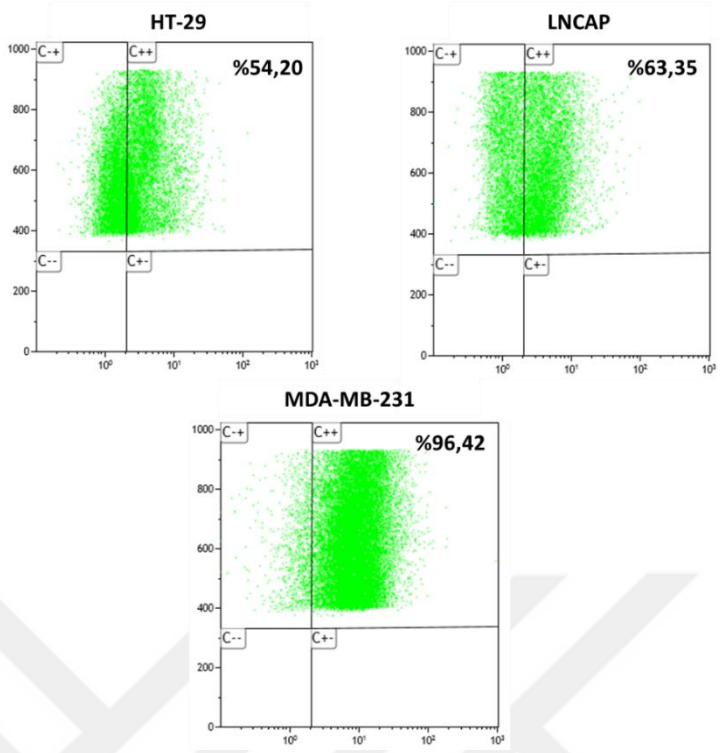
Bundan sonraki deneylerde PD-L1 ifadesi en düşük olan MDA-MB-435 ve DU145 hücreleri ile en yüksek olan LNCAP ve MDA-MB-231 hücreleri kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Akım sitometri analizi sonrasında saptanan MDA-MB-435, DU145, G361 ve A-375 hücrelerindeki düşük düzeydeki PD-L1 ifadeleri



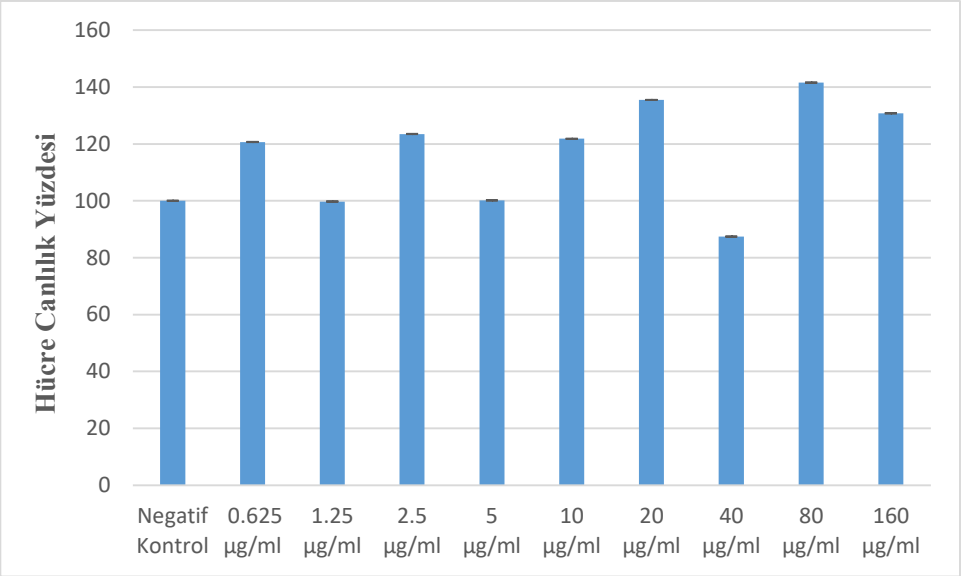
Şekil 3.2. Akım sitometri analizi sonrasında saptanan MDA-MB-468, WM115, A549 ve MCF-7 hücrelerindeki orta düzeydeki PD-L1 ifadeleri



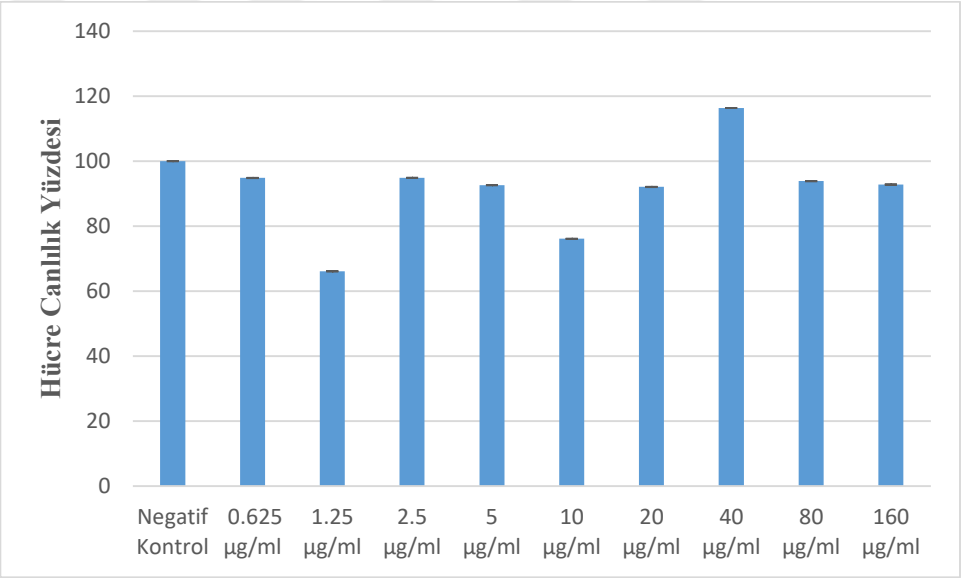
Şekil 3.3. Akım sitometri analizi sonrasında saptanan HT-29, LNCAP ve MDA-MB-231 hücrelerindeki yüksek düzeydeki PD-L1 ifadeleri

3.2. Hücrelere Uygulanan Anti-PD-L1 Monoklonal Antikoru Avelumabın Sitotoksisite Sonuçları

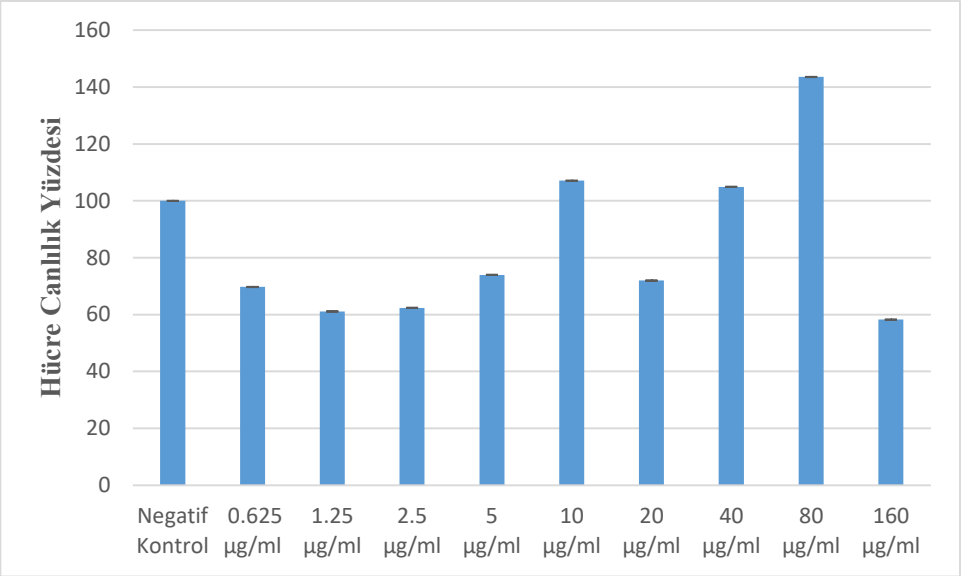
Avelumab'ın hücre canlılığı üzerindeki etkilerini test etmek amacıyla MTT testi uygulandı. Avelumab'ın çözücüsü olarak su kullanıldığı için kontrol grubu olarak ilaç verilmeyen hücreler baz alındı ve 72 saatlik inkübasyon sonucunda bu gruptaki absorbans değerleri %100 canlılık olarak alınarak diğer dozlardaki canlılık oranları hesaplandı. Şekil 3.4, 3.5, 3.6 ve 3.7'de görüleceği üzere Avelumab'ın hücre canlılığı üzerinde DU145 hücreleri dışında belirgin bir etkisi gözlenmedi. Dozlar arasında da belirgin ve anlamlı farklılıklar izlenmedi. DU145 hücrelerinde ise uygulanan düşük dozlarda ve en yüksek dozda (160 mg/ml) %40'a ulaşan bir sitotoksisite gözlendi (Şekil 3.6). LNCAP hücrelerinde de benzer olarak düşük dozlarda sitotoksik bir etki izlendi (Şekil 3.7).



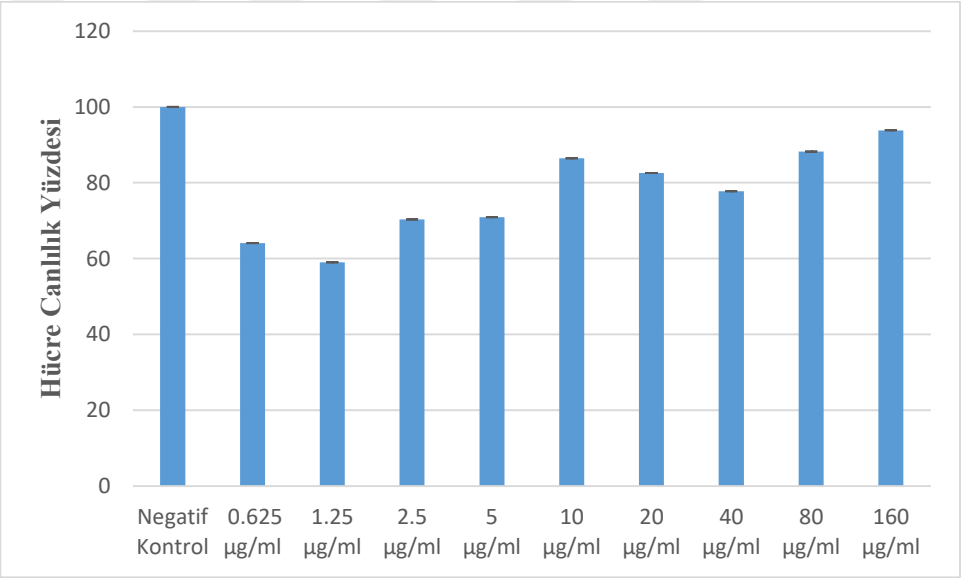
Şekil 3.4. MDA-MB-435 hücrelerine uygulanan dokuz Avelumab dozunun hücre canlılığı üzerine etkisi



Şekil 3.5. MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan dokuz Avelumab dozunun hücre canlılığı üzerine etkisi



Şekil 3.6. DU145 hücrelerine uygulanan dokuz Avelumab dozunun hücre canlılığı üzerine etkisi



Şekil 3.7. LNCAP hücrelerine uygulanan dokuz Avelumab dozunun hücre canlılığı üzerine etkisi

3.3. RNA Örneklerinin Saflık ve Konsantrasyonları

İzole edilen total RNA saflıkları eş zamanlı PZR deneyleri için kabul edilebilecek optimum sınırlarda çıkmıştır. Her bir örnekten toplam 500 ng total RNA kullanılarak cDNA sentezleri yapıldı. İzolasyonu yapılan RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyonları Çizelge 3.1, 3.2, 3.3 ve 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. DU145 hücrelerinin spektrofotometre ile ölçülen saflık ve konsantrasyon değerleri

DU145 Hücresi	Saflık (λ260/ λ280)	Konsantrasyon (µg/ml)
Kontrol 24 saat	1.896	791.58
40 µg/ml Avelumab	1.938	987.98
20 µg/ml Avelumab	1.879	688.81
2 µg/ml Avelumab	1.876	834.24
Kontrol 72 saat	1.924	1506.8
40 µg/ml Avelumab	1.909	1907.5
20 µg/ml Avelumab	1.858	1268.0
2 µg/ml Avelumab	1.874	1318.4

Çizelge 3.2. LNCAP hücrelerinin spektrofotometre ile ölçülen saflık ve konsantrasyon değerleri

LNCAP Hücresi	Saflık (λ260/ λ280)	Konsantrasyon (µg/ml)
Kontrol 24 saat	2.023	559.28
40 µg/ml Avelumab	2.056	481.74
20 µg/ml Avelumab	1.929	968.97
2 µg/ml Avelumab	1.981	946.68
Kontrol 72 saat	1.945	416.99
40 µg/ml Avelumab	1.973	712.38
20 µg/ml Avelumab	1.903	634.56
2 µg/ml Avelumab	1.974	608.15

Çizelge 3.3. MDA-MB-435 hücrelerinin spektrofotometre ile ölçülen saflık ve konsantrasyon değerleri

MDA-MB-435 Hücresi	Saflık (λ260/ λ280)	Konsantrasyon (µg/ml)
Kontrol 24 saat	1.921	424.78
40 µg/ml Avelumab	1.846	624.22
20 µg/ml Avelumab	1.890	405.0
2 µg/ml Avelumab	1.832	863.83
Kontrol 72 saat	1.840	1110.6
40 µg/ml Avelumab	1.996	295.42
20 µg/ml Avelumab	1.812	365.27
2 µg/ml Avelumab	1.840	1263.1

Çizelge 3.4. MDA-MB-231 hücrelerinin spektrofotometre ile ölçülen saflık ve konsantrasyon değerleri

MDA-MB-231 Hücresi	Saflık (λ260/ λ280)	Konsantrasyon (µg/ml)
Kontrol 24 saat	1.887	1528.1
40 µg/ml Avelumab	1.915	1484.3
20 µg/ml Avelumab	1.919	111.36
2 µg/ml Avelumab	1.921	119.35
Kontrol 72 saat	1.912	1462.0
40 µg/ml Avelumab	2.125	72.076
20 µg/ml Avelumab	1.941	349.74
2 µg/ml Avelumab	1.899	1009.1

3.4. Belirlenen Dozlarda Hücrelere Uygulanan Avelumabın Tümör Hücrelerindeki Anjiyogenik Gen İfadeleri Üzerine Etkileri

İn vitro sitotoksisite deneylerinden sonra hücrelere verilmeye karar verilen 40, 20 ve 2 µg/ml avelumab dozları 24 ve 72 saat süreyle hücrelere uygulanmıştır. İnkübasyon sonrasında ilacın hücrelerdeki VEGFA, EGFR, MMP-9, bFGF, TGF-Beta ve CDH1 gen ekspresyonları üzerine etkisi, ΔΔCt metodu (yaklaşım metodu) kullanılarak hesaplanmıştır. Referans geni olarak insan Beta-aktin geni kullanılmıştır.

3.4.1. VEGFA Gen İfadesi

İlaç uygulanmamış ve 40, 20, 2 µg/ml dozlarında Anti-PD-L1 monoklonal antikoru olan avelumab verilmiş LNCAP, MDA-MB-231, DU-145 ve MDA-MB-435 hücrelerindeki VEGFA gen ifade değişimleri Çizelge 3.5 ‘te gösterilmiştir.

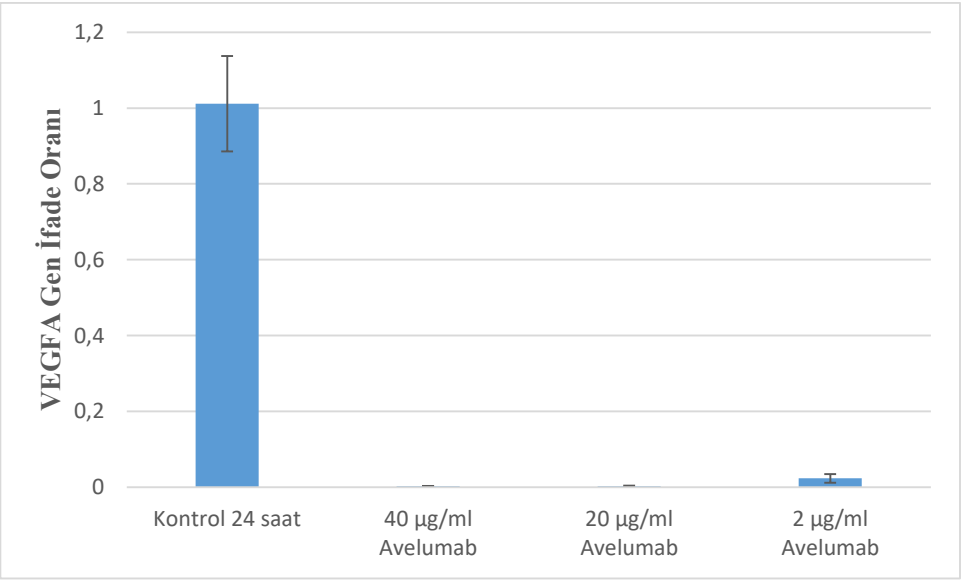
İstatistiksel olarak anlamlı olan sonuçlara göre 24 saat inkübasyon sonunda LNCAP, MDA-MB-231 ve DU145 hücrelerinde kontrol hücresine göre VEGFA ifadesinde azalma gözlenmiştir. 72 saat inkübasyon sonunda ise LNCAP hücresinin 2 µg/ml avelumab dozunda, MDA-MB-231 hücresinin 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab dozunda ve DU145 40 µg/ml avelumab dozunda kontrol hücresine göre VEGFA ifadesinde artma gözlenmiştir. MDA-MB-435 hücresinde her iki inkübasyon süresinde de anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

Çizelge 3.5. Avelumab verilen hücrelerdeki VEGFA gen ifadesi oranları (Ortalama ± Standart Hata) (*p<0.05)

