

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

**KOLON KANSERİNDE PROBİYOTİK BAKTERİLERİN
ETKİSİNİN İMMÜN SİSTEM AÇISINDAN ARAŞTIRILMASI**

Safaa ALTVEŞ

Danışman

Prof. Dr. Hasibe VURAL

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 2201418012 proje numarası ile desteklenmiştir.

Konya-2022

Tez Onay Sayfası

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **Safaa ALTVEŞ**'in “**Kolon Kanserinde Probiyotik Bakterilerin Etkisinin İmmun Sistem Açısından Araştırılması**” başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

KONYA/ 22.11.2022

Tez Danışmanı	Prof. Dr. Hasibe VURAL NEÜ/ Meram Tıp Fakültesi/ Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Üye	Prof. Dr. Ahmet UYSAL Selçuk Üniversitesi/ Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu/ Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Anabilim Dalı
Üye	Doç. Dr. Kıvanç BİLECEN KGTÜ/ Tarım ve Doğa Bilimleri Fakültesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Üye	Doç. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU NEÜ/ Fen Fakültesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı.
Üye	Dr. Öğr. Üyesi İbrahim KILINÇ NEÜ/ Meram Tıp Fakültesi/ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Yukarıdaki Tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 28/ 12 /2022 tarih ve 27/09 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

İmza

BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları; kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

22/11/2022

Safaa ALTVEŞ

Tezin Tam Adı : Kolon Kanserinde Probiyotik Bakterilerin Etkisinin İmmun Sistem Açısından Araştırılması
Öğrencinin Adı Soyadı : Safaa ALTVEŞ
Dosyanın Toplam Sayfa Sayısı: 101

Kolon Kanserinde Probiyotik Bakterilerin Etkisinin İmmun Sistem Açısından Araştırılması

ORJİNALLIK RAPORU

% **1**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **1**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **1**

YAYINLAR

% **1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikerisim.erbakan.edu.tr

İnternet Kaynağı

% **1**

2

acikerisim.dicle.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

% **1**

Danışman Öğretim Üyesi Adı Soyadı: Prof. Dr. Hasibe VURAL

İmzası

:

Önsöz Teşekkür

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren danışmanım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hasibe VURAL’a,

Doktora projemin gerçekleştirilmesine yardımcı olan başta Doç. Dr. Kıvanç BİLECEN olmak üzere, tüm Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi çalışanlarına,

Akademik hayatıma bilgi ve birikimleriyle katkı sağlayan Tıbbi biyoloji Anabilim Dalı hocalarım Prof. Dr. Ercan KURAR, Doç. Hatice Gül DURSUN, Dr. Ebru GÜÇLÜ, Dr. İlknur ÇINAR AYAN ve Dr. Canan EROĞLU GÜNEŞ ile çalışmalarım esnasında bana yardımcı olan Elif DİNÇER ve Esra YETİŞGİN’e,

Türkiye’de bulunma ve güzel insanlarla tanışma fırsatını bana veren ve burs sağlayan Türkiye Burslarına ve tezime maddi destek sağlayan Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü’ne,

Arkadaşlarım H. Kübra YILDIZ ve Fatma S. ÇELİK ile bana kendi kızları gibi davranan ailelerine,

Aramızdaki mesafeye rağmen her zaman yanımda hissettiğim arkadaşlarım Chaza SAYEGH, Khuloud BADAWI ve C.M.H DARWICH’e çok teşekkür ederim...

Tezimi en muhteşem anlarımı birlikte geçirdiğim, en zorlu koşullarda bana yardımcı olan, yaşadığım savaşı bile cennete çeviren sevgili annem, babam ve kardeşlerime ithaf ediyorum...

Sevgili kardeşim Muhammed,

Seni hiç unutmadım ve unutmayacağım....

Safaa ALTVEŞ

İÇİNDEKİLER

Tez Onay Sayfası	ii
Tez Beyan Sayfası.....	iii
Benzerlik Raporu	iv
Önsöz Teşekkür.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	viiix
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kolon Kanseri	3
2.1.1.Risk Faktörü.....	4
2.1.2.Kolorektal Kanser ve Bağırsak Mikrobiyom İlişkileri.....	8
2.1.3.Kolon Kanseri Gelişimi	10
2.1.4.Kolon Kanseri Teşhisi.....	11
2.1.5.Kolon Kanseri Tedavisi	14
2.2. PD-L1/ PD-1 Yolağı	19
2.2.1. İmmünoterapötik Bir Yaklaşım Olarak, İmmün Kontrol Noktalarında PD-1/PD-L1'in Hedeflenmesi	22
2.3. İnsan Mikrobiyotası	23
2.3.1. Bağırsak Mikrobiyotasının İmmünoterapiye Etkisi	24
2.4. Probiyotikler.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Mikrobiyolojik Çalışmalar	29
3.1.1.Probiyotik Bakterilerin İzolasyonu	29
3.1.2. Bakterilerin Tanımlanması.....	32
3.1.3. Bakterilerin Hücre Kültürü Deneyleri için Hazırlanması	34
3.2. Hücre Kültürü ve Moleküler Çalışmalar.....	37
3.2.1. Hücre kültürü	37
3.2.2. XTT Testi Kullanılarak Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi	38
3.2.3. Adhezyon Testi	39
3.2.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi	39
3.2.5. Western Blot Analizi.....	42

3.2.6. PD-L1 Ekspresyonunda Görülen Artışın Fonksiyonel Analizi.....	44
3.3. İstatistiksel Analiz.....	45
4. BULGULAR	47
4.1. Bakterilerin Tanımlaması.....	47
4.1.1. <i>L. rhamnosus</i> 'un Tanımlanması	47
4.1.2. <i>E. faecium</i> 'un Tanımlanması	47
4.1.3. <i>L. mesenteroides</i> 'in Tanımlanması	48
4.1.4. <i>Streptococcus</i> sp'nin Tanımlanması	48
4.2. Hücre Canlılığı Sonuçları.....	49
4.2.1. Canlı Bakterilerin (LC) Kolon Kanseri Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	49
4.2.2. Isı ile Öldürülmüş (HK) Bakterilerin Kolon Kanseri Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	51
4.2.3. Hücre İçermeyen Supernatantın (CFS) Kolon Kanseri Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	52
4.3. Adhezyon Testi Sonuçları	54
4.4. qRT-PZR Sonuçları.....	56
4.4.1. Canlı <i>L. mesenteroides</i> 'in PDL-1 Ekspresyonu Üzerine Etkisi	56
4.4.2. Canlı <i>L. mesenteroides</i> 'in Apotoz ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi.....	57
4.4.3. Farklı IFN- γ Konsantrasyonlarının PD-L1 Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	57
4.4.4. <i>L. mesenteroides</i> ve IFN- γ 'nın TLR Yolağı ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi.....	59
4.4.5. <i>L. mesenteroides</i> ve IFN- γ 'nın NOD Benzeri Reseptörlerin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi.....	60
4.4.6. <i>L. mesenteroides</i> ve IFN- γ 'nın Otofaji ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi.....	61
4.4.7. <i>L. mesenteroides</i> ve IFN- γ 'nın ve Hippo Yolağı ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi	62
4.5. <i>L. mesenteroides</i> ve IFN- γ 'nın PD-L1 Protein Seviyesi Üzerine Etkisi.....	63
4.6. <i>L. mesenteroides</i> ve IFN- γ 'nın T Hücrelerinde Sitokin Salınımı ve Apotoz Üzerine Etkisi.....	64
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	78
7. KAYNAKLAR	80
8. ÖZGEÇMİŞ.....	86
9. EKLER.....	88

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

miRNA	MikroRNA
mRNA	Mesajcı RNA
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü
ATG	Otofaji ilişkili gen
qPCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RNAi	RNA interferans
siRNA	Küçük interferans
IL-2	İnterlökin-2
PD1	Programlı ölüm 1
PDL1	Programlı ölüm ligand-1
ICI	İmmün kontrol noktası inhibitörleri
CH	Crohn Hastalığı
T2DM	Tip 2 diyabet
TNF- α	Tümör nekroz factor- α
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
CTLA-4	Sitotoksik T-lenfosit ilişkili antijen
PAMP	Patojenle ilişkili moleküler paternler
INF-γ	İnterferon gama
CD80	Farklılaşma kümesi 80
SCFA	Kısa zincirli yağ asitleri
Th1	T yardımcı hücreler
APC	Antigen sunan hücre
FIT	Fekal immünokimya testi
TAA	Tümörle ilişkili antijenler
Mts/Çhf	Çok hedefli fekal DNA testi
mAb	Monoklonal antikor
GI	Gastrointestinal
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Polip gelişimi ve kolon kanseri	3
Şekil 2.2. Kolon kanseri risk faktörleri	4
Şekil 2.3. Kolon kanseri gelişimi ve ilerlemesi	11
Şekil 2.4. Bağışıklık sistemi tedavi mekanizması.....	17
Şekil 2.5. Kanser hücrelerinde PD-L1 ifadesini yukarı ve aşağı yönde düzenleyen mekanizmalar	20
Şekil 2.6. Anti-PD-L1 ve anti-PD-1 inhibitörlerinin etki mekanizmaları	23
Şekil 2.7. Bağırsak mikrobiyomu doğuştan gelen bağışıklığı, adaptif bağışıklığı ve tümör antijenlerini değiştirir	27
Şekil 3.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	30
Şekil 3.2. <i>Enterococcus faecium</i>	30
Şekil 3.3. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	31
Şekil 3.4. <i>Streptococcus</i> sp.	31
Şekil 3.5. <i>Bacillus licheniformis</i>	32
Şekil 3.6. Oksidaz Testi	32
Şekil 3.7. Katalaz Testi	33
Şekil 3.8. Bakteriyel optik yoğunluk (OD) ile CFU/ml arasındaki ilişkiyi gösteren standart eğri grafikleri	35
Şekil 3.9. Kristal viyole ile boyanmış bakteri ve Caco-2 2 kolon kanseri hücreleri ile oluşturulmuş kokültür	36
Şekil 3.10. Tezde kullandığımız hücrelerin görüntüsü	38
Şekil 3.11. BSA standart eğri grafiği	43
Şekil 4.1. <i>L. rhamnosus</i> 'un 16S rRNA dizisi	47
Şekil 4.2. <i>E. faecium</i> 'un 16S rRNA dizisi	47
Şekil 4.3. <i>L. mesenteroides</i> 'in 16S rRNA dizisi.....	48
Şekil 4.4. <i>Streptococcus</i> sp'nin 16S rRNA dizisi	48
Şekil 4.5. Canlı bakterilerinin kolon kanseri hücre canlılığı üzerindeki etkisi	50
Şekil 4.6. HK bakterilerinin kolon kanseri hücre canlılığı üzerindeki etkisi	52
Şekil 4.7. Bakterilere ait CFS örneklerinin kolon kanseri hücre canlılığı üzerindeki etkisi	54
Şekil 4.8. Kolon kanseri hücre hatlarında bakteriyel aderans oranı	55
Şekil 4.9. Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerine 6, 12 ve 24 saat süresince canlı <i>L. mesenteroides</i> uygulamasının PDL-1 ekspresyonu üzerindeki etkisi.....	56
Şekil 4.10. Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerine canlı <i>L. mesenteroides</i> uygulamasının apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi	57

Şekil 4.11. Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde farklı IFN- γ konsantrasyonlarının PD-L1 ekspresyonu üzerine etkisi	59
Şekil 4.12. Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde IFN- γ varlığında canlı <i>L. mesenteroides</i> uygulamasının TLR yolağı ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi 60	
Şekil 4.13. Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde IFN- γ varlığında canlı <i>L. mesenteroides</i> uygulamasının NOD benzeri reseptörlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi.....	61
Şekil 4.14. Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde IFN- γ varlığında canlı <i>L. mesenteroides</i> uygulamasının otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi	62
Şekil 4.15. Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde IFN- γ varlığında canlı <i>L. mesenteroides</i> uygulamasının hippo yolağı ile ilişkili genlerin ekspresyon üzerine etkisi	63
Şekil 4.16. Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde IFN- γ varlığında canlı <i>L. mesenteroides</i> uygulamasının PD-L1 protein seviyesi üzerine etkisi.....	64
Şekil 4.17. <i>L. mesenteroides</i> 'in Jurkat T hücrelerinde IFN- γ ve IL-2 üretimi üzerindeki etkisi	65
Şekil 4.18. <i>L. mesenteroides</i> deney düzeneği ile indüklenen PD-L1'in fonksiyonel analizi	66
Şekil 4.19. Caco-2 ve Jurkat T hücrelerinin kokültürü sonrasında kontrol ve doz gruplarında IFN- γ ve IL-2 miktarları	66
Şekil 4.20. HT-29 ve Jurkat T hücrelerinin kokültürü sonrasında kontrol ve doz gruplarında IFN- γ ve IL-2 miktarları	66
Şekil 4.21. Caco-2 ve Jurkat T hücrelerinin kokültürü sonrasında kontrol ve doz grupları ile gerçekleştirilen apoptoz analizi sonuçları	67
Şekil 4.22. HT-29 ve Jurkat T hücrelerinin kokültürü sonrasında kontrol ve doz grupları ile gerçekleştirilen apoptoz analizi sonuçları	68