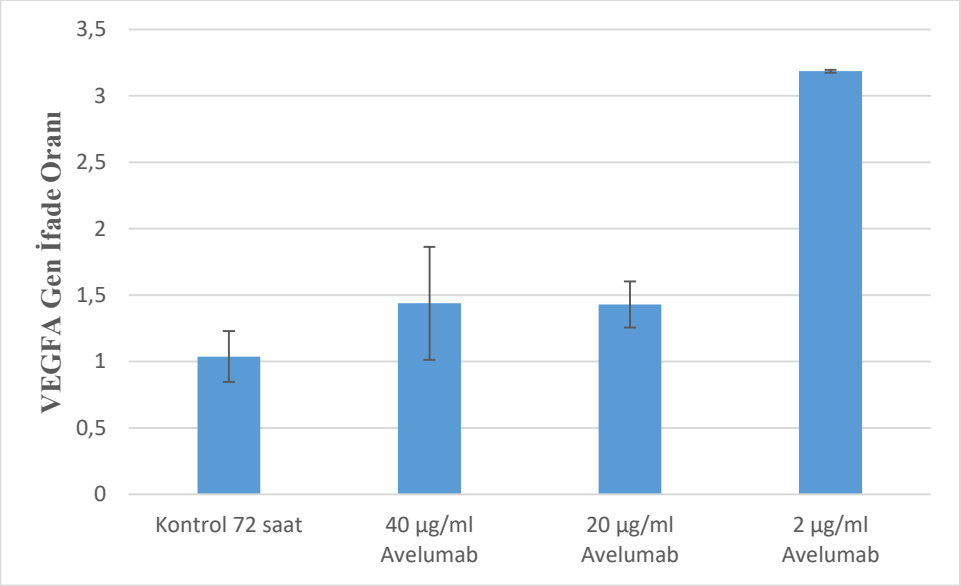
Avelumab Dozları	Hücreler			
	LNCAP	**MDA-MB-231**	**DU-145**	**MDA-MB-435**
Kontrol 24 saat	1,0113 ± 0,1255	1,0625 ± 0,25787	1,0368 ± 0,27363	1,041 ± 0,38716
40 µg/ml	0,0023 ± 0,00071 *	0,0368 ± 0,03294 *	0 ± 0 *	İfade yok
20 µg/ml	0,0027 ± 0,00143 *	0,5089 ± 0,01028	0,0021 ± 0,00052 *	0,3446 ± 0,07726
2 µg/ml	0,0235 ± 0,01148 *	0,0677 ± 0,0098 *	0,0014 ± 0,00043 *	2,7102 ± 0,86986
Kontrol 72 saat	1,0378 ± 0,19215	1,003 ± 0,0534	1,0088 ± 0,09414	1,0166 ± 0,12422
40 µg/ml	1,4387 ± 0,4255	5,8353 ± 1,41151	4,9707 ± 0,344 *	0,6487 ± 0,02023
20 µg/ml	1,4295 ± 0,17451	9,8247 ± 4,0095 *	İfade yok	2,6012 ± 1,08891
2 µg/ml	3,1859 ± 0,01104 *	33,5671 ± 3,3623*	İfade yok	0,6913 ± 0,17126

3.4.1.1. LNCAP Hücrelerindeki VEGFA Gen İfadesi

24 saat inkübasyona bırakılan LNCAP hücrelerinde, 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilmiş hücrelerin gen ifade oranları ile ilaç uygulanmamış kontrol hücresinin gen ifade oranı karşılaştırıldığında VEGF-A ifadesinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Buna karşılık 72 saat inkübasyona bırakılan LNCAP hücrelerinde, 2 µg/ml avelumab verilen hücrelerin VEGFA ifade oranı, kontrol hücresinin VEGFA ifade oranı ile karşılaştırıldığında VEGFA ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir. (Çizelge 3.5, Şekil 3.8 ve 3.9)



Şekil 3.8. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki VEGFA gen ifade oranları.

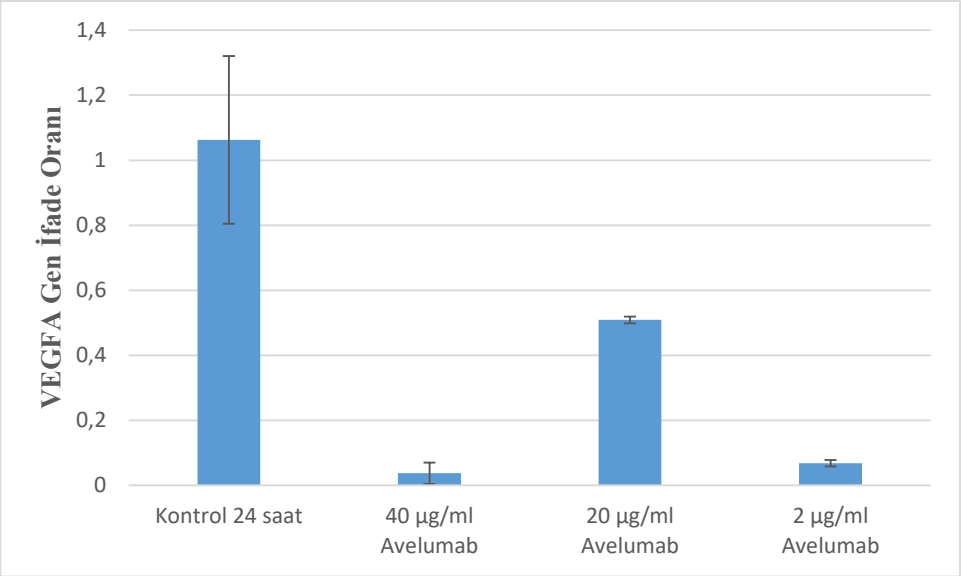


Şekil 3.9. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki VEGFA gen ifade oranları.

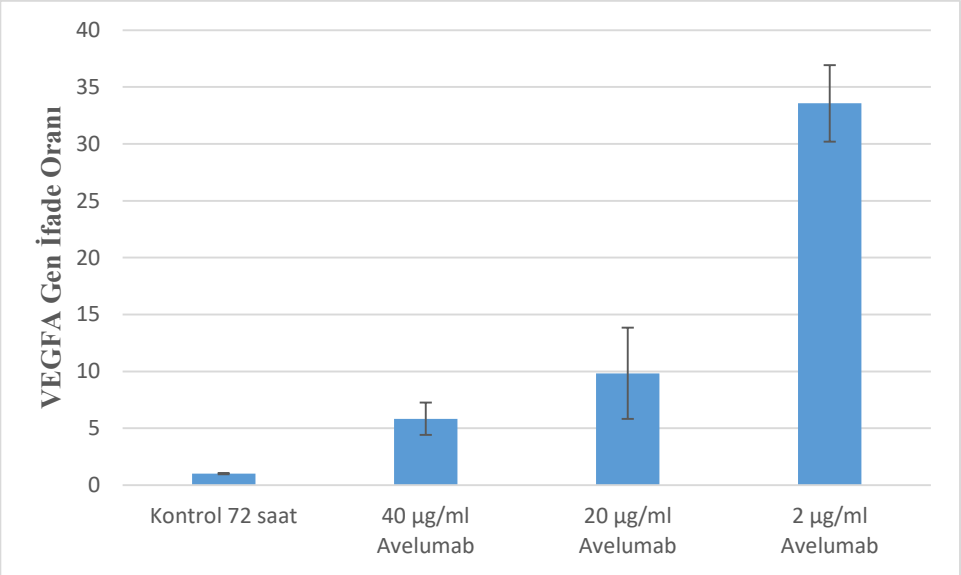
3.4.1.2. MDA-MB-231 Hücrelerindeki VEGFA İfadesi

24 saat inkübasyona bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde, 40 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilen hücrelerin VEGFA ifade oranları ile kontrol örneğinin VEGFA ifade oranı karşılaştırıldığında VEGFA ifadesinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

Buna karşılık 72 saat inkübasyon sonunda 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilen hücrelerin VEGFA ifade oranları ile kontrol örneğinin VEGFA ifade oranı karşılaştırıldığında VEGFA ifadesinde anlamlı artış izlenmiştir (Şekil 3.10, 3.11 ve Çizelge 3.5).



Şekil 3.10. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki VEGFA gen ifade oranları.

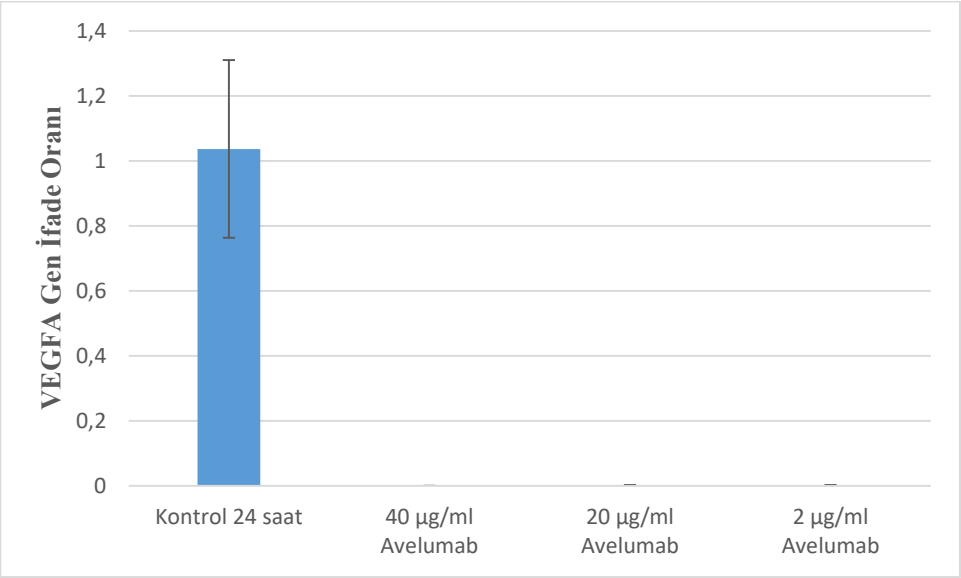


Şekil 3.11. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki VEGFA gen ifade oranları.

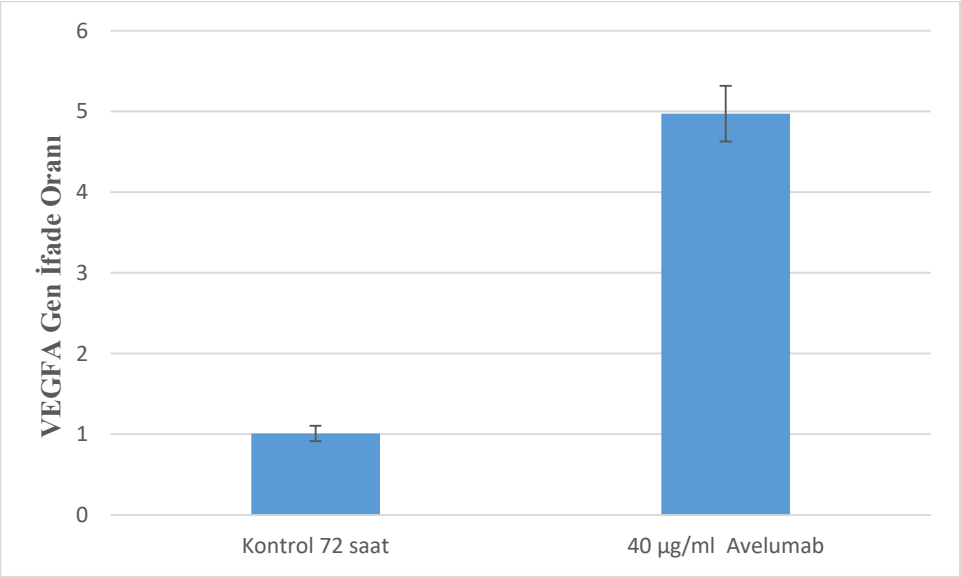
3.4.1.3. DU145 Hücrelerindeki VEGFA Gen İfadesi

24 saat inkübasyona bırakılan DU145 hücrelerinde, 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilmiş hücrelerin VEGFA gen ifade oranları ile kontrol örneğinin VEGF-A gen ifade oranı karşılaştırıldığında ilaç verilmiş hücrelerin VEGFA gen ifade düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

72 saat inkübasyona bırakılan DU145 hücrelerinde, 40 µg/ml avelumab verilmiş hücrelerin VEGFA gen ifade düzeyinin kontrol hücresine göre arttığı gözlenmiştir. Diğer dozlarda ise VEGFA gen ifadesi izlenmemiştir. (Çizelge 3.5, Şekil 3.12, 3.13)



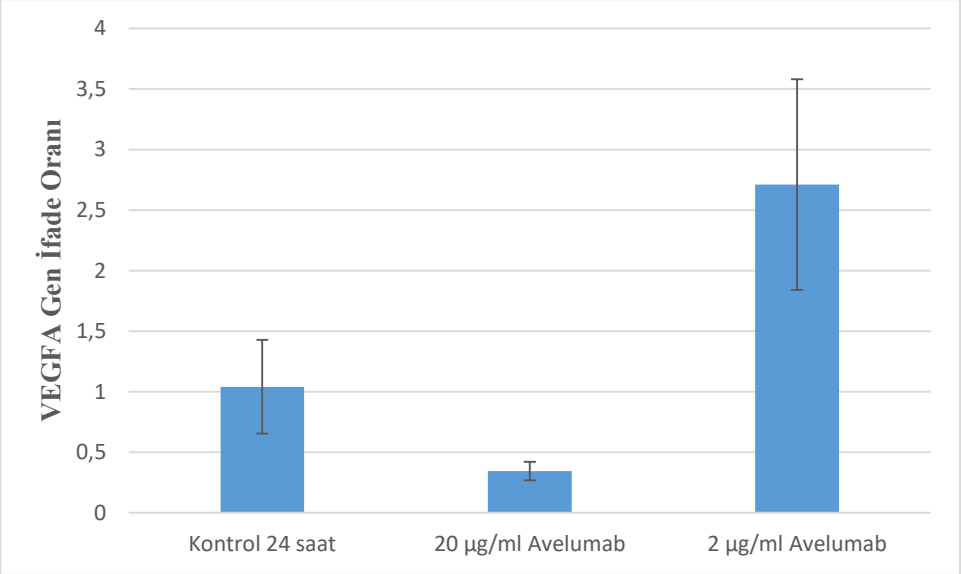
Şekil 3.12. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki VEGFA gen ifade oranları



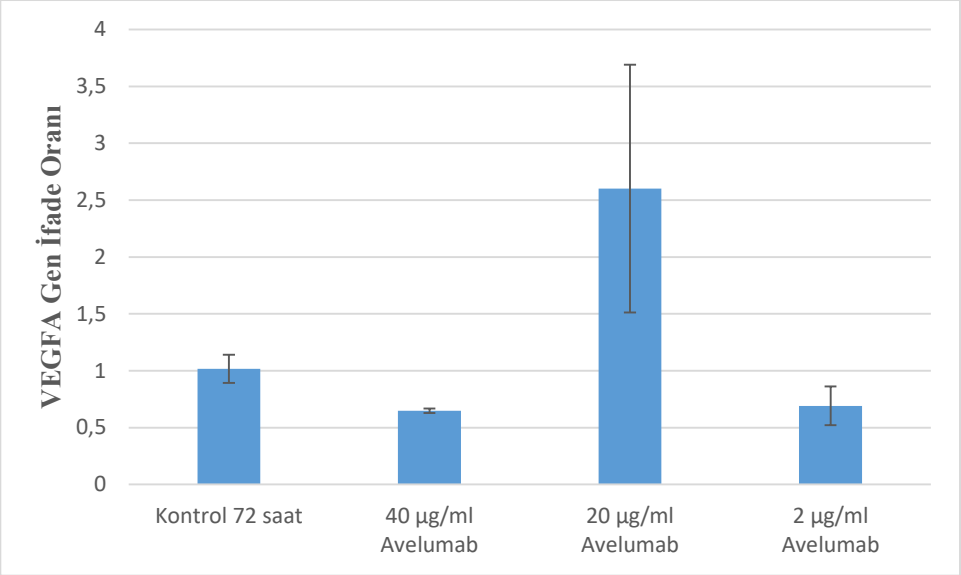
Şekil 3.13. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki VEGFA gen ifade oranları

3.4.1.4 MDA-MB-435 Hücrelerindeki VEGFA Gen İfadesi

24 saat ve 72 saat inkübasyona bırakılan MDA-MB-435 hücrelerinde, ilaç verilen hücrelerin VEGFA gen ifade oranları ile kontrol hücrelerinin VEGFA gen ifade düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı bir artış veya azalma gözlenmemiştir (Çizelge 3.5, Şekil 3.14, 3.15).



Şekil 3.14. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki VEGFA gen ifade oranları



Şekil 3.15. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki VEGFA gen ifade oranları.

3.4.2. Hücrelerdeki EGFR Gen İfadesi

Tez çalışmamızda kullandığımız hücrelerdeki ilaç uygulamaları sonrası izlenen EGFR gen ifade değişiklikleri Çizelge 3.6'da toplu olarak verilmiştir.

İstatistiksel olarak anlamlı sonuçlara göre, 24 saat inkübasyon sonunda LNCAP 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab dozlarında ve DU145 20 µg/ml avelumab dozunda kontrol hücrelerine göre EGFR ifadesinde artış; MDA-MB-231 40 µg/ml ve 20 µg/ml kontrol hücrelerine göre EGFR ifadesinde azalış gözlenmiştir. 72 saat inkübasyon sonunda LNCAP 40 µg/ml ve MB231 2 µg/ml avelumab dozlarında kontrol hücrelerine göre EGFR ifadesinde artış; DU145 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab dozları ile MDA-MB-435 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab dozlarında kontrol hücresine göre EGFR ifadesinde azalış olduğu gözlenmiştir.