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. 16s rRNA amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri.....	34
Tablo 3.2. PZR bileşenleri.....	34
Tablo 3.3. qRT-PZR analizi ile ekspresyon seviyesi değerlendirilmiş genler	41
Tablo 3.4. Primer dizileri ve ampikon uzunlukları	42



ÖZET

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kolon Kanserinde Probiyotik Bakterilerin Etkisinin İmmün Sistem Açısından Araştırılması

Safaa ALTVEŞ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi / Konya-2022

Kolorektal kanser (KRK), dünya çapında en yaygın üçüncü kanser ve kansere bağlı ölümlerin üçüncü önde gelen nedenidir. KRK multifaktöriyel bir hastalıktır ve normal kolon epitelinin adenomatöz polipe dönüşmesi sonucu gelişir. Kemoterapi, radyasyon ve cerrahi prosedürler geleneksel olarak kolon kanserini tedavi etmek için kullanılmaktadır. Son zamanlarda, bu tedaviler immünoterapötik stratejilerle birleştirilmiş ve tedavi sonuçlarını büyük ölçüde iyileştirmiştir. PD-L1'in antikor-aracılı blokajı, kanser hücrelerine saldıran sitotoksik T hücrelerinin aktivitesini ve inhibisyonunu engelleyerek ve güçlendirerek PD-L1 kontrol noktası reseptörlerini bloke etmeyi amaçlayan immünoterapi yaklaşımlarından biridir. Son yıllarda, özellikle immün kontrol noktası inhibitörleri üzerinde yapılan birçok çalışma, probiyotiklerin immünoterapi yanıtındaki temel rolüne atıfta bulunmuştur. Probiyotik türlerin immün kontrol noktası inhibitörleri üzerindeki rolünü araştıran birkaç çalışma, immünoterapi sırasında adjuvan ajanların bulunmasına veya tedavi üzerinde kötü bir etkisi varsa hastanın diyetinden çıkarılmasına ışık tutmaktadır.

Bu tezde, dört probiyotik bakteri izole edilmiş ve bakteriler *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides* ve *Streptococcus* sp. olarak morfolojik ve biyokimyasal testlerin yanı sıra 16S rRNA tüm gen dizilimi kullanılarak tanımlanmıştır. Daha sonra izole edilen bakterilerin hücre sitotoksitesi XTT kullanılarak incelenmiştir. *L. mesenteroides*, hem süt fermente ürünleri hazırlamak için starter olarak kullanılması ve önemli fonksiyonel özelliklere sahip olması hem de diğer laktik asit bakterilerine göre daha az çalışılmış olması nedeniyle sonraki deneyler için seçilmiştir.

Çalışmada *L. mesenteroides*'in Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücre hatları üzerine etkisinin immün kontrol noktası PD-L1 ve PD-L1 tarafından düzenlenen yolaklar açısından araştırılması amaçlanmıştır. *L. mesenteroides*'in PD-L1 geni ve protein ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisi, IFN- γ uyarımına bağlı olarak qPCR ve western blot yöntemleri ile incelenmiştir. Kolon kanserinde PD-L1'in fonksiyonel analizini belirlemek için T hücrelerinin aktive sitokin markörleri ölçülmüştür. Bakteri-aracılı PD-L1 tarafından düzenlenen yolaklar qPCR yöntemi ile incelenmiştir.

Sonuçlarımıza göre, canlı *L. mesenteroides* ile muameleden sonra her iki hücre hattında PD-L1 gen ekspresyonu önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca, *L. mesenteroides* IFN- γ üretimini indüklemiştir. IFN- γ , PD-L1 geni ve protein ekspresyonunda önemli rol oynadığı için deney protokollerine dahil edilmiştir. *L. mesenteroides* ile IFN- γ 'nin PD-L1 ifadelerini on kattan fazla arttırdığı bulunmuştur. Öte yandan, *L. mesenteroides* ve IFN- γ tarafından indüklenen PD-L1, Jurkat T-hücrelerinin canlılığı ile IFN- γ ve IL-2 sitokinlerinin seviyesini önemli ölçüde artırmıştır. Ek olarak, *L. mesenteroides* ve IFN- γ tarafından kolon kanserinde indüklenen PD-L1'in, bakteri ile ilişkili PD-L1 tarafından düzenlenen yolaklarda çoklu değişikliklerle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Buna göre *Hippo* yolağı markörleri YAP-1 ve TAZ aktivasyonuna bağlı olarak TLR'ler, NOD ve bakteri ilişkili G-protein ilişkili reseptörler aktive edilirken otofaji markör genleri BECN-1, ATG-5 ve SQSTM önemli ölçüde azalmıştır.

Sonuç olarak, *L. mesenteroides* kolon kanseri hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunu arttırmıştır. Bu artış, PD-L1'nin antikor aracılı blokajı varlığında Jurkat T hücrelerini aktive etmiştir. Elde edilen sonuçlar, mevcut bakterinin PD-L1 blokajını hedefleyen immün terapisi sırasında bir adjuvan ajan olarak (koruyucu tedavi) kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: İmmün kontrol noktası, PD-L1, PD-L1 blokajı, Probiyotik bakteriler

ABSTRACT

REPUBLIC OF TÜRKİYE
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation The Effect of Probiotic Bacteria in Colon Cancer in Terms of Immune System

Safaa ALTVEŞ
Department of Medical Biology
PhD Thesis / Konya-2022

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer and the third leading cause of cancer-related death worldwide. CRC is a multifactorial disease and develops as a result of the change in normal colonic epithelium to an adenomatous polyp. Chemotherapy, radiation, and surgical procedures are traditionally being used to treat colon cancer. Recently, these therapies have been combined with immunotherapeutic strategies, greatly improving therapy outcomes. The blockade of PD-L1 antibody is one of the immunotherapy approaches aims to block PD-L1 checkpoint receptors by increasing and enhancing cytotoxic T cells activity in attacking cancer cells. In recent years, many studies have also referred to probiotics' essential role in immune therapy response, particularly on immune checkpoint inhibitors. Several studies investigating the role of probiotic species on immune checkpoint inhibitors shed the light to find adjuvant agents during immunotherapy or remove it from the patient's diet if it has a bad impact on the treatment.

In this thesis, we isolate four probiotic bacteria. The bacteria have been confirmed as *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Streptococcus* sp. using morphological and biochemical tests as well as 16S rRNA whole gene sequencing. Then cell cytotoxicity of the isolated bacteria has been studied using XTT. *L. mesenteroides* has been chosen for the following experiments since it is used as a starter to prepare milk fermented products and owned important functional properties, in the same time, inferior studies had been conducted compared to the other lactic acid bacteria.

We aimed to investigate the role of *L. mesenteroides* on colon cancer cell lines; Caco-2 and HT-29 in terms of immune checkpoint PD-L1 and bacterial-related PD-L1 regulated pathways. The effect of *L. mesenteroides* on PD-L1 gene and protein expression level was investigated using qPCR and western blot analyses in the presence of an external supplement of IFN- γ . To determine the functional analysis of PD-L1 in colon cancer in the presence of blockade of PD-L1 antibody T cells activated cytokines markers has been measured. Regarding to bacterial-related PD-L1 regulated pathways the investigation has been done using qPCR.

According to our results, PD-L1 gene expression has been significantly increased in both cell lines after treatment with live *L. mesenteroides*. It has been found that *L. mesenteroides* induce IFN- γ production. Since IFN- γ plays important role in PD-L1 gene and protein expression we added it to the experiments. And found that *L. mesenteroides* plus IFN- γ increases PD-L1 expressions more than ten folds. On the other hand, presence of blockade PD-L1 antibody with per-induced PD-L1 colon cancer by *L. mesenteroides* plus IFN- γ increased Jurkat T-cells viability and significantly increased activated T cells marker cytokines IFN- γ and IL-2. Additionally, it has been found that induced PD-L1 in colon cancer by *L. mesenteroides* plus IFN- γ has been associated with multiple changes in bacterial-related PD-L1 regulated pathways. Although TLRs, NOD, and bacterial related G-protein coupled receptors have been activated leading to activate hippo pathway markers YAP-1 and TAZ, autophagy marker genes BECN-1, ATG-5 and SQSTM, have been significantly reduced.

In conclusion, *L. mesenteroides* has increased PD-L1 expression in colon cancer cells. This increase was significant in the presence of blockade PD-L1 antibody to activate Jurkat T cells. This indicates a possible use of this bacterium as an adjuvant agent during blockade PD-L1 antibody immunotherapy.

Keywords: Immune checkpoint, PD-L1, PD-L1 blockade, Probiotic bacteria.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser ciddi sağlık sorunlarına yol açan ve tedavisi zor olan dünyada en yüksek ölüm oranlarına sahip yaygın hastalıklardandır (Rouzbahani ve ark.2018). Kanser vakalarının %5-10'u kalıtsal olan genetik değişikliklerden kaynaklanırken, %90-95'i gen mutasyonlarına yol açan çevresel nedenlerden kaynaklanmaktadır (Rouzbahani ve ark.2018).

Dünya çapında, her yıl on milyonlarca kişiye kanser teşhisi konulmaktadır ve yarısından fazlası hayatını kaybetmektedir (Anand ve ark. 2008). Yılda 1,2 milyondan fazla yeni vaka ve 600.000 ölüme neden olan kolorektal kanser (KRK) (Ma ve Yu 2006) dünyadaki en ölümcül üçüncü hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır (Rawla ve ark.2019).

Bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, alkol, sigara kullanımı, yaş, ülseratif kolit ve sedanter davranış gibi çok sayıda risk faktörü de genetik anormalliklere ek olarak KRK'ye katkıda bulunabilir (Yaghoubi ve ark. 2019). İmmünoterapi; cerrahi, hormon tedavisi, radyasyon ve kemoterapi gibi multimodal yaklaşımların yerini alarak kanserin tedavi edilme şeklini değiştirmiştir (Rouzbahani ve ark. 2018).

Kanser immünoterapisi, kanseri tedavi etmek için bağışıklık sisteminin yapay olarak uyarılmasını ve dolayısıyla bağışıklık sisteminin hastalıklarla mücadele etme kapasitesinin artırılmasını içerir. Kanser immünoterapisi özünde hastanın kendi bağışıklık sistemini harekete geçirir ve bağışıklık sisteminin gücünü ve özgüllüğünü kullanarak kanseri tedavi etmeye çalışır. Kanser immünoterapileri, efektör yolları aktive etmeyi veya inhibe etmeyi amaçlayan çeşitli stratejiler kullanır. Bağışıklık tepkisini değiştirmek ve kanseri tedavi etmek için küçük bileşikler, peptitler, rekombinant antikorlar, aşılar ve hücresel terapi yaklaşımları kullanılmaktadır (Syn ve ark. 2017, Blattman ve Greenberg 2004).

İmmün kontrol noktası inhibitörleri (ICI) olarak bilinen yeni immünoterapi ilaçları, ileri hematolojik ve katı maligniteler üzerinde önemli ve uzun süreli iyileştirici faydalar göstermektedir. Artan yan etkilere rağmen, sitotoksik T-lenfosit antijen-4 (CTLA-4) ve programlanmış hücre ölümü proteini 1/programlanmış hücre ölümü ligandı 1 (PD-1/PD-L1) dahil olmak üzere iki ICI sinyal yolunu aynı anda

inhibe etmek, sitotoksik T hücrelerinin etkilerini büyük ölçüde artırabilir (Schreiber ve ark. 2011).