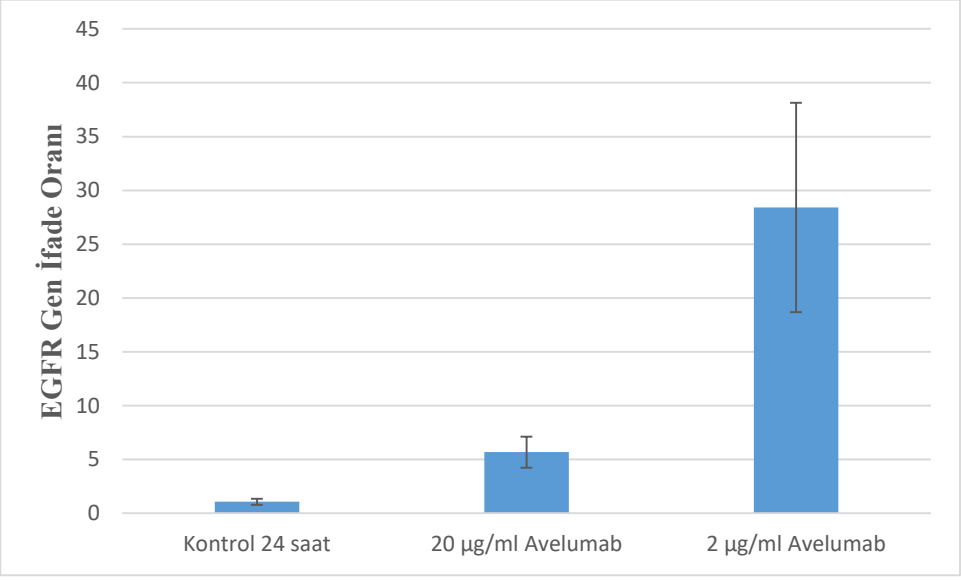
Çizelge 3.6. Avelumab verilen hücrelerdeki EGFR gen ifadesi oranları (Ortalama ± Standart Hata) (*p<0.05)

Avelumab Dozları	Hücreler			
	LNCAP	MDA-MB-231	DU-145	MDA-MB-435

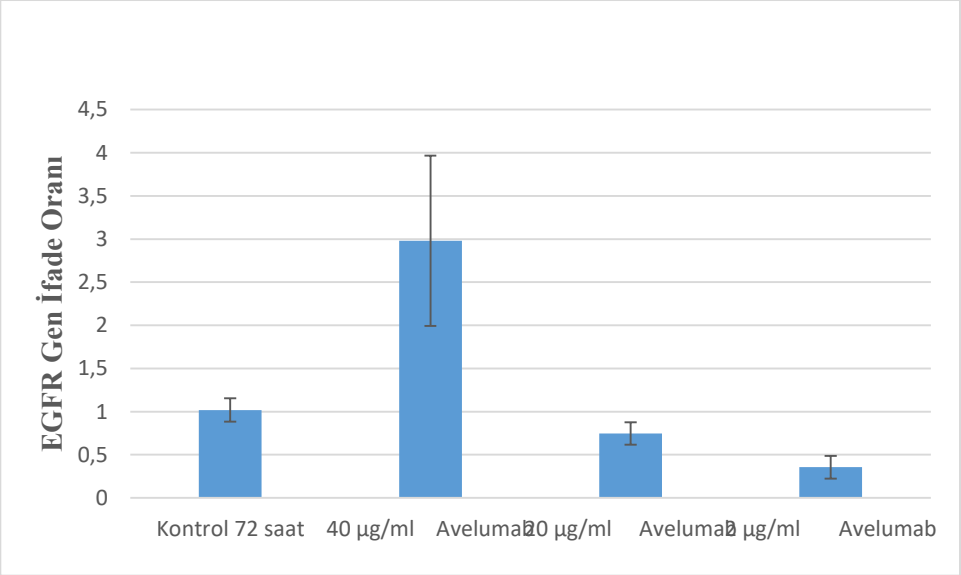
Kontrol 24 saat	1,0688 ± 0,28199	1,0139 ± 0,16712	1,0065 ± 0,4736	1,0387 ± 0,28082
40 µg/ml	İfade yok	0,0008 ± 0,00065 *	1,1204 ± 0,30773	0,1249 ± 0,09701
20 µg/ml	5,6824 ± 1,44464 *	0,3203 ± 0,1478 *	4,2898 ± 1,18343 *	İfade yok
2 µg/ml	28,4101 ± 9,7317 *	1,1205 ± 0,1007	1,2991 ± 0,19454	İfade yok
Kontrol 72 saat	1,0185 ± 0,13607	1,0122 ± 0,10945	1,00 ± 0,00347	1,0879 ± 0,30043
40 µg/ml	2,9812 ± 0,98745 *	0,8767 ± 0,16218	0,8828 ± 0,06109	0,171 ± 0,0617 *
20 µg/ml	0,7474 ± 0,13031	1,2153 ± 0,13511	0,0236 ± 0,01004 *	0,3698 ± 0,0321 *
2 µg/ml	0,3554 ± 0,13221	2,0709 ± 0,51976 *	0,5294 ± 0,04758 *	0,3202 ± 0,03031 *

3.4.2.1. LNCAP Hücrelerindeki EGFR Gen İfadesi

24 saat inkübasyona bırakılan LNCAP hücrelerinde, 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilen hücrelerin EGFR gen ifade oranında anlamlı artış gözlenmiştir. 72 saat inkübasyona bırakılan LNCAP hücrelerinde ise sadece 40 µg/ml avelumab verilen hücrelerin EGFR gen ifade oranın oranında anlamlı bir artış izlenirken diğer dozlarda azalma izlenmiştir (Çizelge 3.6, Şekil 3.16, 3.17)



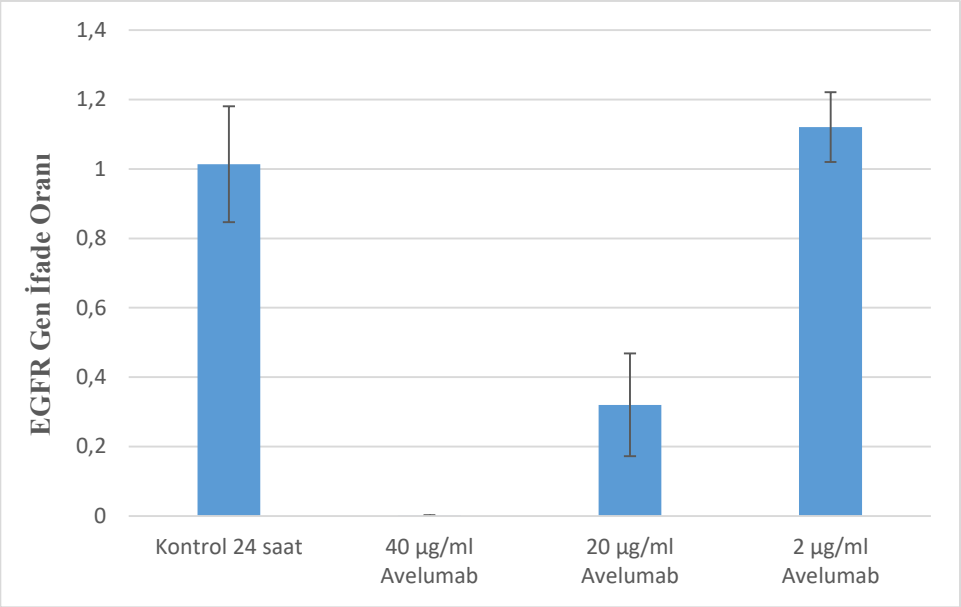
Şekil 3.16. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki EGFR gen ifade oranları.



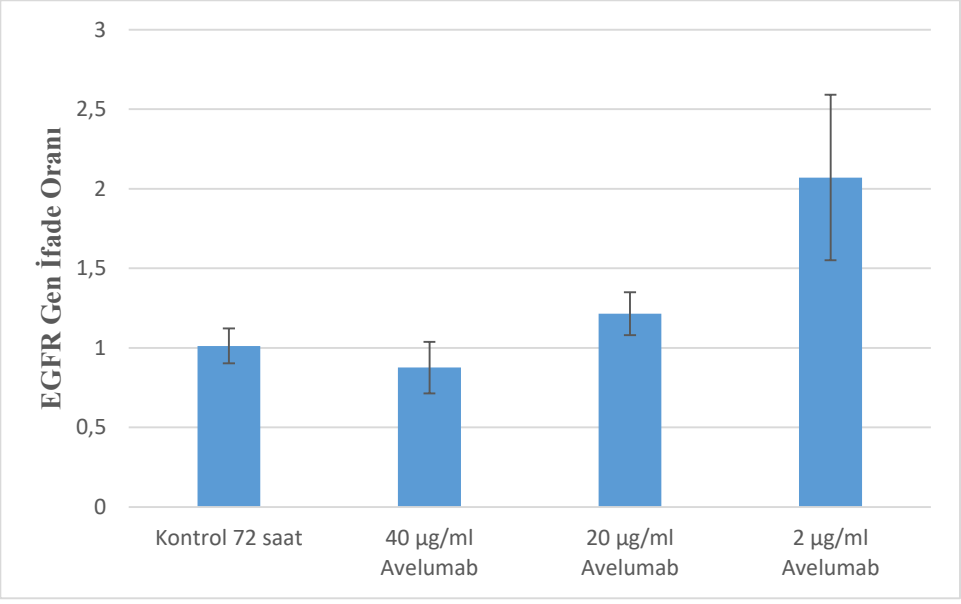
Şekil 3.17. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki EGFR gen ifade oranları.

3.4.2.2. MDA-MB-231 Hücrelerindeki EGFR Gen İfadesi

24 saat inkübasyon sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde, 40 µg/ml ve 20 µg/ml avelumab verilen hücrelerin EGFR gen ifade oranlarında anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Buna karşılık 2 µg/ml dozunda anlamlı bir değişiklik izlenmemiştir. 72 saat inkübasyon sonrasında ise, sadece 2 µg/ml avelumab dozunda EGFR gen ifade oranlarında anlamlı artış izlenirken diğer dozlarda bir değişiklik izlenmemiştir (Çizelge 3.6, Şekil 3.18, 3.19).



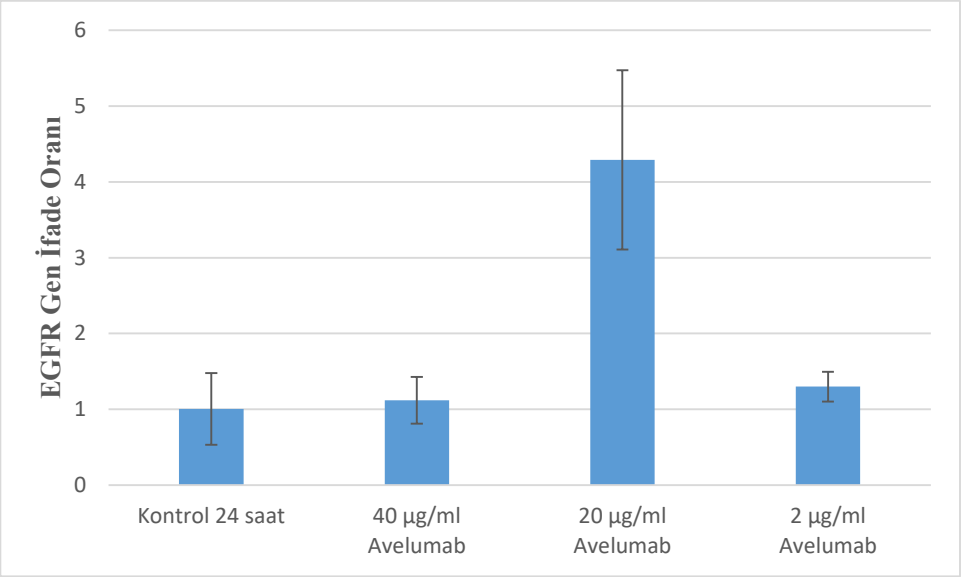
Şekil 3.18. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki EGFR gen ifade oranları



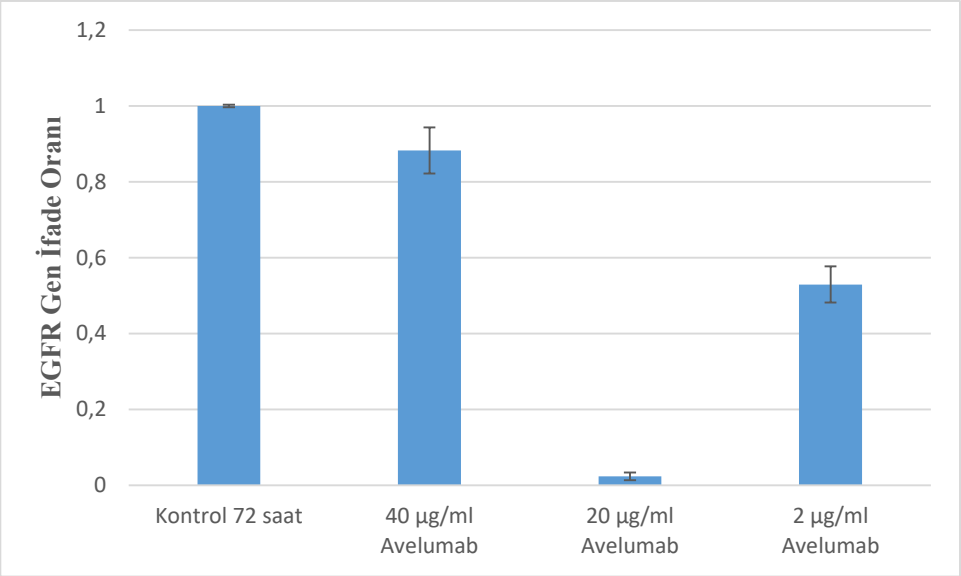
Şekil 3.19. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki EGFR gen ifade oranları

3.4.2.3. DU145 Hücrelerindeki EGFR Gen İfadesi

24 saat inkübasyona bırakılan DU145 hücrelerinde, 20 µg/ml avelumab verilen hücrelerin EGFR gen ifade oranlarında anlamlı artış gözlenirken diğer dozlarda bir değişiklik saptanmamıştır. 72 saat inkübasyona bırakılan DU145 hücrelerinde, 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilen hücrelerin EGFR gen ifade oranlarında, anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Çizelge 3.6, Şekil 3.20, 3.21).



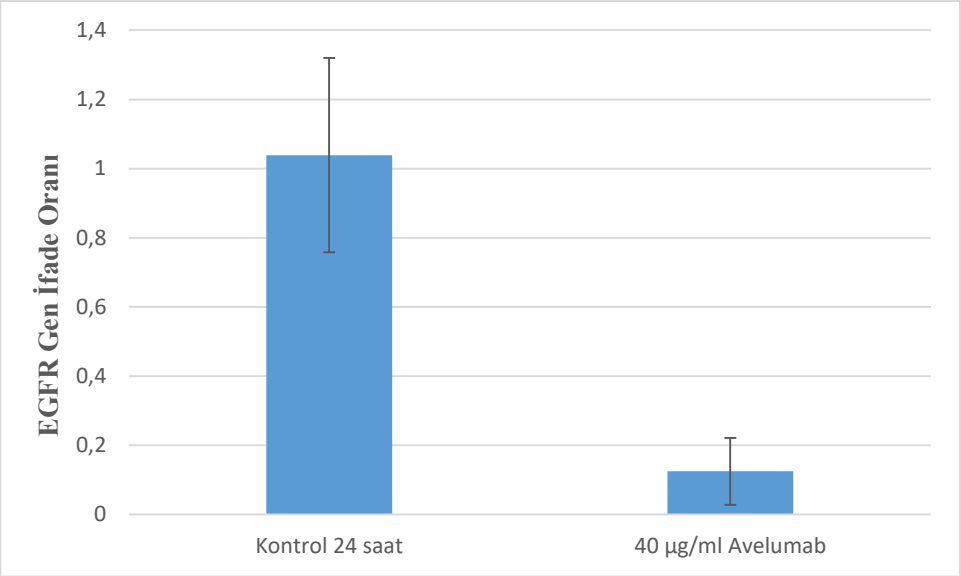
Şekil 3.20. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki EGFR gen ifade oranları



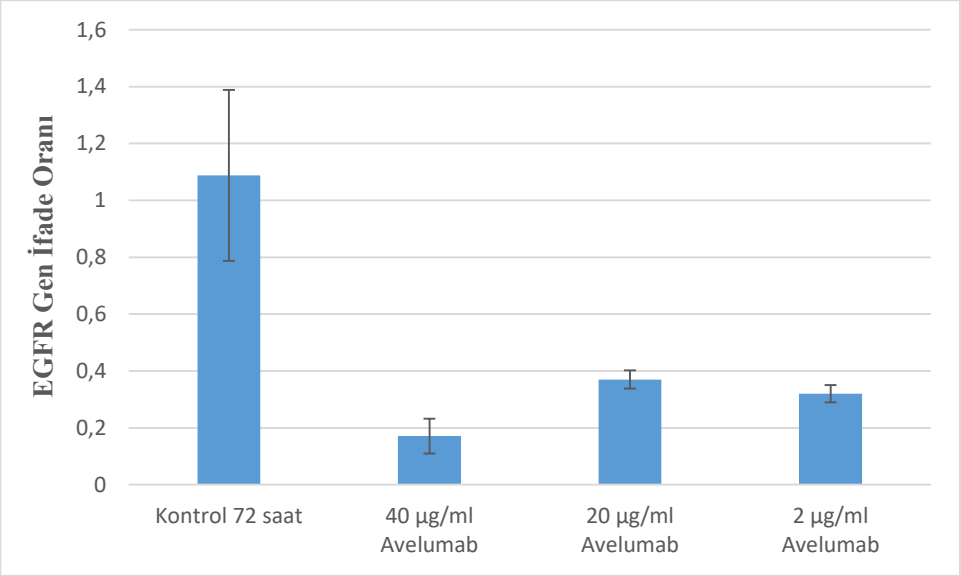
Şekil 3.21. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki EGFR gen ifade oranları

3.4.2.4. MDA-MB-435 Hücrelerindeki EGFR Gen İfadesi

24 saat inkübasyon sonrası MDA-MB-435 hücrelerinde, 40 µg/ml avelumab verilen hücrelerin EGFR gen ifade oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. 72 saat inkübasyon sonrasında ise, uygulanan tüm dozlarda EGFR gen ifade oranlarında anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Çizelge 3.6, Şekil 3.22, 3.23).



Şekil 3.22. 24 saat saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki EGFR gen ifade oranları



Şekil 3.23. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki EGFR gen ifade oranları

3.4.3. Hücrelerdeki MMP-9 Gen İfadesi

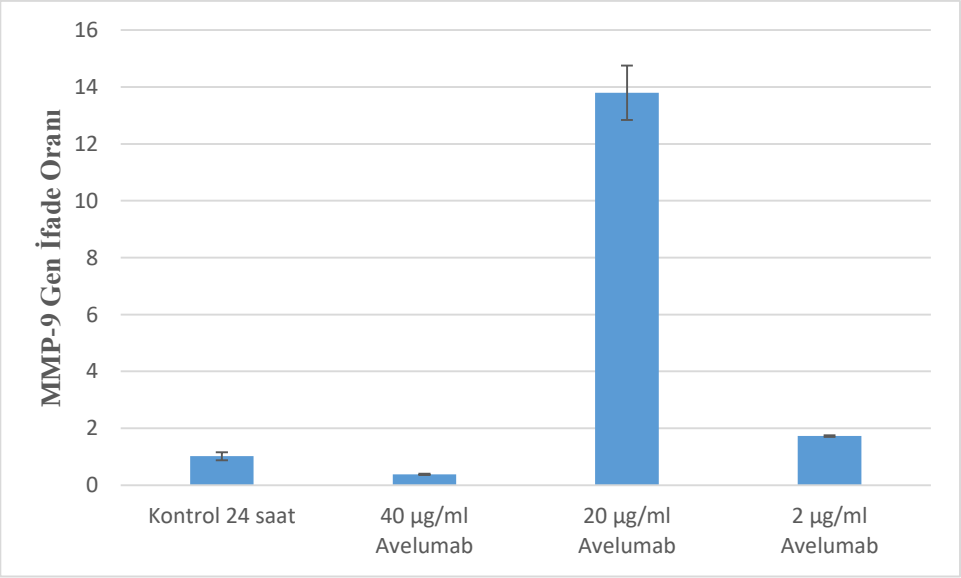
Tez çalışmamızda kullandığımız hücrelerdeki ilaç uygulamaları sonrası izlenen MMP-9 gen ifade değişiklikleri Çizelge 3.7'de toplu olarak verilmiştir.

Çizelge 3.7. Avelumab verilen hücrelerdeki MMP-9 gen ifadesi oranları (Ortalama ± Standart Hata) (*p<0.05)

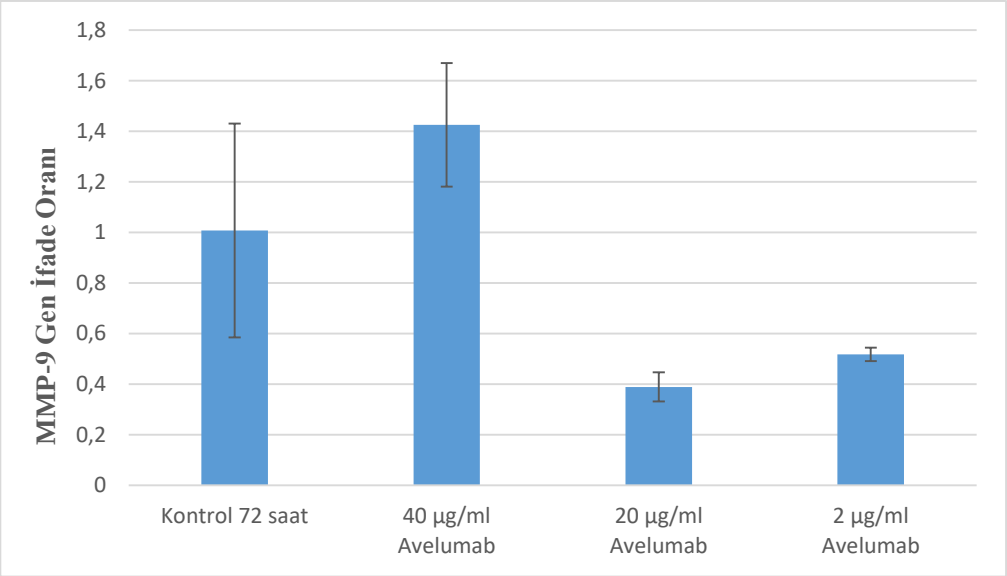
Avelumab Dozları	Hücreler			
	LNCAP	MDA-MB-231	DU-145	MDA-MB-435
Kontrol 24 saat	1,0177 ± 0,1395	1,0447 ± 0,0744	1,0088 ± 0,0971	1,002 ± 0,56623
40 µg/ml	0,3807 ± 0,02635	0,0115 ± 0,00306 *	0,9478 ± 0,06055	1,5069 ± 0,46162
20 µg/ml	13,8016 ± 0,95512*	0,0142 ± 0,00546 *	6,4174 ± 0,96918 *	İfade yok
2 µg/ml	1,7273 ± 0,02993	0,0069 ± 0,00156 *	1,3508 ± 0,03744	2,5241 ± 0,68939
Kontrol 72 saat	1,00753 ± 0,42283	1,0121 ± 0,11262	1,0003 ± 0,02426	1,0153 ± 0,1293
40 µg/ml	1,4257 ± 0,24461	0,0919 ± 0,01308 *	1,5439 ± 0,16524 *	2,4758 ± 1,44081
20 µg/ml	0,389 ± 0,05754	0,2511 ± 0,04927 *	0,1458 ± 0,02256 *	0,9448 ± 0,08571
2 µg/ml	0,5178 ± 0,02648	0,0183 ± 0,00226 *	1,0694 ± 0,01482	0,3763 ± 0,07213

3.4.3.1. LNCAP Hücrelerindeki MMP-9 Gen İfadesi

24 saat inkübasyona bırakılan LNCAP hücrelerinde, 20 µg/ml avelumab verilen hücrelerin MMP-9 gen ifadelerinde anlamlı artış gözlenmiştir. 72 saat inkübasyona bırakılan LNCAP hücrelerinde, 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilen hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Çizelge 3.7, Şekil 3.24, 3.25).



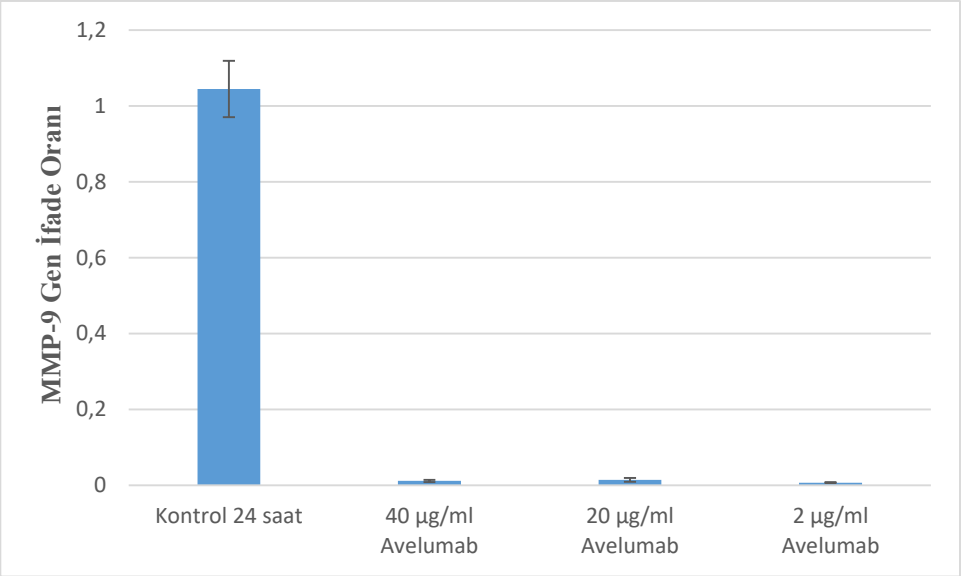
Şekil 3.24. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki MMP-9 gen ifade oranları.



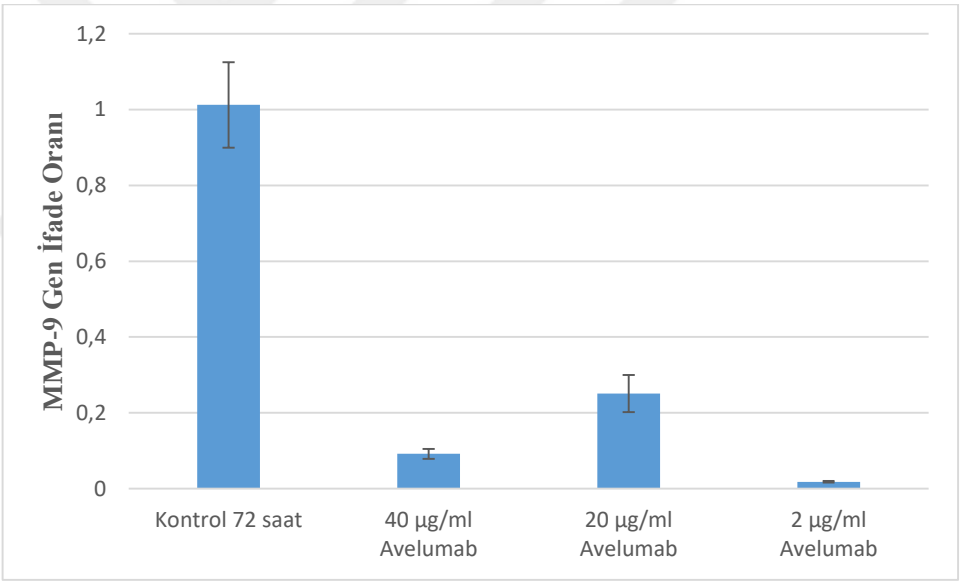
Şekil 3.25.72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki MMP-9 gen ifade oranları.

3.4.3.2. MDA-MB-231 Hücrelerindeki MMP-9 Gen İfadesi

Hem 24 saat hem de 72 saat inkübasyona bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde, 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilen hücrelerin MMP-9 gen ifadelerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Çizelge 3.7, Şekil 3.26, 3.27).



Şekil 3.26.. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki MMP-9 gen ifade oranları

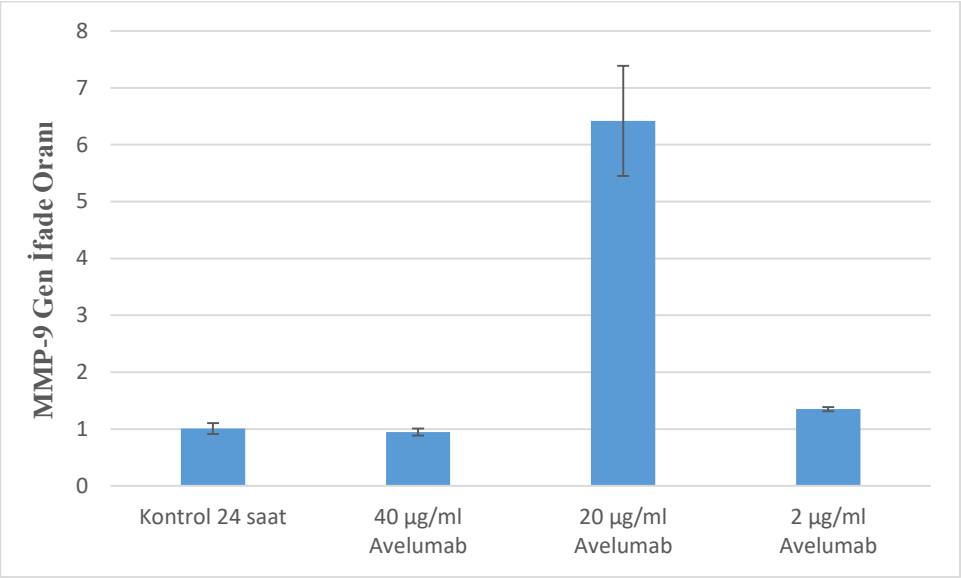


Şekil 3.27. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki MMP-9 gen ifade oranları

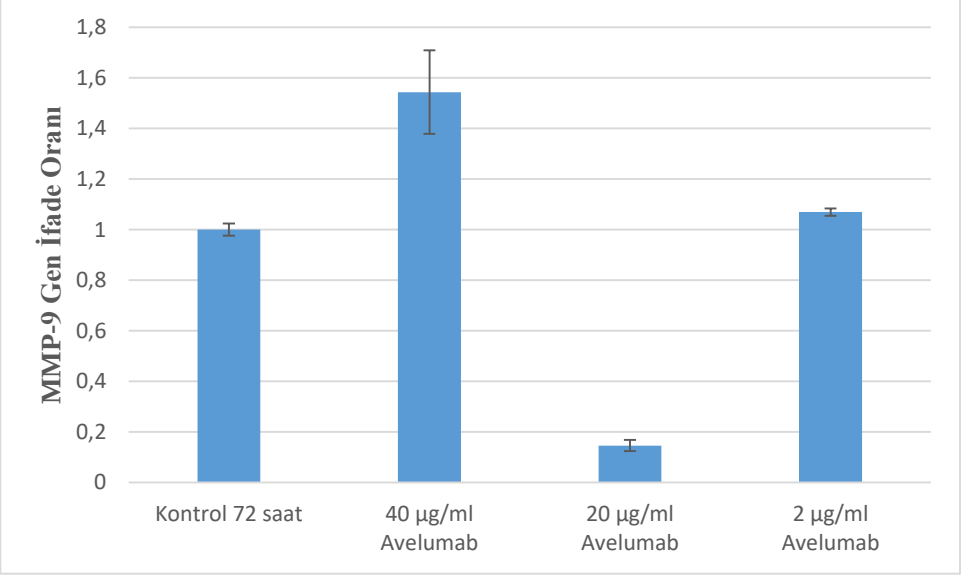
3.4.3.3. DU145 Hücrelerindeki MMP-9 Gen İfadesi

24 saat inkübasyona bırakılan DU145 hücrelerinde, 20 µg/ml avelumab verilen hücrelerin MMP-9 gen ifade oranında, ilaç verilmemiş kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı artış olduğu gözlenmiştir. 72 saat inkübasyonda ise 40 µg/ml avelumab verilen hücrelerin MMP-9 gen ifade oranında anlamlı artış

gözlenirken; 20 µg/ml avelumab verilen hücrelerin MMP-9 gen ifade oranında, ilaç verilmemiş kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Çizelge 3.7, Şekil 3.28, 3.29).



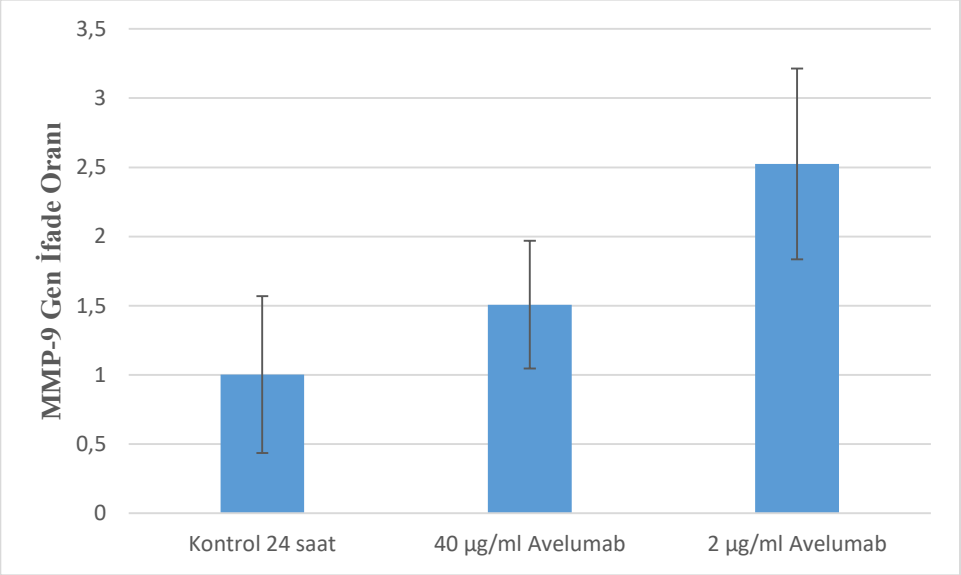
Şekil 3.28. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki MMP-9 gen ifade oranları



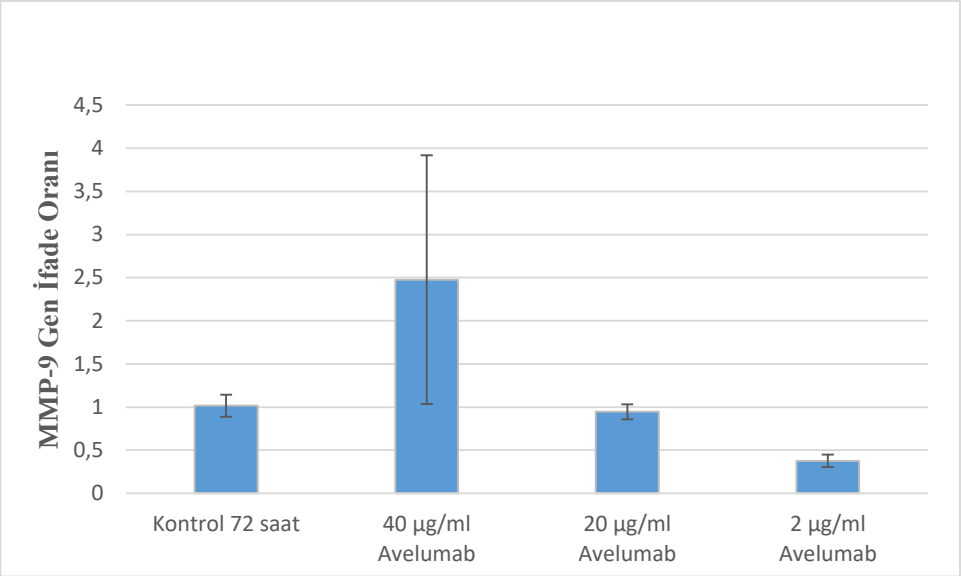
Şekil 3.29. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki MMP-9 gen ifade oranları

3.4.3.4. MDA-MB-435 Hücrelerindeki MMP-9 Gen İfadesi

24 saat ve 72 saat inkübasyona bırakılan MDA-MB-435 hücrelerinde 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilen hücrelerin MMP-9 gen ifade oranları ile ilaç verilmemiş kontrol hücrelerin MMP-9 gen ifade oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 3.7, Şekil 3.30, 3.31).



Şekil 3.30. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki MMP-9 gen ifade oranları



Şekil 3.31. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki MMP-9 gen ifade oranları

3.4.4. Hücrelerdeki bFGF Gen İfadesi

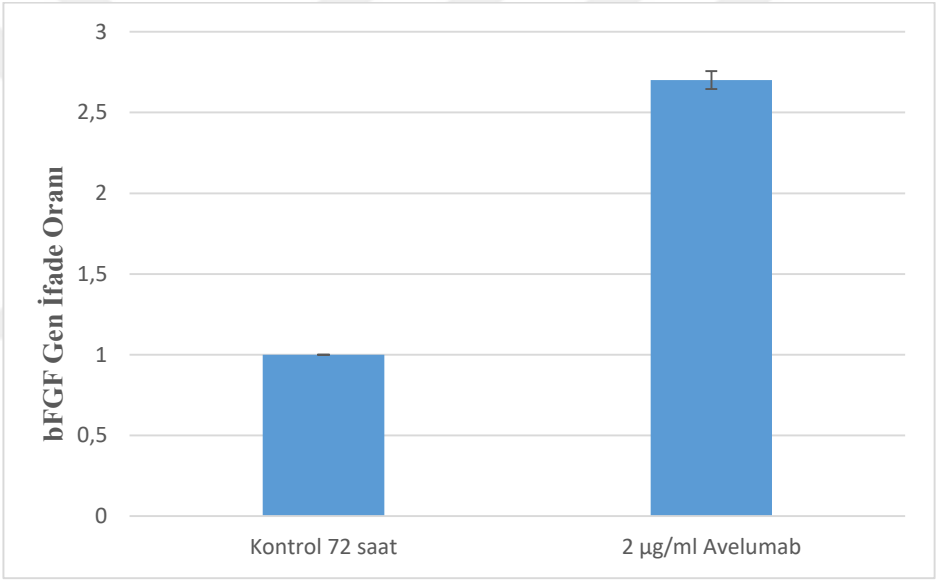
Tez çalışmamızda kullandığımız hücrelerdeki ilaç uygulamaları sonrası izlenen bFGF gen ifade değişiklikleri Çizelge 3.8'de toplu olarak verilmiştir.