Son araştırmalar, bağırsak mikrobiyotası ile ICI'nin etkinliği arasında bir bağlantı olduğunu göstererek bize immünoterapi müdahalesine yeni bir bakış açısı kazandırmıştır (Yi ve ark.2018). Buna göre, probiyotiklerin kanser hastalarında immünoterapinin etkinliği üzerinde, bakteriye göre değişiklik gösterebilen iyi bir etkinin olabileceği düşünülmektedir (Lee ve ark. 2021).

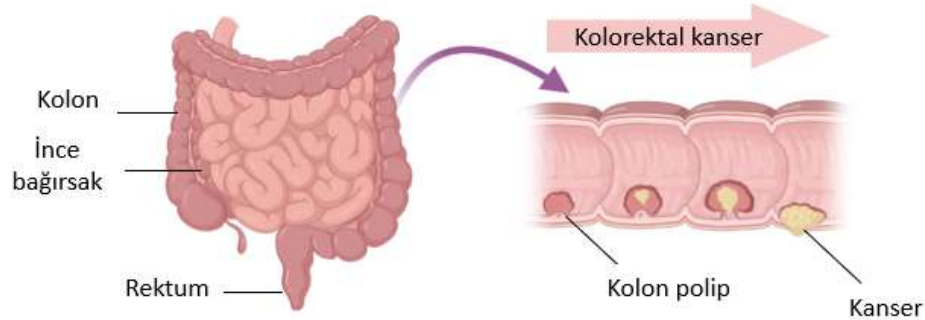
Bu tez projesinin amacı, bir prebiyotik olan kefir ürününden izole edilen ve morfolojik ve biyokimyasal testlerin yanı sıra 16sRNA gen dizilimi kullanılarak tanımlanan bakterilerinin kolon kanseri hücreleri üzerine etkisinin immün sistem açısından araştırılmasıdır. Araştırmada kullanılan probiyotik bakteriler; canlı probiyotik bakteriler, hücre içermeyen süpernatantlar ve ısıyla öldürülen probiyotik bakteriler olarak üç grupta incelenmiştir. Gen ve protein düzeyindeki ileri araştırmalarda PD-L1 ekspresyonunda artışa sebep olan izolatlardan biri seçilmiştir. Ayrıca, PD-L1 ekspresyonunda önemli rol oynayan ve probiyotik bakteriler tarafından bağışıklık hücrelerince üretilmesi indüklenen IFN- γ da bir dış faktör olarak çalışmaya eklenmiştir. Bir sonraki adımda, immünoterapi ajanı olarak blokaj antikoru ile PD-L1'in fonksiyonel analizi için, T immün hücrelerinin bir modeli olan Jurkat T hücreleri ile kolon kanseri hücreleri ko-kültüre edilmiştir. Bu araştırma ayrıca, bakteriyel enfeksiyonlar sırasında PD-L1'i indükleyen efektör genleri bulmak için bakteri ilişkili yolak ve PD-L1 gen ekspresyonu arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolon Kanseri

Kolon, rektum, mide, pankreas, yemek borusu, anüs, safra kesesi, karaciğer ve safra kanalı tümörleri gastrointestinal tümörlere örnektir. Kolorektal, pankreas ve mide kanserleri batı dünyasında en sık görülen gastrointestinal malignitelerdir (Link & Goel 2013).

Kolorektal kanser (KRK), ABD'de en yaygın üçüncü kanser ve kansere bağlı ölümlerin üçüncü önde gelen nedenidir (Siegel ve ark. 2021). Sigara, aşırı alkol kullanımı, yaşlanma, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, kronik pankreatit ve obezite, birçok gastrointestinal malignite türü için birincil risk faktörlerinden bazılarıdır (Link & Goel, 2013). WNT, RAS-MAPK, PI3K, TGF, P53 ve DNA yanlış eşleşme onarım yolları/yolakları, en önemli KRK duyarlılık genleri ve yolakları arasındadır. KRK'ye genetik yatkınlıkların bilinmesine rağmen, KRK patogenezinin ayrıntılı mekanizması hala belirsizdir. Bu, KRK'nin heterojen doğasının ve bağırsak mikrobiyomu, enfeksiyon ve diyet dahil olmak üzere diğer faktörlerle birlikteliğinin bir sonucudur (Muzny ve ark. 2012).



Şekil 2.1. Polip gelişimi ve kolon kanseri

Kolon kanseri (KK), normal kolon epitelinin adenomatöz polipe dönüşmesi sonucu gelişir (Şekil 2.1). KK sıklıkla bağırsak mukozasında bir polip olarak başlar, ancak histolojik görünümüne bağlı olarak bazen de malign bir lezyona dönüşme potansiyeline sahip adenom olarak adlandırılan iyi huylu bir lezyon olarak da başlayabilir (Granados-Romero ve ark. 2017).

Sporadik KRK vakalarının %65-70'inde kromozomal instabilite (Pino & Chung2010) bulunmaktadır, bunların da %10-15'ine satellit DNA kararsızlığı neden olmaktadır (Kang ve ark., 2018). Sporadik kanserin %20'sinde ve kalıtsal kolorektal kanserin %80'inde esas olarak APC, p53, DCC, KRAS ve BAX gen mutasyonları mevcuttur (Granados -Romero ve ark. 2017).

2.1.1. Risk Faktörü

Bağırsak florasındaki bireysel farklılıkların yanı sıra kişilerdeki genetik özelliklerin bazı kolon hastalıklarının patogeneğinde rolü olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle kalın bağırsakta yararlı bakterilerin koloni oluşturmasıyla olası hastalıkların önlenebileceği bilinmektedir. Çeşitli çalışmalarda elde edilen bulgular, kalın bağırsak mikroflorasının kanser etiyolojisinde rolü olduğu görüşünü desteklemektedir. Kolon kanseri risk faktörü; değiştirilemeyen risk faktörü ve değiştirilebilir risk faktörü olarak ikiye ayrılabilir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Kolon kanseri risk faktörleri

İrk ve Etnisite: KKK hastalarında beklenti ırk ve etnik kökene bağlı olarak farklılık gösterebilir. Örneğin, Afrikalı Amerikalılar ve Yerli Amerikalılar, Amerika Birleşik Devletleri'nde KKK'nin tüm aşamalarında daha yüksek bir KKK prevalansına ve daha kötü bir hayatta kalma oranına sahiptir (Rawla ve ark. 2019, Zaki ve ark. 2022). İrksal görünümdeki farklılıkların kalıtsal bir olgudan ziyade yeterli sağlık hizmetlerine, önleyici taramalara, besleyici diyetlere, paraya ve eğitime erişimdeki eşitsizliklerden kaynaklanması daha olasıdır (Pankratz ve ark. 2022).

Cinsiyet: Çalışmalar cinsiyetin KKK'yi etkilediğini göstermiştir. Örneğin, Birleşik Krallık'ta 45 yaş üstü erkeklerin kadınlara göre 1,7:1 oranında önemli ölçüde daha yüksek KKK insidans oranlarına sahip olduğu gösterilmiştir (White ve ark. 2018). ABD'de erkekler, Amerikan Kanseri Derneğine göre kadınlardan %14 daha fazla KKK insidans oranına sahiptir (Chang ve ark. 2022).

Yaş: Kolorektal kanser insidansının yaşa bağlı tahminleri keskin bir artış göstermektedir. Yeni vakaların yaklaşık %90'ını 50 yaş üstü yetişkinler oluşturmaktadır, ayrıca 65 yaş üstü kişilerde KKK gelişme olasılığı üç kat daha fazladır. Bununla birlikte, 65 yaş üstü kadınlarda KKK insidansı ve mortalitesi erkeklere oranla daha fazladır (White ve ark. 2018).

Kalıtsal faktörler: Kolorektal kanser gelişimi için risk faktörlerinin yaklaşık %35'inin kalıtsal olduğu tahmin edilmektedir (Granados-Romero ve ark. 2017). Örneğin, Lynch sendromunda MLH1 ve MLH2'deki mutasyonların yaklaşık %90'ı, polipozisi olsun veya olmasın kalıtsal kolon kanseri ailelerinde bulunmaktadır (Zhary ve ark. 2012).

Kronik inflamasyonlar: Ülseratif Kolit (UK) ve Crohn Hastalığı (CH) gibi inflamatuvar bağırsak hastalıkları (IBH), KKK ile bağlantılı ortak genetik risk faktörüdür. Her iki hastalık da hemen hemen aynı etolojiye sahiptir (Katsaounou ve ark. 2022). UK, kolon mukozasının rektumdan çekuma değişen yayılımı ile kalıcı inflamasyonu ve ülserasyonudur. Bu, hastalığı başlatan ve geliştiren bağışıklık sisteminin kontrolsüz tepkisi nedeniyle olur (Guo ve ark. 2022). CH iltihabı, sindirim sistemi katmanlarına nüfuz eden sindirim sisteminin birçok bölümünü içerir (Ayoub ve ark. 2022). Kronik inflamasyon kolon kanserinde ayırt edici bir özelliktir çünkü kontrolsüz sitokinler, büyüme faktörü ve kemokinler kanser başlangıcını ve

gelişimini desteklemektedir. Aslında, IBH hastalarında KRK oluşumunun göreceli riskinin 4 ila 20 kat daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir (Katsaounou ve ark. 2022).

Kistik fibrozis: Kistik fibrözisli hastalarda KRK geliştirme riski yüksektir. Kistik fibrozisli kişilerde KRK insidansı 10 kat daha fazladır (Yamada ve ark. 2018)

Sedanter yaşam tarzı: Son elli yıl boyunca, yüksek gelirli ülkelerde yerleşik yaşam tarzları, masa başında çalışmayla bağlantılı genel oturma süresi giderek artmaktadır (Katsaounou ve ark. 2022). Fiziksel olarak aktif kişilerde kolon ve rektum tümörlerinin gelişme ihtimali %25 azalmaktadır. Çünkü egzersiz ile kardiyovasküler ve gastrointestinal sistemler güçlenmekte ve kan akışı, metabolik hız artmaktadır. Bu da, her ikisi de KRK ile ilişkili somatik belirteçler olan bel çevresini ve vücut kitle indekslerini (BMI'ler) azaltır (Rawla ve ark. 2019). Bazen yaşam konforu hastalıkların oluşma riskini tetikleyebilmektedir. Örneğin, dünya çapındaki anti-SARS-CoV-2 pandemik eylemlerinin bir sonucu olarak, gençlerin %70'i fiziksel aktivitelerini azalttı ve oturma sürelerini artırdı. (Zheng ve ark. 2020). Ayrıca hava ve su kirliliği gibi çevresel değişkenlerin yanı sıra yeşil alanlara, spor tesislerine ve parklara erişim, fiziksel aktivite ve obezite üzerinde etkilidir. Çevresel şartların kalitesi ne kadar düşükse, fiziksel aktivite eksikliğine bağlı obezite insidansı o kadar yüksek olur (Katsaounou ve ark. 2022).

Obezite: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, aşırı vücut yağının endometrial, multipl miyelom, menopoz sonrası meme, meningioma, kolorektal, özofagus, renal/böbrekler, pankreas, karaciğer, mide kardiyak, yumurtalık, tiroid ve safra kesesi dahil olmak üzere en az 13 farklı malignite riskinin artmasıyla bağlantılı olduğuna dair ikna edici kanıtlar sunmuştur (Friedenreich ve ark. 2021). Obezite birçok nedenden dolayı kolon kanserinin başlamasına neden olur. Adipoz doku, tüm dokular arasında en inflamatuardır ve tümörü teşvik eden sitokinler üretir. Ayrıca aşırı vücut ağırlığı metabolik süreçleri bozarak mutajenik serbest oksijen radikallerinin oluşumunda artışa neden olabilir (Katsaounou ve ark. 2022). Adipozite, yağın visceral bölgeye daha derine nüfuz etmesini arttırır, karaciğerde, kalpte, iskelet kaslarında, pankreasta ve bağırsakta ektopik olarak birikerek hepatik steatoz, yağlı karaciğer hastalığı ve kanser gibi diğer kronik hastalıklar gibi metabolik dengesizliklere neden olur. Karaciğer, pankreas ve bağırsağın

derinliklerinde visseral yağın toplanması, hormonların ve proinflamatuvar sitokinlerin adipositlerden salgılanmasını uyarak organ homeostazını bozar, bu da oksidatif stres ve immünoşpresyonu teşvik eder ve daha yüksek serum amiloid A seviyeleri ve kanda daha yüksek C-reaktif protein yoluyla kronik düşük seviyeli inflamasyonu indükler. Buna karşılık, inflamatuvar ve büyüme faktörleri, onkogeninin yanı sıra metabolik ve endokrin problemlere neden olabilir (Hursting & Dunlap 2012).