Çizelge 3.8. Avelumab verilen hücrelerdeki bFGF gen ifadesi oranları (Ortalama ± Standart Hata) (*p<0.05)

Avelumab Dozları	Hücreler			
	LNCAP	MDA MB 231	DU-145	MDA MB 435
Kontrol 24 saat	İfade yok	İfade yok	1,0044 ± 0,04012	1,002 ± 0,05192
40 µg/ml	İfade yok	İfade yok	0,0812 ± 0,00028	0,0384 ± 0,01319 *
20 µg/ml	İfade yok	İfade yok	0,1404 ± 0,01455	0,3011 ± 0,01302 *
2 µg/ml	İfade yok	İfade yok	0,0362 ± 0,00753 *	0,2141 ± 0,02949 *
Kontrol 72 saat	1,00 ± 0	1,00 ± 0	1,0515 ± 0,24265	1,0439 ± 0,55546
40 µg/ml	İfade yok	İfade yok	1,8455 ± 1,12354	5,1403 ± 0,07125
20 µg/ml	İfade yok	3,1625 ± 0,32764 *	0,3429 ± 0,03434	14,5797 ± 4,03536*
2 µg/ml	2,7014 ± 0,05617 *	İfade yok	0,2542 ± 0,01333	3,898 ± 0,28632

3.4.4.1. LNCAP Hücrelerindeki bFGF Gen İfadesi

24 saat inkübasyona bırakılan LNCAP hücrelerinde, ilaç verilmemiş kontrol hücrelerinde ve 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilmiş hücrelerde bGFG geni ifade olmamıştır. 72 saat inkübasyona bırakılan LNCAP hücrelerinde ise, bFGF geni sadece ilaç verilmemiş kontrol hücrelerinde ve 2 µg/ml avelumab verilmiş hücrelerde ifade olmuştur. 2 µg/ml avelumab verilmiş hücrelerin bFGF gen ifade oranlarında, ilaç verilmemiş kontrol hücrelerin bFGF gen ifade oranları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir (Çizelge 3.8, Şekil 3.32).

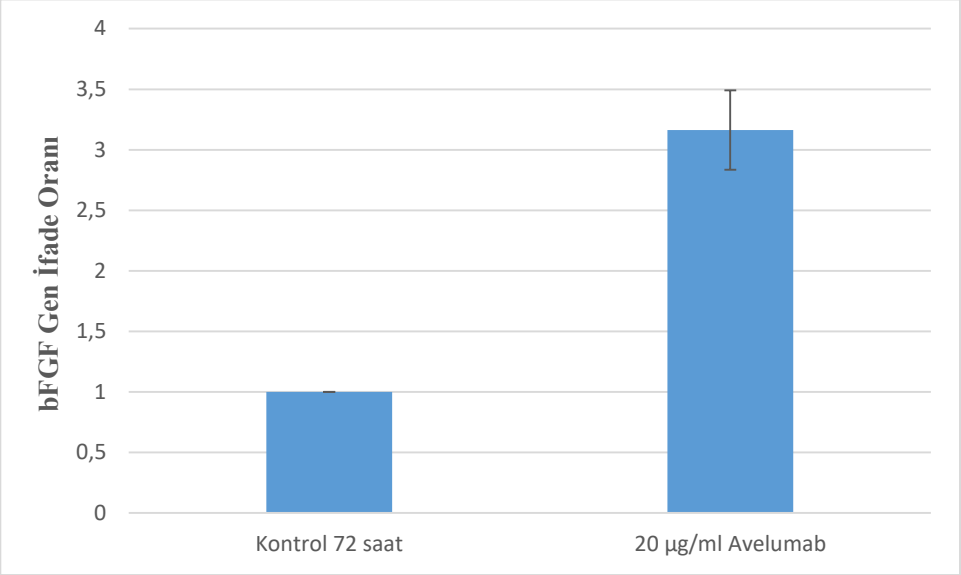


Şekil 3.32. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki bFGF gen ifade oranları

3.4.4.2. MDA-MB-231 Hücrelerindeki bFGF Gen İfadesi

24 saat inkübasyona bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde ilaç verilmemiş kontrol hücrelerinde ve 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilmiş hücrelerde bGFG geni ifade olmamıştır. 72 saat inkübasyona bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde, bFGF geni sadece ilaç verilmemiş kontrol hücrelerinde ve 20 µg/ml avelumab verilmiş hücrelerde ifade olmuştur. 20 µg/ml avelumab verilmiş hücrelerin bFGF gen ifade oranlarında, ilaç verilmemiş kontrol hücrelerin bFGF gen ifade

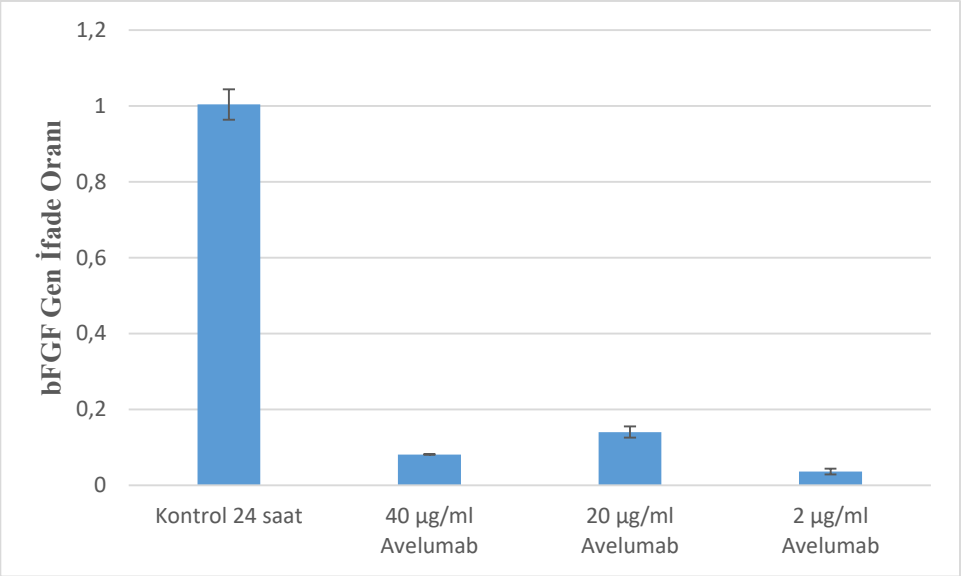
oranları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmiştir (Şekil 3.33, Çizelge 3.8).



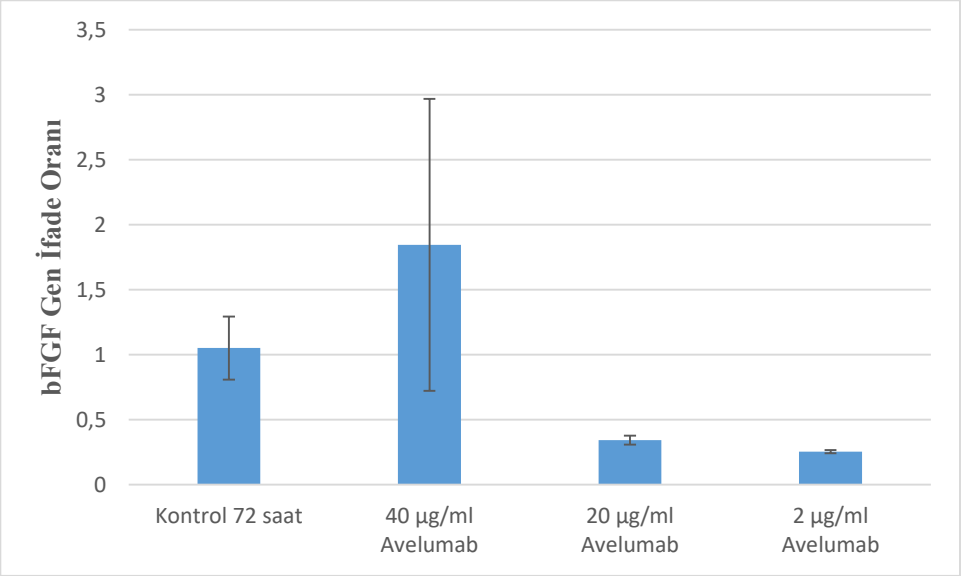
Şekil 3.33. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki bFGF gen ifade oranları

3.4.4.3. DU145 Hücrelerindeki bFGF Gen İfadeleri

24 saat inkübasyona bırakılan DU145 hücrelerinde, tüm avelumab dozlarında bFGF gen ifade oranlarında bir azalma izlenmiştir. 72 saat inkübasyon sonrasında ise uygulanan ilaç dozlarında bFGF gen ifadelerinde anlamlı bir değişiklik izlenmemiştir (Çizelge 3.8, Şekil 3.34, 3.35).



Şekil 3.34. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki bFGF gen ifade oranları

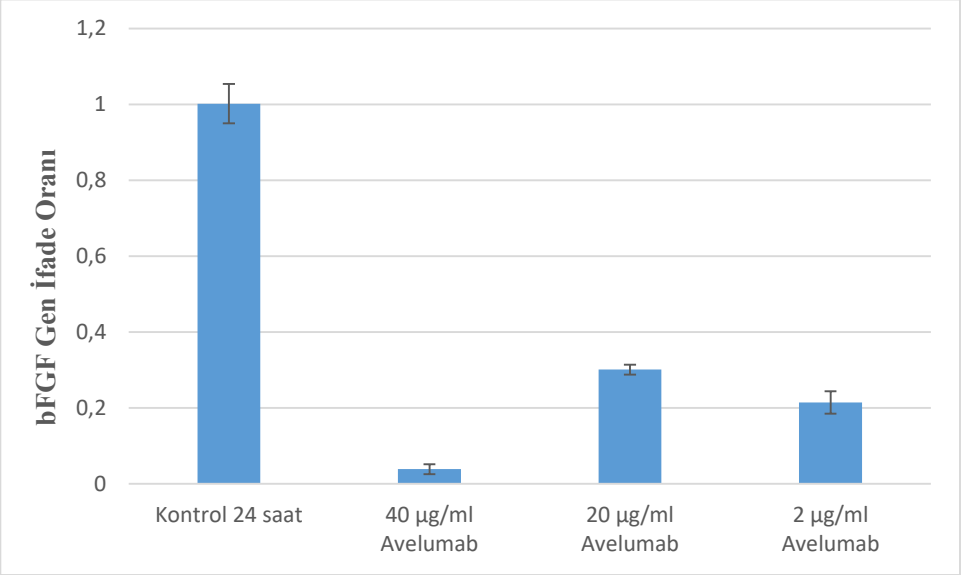


Şekil 3.35. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki bFGF gen ifade oranları

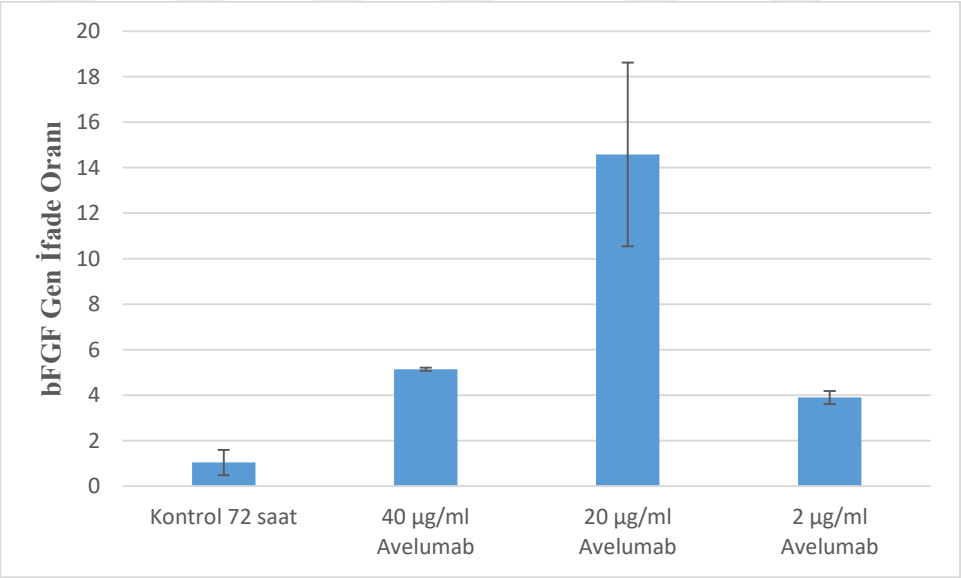
3.4.4.4. MDA-MD-435 Hücrelerindeki bFGF Gen İfadesi

24 saat inkübasyon sonrası MDA-MB-435 hücrelerinde 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilmiş hücrelerin bFGF gen ifade oranlarında, ilaç verilmemiş kontrol hücrelerin bFGF gen ifade oranları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma gözlenmiştir. 72 saat inkübasyon sonrası ise, uygulanan tüm dozlarda bFGF gen

ifadesinde artış izlenirken en belirgin artış 20 µg/ml avelumab dozunda olmuştur (Çizelge 3.8, Şekil 3.36, 3.37).



Şekil 3.36. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki bFGF gen ifade oranları



Şekil 3.37. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki bFGF gen ifade oranları

3.4.5. Hücrelerdeki TGF-beta Gen İfadesi

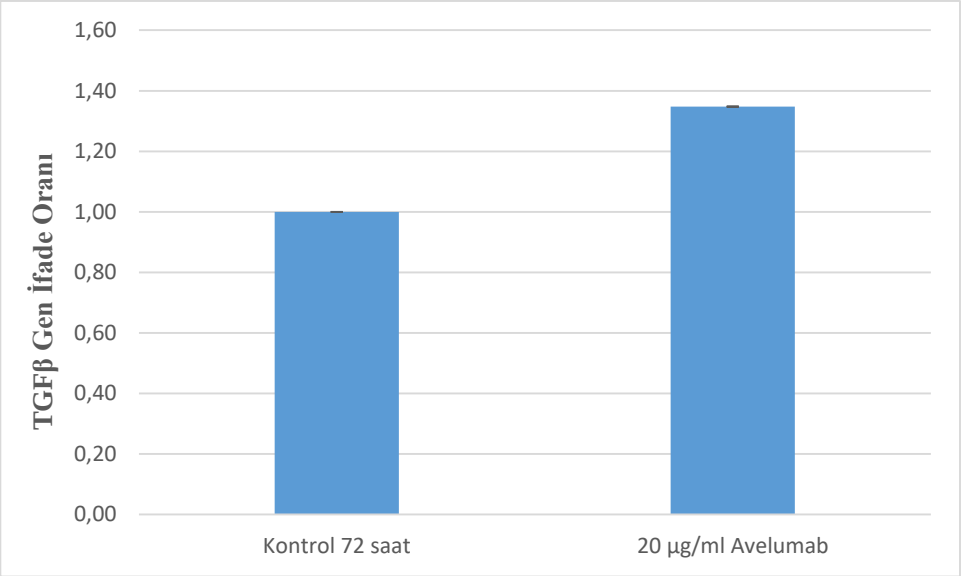
Tez çalışmamızda kullandığımız hücrelerdeki ilaç uygulamaları sonrası izlenen TGF-beta gen ifade değişiklikleri Çizelge 3.9'da toplu olarak verilmiştir.

Çizelge 3.9. Avelumab verilen hücrelerdeki TGF-beta gen ifadesi oranları (Ortalama ± Standart Hata) (*p<0.05)

Avelumab Dozları	Hücreler			
	LNCAP	**MDA-MB-231**	**DU-145**	**MDA-MB-435**
Kontrol 24 saat	İfade yok	1,0032 ± 0,05514	1,0278 ± 0,17534	1,0049 ± 0,06745
40 µg/ml	İfade yok	0,0551 ± 0,00095 *	0,3315 ± 0,12752 *	0,0003 ± 0,00004 *
20 µg/ml	İfade yok	0,0929 ± 0,02821 *	0,2597 ± 0,01259 *	0,0502 ± 0,00987 *
2 µg/ml	İfade yok	0,0514 ± 0,01047 *	0,1963 ± 0,104 *	0,0949 ± 0,00853 *
Kontrol 72 saat	1,00 ± 0	1,0203 ± 0,20237	1,0232 ± 0,21653	1,0104 ± 0,09938
40 µg/ml	İfade yok	0,3407 ± 0,1149	0,1453 ± 0,04976	6,4416 ± 1,44827 *
20 µg/ml	1,35 ± 0	1,0663 ± 0,29432	İfade yok	4,7547 ± 0,54323 *
2 µg/ml	İfade yok	0,2529 ± 0,01139	İfade yok	5,2577 ± 0,81142 *

3.4.5.1. LNCAP Hücrelerindeki TGF-Beta Gen İfadesi

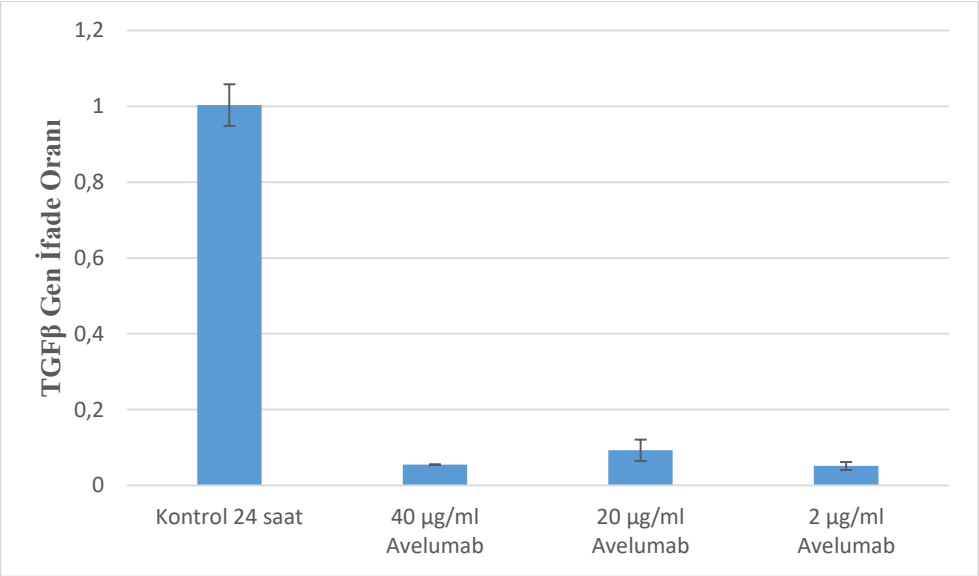
24 saat inkübasyona bırakılan LNCAP hücrelerinde, ilaç verilmemiş kontrol hücrelerinde ve 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilmiş hücrelerde TGF-beta geni ifade olmamıştır. 72 saat inkübasyona bırakılan LNCAP hücrelerinde, TGF-beta geni sadece ilaç verilmemiş kontrol hücrelerinde ve 20 µg/ml avelumab verilmiş hücrelerde ifade olmuştur. Ancak bu iki hücrenin gen ifade oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Çizelge 3.9, Şekil 3.38).



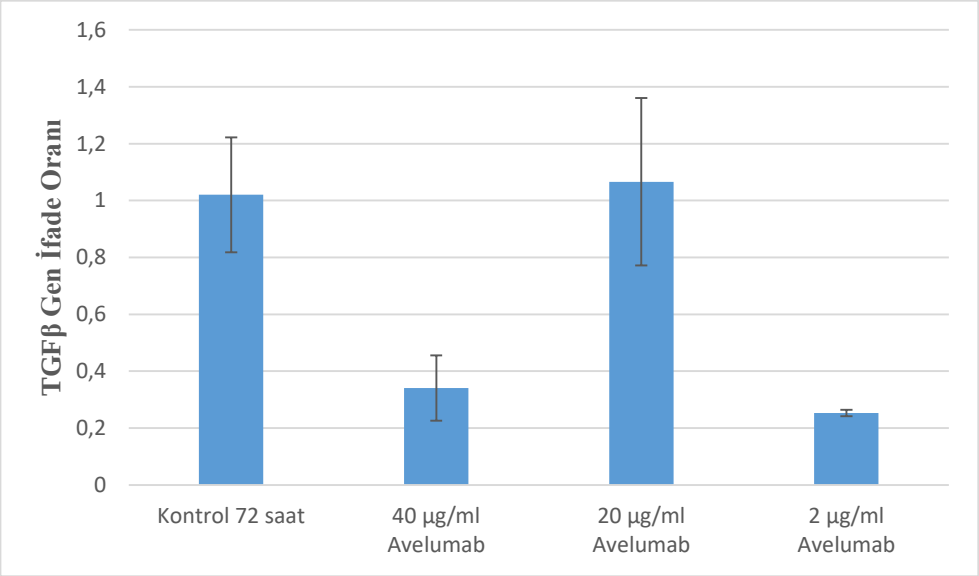
Şekil 3.38. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki TGF-beta gen ifade oranları

3.4.5.2. MDA-MB-231 Hücrelerindeki TGF-beta Gen İfadesi

24 saat inkübasyon sonrasında MDA MB 231 hücrelerinde, 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 2 µg/ml Avelumab verilmiş hücrelerin TGF-beta gen ifade oranlarında, anlamlı bir azalma gözlenmiştir. 72 saat inkübasyon sonrasında ise 40 µg/ml ve 2 µg/ml ilaç verilmiş hücrelerin TGF-beta gen ifade oranlarında bir azalma izlenmiştir (Çizelge 3.9, Şekil 3.39, 3.40).



Şekil 3.39. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki TGF-beta gen ifade oranları

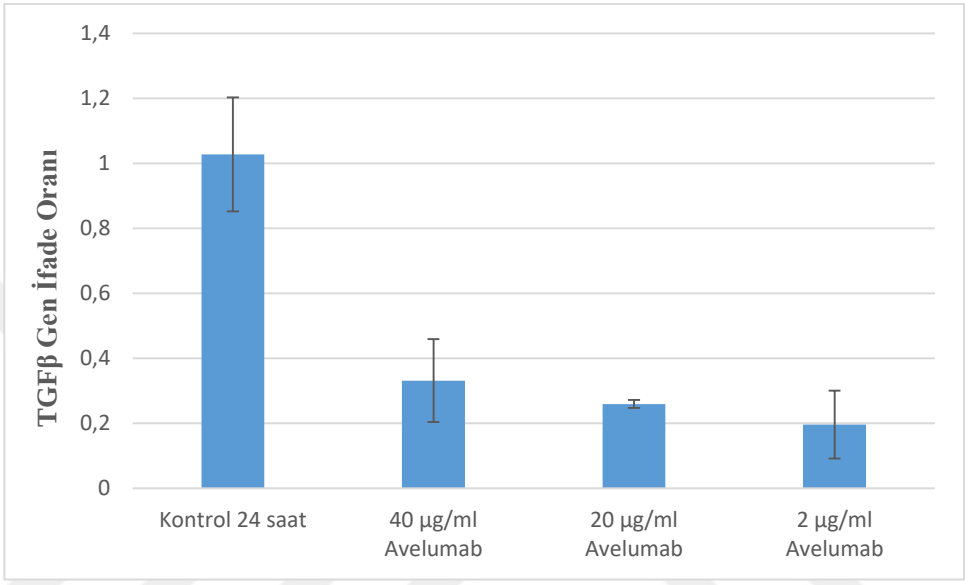


Şekil 3.40. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerindeki TGF-beta gen ifade oranları

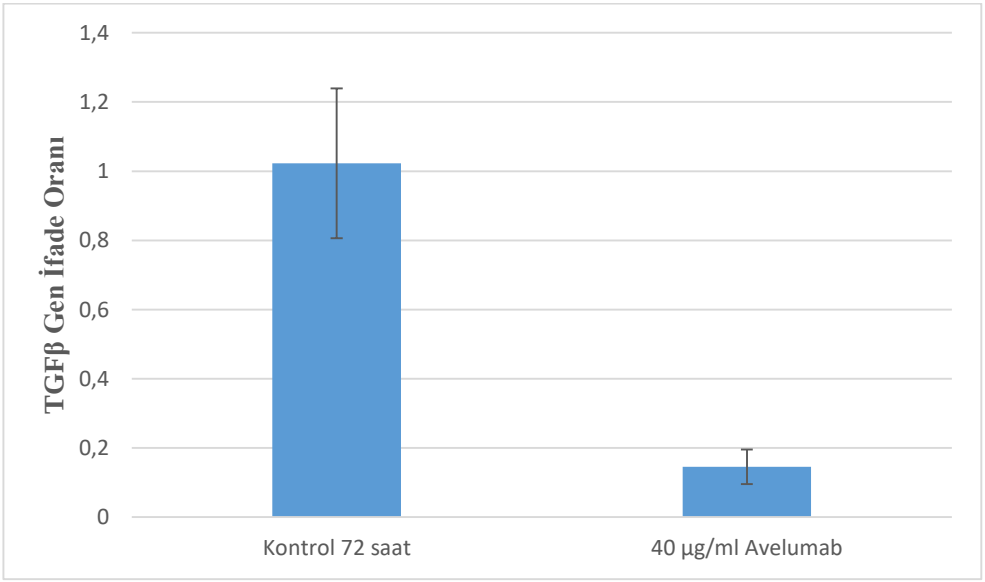
3.4.5.3. DU145 Hücrelerindeki TGF-beta Gen İfadesi

24 saat inkübasyon sonrasında DU145 hücrelerinde, 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilmiş hücrelerin TGF-beta gen ifade oranlarında istatistiksel olarak

anlamlı bir azalma gözlenmiştir. 72 saat inkübasyona bırakılan DU145 hücrelerinde, TGF-beta geni sadece ilaç verilmemiş kontrol hücrelerinde ve 40 µg/ml Avelumab verilmiş hücrelerde ifade olmuş ve kontrole göre ifade de bir azalma gözlenmiştir. Ancak bu iki hücrenin gen ifade oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Çizelge 3.9, Şekil 3.41, 3.42).



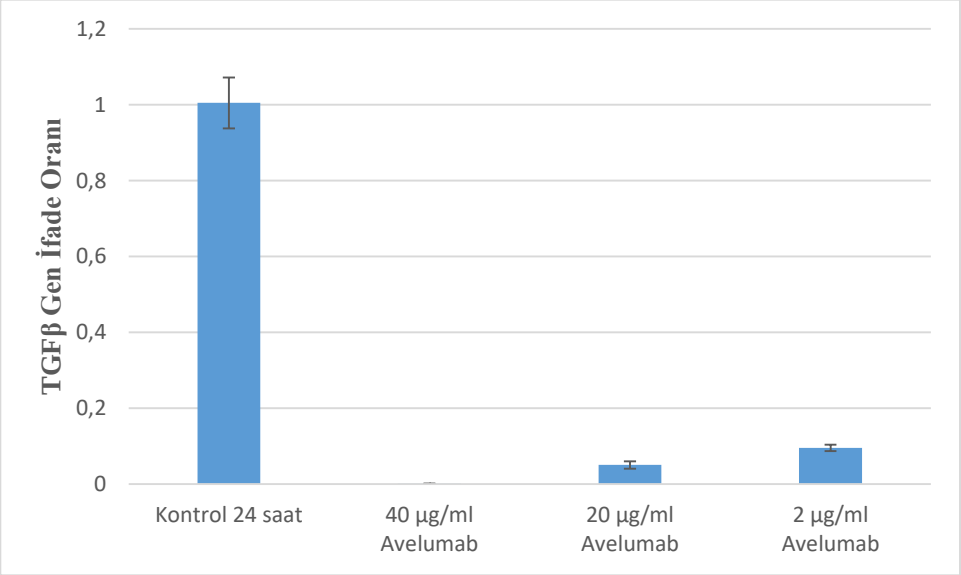
Şekil 3.41. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki TGF-beta gen ifade oranları



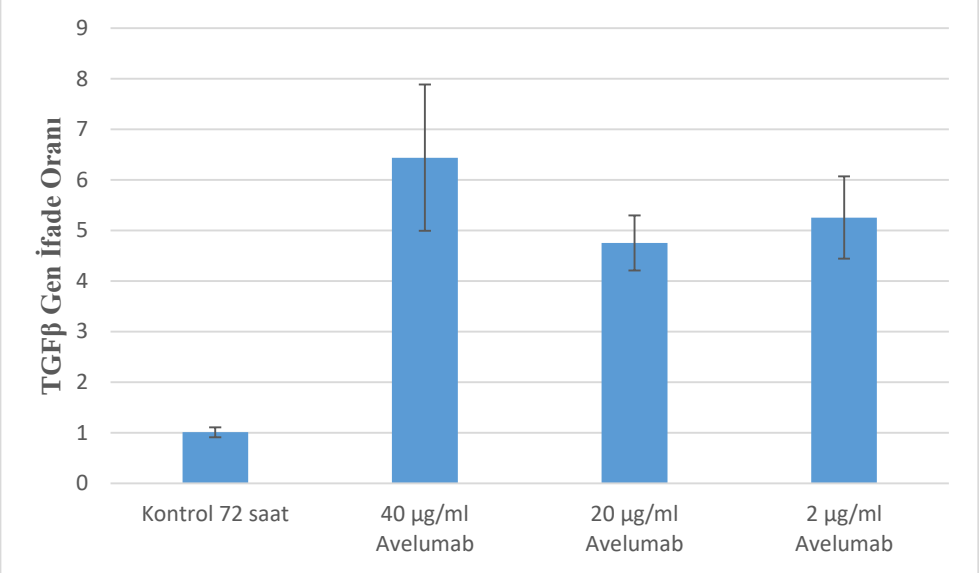
Şekil 3.42. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki TGF-beta gen ifade oranları

3.4.5.4. MDA-MB-435 Hücrelerindeki TGF-beta Gen İfadesi

24 saat inkübasyona bırakılan MDA-MB-435 hücrelerinde, 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilmiş hücrelerin gen ifade oranlarında anlamlı azalma gözlenmiştir. 72 saat inkübasyon sonrasında ise uygulanan tüm dozlarda TGF-beta gen ifade oranında anlamlı artış izlenmiştir (Çizelge 3.9, Şekil 3.43, 3.44).



Şekil 3.43. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki TGF-beta gen ifade oranları



Şekil 3.44. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış MDA-MB-435 hücrelerindeki TGF-beta gen ifade oranları.

3.4.6. Hücrelerdeki CDH1 Gen İfadesi

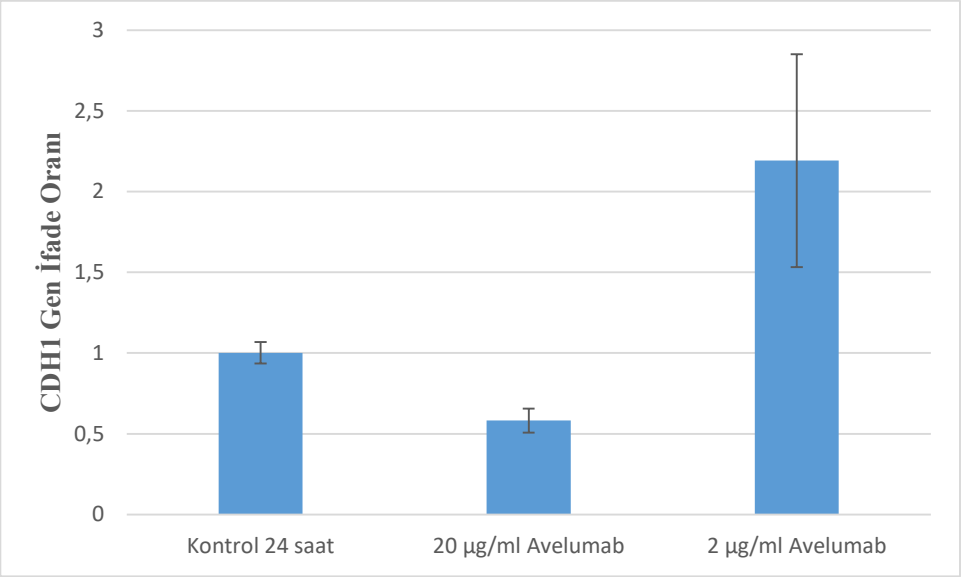
Tez çalışmamızda kullandığımız hücrelerdeki ilaç uygulamaları sonrası izlenen CDH1 gen ifade değişiklikleri Çizelge 3.10'da toplu olarak verilmiştir.

Çizelge 3.10. Avelumab verilen hücrelerdeki CDH1 gen ifadesi oranları (Ortalama ± Standart Hata) (*p<0.05)

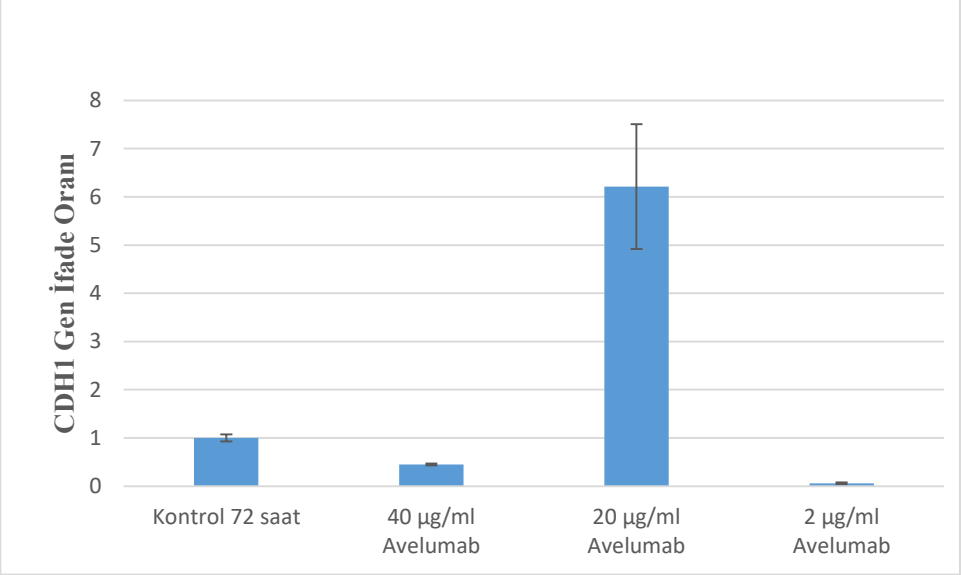
Avelumab Dozları	Hücreler			
	LNCAP	MDA-MB-231	DU-145	MDA-MB-435
Kontrol 24 saat	1,0012 ± 0,06634	İfade yok	1,00 ± 0	İfade yok
40 µg/ml	İfade yok	İfade yok	50,1911 ± 18,55943	İfade yok
20 µg/ml	0,5818 ± 0,0741	İfade yok	32,0363 ± 10,77735	İfade yok
2 µg/ml	2,1921 ± 0,65945	İfade yok	23,9641 ± 14,00096	İfade yok
Kontrol 72 saat	1,0026 ± 0,07284	İfade yok	1,0526 ± 0,075434	İfade yok
40 µg/ml	0,4469 ± 0,02012	İfade yok	İfade yok	İfade yok
20 µg/ml	6,2131 ± 1,29428 *	İfade yok	İfade yok	İfade yok
2 µg/ml	0,0548 ± 0,01911	İfade yok	27,2874 ± 1,8884 *	İfade yok

3.4.6.1 LNCAP Hücrelerindeki CDH1 Gen İfadesi

24 saat inkübasyona bırakılan LNCAP hücrelerinde, 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilen hücrelerin CDH1 gen ifade oranlarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. 72 saat inkübasyona bırakılan LNCAP hücrelerinde ise 20 µg/ml avelumab verilen hücrelerin CDH1 gen ifade oranında anlamlı artış gözlenmiştir (Çizelge 3.10, Şekil 3.45, 3.46).