Diyet; Düşük lifli, yüksek yağlı diyet ve Alkol tüketimi: Kilo ne olursa olsun diyet, KKK gelişimi üzerinde olumsuz veya koruyucu bir etkiye sahip olabilir. Aslında, sağlıklı bir vücutta insan hücrelerinden daha fazla bakteri hücresi çeşidi vardır, bu da çeşitlendirilmiş bir mikrobiyotaya ihtiyacının altını çizer. Farklı gıdalar mikrobiyotaya popülasyonunu ve bağırsak iltihabını farklı şekillerde etkiler (Rawla ve ark. 2019). Mide ve ince bağırsak kanserlerinin yanı sıra KKK'nin kırmızı ve işlenmiş etler tarafından artırıldığı bilinmektedir. Prospektif çalışmalarda, en fazla kırmızı ve işlenmiş et tüketen kişilerde göreceli risk 1,22'dir (Rawla ve ark. 2019). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC), 2015 yılında, çoğunlukla KKK riski üzerindeki etkisinden dolayı, işlenmiş eti "kanserojen" ve kırmızı eti "muhtemelen kanserojen" olarak sınıflandırmıştır (Kim ve ark. 2013). Öte yandan sebze ve meyvelere dayalı beslenmenin antikanserojen etkisi vardır. İçerdikleri lifler, bağırsak bakterileri tarafından anti-inflamatuvar ve anti-proliferatif özelliklere sahip kısa zincirli yağ asitlerine dönüştürülür. Ayrıca, yüksek diyet lifi tüketimi ile birleştirilmiş sağlıklı bir mikrobiyotaya, protoonkogenleri ve onkogenik yolları aktive eden epigenetik süreçleri modüle ederek hücre proliferasyonunu azaltabilir (Tudosie ve ark. 2022). Bunun yanı sıra, lif dışı geçiş sürelerini hızlandırarak olası kanserojenlere maruz kalmayı azaltır (Rawla ve ark. 2019).

Ağır alkol tüketimi, artan KKK riski ile ilişkilidir. Birkaç çalışma, alkol kullanımı ile bunların KKK'de geliştirdikleri adenomatöz polip gelişimi riski arasında bir bağlantı bulmuştur (Rossi ve ark. 2018). Erkeklerin alkol metabolizmasındaki hormona bağlı değişiklikler nedeniyle alkol tüketiminden kanser geliştirme riski daha yüksektir (Rawla ve ark. 2019). Etanol, bazı bağırsak mikrobiyotaya tarafından, kolon mukozasının zayıf aldehit dehidrojenaz aktivitesi nedeniyle kolonda biriken zehirli ve reaktif asetaldehite dönüştürülür. Buna karşılık, asetaldehit çeşitli DNA mutasyonlarını indükleyebilir (Katsaounou ve ark. 2022).

Diyabet: Diyabetin çeşitli kanser türlerine yatkınlık oluşturduğu iyi bilinmektedir. Hareketsiz bir yaşam tarzı ve obezite, bu riski artıran iki risk faktörüdür. Şeker hastalarında kan şekeri seviyeleri de aşırı derecede yüksektir, bu da glikoz metabolizmasını hızlandırabilir ve malign glikolize kaymayı artırabilir (Warburg etkisi olarak bilinir). Aksine, tip 2 diyabetli (T2DM) olanlar, BMI, fiziksel aktivite ve yaygın olarak kullanılan diğer faktörleri hesaba kattıktan sonra bile daha yüksek KRK riskine sahiptir. (Rawla ve ark. 2019) Hiperinsülinemi, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ekseni, hiperglisemi, obezite, kronik inflamasyon, sitokinler, adipokinler ve fekal kanserojen maruziyeti, T2DM ve KRK'yi birbirine bağlayan olası patofizyolojik ve moleküler süreçlerdir (Yu ve ark. 2022).

Sigara: Araştırmalara göre sigara, kansere bağlı ölümlerin ana önlenabilir nedenidir. 30 yıldan fazla bir süre boyunca 40'tan fazla sigara içmek, KRK insidansı riskini %40 artırır ve KRK ölüm riskini iki katına çıkarır (Katsaounou ve ark. 2022). Tütündeki çok sayıda kanserojen, BRAF sinyal bileşenlerindeki mutasyonlar, yüksek mikro satellit kararsızlığı (MSI-yüksek) ve CpG adası metilatör fenotipi dahil olmak üzere çeşitli genetik ve epigenetik anormalliklere neden olur. Tütün tüketmek bu yolları etkileyerek rektum ve proksimal kolonda poliplere neden olabilir (Rawla ve ark. 2019). Öte yandan, sigara içmek, DNA metilasyon modellerini sigara içmeyenlere veya eski sigara içenlere göre çok daha fazla değiştirir ve KRK'nin başlamasına önemli ölçüde katkıda bulunabilir, sigarayı bıraktıktan sonra da giderek geri dönüşümlü hale gelir, sigarayı bırakmak daha iyi yaşam ve kolon kanseri sağkalımı ile bağlantılıdır (Katsaounou ve ark. 2022)

2.1.2. Kolorektal Kanser ve Bağırsak Mikrobiyom İlişkileri

Son zamanlarda, yeni çalışmalar, KRK örneklerinde bağırsak mikrobiyotasında değişiklikler olduğunu bildirmiştir, bu da bağırsak mikrobiyotasının bu malignitenin başlangıcında ve ilerlemesinde önemli bir bileşen olabileceğini göstermektedir (Saus ve ark. 2019).

Bağırsak mikrobiyotası, mukozal homeostazın ve epitel bariyer fonksiyonunun korunmasına yardımcı olur. Bağırsak bariyeri, sağlıklı bir durumda bakterileri lümeneye etkili bir şekilde bölümlere ayırır, ancak bağırsak bariyeri işlevindeki bozulmalar, "bağırsak geçirgenliğine" yani irritabl bağırsak sendromu (IBS)'na yol açabilir, inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD), çölyak hastalığı ve kolon

kanseri gelişimi dahil olmak üzere çeşitli gastrointestinal bozukluklar ve hastalıklarla bağlantılıdır (Altveş ve ark. 2020).

Ayrıca, bağırsak mikroorganizmaları, özellikle metabolik ürünleri, bağışıklık tepkisi üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir ve bir kronik iltihaplanma kaynağı olarak hizmet görebilir. Sonuç olarak, mikrobiyota ve kısa zincirli yağ asitleri gibi metabolitleri (Altveş ve ark. 2020), bağırsak epitelyal bariyer disfonksiyonuna neden olabilir, böylece tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinleri ve epitel hücre bağlantılarına zarar veren interlökin-6 aktive edebilir (Pinto ve ark. 2018).

Bazı bakteriler, inflamatuvar reaksiyonlara neden olabilir veya gastrointestinal hücrelere doğrudan zarar veren toksinler oluşturabilir. Örneğin, *Bacteroides fragilis* ve *Enterococcus faecalis*, oksidatif DNA hasarına, iltihaplanmaya ve epitel bariyerinin bozulmasına neden olan enterotoksinler ve reaktif oksijen türleri oluşturur. Ayrıca, *B. fragilis* β -katenin'i artırarak hücresel proliferasyonu teşvik etmektedir (Saus ve ark. 2019).

KRK hastalarında çeşitli mikrobiyom değişiklikleri belirlenmiştir. Mikrobiyom sıklıkla pro-inflamatuvar fırsatçı patojenler ve metabolik problemlerle ilişkili mikroorganizmalar açısından zengindir ve bütirat üreten bakterilerden eksiktir. *Streptococcus gallolyticus*, *E. faecalis*, *Fusobacterium nukleatum*, *Escherichia coli* ve *B. fragilis* daha yaygınken, *Roseburia*, *Clostridium*, *Faecalibacterium* ve *Bifidobacterium* gibi cinsler, sağlıklı bireylere kıyasla KRK hastalarında tipik olarak azalmaktadır (Saus ve ark. 2019) .

Mikrobiyal dengesizliğin karsinogenezdeki işlevini açıklamak için çeşitli hipotezler geliştirilmiştir. Bazı araştırmacılar, bağırsak mikrobiyota disbiyozunun, kronik pro-inflamatuvar tepkilere ve epitel hücre değişikliğine neden olan ve sonuçta kansere yol açan fonksiyonel bir dengesizliği uyardığını belirtmiştir. İlgili bir model Driver- Passenger hipotezidir. Bu hipotezde, yerli bağırsak bakterileri (Driver), epitel hücrelerinde kanserin başlamasına katkıda bulunan DNA hasarına neden olur. Daha sonraki bir aşamada, devam eden karsinogenez, çevredeki mikro-çevreyi etkiler ve fırsatçı mikroorganizmaların (Passenger) büyümesini teşvik eder. Gelişen tümörün bir sonucu olarak bu model; hastalık ilerlemesinin mikroçevrede değişiklikler

ürettiğini ve mikrobiyotanın yerini, tümör mikroçevresinde rekabet avantajına sahip olan ve tümör genişlemesini destekleyecek başka ajanlar ile değiştirdiğini varsaymaktadır. Bu paradigmaya göre, hem sürücüler hem de yolcular, KRK ile farklı zamansal korelasyona sahiptir ve etiolojide belirli bir rolü temsil edebilmektedir (Saus ve ark. 2019)

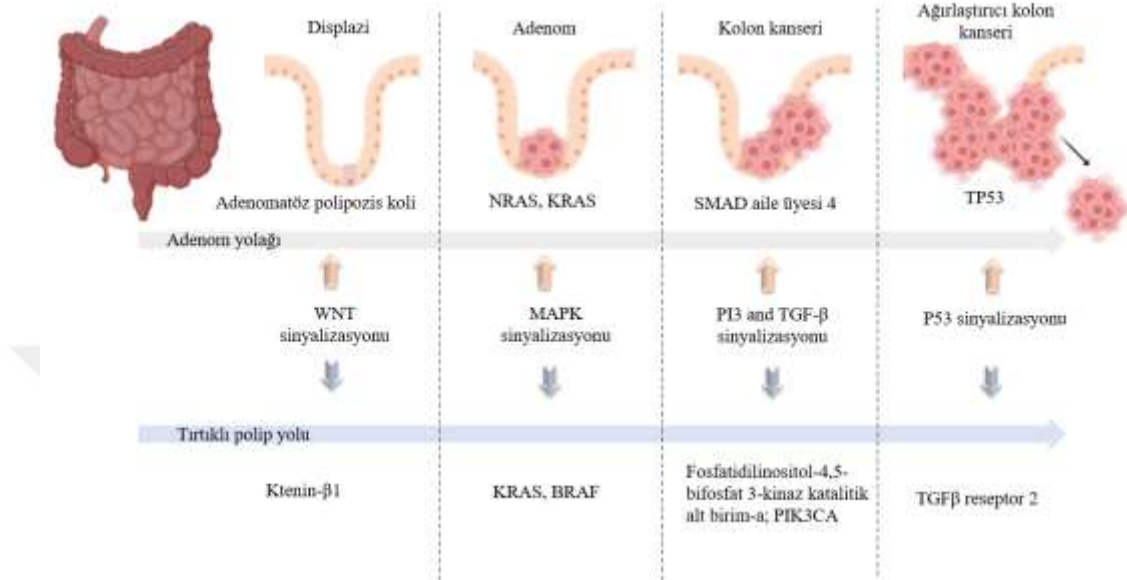
2.1.3. Kolon Kanseri Gelişimi

Genel olarak KRK, dışkı geçişlerini rahatsız eden veya bağırsak hareketlerinde ağrı ve ağrılarla birlikte görünür kan olarak ortaya çıkabilen veya nadir durumlarda siyah "katran" olarak ortaya çıkabilen önemli bir boyuta ulaşana kadar, birkaç santimetreye ulaşana kadar yavaş yavaş gelişir (ACS 2020). Çoğu kolon kanseri, art arda histolojik, morfolojik ve genetik değişiklikleri içeren çok aşamalı bir süreçle zamanla büyütür (Simon 2016).