Şekil 3.45. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki CDH1 gen ifade oranları



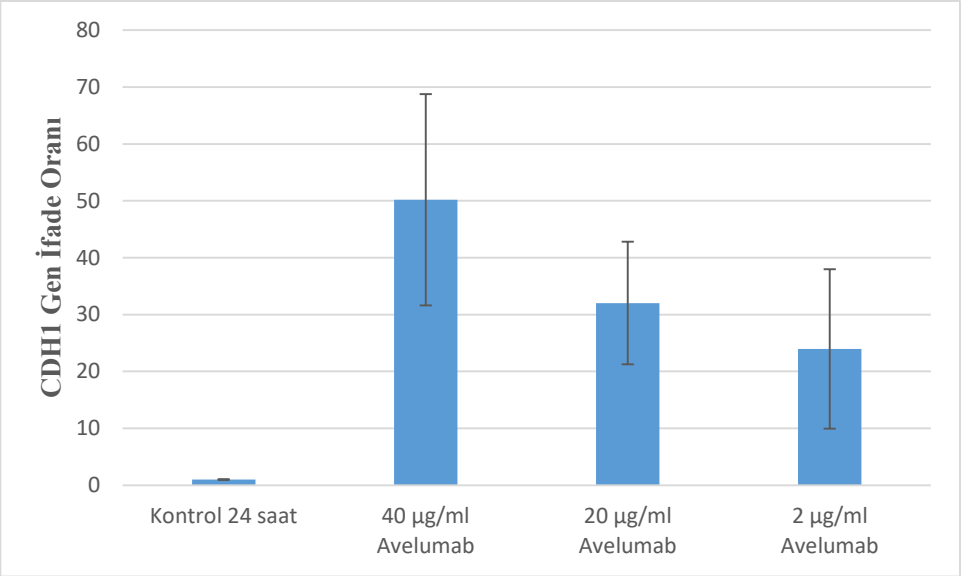
Şekil 3.46. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış LNCAP hücrelerindeki CDH1 gen ifade oranları

3.4.6.2 MDA-MB-231 Hücrelerindeki CDH1 Gen İfadesi

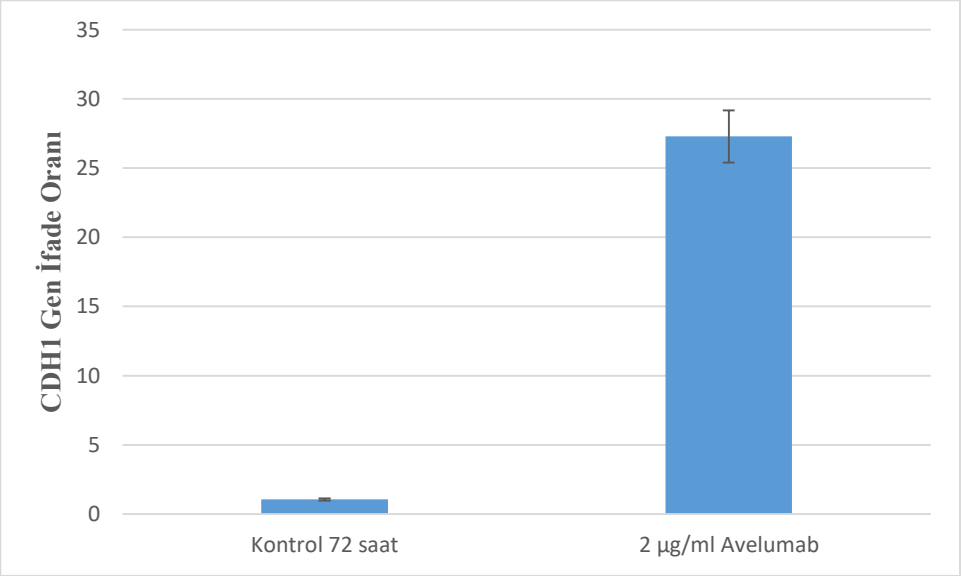
24 ve 72 saat inkübasyona bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde, ilaç verilmemiş kontrol hücrelerinde ve 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 2 µg/ml Avelumab verilmiş hücrelerde CDH1 geni ifade olmamıştır.

3.4.6.3 DU145 Hücrelerindeki CDH1 Gen İfadesi

24 saat inkübasyona bırakılan DU145 hücrelerinde, 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilen hücrelerin CDH1 gen ifade oranlarında belirgin artış izlenmiştir. 72 saat inkübasyonda ise CDH1 geni sadece ilaç verilmemiş kontrol hücrelerinde ve 2 µg/ml avelumab verilmiş hücrelerde ifade olmuştur. 2 µg/ml avelumab verilen hücrelerin CDH1 gen ifade oranında, ilaç verilmemiş kontrol hücrelerine göre artış gözlenmiştir (Çizelge 3.10, Şekil 3.47, 3.48).



Şekil 3.47. 24 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki CDH1 gen ifade oranları



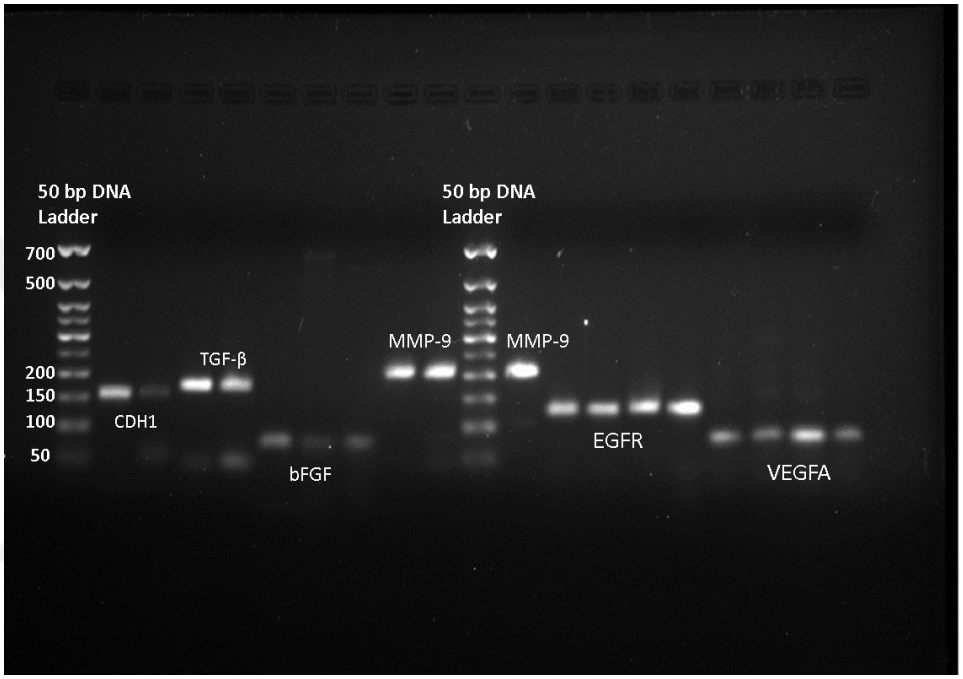
Şekil 3.48. 72 saat inkübasyon sonrası ilaç uygulanmamış ve farklı dozlarda ilaç uygulanmış DU145 hücrelerindeki CDH1 gen ifade oranları

3.4.6.4 MDA-MB-435 Hücrelerindeki CDH1 Gen İfadesi

24 ve 72 saat inkübasyona bırakılan MDA-MB-435 hücrelerinde, ilaç verilmemiş kontrol hücrelerinde ve 40 µg/ml, 20 µg/ml ve 2 µg/ml avelumab verilmiş hücrelerde CDH1 geni ifade olmamıştır.

3.5. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü

EZ-PZR amplifikasyonu yapılan örneklerde amplifkasyon olan kuyucukların örnekleri doğrulama amacıyla %2'lik agaroz jelde yürütülerek doğrulanmıştır. Şekil 3.49'da bir örneği verilmiştir. Genlerin ürün uzunlukları ile DNA Ladder bant uzunlukları birbirleriyle uyumludur.



Şekil 3.49. EZ-PZR amplifikasyonu yapılan örneklerin %2'lik jelde yürütülmesi

4. TARTIŞMA

İmmün denetim noktalarını hedefleyen monoklonal antikorlar son yıllarda artan bir oranda klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Bu antikorlar için genel kabul gören bir biyomarker bulunmamakla birlikte PD1/PDL-1 inhibitörleri için tümör dokusundaki tümör hücreleri ya da immün hücreler üzerindeki PD-L1 ifadesinin kullanılabileceği önerilmektedir (He ve ark., 2015). Anti-PD1/anti-PD-L1 monoklonal antikorlar başta melanom ve akciğer kanseri olmak üzere birçok tümör tipinde endikasyon almış olmakla birlikte bu hastalarda izlenen ortalama başarı oranı %20'ler düzeyinde kalmaktadır (Xia ve Herbst, 2016). Bu ilaçların etkinliğini arttırmak için başta kemoterapi olmak üzere değişik ilaçlarla kombinasyon yoluna gidilmektedir.

Günümüzde klinikte anti-PD-L1 inhibitörü ilaçlar ile anti-VEGF ilaçlar test edilen kombinasyonlardan biridir. Halen yürütülmekte olan bir Faz 1b çalışmasında, ileri renal hücre kanserli hasta grubunda Axitinib (anti-VEGF) ile anti-PD-L1 inhibitörü olan Avelumab kombinasyonu denenmektedir (clinicaltrials.gov, 2015c). Yine bir başka Faz 2 çalışmada, tedavi edilemeyen ileri renal hücre kanserli hastalarda anti-PD-L1 antikoru olan Atezolizumab ile anti-VEGF antikoru Bevacizumab kombinasyonu denenmektedir (clinicaltrials.gov, 2015b). Bir başka karşılaştırmalı çalışmada ise evre IV non-skuamoz küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastalarda Atezolizumab ve Carboplatin + Paklitaksel ile Atezolizumab ve Carboplatin+ Paklitaksel + Bevacizumab kombinasyonları karşılaştırılmaktadır (clinicaltrials.gov, 2015a). Bu çalışmaların etkinliği konusunda henüz elimizde bir veri bulunmamaktadır.

Anti-PD-L1 antikor ve anti-anjiyogenik ilaç kombinasyonu rasyoneli için elimizde yeterince veri bulunmamaktadır. Tümör mikroçevresinde PD-L1 ifadesi ile anjiyogenez arasındaki ilişki iyi bilinmemektedir. Çok az sayıda çalışmada değişik sonuçlar bildirilmiştir. Fare endotel hücrelerinde PD-L1 ifadesi ile VEGF reseptörleri arasında ters bir ilişki gösterilmiştir. Endotel hücrelerinde PD-L1 ifadesinin siRNA transfeksiyonu ile baskılanmasının VEGFR2 mRNA düzeyini azalttığı, yine PD-L1 knock-out farelerde VEGFR2 ifadesinin arttığı gösterilmiştir (Jin ve ark., 2011). Yine

yakın zamanlarda insan böbrek tümör dokularında yapılan bir immünhistokimyasal çalışmada tümör dokusunda PD-L1 ekspresyonu ile VEGFA, VEGFR1 ve VEGFR2 ifadesi arasında ters bir ilişki gösterilmiştir (Joseph ve ark., 2013).

Tez çalışmamız anti-PD-L1 uygulanan tümör hücrelerinde anjiyogenez ve invazyonda rol oynayan gen ifade düzeylerine etkisini araştırması açısından bir özgünlük taşımaktadır. PD-L1 ifadesi yüksek olan LNCAP ve MDA-MB-231 hücrelerinde avelumab ile 24 saatlik inkübasyonda VEGFA ifadesinin azaldığı bulunmuştur (Şekil 3.8 ve Şekil 3.10). Buna karşılık 72 saatin sonunda ise tersine bir artış izlenmiştir (Şekil 3.9 ve Şekil 3.11). Yine benzer olarak aynı hücrelerde 72 saatte bFGF gen ifadesinde de artış izlenmiştir (Şekil 3.32 ve Şekil 3.33). Bu bulgu avelumab ile tedavinin VEGFA ve bFGF genlerinde ifade artışına neden olması sonucunda, avelumabın tek başına kullanıldığında uzun vadede anjiyogenezi uyarabileceğini göstermektedir. Bu durum da anti-PD-L1 antikoru ile anti-VEGF tedavisi veya bFGF inhibitörlerinin ile kombinasyonunun PD-L1 pozitif tümörlerde yararlı olabileceğini düşündürmektedir. PD-L1 negatif olan hücrelerde ise avelumabın VEGFA ve bFGF üzerindeki etkileri doza bağımlı olarak değişkenlik göstermektedir (Şekil 3.12, 3.13, 3.34, 3.36, 3.37).

Tümör hücre proliferasyonunda son derece aktif bir yolak olan ve aynı zamanda anjiyogenez sürecinde de rol oynayan EGFR yolağı ile PD-L1 ilişkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda elde edilen verilere göre, PD-L1 ifadesi yüksek olan LNCAP hücrelerinde avelumab uygulaması ile EGFR ifadesi artarken, yine PD-L1 ifadesi yüksek diğer bir hücre olan MDA-MB-231 hücrelerinde EGFR ifadesi azalmıştır (Şekil 3.16, 3.17, 3.18). PD-L1 ifadesi düşük olan DU145 hücrelerinde ise EGFR ifadesinin arttığı saptanmıştır (Şekil 3.20). Bu sonuçlar ile avelumab tedavisi ile PD-L1 ve EGFR'nin ekspresyonu arasında özellikle klinik açıdan yol gösterici bir ilişki kurmak zor görünmektedir.

Anjiyogenezin yanı sıra tümör hücrelerinde epitelyal mezenkimal geçiş ve invazyonda rol oynayan MMP-9, TGF-b ve E-kaderin (CDH1) genleri ile PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi de tez çalışmamızda değerlendirdik. Literatürde daha

önce bu genlerle PD-L1 ilişkisini araştıran bir çalışmaya rastlayamadık. Çalışmamızda PD-L1 ifadesi yüksek olan LNCAP ve MDA-MB-231 hücrelerinde avelumab uygulamasının, MMP-9 ifade oranları üzerindeki etkisi üzerine tümör hücre tipine göre farklılıklar gösterdiği bulunmuştur. LNCAP hücrelerinde MMP-9 ifadesi artarken (Şekil 3.24), MDA-MB-231 hücrelerinde MMP-9 ifadesi azalmıştır (Şekil 3.26, 3.27). Bu sonuçlar MMP-9 ifadesi ile PD-L1 oranı arasında ilişki olup olmadığı konusunda net bir şey söylemek için yeterli değildir.

TGF-β'nın benign hücrelerde PD-L1 ifadesini baskıladığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bir çalışmada TGF-β tedavisinin, sağlıklı monositler üzerindeki PD-L1 yüzey proteinini belirgin bir şekilde baskıladığı bulunmuştur. Bir başka çalışmada da $CD8^+$ T hücrelerinin aktive ettiği TGF-β'nın fare proksimal tübüler epitel hücreleri üzerinde eksprese olan PD-L1'i baskıladığı bulunmuştur (Ou ve ark., 2012). Ancak PD-L1'in anti-PD-L1 antikorları ile bloke edilmesinin TGF-β ifadesi üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Tez çalışmamızda PD-L1 ifadesi yüksek olan MDA-MB-231 ile PD-L1 ifadesi düşük olan DU-145 ve MDA-MB-435 hücrelerinde avelumabın TGF- β ifadesinin azalttığını bulduk (Şekil 3.39, 3.41, 3.43). Bu sonuçlar anti-PD-L1 antikorunun PD-L1 oranından bağımsız olarak TGF-β'nın ifadesini azalttığını göstermektedir. Sonuçlarımız avelumabın TGF-β ifadesini azaltarak tümörün invazyon ve metastaz potansiyelini de azaltabileceğini göstermektedir.

CDH1 geni tümür hücrelerini bir arada tutan ve E-kaderin olarak adlandırılan bir adezyon molekülü kodlamaktadır. Kanser hücreleri invazyona başlarken öncelikle bu gen ifadesinde azalama ile birlikte komşu hücrelerden ayrılarak bir taraftan da mezenkimal genlerin ifade olmaya başlaması ile birlikte (epitelyal mezenkimal geçiş) invazyona başlar. PD-L1 ile CDH1 arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Çalışmamızda avelumabın, PD-L1 ifadesi yüksek LNCAP ile PD-L1 ifadesi düşük DU145 hücrelerinde CDH1 ifadesini arttırdığını bulduk. Bu sonuçlar anti-PD-L1 antikorlarının TGF-β ve CDH1 üzerinden tümör hücrelerinde invazyon ve metastazı engelleyebileceğini düşündürmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

PD-L1 ifade oranı yüksek olan LNCAP ve MDA-MB-231 hücrelerinde anti-PD-L1 antikoru olan avelumabın VEGFA ve bFGF ifadesini 72 saatlik inkübasyonda arttırması bu ilacın anjiyogenezi uyarabileceğini göstermektedir. Ancak çalışmamızın sadece in vitro olması nedeniyle bu konuda daha fazla bir şey söyleyebilmek için damar oluşturma deneylerinin yanı sıra hayvan modellerinde de test edilmesine gerek vardır.

Çalışmamızda elde edilen EGFR gen ifadelerinin, PD-L1 oranı yüksek ve düşük gruplarda ve uygulanan farklı ilaç dozlarında tutarlı sonuçlar vermemesinden dolayı PD-L1 ifadesi ile EGFR ifadesi arasında bir ilişki kurmak zor görünmektedir. Ayrıca kanser sürecinde EGFR gen ifadesi artışı yanı sıra bu gende izlenen mutasyonların da çok önemli olması ve bizim çalışmamızda mutasyonların dikkate alınmamış olması bu açıdan bir kısıtlılık oluşturmaktadır.

Çalışmamızda avelumabın, TGF-β ifadesini azaltması ve CDH1 ifadesini arttırmış olması anti-PD-L1 antikorlarının epitelyal mezenkimal geçişi engelleyerek tümör invazyon ve metastazını engelleyebileceğini göstermektedir. Ancak bu sonuçların invazyon ve metastaz modellerinde test edilmesine ihtiyaç vardır.

Tümör hücre invazyonu ve özelikle de anjiyogenezdeki rolü MMP-9'u önemli tedavi hedeflerinden biri haline getirmiştir. Çalışmamızda avelumab uygulanan PD-L1 pozitif ve negatif tümör hücrelerinde MMP-9 gen ifadelerinde farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır. PD-L1 MMP-9 ilişkisi hakkında bu sonuçlarla net bir şey söylemek zor görünmekle birlikte farklı tümör tiplerinde anti-PD-L1 antikorların tümör invazyonunu kolaylaştırma potansiyeli olabileceğini de düşündürmektedir.

ÖZET

Tümör Hücrelerindeki PD-L1 Ekspresyonunun Anjiyogenez ve İnvazyon Üzerine Etkisi

CTLA-4 ve PD-1 gibi immün denetim noktalarını bloke eden anti-CTLA-4, anti-PD1 ve anti-PDL1 monoklonal antikorlar, klinik çalışmalarda başta melanoma olmak üzere pek çok solid tümörün tedavisinde başarılı olarak rutin tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Ancak bu ilaçlar kullanılan hastaların yaklaşık %20 kadarında etkili olmaktadır. Klinik çalışmalarda tümör dokusunda immunohistokimyasal olarak PD-L1 ekspresyonu olduğu gösterilen hastalarda PD-L1'e karşı geliştirilen monoklonal antikorlar ile elde edilen yanıt oranının daha yüksek olabildiği gösterilmiştir. Bugün için tümör hücreleri ve tümör mikroçevresindeki immün hücrelerdeki PD-L1 ifadesi dışında bu hastalarda genel kabul gören bir biyomarker bulunmamaktadır. Anti-PDL1 antikorlarının tümör anjiyogenezi ve tümör hücre biyolojisi üzerindeki etkileri iyi bilinmemektedir. Bu çalışmamızda anti-PDL1 monoklonal antikoru olan avelumabın PD-L1 ifade eden ve etmeyen tümör hücrelerinde anjiyogenez ve metastaz sürecinde önemli rol oynayan genlerin ifadesi üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 11 adet insan tümör hücresi (HT-29, MDA-MB-231, LNCAP, DU145, A-375, A549, MCF-7, WM115, MDA-MB-435, MDA-MB-468, G361) akım sitometrisi ile PD-L1 ifadesi yönünden taranmış ve PD-L1 ifadesi en düşük ve en yüksek olan ikişer tanesi gen ifade çalışmalarında kullanılmıştır. Tümör hücrelerine 40 µg/ml, 20µg/ml ve 2 µg/ml olmak üzere 3 farklı dozda avelumab uygulanmış ve 24 ile 72 saatlik inkübasyon sonrası hücreler toplanarak eş zamanlı PZR yöntemi ile VEGFA, bFGF, EGFR, MMP-9, E-kaderin ve TGF-β genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonları incelenmiştir.