KRK'ye genellikle iyi huylu, kanser öncesi poliplerin içindeki lokalize değişiklikler neden olur (Şekil 2.3). Bu polipler, bağırsak lümenine doğru çıkıntı yapan bağırsak mukozası içindeki anormal hücre kümeleridir. Poliplerin, zamanla sapsız veya saplı olmak üzere farklı formları takip etmesinin iki yolu vardır. Bu polipteki kopyalanmış hücreler, bağırsak duvarını KRK'nin bir özelliği olarak kırmalarına ve daha sonra daha fazla değişmesine ve yerel lenf düğümlerine ve son olarak uzak metastatik yerlere yayılmasına izin vermek için yeterli genetik modifikasyonları birikebilir. Neyse ki, tüm polipler çok az sayıda kötü huylu özellikler geliştirmez ve bunun gerçekleşmesi on yıl alınmaktadır (Simon 2016).

Malign polipler teriminde, adenomlar ve sesil tırtıklı polipler (SSP'ler), malign potansiyeli olan iki ana polip formudur ve her biri, KRK'ye dönüşme riski ile bağlantılıdır. Adenomların çoğu küçük, yuvarlak, atipik bezleri olan tübüler bir histolojiye sahiptir, ancak genişledikçe, sıklıkla patoloji raporlarında villöz veya tübülovilli olarak karakterize edilen uzun filamentli yapısal bölümlerine sahiptirler. Adenomlar, tanımı gereği displazi (düşük derecede hücresel ve yapısal atipi) ile karakterize edilir. Tubulovillöz ve villöz adenomlar, özellikle %25 villöz içeriğe sahip olanlar, genellikle daha büyüktür ve kanserli hücre içermeye riski daha yüksektir. Öte yandan SSP'ler, tırtıklı veya testere dişli bezleri olan düz ve halı benzeridir. SSP'ler, tümü KRK gelişimi ile bağlantılı olan sapsız tırtıklı adenomlar, geleneksel tırtıklı adenomlar ve karışık poliplerden oluşur (Conteduca ve ark. 2013).

Kolon veya rektumun duvarından gelişen KRK'ler kan veya lenf damarlarına girerek kan yoluyla uzak organlara veya komşu lenf düğümlerine metastazı kolaylaştırabilir. İstila derecesi, bir KRK teşhisinin evrelemesini ve dolayısıyla prognozu belirler (Rawla ve ark. 2019).



Şekil 2.3. Kolon kanseri gelişimi ve ilerlemesi; normal kolonu kolorektal kansere dönüştüren iki ayrı yolak tanımlanmıştır. 'Klasik' yolak (üstte), adenokarsinomlara ilerleyebilen tübüler adenomların gelişimini içerir. Alternatif yolak (altta), tırtıklı polipleri ve bunların tırtıklı kolorektal kansere ilerlemesini içerir. Her iki yolak da onkogen mutasyonlarının çoğunu barındırır (Kuipers ve ark., 2015).

2.1.4. Kolon Kanseri Teşhisi

2.1.4.1. Dışkı Bazlı Testler

Fekal immünokimya testi: FIT'ler, daha spesifik olmayan peroksidaz yanıtı yerine insan hemoglobinine özgü antikorlar kullanarak dışkıdaki hemoglobini saptamaya yönelik geliştirilen bir gaytada gizli kan arama tekniğidir. FIT de tek örnektir ve evde yapılır. Diyet ve ilaçların FIT'ler üzerinde çok az etkisi vardır ve kantitatif bir test kullanılıyorsa, pozitif bir test için kesme değeri düşürülerek duyarlılık ve özgüllük ayarlanabilir. Tek bir FIT kolonoskopiden daha az duyarlı olsa da FIT'e daha fazla katılım, sadece bir kolonoskopi teklifine kıyasla, tek bir FIT ile KRK'nin neredeyse karşılaştırılabilir tanımlanmasına yol açabilir. Yıllık veya iki yılda bir yapılan FIT, KRK ve öncü neoplaziyi tanımlamada tek bir FIT'den daha yüksek bir kümülatif orana sahiptir ve bu da onu her on yılda bir yapılan kolonoskopinin verimine benzer hale getirir (Shaukat & Levin 2022).

Çok hedefli fekal (çhf) DNA testi: Gizli kan tespiti ile birlikte dışkıda metilasyon ve tümör DNA'sının tespiti, FIT duyarlılığını artırmak için uygun bir tekniktir. ÇhfDNA testi, hemoglobini saptamak için FIT'in yanı sıra ileri adenomlar veya KRK tarafından dökülen DNA'daki KRK mutasyonlarını belirlemeye yönelik tahlilleri içerir. Öte yandan mtsDNA testi, KRK veya ileri adenomlar için yüzde 95 özgüllüğe sahip olan OC-Sensörüne göre daha düşük bir özgüllüğe (%87) sahiptir. Çhf DNA testinin bir diğer dezavantajı, dışkı toplamanın zor olmasıdır. FIT'e ek olarak, çhfDNA testi, özel bir tampon içeren büyük bir kavanozda gelişmiş dışkı örneği toplamayı gerektirir. Prospektif bir deneyde, FIT için % 0,6 ile karşılaştırıldığında, bireylerin %6'sından fazlası yeterli dışkı örneği toplayamadı veya iletemedi. Testin daha zayıf özgüllüğü nedeniyle, çhfDNA testi pozitif olduğunda ve ardından normal bir kolonoskopi yapıldığında ortaya çıkan yanlış pozitiflik durumunda çhfDNA testi konusunda endişeler bulunabilir.

2.1.4.2. Görselleştirme Testleri

Kolonoskopi: Doğrudan gözleme, biraz kesin lokalizasyona ve histolojik değerlendirme için doku örneklerinin toplanmasına izin verir, bu nedenle kolonoskopi, kanser öncesi lezyonların ve kolon karsinomasının saptanması için "altın standart"tır (Conteduca ve ark. 2013). Çoklu vaka-kontrol ve prospektif kohort çalışmaları hem proksimal hem de distal KRK için koruma sağlayarak, tarama kolonoskopisi alanlarda, almayanlara göre kanser mortalitesinin %29-68 daha düşük olduğunu tahmin etmiştir (Shaukat & Levin 2022). İleoçekal valve uzanan tam kolonoskopi mümkün olmadığında, hava kontrastlı baryumlu lavman ve sanal kolonoskopi uygun alternatiflerdir (Conteduca ve ark. 2013).

Endoskopik KRK Taraması: Esnek sigmoidoskopi, endoskopik KRK taraması sırasında rektum, sigmoid kolon ve inen kolonun doğrudan gözlemlenmesine izin verir. Teknik ayrıca uzak kolorektal lezyonların eksizyonuna veya biyopsisine de izin verir. Esnek sigmoidoskopinin kolonoskopiye göre faydaları arasında daha az kanama ve perforasyon riski, sedasyon ve anesteziye kaçınma ve daha düşük maliyet sayılabilir. Ek olarak, daha geniş bir klinik profesyonel yelpazesi esnek sigmoidoskopi yapabilir (Jain ve ark. 2022).

CT Kolonografi (CTC): Kolorektal kanser ve öncü polipler, tam kolon değerlendirmesi olan CTC'de sıklıkla bulunur. Gastrografin gibi tek bir ozmotik

müşhil, hala mevcut olabilecek herhangi bir dışkıyı tanımlamak için bağırsağı temizlemek için bir oral katartik ilacı bir oral kontrast madde ile birleştirmek için kullanılabilir. Bundan sonra, gazla şişmiş kolonu görselleştirmek için yüksek çözünürlüklü iki ve üç boyutlu BT taramaları kullanılır. CTC görüntülerini yorumlamak zaman alır ve tipik abdominopelvik BT taramalarını okumaktan farklıdır. Sonuç olarak, maksimum teşhis doğruluğu için daha fazla bilgi ve eğitim gereklidir (Obaro ve ark. 2022).

Kolon için Kapsül: Kolon kapsülü, terminal ileumda yutulan ve tetiklenen kablosuz, hap boyutunda bir kamera kapsülü teknolojisini kullanır. Kapsül, radyasyon, anestezi veya gaz insüflasyonu gerekmeden kolon mukozasının fotoğrafını çeker (Shaukat & Levin 2022).

2.1.4.3. Kan Testleri

Yaygın olarak "sıvı biyopsi" olarak bilinen kan bazlı kanser tespit tahlilleri, tek kanser veya çoklu kanser teşhis prosedürleri için yeni bir olası yol sağlar. KRK, kan bazlı tarama tahlillerinin geliştirilmesi için aday olan bağırsak mukozasındaki genetik ve epigenetik değişikliklerin bir kombinasyonunun bir sonucu olarak gelişir (Jain ve ark. 2022). Şu anda yalnızca bir FDA onaylı kan bazlı KRK tarama testi bulunmaktadır. SEPT9, septin 9'u kodlayan ve KRK yolunda erken dönemde değişen bir tümör baskılayıcı gendir. Plazma metillenmiş septin 9'un (mSEPT9) ölçümü, daha yüksek etkinlik tarama testlerini reddeden veya tamamlayamayan kişiler için yararlıdır (Shaukat & Levin 2022).

Başka bir DNA metilasyon testi olan TriMeth, üç KRK'ye özgü DNA metilasyon markörünü (C9orf50, KCNQ6 ve CLIP4) tanımlamayı amaçlar. Ayrıca plazma mikroRNA (miRNA) ve plazma protein biyobelirteçlerini saptayan testler de kan bazlı tarama testlerine dahildir. miRNA, KRK oluşumunun erken evrelerinde eksprese edildiğinden, kanser öncesi ve kanserli hücrelerde düzenlenmediğinden ve genellikle periferik kanda stabil olduğundan, KRK taramasında benzersiz bir ilgi alanı oluştururlar (Jain ve ark. 2022).

2.1.4.4. Dışkı Bazlı Mikrobiyom Testleri

Dışkı bazlı mikrobiyom tahlilleri, FDA tarafından düşük riskli tarama için henüz onaylanmamış veya tavsiye edilmemiş yeni tarama yöntemleridir. Yüksek

dereceli displazisi ve KKK'si olanlarda dışkıdaki bakteri yükü daha büyük olabilir ve bu da araştırmacıları dışkıda KKK bakteriyel göstergeleri aramaya sevk eder. Ancak, bu testler hala nispeten yeni olduğundan, test performansına ilişkin veriler sınırlıdır. *Lachnoclostridium* sp., *Fusobacterium nucleatum* ve *Clostridium hathewayi*, 2020 metagenomik ve doğrulama araştırmasında adenomda önemli ölçüde zenginleştirilmiştir.

Bu tarama tekniğiyle ilgili bir başka zorluk, mevcut birçok mikrobiyom testinin, PCR testleriyle karşılaştırıldığında zaman alıcı ve maliyetli olan genomik veya metagenomik dizilemeyi içermesidir. En iyi mikrobiyom biyobelirteçlerini ve biyobelirteç kombinasyonlarını bulmak ve ayrıca test doğruluğunu ve maliyetini değerlendirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Saus ve ark. 2019).

2.1.5. Kolon Kanseri Tedavisi

Kanserin türü ve evresi, olası yan etkiler, hastanın tercihleri ve genel sağlık durumu, kolon kanseri tedavi seçeneklerini ve önerilerini etkiler. Sıklıkla kullanılan kolorektal kanser tedavileri cerrahi, radyasyon, kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapiyi içerir.

2.1.5.1. Cerrahi

Cerrahi, en sık kullanılan kolorektal kanser tedavisidir. Sağlıklı kolon veya rektumun bir kısmı ile komşu lenf düğümleri çıkarılacaktır. Cerrahi birincil tedavi olmasına ve hastaların %50'sini iyileştirmesine rağmen, ameliyatların ötesinde nüks ciddi bir dezavantajdır ve bazen ölüme yol açar (Daniel ve ark. 2018).

2.1.5.2. Radyoterapi

Radyoterapi, her ne kadar kolon kanseri olan kişiler için sıklıkla önerilmese de kanser hücrelerini yok etmek için yüksek enerjili x-ışınlarının kullanılmasıdır. Bu tür bir tümör ilk ortaya çıktığı yerin etrafında dönme eğilimi gösterdiğinden, rektum kanserini tedavi etmek için yaygın olarak kullanılır (Haddock 2017).

2.1.5.3. Kemoterapi

Kemoterapide, hızla gelişen kanser hücrelerini inhibe etmek için antikanser ilaçlar kullanılır. Kolon kanserinin metastatik evrelerinin son evrelerinde kemoterapi

iyi bir seçim olabilir (Daniel ve ark., 2018). Kemoterapi genellikle seanslar halinde uygulanır. Her seanstan sonra, hastanın rahatlaması ve vücudunun antikanser ilaçların zararlı etkilerinden kurtulması için tedavi belirli bir süre duraklatılır. KK için geleneksel kemoterapi kullanıldığında hastalar nihayetinde nötropeni, anemi, ishal, el-ayak sendromu, gastrointestinal (GI) toksisite, bulantı, kusma, mukozit, yorgunluk, karaciğer hasarı ve hematolojik problemler gibi istenmeyen yan etkilerden mustarıptır (Alam 2018).

2.1.5.4. Hedefe Yönelik Tedavi

Sağlığı etkilemeden kanser hücrelerinin çoğalmasını, farklılaşmasını ve kanser hücrelerinin göçünü doğrudan engelleyebilen hedefe yönelik ilaçların kullanılmasıdır. Hedeflenen ilaçlar ayrıca tümör gelişimini engellemek ve artan bağışıklık uyanıklığına ve neoplastik hücrelere saldırıya izin vermek için lokal kan damarları ve bağışıklık hücreleri dahil olmak üzere tümör mikro-ortamını değiştirebilir (Morgado ve ark., 2022). Metastatik KKK için gerçek farmakolojik tedaviler, fluorourasil bazlı kemoterapi rejimlerinin (örn., FOLFIRI, FOLFOX, XELOX) ve hedefe yönelik ilaçlarda kullanılan bazı moleküllerin bir kombinasyonunu içerebilir, ancak bazıları tek başına da uygulanabilir. 2004 yılında FDA, KKK için ilk hedeflenen ajan olarak Cetuximab'ı onayladı (Morgado ve ark. 2022). *Cetuximab* ve *Panitumumab*, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörünü (EGFR) hedefleyen monoklonal antikorlardır. Genellikle, Kolorektal hücrelerin yüzeylerinde yüksek seviyelerde EGFR bulunur. Bu monoklonal antikorların EGFR'ye bağlanması, tümör hücresi gelişimini engeller ve onları öldürür (García-Foncillas ve ark. 2019). *Bevacizumab*, *Aflibercept* ve *Ramucirumab* ise vaskülogenez ve anjiyogenezin kritik düzenleyicisi olan Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) için inhibitör hedefler. Sonuç olarak, bu ilaçlar tümör vaskülarizasyonunu geriletirerek, rezidüel tümör vaskülatörünü normalleştirerek ve yeni tümör vaskülatörünün üretimini bloke ederek tümör gelişimini azaltır (Kanat & Ertas 2019).

Tirozin kinazlar ve diğer protein kinazlar, büyüme faktörlerinin kontrolünde önemli rol oynayan bir enzim sınıfıdır, bu nedenle çeşitli onkolojik hastalıklarda moleküler bir hedef olurlar. Monoklonal antikorların aksine, tirozin kinaz inhibitörleri ve diğer protein kinazlar, hücre zarına nüfuz etme ve dolayısıyla çeşitli

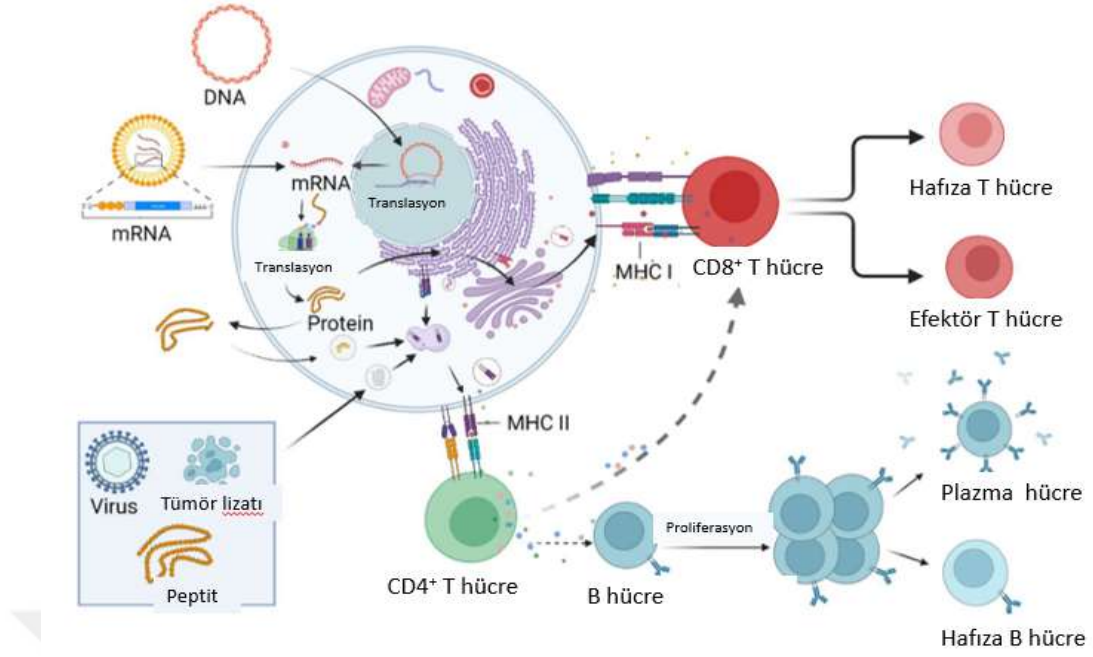
hücre içi yolları bozma yeteneğine sahiptir. Regorafenib, Encorafenib bu tür hedefe yönelik tedavinin örnekleridir. Genellikle bu ajanlar, Encorafenib'in Binimetinib ve Setuksimab (Morgado ve ark. 2022) ile birleştirilmesi gibi başka bir monoklonal antikor ile birleştirilir.

2.1.5.5. İmmünoterapi

Son yıllarda alternatif bir tedavi stratejisi olarak kanser immünoterapisi büyük ölçüde gelişme göstermiştir. İmmünoterapiye odaklanma, özgünlüğüne geri dönmüştür. İmmünoterapi, kanserin ilerlemesini önlemeyi ve hastaların yaşam kalitesini artırmayı amaçlar (Schuster ve ark. 2006).

İmmün sürveyans, tümör büyümesini önlemek için konakçının bağışıklık sistemi tarafından anormal hücrelerin erken ortadan kaldırılması kavramıdır. Bununla birlikte, immün sürveyanstan bir eksiklik veya kaçış, kanser büyümesinde ve IL-10 ve TGF- β gibi immünosupresan molekülleri salgılayarak tümör hücresinin immün sistem izlemesinden kaçmasında önemli bir rol oynar (Kiessling ve ark. 1999). İmmünoterapi teknikleri, konağın bağışıklık sisteminin kanserle savaşma kabiliyetini geri kazanmaya dayanır. Bu nedenle, aşılar, antikorlar, lenfokinler, in vitro stimüle edilmiş immün efektör hücreler gibi bir dizi maddenin kullanımı yoluyla bağışıklık sisteminin tamamlanması veya uyarılması sağlanmıştır (Marincola ve ark. 2000).

İmmünoterapi, aktif ve pasif kanser immünoterapisi olarak ikiye ayrılabilir (Şekil 2.4). Aktif kanser immünoterapisinin amacı, endojen, uzun süreli bir tümör antijenine özgü bağışıklık tepkisini uyarmaktır (Bertolaccini & Olivero 2001). Öte yandan, pasif kanser immünoterapisi, tümöre özgü antikorlar veya sitotoksik T lenfositler gibi büyük miktarlarda efektör molekülü veya hücreleri yeniden kaydederek tekrarlanan uygulamalara bağlıdır (Frödin ve ark. 1992).



Şekil 2.4. Bağışıklık sistemi tedavi mekanizması; Nükleik asit temelli aşılar, peptid temelli aşılara kıyasla DC'ler tarafından T hücrelerine verilmeden önce vücuda girdikten sonra ek işlem adımları gerektirir. Bununla birlikte, peptid aşıları, MHC I sunum antijenlerinin verilmesi için DNA ve RNA aşılardan daha az etkilidir. DC'ler, tümör antijenlerini sindirir ve bunları hücre yüzeyindeki MHC I ve MHC II moleküllerine iletir. T hücreleri, aynı kökenli reseptör-ligand çiftleri ve MHC-peptid kompleksi-T hücre reseptörü (TCR) arasındaki etkileşimler yoluyla aktive edilir. B hücreleri, aktive edilmiş CD4⁺ T hücreleri tarafından plazma hücrelerine ve bellek B hücrelerine dönüşmek üzere indüklenir. Efektör T hücreleri, B hücreleri, antikorlar ve belirli sitokinler, sonunda doğrudan veya dolaylı olarak tümör hücrelerini yok etmektedir (Liu ve ark, 2022)

Aktif Kanser İmmünoterapisi; Kanser Aşıları

Öncü aktif immünoterapi deneyleri, öldürülen *Streptococcus pyogenes* ve *Serratia marcescens*'i bağışıklık sistemini kansere karşı uyarmak için bir toksin olarak kullanan William Bradley Coley tarafından gerçekleştirilmiştir (McCarthy 2006). Bağışıklık yanıtının açıklaması, yüksek düzeyde immünojenik bakteri hücre duvarı bileşenlerinden gelir. Bu dönüm noktası keşifleri, immünojenik bir ortamda tanımlandıklarında, bağışıklık sisteminin tümör hücrelerini yok etme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Schuster ve ark. 2006). Antigen sunan hücre (APC) 'ler aracılığıyla konak T hücrelerine tümörle ilişkili antijenlerin işlenmesi ve sunulması, doğrudan T hücresi aktivasyonundan ziyade tümör antijenlerinin immünolojik tanımlanması için çok önemli bir ön koşul gibi görünmektedir (Waldman ve ark. 2020). Kanseri aşılarda, hücre bazlı aşılarda, peptid bazlı aşılarda, viral bazlı aşılarda ve nükleik asit bazlı aşılarda olarak sınıflandırılır (Liu ve ark. 2022). Hücre bazlı kanser aşılarda sıklıkla tüm hücrelerden veya neredeyse tüm tümör antijenlerini içeren hücre

parçalarından yapılır ve daha geniş bir antijen bağışıklık tepkisi ortaya çıkarır (Crews ve ark. 2021). Öngörülen veya bilinen spesifik tümör antijenlerinin kimyasal ve biyosentetik preparasyonlarını içeren peptit bazlı alt birim aşılar, belirli tümör antijen bölgesine karşı güçlü bir bağışıklık tepkisi indükler. Adjuvanlarla birleştirilmiş peptit bazlı alt birim aşı, hümmoral bir bağışıklık tepkisini verimli bir şekilde tetikleyebilir (Malonis ve ark. 2020). Virüs temelli aşılardan en önemli avantajlarından biri, etkili ve uzun süreli bir bağışıklık tepkisi üretmek için hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık sistemlerini uyarabilmeleridir. En çok vaat edilen virüs bazlı aşılarından biri adenovirüsleri kullanmaktır. Adenovirüsün kontrolü basittir, iyi tanımlanmış bir gen yapısına sahiptir ve gen transferi ve tümör antijen ekspresyonu elde etmek basittir (Lee ve ark. 2017). Hem replike olmayan vektörler hem de onkolitik adenovirüsler olarak adenovirüs bazlı kanser aşıları, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda umut vaat etmiştir (Appaiahgari & Vрати 2015). Nükleik asit aşısı aynı anda çok sayıda antijen sunabilir ve hem hümmoral hem de hüccresel korumayı tetikleyebilir. Ayrıca, nükleik asit aşıları, APC'nin aynı anda birçok epitopu veya antijeni çapraz sunmasına izin vererek tam uzunluktaki tümör antijenlerini kodlayabilir. Son olarak, nükleik asit aşılarının sentezi basit ve hızlıdır, bu da onları uyarlanmış neoantijen kanser aşılarının üretilmesi için ideal hale getirir (Liu ve ark. 2022).