Çalışmaya, PDL-1 ifadesi açısından taradığımız 11 hücreden PD-L1 ifadesi % 2'nin altında olan DU-145 ve MDA-MB-435 hücreleri ile %50'nin üzerinde olan LNCAP ve MDA-MB-231 hücreleri ile devam edildi. Avelumab PD-L1 ifadesi yüksek olan LNCAP ve MDA-MB-231 hücrelerinde VEGFA ve bFGF ifadesini 72 saatlik inkübasyonda belirgin olarak arttırırken PD-L1 ifadesi düşük olan hücrelerde doza bağımlı değişken bir cevap izlenmiştir. Avelumabın PD-L1 ifadesi yüksek olan tümör hücrelerinde CDH1 ifadesini arttırdığı, TGFb ifadesini azalttığı bulundu. PD-L1 düşük düzeyde ifade eden hücrelerde ise doza bağımlı değişken cevap izlendi. Avelumabın EGFR ve MMP-9 gen ifadesi üzerindeki etkileri hücrelerdeki PD-L1 ifadesinden bağımsız ve doza bağlı değişkenlik göstermiştir.

Sonuç olarak anti-PDL1 antikoru olan avelumab PD-L1 ifadesi yüksek olan tümör hücrelerinde bFGF ve VEGFA genlerini uyararak anjiyogenezi uyarma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra yine aynı hücrelerde CDH1 ve TGFb üzerindeki etkileri ile epitelyal mezenkimal geçişi baskılayabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Anti-PD-L1 antikoru, PD-L1, İmmünoterapi, Anjiyogenez, GZ-PZR

SUMMARY

Effect of PD-L1 Expression on Tumor Cells on Angiogenesis and Invasion

Anti-CTLA-4, anti-PD-1 and anti-PD-L1 monoclonal antibodies blocking immune check points such as CTLA-4, PD-1 and PD-L1 have been successfully used in routine treatment of many solid tumors, especially melanoma in clinic trials. However, these drugs are effective in about %20 of patients. Clinical trials have shown that the response rate to monoclonal antibodies developed against PD-L1 may be higher in patients who are shown to have PD-L1 expression immunohistochemically in tumor tissue. There are no biomarkers that are generally accepted in these patients except for expression of PD-L1 in tumor cells and immune cells in the tumor microenvironment. The effects of ant-PD-L1 antibodies on tumor angiogenesis and tumor cell biology are not well known.

In this study, we aimed to investigate the effects of avelumab, an anti-PD-L1 monoclonal antibody, on the expression of genes that play an important role in the angiogenesis and metastasis process in the PD-L1 expressing and non-PD-L1 tumor cells.

In our study eleven human tumors (HT-29, MDA-MB-231, LNCAP, DU145, A-375, A549, MCF-7, WM115, MDA-MB-435, MDA-MB-468, G361) were screened for PD-L1 expression by flow cytometry and two cells with the lowest and two cells with highest expression of PD-L1 were used in gene expression study.

Three different doses of avelumab (40 ug/ml, 20ug/ml ve 2 ug/ml) were administered to the tumor cells and after 24 and 72 hours of incubation, the cells were collected and their expression at the mRNA levels of VEGFA, bFGF, EGFR, MMP-9, E-cadherin and TGF-Beta genes were examined by the quantitative PCR method. The study continued with LNCAP and MDA-MB-231 cells with a PD-L1 expression of over %50 and DU145 and MDA-MB-435 with a PD-L1 expression of less than %2.

Avelumab significantly increased VEGFA and bFGF expression in LNCAP and MDA-MB-231 cells with high expression of PD-L1in the 72 hour incubation, whereas a dose dependent variable response was observed in cells with low PD-L1 expression.

Avelumab was found to increase CDH1 expression and decrease TGF-Beta expression in tumor cells with high expression of PD-L1. Whereas in cells expressing low levels of PD-L1 the variable responses were observed.

The effects of avelumab on EGFR and MMP-9 gene expression was independent of the PD-L1 expression in the cells and showed dose dependent variability.

In conclusion, the anti-PD-L1 antibody avelumab has the potential to stimulate angiogenesis by stimulating bFGF and VEGFA genes in tumor cells with high expression of PD-L1. Besides, it shows that avelumab can suppress epithelial mesenchymal transition with its effects on CDH1 and TGF-beta.

Keywords: Angiogenesis, Anti-PD-L1 antibody, Immunotherapy, PD-L1, RT-PCR

KAYNAKLAR

ABUL K ABBAS AHL 2014. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immue System.*, Philedelphia,USA, , Elsevier/Saunders.

AKL MR, NAGPAL P, AYOUB NM, TAI B, PRABHU SA, CAPAC CM, GLIKSMAN M, GOY A & SUH KS (2016). Molecular and clinical significance of fibroblast growth factor 2 (FGF2 /bFGF) in malignancies of solid and hematological cancers for personalized therapies. *Oncotarget*, **7**: 44735-44762.

ALME AK, KARIR BS, FALTAS BM & DRAKE CG (2016). Blocking immune checkpoints in prostate, kidney, and urothelial cancer: An overview. *Urol Oncol*, **34**: 171-181.

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW & LIPMAN DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**: 403-410.

ANGIO.ORG. 2008. *Angiogenesis: Cascade of Events* [Online]. [Accessed 29/07/2017].

BERX G, CLETON-JANSEN AM, NOLLET F, DE LEEUW WJ, VAN DE VIJVER M, CORNELISSE C & VAN ROY F (1995). E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *Embo j*, **14**: 6107-6115.

BLACK M, BARSOUM IB, TRUESDELL P, COTECHINI T, MACDONALD-GOODFELLOW SK, PETROFF M, SIEMENS DR, KOTI M, CRAIG AW & GRAHAM CH (2016). Activation of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint confers tumor cell chemoresistance associated with increased metastasis. *Oncotarget*, **7**: 10557-10567.

BLACKBURN EH (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell*, **106**: 661-673.

BLASCO MA (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*, **6**: 611-622.

BURKHART DL & SAGE J (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*, **8**: 671-682.

CARMELIET P & JAIN RK (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, **407**: 249-257.

CHEN Z, GAUDINO G, PASS HI, CARBONE M & YANG H (2017). Diagnostic and prognostic biomarkers for malignant mesothelioma: an update. *Transl Lung Cancer Res*, **6**: 259-269.

CLINICALTRIALS.GOV. 2015a. *A Study of Atezolizumab (Anti-Programmed Death-Ligand 1 [PD-L1] Antibody) in Combination With Carboplatin Plus (+) Paclitaxel With or Without Bevacizumab Compared With Carboplatin+Paclitaxel+Bevacizumab in Participants With Stage IV Non-Squamous Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) (IMpower150)* [Online]. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02366143?term=NCT02366143&rank=1. [Accessed 29/7/2017].

CLINICALTRIALS.GOV. 2015b. *A Study of Atezolizumab in Combination With Bevacizumab Versus Sunitinib in Participants With Untreated Advanced Renal Cell Carcinoma [IMmotion151]* [Online]. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02420821?term=NCT02420821&rank=1. [Accessed 29/7/2017].

CLINICALTRIALS.GOV. 2015c. *A Study Of Avelumab In Combination With Axitinib In Advanced Renal Cell Cancer (JAVELIN Renal 100)* [Online]. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02493751?term=NCT02493751&rank=1. [Accessed 29/7/2017].

CONCHA-BENAVENTE F & FERRIS RL (2017). Reversing EGFR Mediated Immunoescape by Targeted Monoclonal Antibody Therapy. *Frontiers in Pharmacology*, **8**: 332.

CORSO G, INTRA M, TRENTIN C, VERONESI P & GALIMBERTI V (2016). CDH1 germline mutations and hereditary lobular breast cancer. *Fam Cancer*, **15**: 215-219.

CRISCITIELLO C (2012). Tumor-associated antigens in breast cancer. *Breast Care (Basel)*, **7**: 262-266.

DE GUILLEBON E, ROUSSILLE P, FROUIN E & TOUGERON D (2015). Anti program death-1/anti program death-ligand 1 in digestive cancers. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, **7**: 95-101.

DERYUGINA EI, ZAJAC E, JUNCKER-JENSEN A, KUPRIYANOVA TA, WELTER L & QUIGLEY JP (2014). Tissue-Infiltrating Neutrophils Constitute the Major In Vivo Source of Angiogenesis-Inducing MMP-9 in the Tumor Microenvironment()(). *Neoplasia (New York, N.Y.)*, **16**: 771-788.

DEVI PU (2004). Basics of Carcinogenesis. *Health Administrator*, **XVII**: 16-24.

DRANOFF G (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **4**: 11-22.

DUNN BK & KRAMER BS (2016). Cancer Prevention: Lessons Learned and Future Directions. *Trends Cancer*, **2**: 713-722.

FDA.GOV. 2017. *Avelumab* [Online]. https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm547965.htm. [Accessed 31/7/2017].

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. *Int J Cancer,* **136**: E359-386.

FERRARA N (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* **29**: 789-791.

FOLKMAN J (2006). Angiogenesis. *Annu Rev Med,* **57**: 1-18.

FOWLER J & BHIMJI S 2017. Cancer, Cervical. *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

StatPearls Publishing LLC.

GUO XE, NGO B, MODREK AS & LEE WH (2014). Targeting tumor suppressor networks for cancer therapeutics. *Curr Drug Targets,* **15**: 2-16.

HANAHAN D & FOLKMAN J (1996). Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell,* **86**: 353-364.

HANAHAN D & WEINBERG ROBERT A (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell,* **144**: 646-674.

HE J, HU Y, HU M & LI B (2015). Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci Rep,* **5**: 13110.

JIN Y, CHAUHAN SK, E.I. ANNAN J, SAGE PT, SHARPE AH & DANA R (2011). A Novel Function for Programmed Death Ligand-1: Regulation of Angiogenesis. *The American Journal of Pathology,* **178**: 1922-1929.

JONES RG & THOMPSON CB (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev,* **23**: 537-548.

JOSEPH RW, PARASRAMKA M, ECKEL-PASSOW J, SERIE DJ, WU KJ, JIANG J, KALARI KR, THOMPSON RH, HO TH, CASTLE EP, CHEVILLE JC, KWON ED, THOMPSON EA & PARKER AS (2013). Inverse association between PDL1 and genes in the VEGF pathway in primary clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Immunology Research,*

KANSER.GOV. 2017. *Erisim: [http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2014-RAPOR._uzun.pdf] Türküye Kanser istatistikleri, 2017* [Online]. kanser.gov. [Accessed 23/07 2017].

KAZEROUNIAN S, YEE KO & LAWLER J (2008). Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci*, **65**: 700-712.

KERBEL RS (2000). Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*, **21**: 505-515.

KESSENBROCK K, PLAKS V & WERB Z (2010). Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*, **141**: 52-67.

KORESSAAR T & REMM M (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, **23**: 1289-1291.

KURIMOTO R, IWASAWA S, EBATA T, ISHIWATA T, SEKINE I, TADA Y, TATSUMI K, KOIDE S, IWAMA A & TAKIGUCHI Y (2016). Drug resistance originating from a TGF-beta/FGF-2-driven epithelial-to-mesenchymal transition and its reversion in human lung adenocarcinoma cell lines harboring an EGFR mutation. *Int J Oncol*, **48**: 1825-1836.

LI Z & JENNINGS A (2017). Worldwide Regulations of Standard Values of Pesticides for Human Health Risk Control: A Review. *Int J Environ Res Public Health*, **14**:

LINGGI B & CARPENTER G (2006). ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol*, **16**: 649-656.

MARSHALL OJ (2004). PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*, **20**: 2471-2472.

MASSAGUE J (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell*, **134**: 215-230.

MCDERMOTT DF & ATKINS MB (2013). PD-1 as a potential target in cancer therapy. *Cancer Medicine*, **2**: 662-673.

MCNIEL EA & TSICHLIS PN (2017). Analyses of publicly available genomics resources define FGF-2-expressing bladder carcinomas as EMT-prone, proliferative tumors with low mutation rates and high expression of CTLA-4, PD-1 and PD-L1. *Signal Transduct Target Ther*, **2**:

NAGY JA, CHANG SH, SHIH SC, DVORAK AM & DVORAK HF (2010). Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost*, **36**: 321-331.

OHM JE & CARBONE DP (2001). VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. *Immunol Res*, **23**: 263-272.

OTT PA, HODI FS & BUCHBINDER EI (2015). Inhibition of Immune Checkpoints and Vascular Endothelial Growth Factor as Combination Therapy for Metastatic Melanoma: An Overview of Rationale, Preclinical Evidence, and Initial Clinical Data. *Frontiers in Oncology,* **5**: 202.

OU J-N, WIEDEMAN AE & STEVENS AM (2012). TNF-α and TGF-β Counter-Regulate PD-L1 Expression on Monocytes in Systemic Lupus Erythematosus. *Scientific Reports,* **2**: 295.

OWCZARZY R, TATAUROV AV, WU Y, MANTHEY JA, MCQUISTEN KA, ALMABRAZI HG, PEDERSEN KF, LIN Y, GARRETSON J, MCENTAGGART NO, SAILOR CA, DAWSON RB & PEEK AS (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research,* **36**: W163-W169.

PENNELL NA (2015). Understanding the Rationale for Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Seminars in Oncology,* **42**: S3-S10.

RAICA M, CIMPEAN AM & RIBATTI D (2009). Angiogenesis in pre-malignant conditions. *European Journal of Cancer,* **45**: 1924-1934.

ROMERO-LAORDEN N & CASTRO E (2017). Inherited mutations in DNA repair genes and cancer risk. *Current Problems in Cancer,*

SAMPLE A & HE YY (2017). Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed,*

SCARPACE SL (2015). Metastatic squamous cell non-small-cell lung cancer (NSCLC): disrupting the drug treatment paradigm with immunotherapies. *Drugs Context,* **4**: 212289.

SHARMA P & ALLISON JP (2015). The future of immune checkpoint therapy. *Science,* **348**: 56-61.

SINGHAI R, PATIL VW, JAISWAL SR, PATIL SD, TAYADE MB & PATIL AV (2011). E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer. *North American Journal of Medical Sciences,* **3**: 227-233.

STARKE A, WÜTHRICH RP & WAECKERLE-MEN Y (2007). TGF-Beta Treatment Modulates PD-L1 and CD40 Expression in Proximal Renal Tubular Epithelial Cells and Enhances CD8⁺ Cytotoxic T-Cell Responses. *Nephron Experimental Nephrology,* **107**: e22-e29.

TOPALIAN SL, HODI FS, BRAHMER JR, GETTINGER SN, SMITH DC, MCDERMOTT DF, POWDERLY JD, CARVAJAL RD, SOSMAN JA, ATKINS MB, LEMING PD, SPIGEL DR, ANTONIA SJ, HORN L, DRAKE CG, PARDOLL DM, CHEN L, SHARFMAN WH, ANDERS RA, TAUBE JM, MCMILLER TL, XU H, KORMAN AJ, JURE-KUNKEL M, AGRAWAL S, MCDONALD D, KOLLIA

GD, GUPTA A, WIGGINTON JM & SZNOL M (2012). Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti–PD-1 Antibody in Cancer. *New England Journal of Medicine,* **366**: 2443-2454.

TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, FERLAY J, LORTET-TIEULENT J & JEMAL A (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin,* **65**: 87-108.

XIA B & HERBST RS (2016). Immune checkpoint therapy for non-small-cell lung cancer: an update. *Immunotherapy,* **8**: 279-298.

YANCOPOULOS GD, DAVIS S, GALE NW, RUDGE JS, WIEGAND SJ & HOLASH J (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature,* **407**: 242-248.

YE J, COULOURIS G, ZARETSKAYA I, CUTCUTACHE I, ROZEN S & MADDEN TL (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics,* **13**: 134-134.

YOUNG KH, GOUGH MJ & CRITTENDEN M (2015). Tumor immune remodeling by TGFbeta inhibition improves the efficacy of radiation therapy. *Oncoimmunology,* **4**: e955696.

ZUR HAUSEN H (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology,* **384**: 260-265.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Ad ve Soyad: Cansu Babahan
Doğum Yeri: Ortaköy / Lefkoşa - KKTC
Doğum Tarihi: 15.06.1991
Uyruk: TC / KKTC
Medeni Hali: Bekar
İletişim Adresi: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Cumhuriyet Öğrenci Evi Çankaya / ANKARA
Telefon: 0534 797 92 64
E-mail Adresi: cansu_babahan@outlook.com

II- Eğitimi

2015 - 2017 : Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD, Tıbbi Onkoloji BD Tümör Biyolojisi Yüksek Lisans Programı, Ankara (Not Ortalaması: 3.90 /4.00)

2010 - 2014: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Bölüm üçüncülüğü (Not Ortalama: 3.63/ 4.00
Yüksek Şeref Öğrencisi)

2006 - 2009: Bülent Ecevit Anadolu Lisesi (KKTC) (KKTC 6.lığı)

Yabancı Dil: İngilizce (İyi Derece)

III- Mesleki Deneyimi

2012: KKTC Dr. Burhan Nalbantoğlu Devlet Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı (45 günlük zorunlu staj)

2014: Hacettepe Üniversitesi Prof. Dr. Şayeste Demirezen ile Histoloji alanında özel çalışma.

IV- Üyelikler

KKTC Biyologlar Derneği

V- Eğitimler

Hacettepe Üniversitesi Klinik Araştırmalara Giriş Eğitimi - 2012

5. Turkısh-US Cytometry Workshop – 2015 (ISAC)

Therapeutic Peptides and Antibodies: Design & Manufacturing Workshop - 2015

Onkolojide Güncel Tedaviler Sempozyumu – 2015

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitimi, Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi -2016