Pasif Kanser İmmünoterapisi

Antikor bazlı pasif kanser immünoterapisi, tümör antijenine özgü bir antikor vererek Tümör İlişkili Antikorları bağışıklık sistemine bağlar. Pasif olarak verilen antikorlar, aglütinasyon, sinyal proteinlerinin nötralizasyonu ve reseptör bağlanma bölgelerinin blokajı dahil olmak üzere çeşitli biyolojik etkilere sahiptir (Schuster ve ark. 2006).

Antikorlar ayrıca, kovalent olarak bağlanmış sitotoksik bir kimyasalın tümör konumlarına tam olarak iletilmesi için araçlar olarak da kullanılır. Pasif kanser immünoterapisi ise çok sayıda tümör antijenine özgü antikor gerektirir ve aktif immünoterapiden farklı olarak sınırlı bir süreye sahiptir. mAb bazlı kanser tedavileri, hem hematolojik hem de katı tümörlerin tedavisinde dikkate değer klinik sonuçlar göstermiştir (Weiner ve ark. 2010). Kolon kanseri durumunda, tek başına veya kemoterapi ile vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörlerini (VEGFR) ve epidermal büyüme faktörü reseptörlerini (EGFR) hedef alan monoklonal antikorlar

üzerinde çalışılmaktadır. Bu artık mCRC'de standart sağlık kontrolü olarak kabul edilmektedir (Breakstone 2021). Bağışıklık kontrol noktası inhibitörü açısından, programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD-1) ve sitotoksik T-lenfosit ilişkili antijen 4 CTLA-4, FDA'nın onayından sonra metastatik melanom tedavisinde kullanılan en yüksek klinik ölçüdür. (Vaddepally ve ark. 2020). Kontrol noktası blokaj inhibitörleri, T hücreleri tarafından tümörün kaçmasını önler ve immün sürveyansını artırır (Morgado ve diğerleri, 2022). Bu nedenle, immün sürveyansı artırmak için anti-PD-1 olan *Nivolumab* ve *Dostarlimab* gibi birçok antikör tasarlanmıştır. *Nivolumab*, Temmuz 2017'de özellikle mikro uydu kararsız veya eksik uyumsuzluk onarımı (dMMR) vakalarında metastatik kolon kanseri tedavisi için FDA tarafından onaylanan ilk ilaçtır, *Dostarlimab* ise, 2021 yılında kolorektal kanser tedavisi için onaylanmıştır (Çerçek ve ark., 2022).

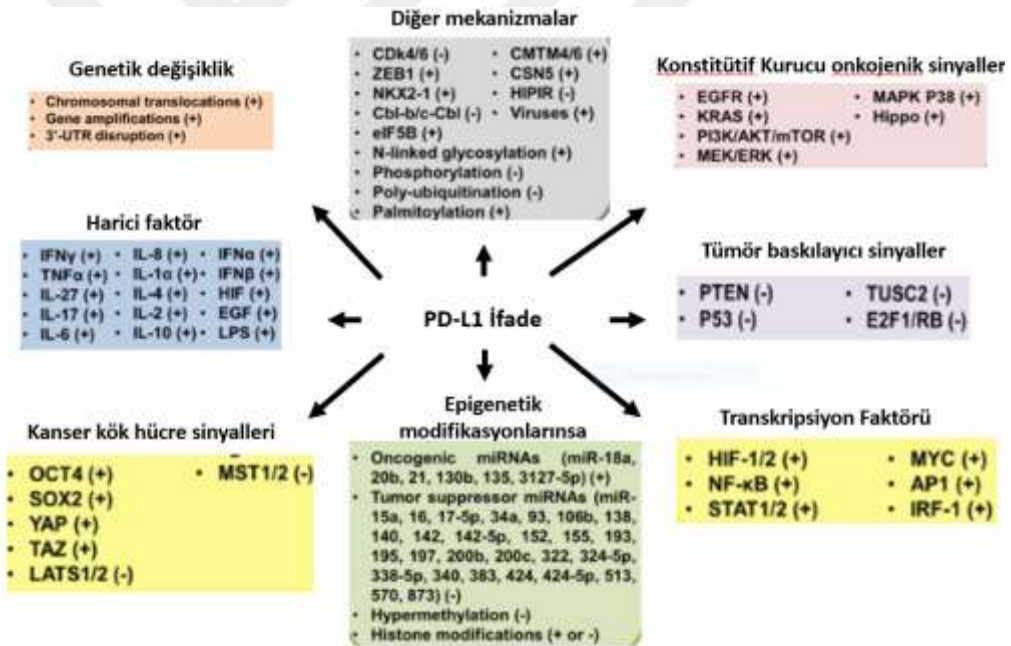
2.2. PD-L1/ PD-1 Yolağı

PD-1 (CD279), CD28 ailesinden biridir ve PDCD1 geni tarafından kromozom 2q37.3 üzerinde kodlanır ve çoğunlukla aktive edilmiş T hücresinde eksprese edilir (Keir ve ark, 2008) . PD-1, PD-L1 (CD274, B7-H1) ve PD-L2 (CD273, B7-DC) için 9p24 kromozomu üzerinde CD274 ve PDCD1LG2 genleri tarafından kodlanan farklı ekspresyon paternlerine sahip iki ligand vardır.

PD-L1, tümör hücrelerinin yanı sıra bağışıklık hücrelerinde de geniş ölçüde eksprese edilir. Öte yandan, PD-L2 ifadesinin çoğunlukla aktif DC'ler ve makrofajlarla sınırlı olduğu düşünülmektedir (Shen ve ark. 2019). PD-L1 ekspresyonu, anti-PD1/PD-L1 yolu bazlı immün kontrol noktası inhibitörlerinin etkinliğini tahmin etmek için bir biyobelirteç olarak oluşturulmuştur. Ayrıca, tümör ve tümör mikroçevresindeki yüksek PD-L1, immün baskılayıcı ortam için biyobelirteçler olarak kullanılabilir. PD-L1 ekspresyonunun hem doğuştan gelen hem de kazanılmış bağışıklık direnci tarafından artırıldığı bilinmektedir (Hong, 2019).

PD-L1 ekspresyonu, kromozomal değişiklikler, epigenetik modifikasyonlar, anormal onkojenik ve tümör baskılayıcı sinyaller, inflamatuvar sitokinler ve genetik, transkripsiyonel, transkripsiyon sonrası, translasyon ve translasyon sonrası diğer faktörler dahil olmak üzere çeşitli içsel ve dışsal sinyallerden etkilenir. (Shen ve ark. 2019). 9p24.1 kromozomundaki genetik anormallik, yakın zamanda birçok kanser türünde keşfedilen PD-L1 kopya sayısı değişimlerine yol açmıştır ve sonuç olarak

PD-L1 gen ekspresyonu etkilenmiştir (Budczies ve ark. 2017). PD-L1 gen delesyonlarının ise malignitelerde, özellikle küçük hücre dışı akciğer kanseri (NSCLC) ve melanomda PD-L1 artışlarından daha yaygın olduğu gösterilmiştir (Roemer ve ark. 2016) . Wang ve arkadaşlarının çalışması, PD-L1 geninin 3' çevrilmemiş bölgesinde doğal olarak oluşan bir polimorfizm lokusunda, rs4143815'te bir somatik mutasyonun, mide kanserinde artan PD-L1 protein üretimi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Wang ve ark. 2012). Başka bir çalışmada PD-L1 promotor bölgesindeki bir polimorfizmin, mide kanseri ile ilişkili olarak transkripsiyonel faktör SP1 için bir bağlanma bölgesi oluşturduğu ve böylelikle PD-L1 mRNA ve protein üretimini arttırdığı gösterilmiştir (Tao ve ark. 2017). Ayrıca, PD-L1 geninin 3'-UTR bölgesindeki anormal varyasyonlar T hücreli löseminin (ATL), mide adenokarsinomunun ve Diffüz büyük B hücreli lenfomanın (DLBCL) tamamında PD-L1 ekspresyonunun artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Şekil 2.5) (Shen ve ark. 2019).



Şekil. 2.5. Kanser hücrelerinde PD-L1 ifadesini yukarı ve aşağı yönde düzenleyen mekanizmalar (Hudson ve ark. 2020).

Çeşitli epigenetik mekanizmalar da PD-L1 ekspresyonunun kontrolünde rol oynamaktadır. Yang ve arkadaşları (2014), hipometile edici ilaç kullanımının, hastalarda ilk tedaviye karşı direnç ile ilişkili olarak PD-L1 protein seviyesini yükselttiğini belirtmiştir. Ayrıca PD-L1 metilasyonu, çeşitli kanserlerde bir biyobelirteç olarak değerlendirilebilir. PD-L1 promotorunun hipometilasyonu, mRNA ve protein ekspresyonu artırmaktadır (Mu ve ark. 2018). Histon deasetilaz

(HDAC) inhibitörleri, potansiyel antikanser ilaçları olarak değerlendirilmektedir. Melanomada, sınıf I histon deasetilaz olan HDAC8'in inhibe edilmesi, PD-L1 promotorunun aktivitesini artırarak PD-L1 ekspresyonunda artışa neden olmuştur (Wang ve ark. 2018). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar pankreas kanserinde CD274 promotor bölgesinde histon metilasyonunun (H3K4me3) yaygın olduğunu ortaya koymuştur. Pankreas kanseri hücrelerinde H3K4me3'ü önemli ölçüde azaltan MLL1'in susturulması ise PD-L1 mRNA seviyesini azaltmıştır (Lu ve ark. 2017).

PD-L1 ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan diğer bir epigenetik mekanizma, mikroRNA (miRNA)'ların etkinliğidir. Örneğin; miR-3127-5p, miR-135, miR-20b, miR-21, miR-130b ve miR-142-5P gibi miRNA'lar, PD-L1 ekspresyonunu pozitif yönde; miR200, miR-34a ve miR-140 gibi miRNA'lar ise negatif yönde düzenlemektedir (Shen ve ark. 2019; Skafi ve ark. 2020). Mide kanseri hücre hatlarında miR-152'nin aşırı ekspresyonu, PD-L1 seviyelerinde önemli bir düşüşe neden olurken, T hücre aktivitesini artırmıştır (Wang ve ark. 2017). Sirküler RNA ve PD-1/PD-L1 ilişkisine odaklanan bir çalışma da; circ 0000284'ün NSCLC'de, miR-377-3'ün rekabetçi endojen RNA'sı olarak PD-L1 ekspresyonunu dolaylı olarak etkilediğini göstermiştir (Li ve ark. 2020). KRK hücreleri ile gerçekleştirilen başka bir araştırma ise, sirküler RNA hsa_circ_0020397'nin miR-138 aktivitesini bloke ederek PD-L1 ifadesini artırdığını ortaya koymuştur (Zhang ve ark. 2017).

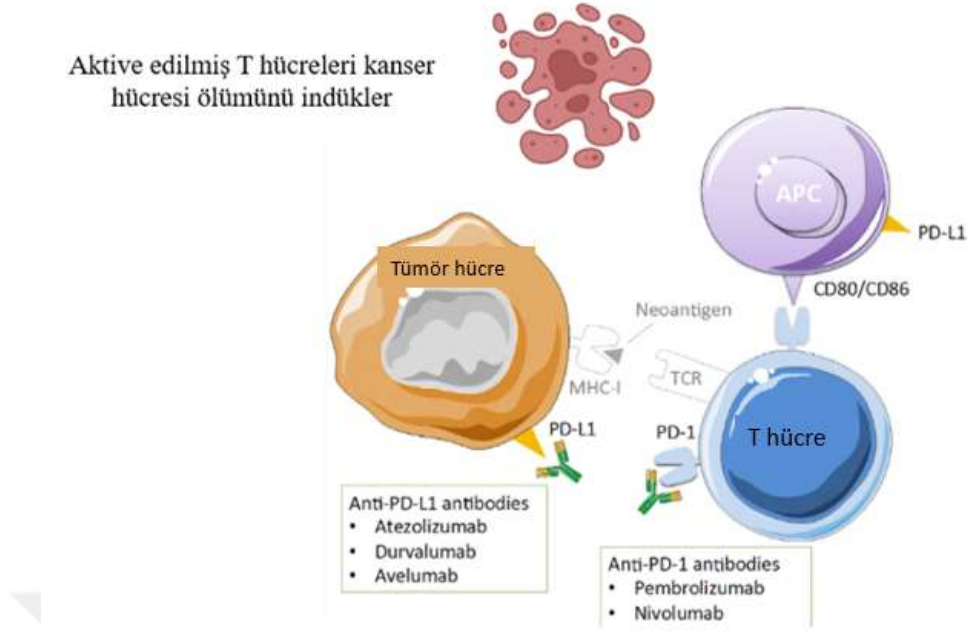
Virüs ve bakteriyel enfeksiyonlar ise PD-L1 ekspresyonunu kontrol eden dış faktörlerdir. Patojenle ilişkili moleküler paternler (PAMP'ler), IFN- γ , IFN-a, IFN-p, TNF-a, EGF, IL-17, IL-4 ve IL-27 gibi molekülleri provoke eden Toll Benzeri Reseptörleri aktive etmektedir (Hudson ve ark. 2020). Ayrıca hipoksinin de, tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunu önemli ölçüde artıran dış faktörlerden biri olduğu tespit edilmiştir. Hipoksik koşullarda HIF-1 α , PD-L1 promotoruna doğrudan bağlanarak PD-L1'nin aşırı ekspresyonuna ve immün kaçışa yol açmaktadır (Cubillos-Zapata ve ark. 2017). Bu nedenle, kanserde PD-L1 ile ilişkili olarak Hif-1 α 'nın hedeflenmesinin de bir terapötik yaklaşım olabileceği düşünülmektedir (Shurin ve Umansky 2022).

Onkogenik aktivasyon gibi içsel faktörler de PD-L1 ekspresyonunu farklı derecelerde etkileyebilmektedir. EGFR, EML4-ALK, JAK/STAT, RAS/ERK veya

PI3K/AKT/MTOR gibi onkojenik sinyal yollarının tümöral PD-L1 ekspresyonunu RF-1, STAT3, STAT1, c-Jun, HIFs veya NF-B gibi transkripsiyon faktörleri (TF) aracılığı ile düzenlediği gösterilmiştir. Bu TF'ler çekirdekte giderek PD-L1 promotorunun belirli bölgelerine bağlanmakta ve PD-L1 ekspresyonunu aktive etmektedir (Hong, 2019). Bununla beraber son araştırmalar YAP/TAZ'ın PD-L1 ekspresyonunu modüle ederek tümör bağışıklığında önemli bir rol oynadığı ortaya koymuştur. İnsan malign plevral mezotelyoma, melanom, meme ve akciğer kanseri hücrelerinde, YAP/TAZ'ın TEA domain (TEAD) transkripsiyon faktörleri ailesi aracılığıyla PD-L1 promotoru ile etkileşime girdiği ve PD-L1 transkripsiyonunun arttığı belirtilmiştir (Hong, 2019).

2.2.1. İmmunoterapötik Bir Yaklaşım Olarak, İmmün Kontrol Noktalarında PD-1/PD-L1'in Hedeflenmesi

Bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini "yabancı" olarak tanıması gerektiği gerçeğine rağmen, bağışıklık sistemi ile tümör hücreleri arasındaki etkileşimler karmaşıktır. Tolerans immün cevap ile kanser arasındaki doğal bir dengedir. Kanser hücreleri sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonunu etkileyerek bağışıklık sürveyansını azaltabilmektedir, bu da antitümör bağışıklık tepkisinin niteliğini etkilemektedir (Hudson ve ark. 2020). T hücrelerinin aktivasyonu, bakteri, virüs veya tümöre özgü antijenleri tanıyan ve bunları majör histo-uyumluluk kompleksi ile sunan hücreler olan antijen sunan hücreler (APC'ler) ile başlatılır. Sonrasında, APC'ler üzerindeki B7 moleküllerine (CD80 ve CD86) bağlanan ve T hücrelerinin yüzeyinde bulunan CD28 kostimülatör sinyali T hücrelerini aktive eder (Chen, 2004). Sonuç olarak, APC'ler tümöre özgü antijenleri "yabancı" antijenler olarak algılayacak ve bunun sonucunda aktif T hücreler tümör hücrelerine saldıracaktır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Anti-PD-L1 ve anti-PD-1 inhibitörlerinin etki mekanizmaları (Rouanne ve ark. 2018) .

2.3. İnsan Mikrobiyotası

Mikrobiyota, belirli bir yerde yaşayan ekolojik bir topluktur. Lederberg ve McCray, mikropların insan sağlığı ve hastalığındaki işlevini tartışırken bu ifadeyi kullanan ilk araştırmacılar (Altveş ve ark. 2020).

İnsan mikrobiyomu üzerine yapılan araştırmalara göre, insan vücudu 2000 cins ve 25 filuma ait 5000'den fazla mikrop türüne ev sahipliği yapmaktadır. Bu da toplam 316 milyon mikrobiom genine tekabül etmektedir (Thomas & Segata 2019) . Tahminlere göre, insan sindirim sistemi tek başına 9 milyon bakteri kökenli gene sahiptir. İnsan bağırsağı mikrobiyomunun Gen Kataloğu (IGC) ve EggNOG veri tabanına göre, mikrobiom genlerin yaklaşık %40'ı bilinmemektedir veya belirsiz bir işlevi vardır (Li ve ark. 2014). İnsan mikrobiyotasının kalitatif ve kantitatif yapısı, 202 tane insan bağırsak bakteri genomunun 16S rRNA dizileri kullanılarak genomik analiz ile tahmin edilmiştir (Thomas & Segata 2019).

Tüm bakteri türlerinin yaklaşık % 65'ini oluşturan ve GI yolunda en sık kolonize olan Firmicutes türleridir. Bir sonraki en büyük filum ise %30 oranında bulunan Bacteroidetes'dir. Bunu %5 ile Proteobacteria ve Actinobacteria takip etmektedir (Altveş ve ark. 2020). Bağırsak mikrobiyomu ve onun simbiyotik bağlantısı hakkındaki bilginiz, metagenomik tekniklerin keşfedilmesi ile radikal bir

değişime uğramıştır. Farklı ve uzun vadeli diyetlerin, ortamların, yaşların ve hastalıkların bağırsak mikrobiyotasını nasıl etkilediğini anlamak, genetik yöntemler kullanılarak insan mikrobiyomunun incelenmesiyle daha kolay hale gelmiştir (Qin ve ark. 2010).

2.3.1. Bağırsak Mikrobiyotasının İmmünoterapiye Etkisi

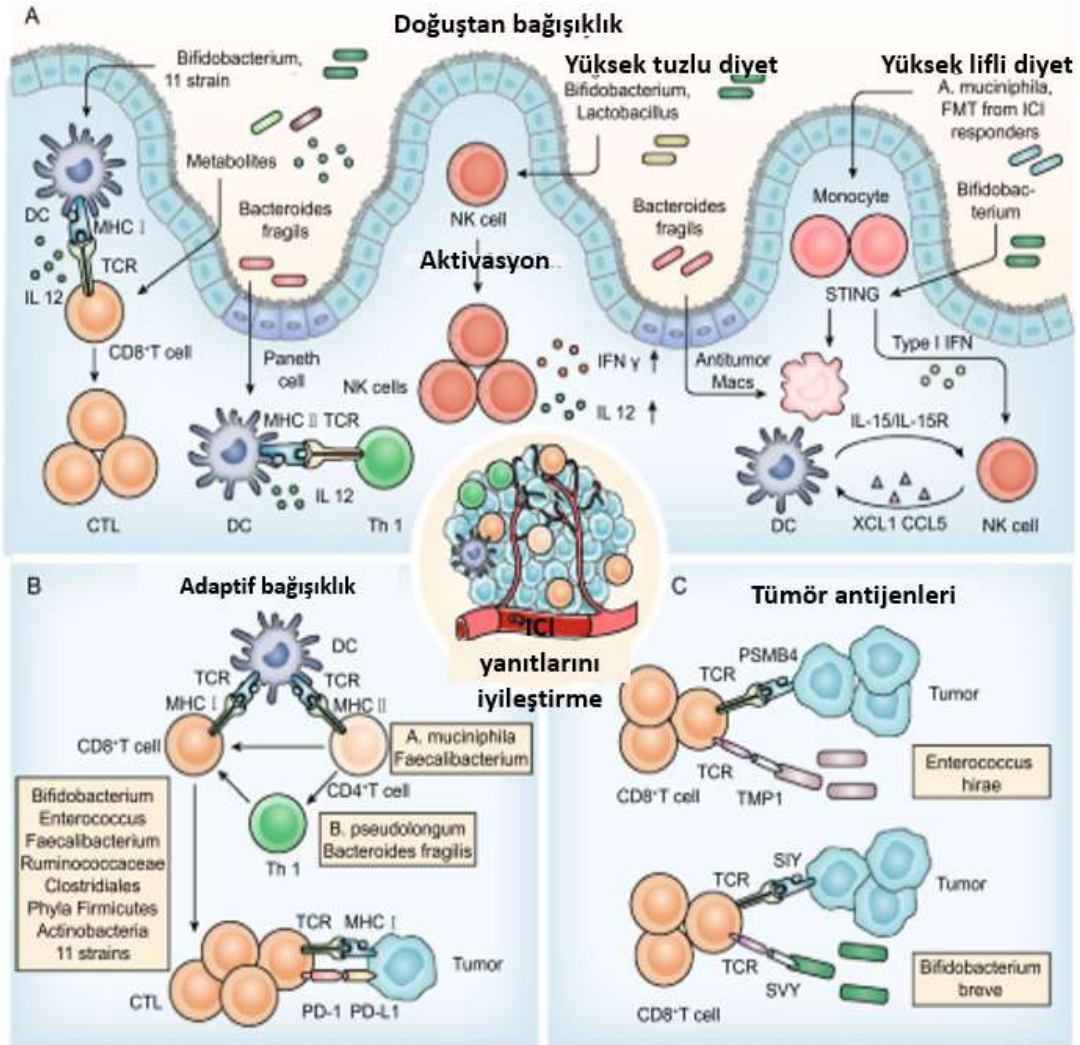
Bağırsak mikrobiyotasının bağışıklık sistemi üzerindeki etkisi nedeniyle mikrobiyota, immünoterapi de dahil olmak üzere farklı tedavilere karşı tümör duyarlılığını etkileyen tümör ortamının kritik bir bileşenidir (Ting ve ark. 2022). Bağırsak mikrobiyomunun yapısı, PD-1/PD-L1 ve CTLA-4'e dayalı kanser immünoterapisinin terapötik etkisine katkıda bulunan antikanser immün sürveyansının etkinliği açısından oldukça önemlidir (Wu ve ark. 2021).

Jin'de ve ark (2019), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında bağırsak mikrobiyom çeşitliliği ile PD-1 inhibitör antikoru (nivolumab) etkinliği arasında pozitif bir ilişki bulmuştur. Ayrıca, solid maligniteler üzerine yapılan kapsamlı bir çalışmada, Firmicutes ve Verrucomicrobia'nın daha yaygın olduğu hastalarda ICI duyarlılığının arttığı, Proteobacteria'lı hastalarda ise olumsuz sonuçların olduğu rapor edilmiştir (Huang ve ark. 2021). Bu durum, ICI tedavisi sırasında bakterilerin iyi bir bağışıklık sinerjisti olabileceklerini göstermektedir. Örneğin, *Bifidobacterium breve*'nin KRK tedavisinde PD-1 inhibitörlerinin etkinliğini artırabileceği belirtilmiştir (Yoon ve ark. 2021). Benzer şekilde, KRK'de *Lactobacillus rhamnosus* Probio-M9'un kullanımının bağırsak mikrobiyom çeşitliliğini (FMT) düzenlediği ve Anti-PDL-1 sinerjik faktörü gibi davrandığı gösterilmiştir (Gao ve ark. 2021). Öte yandan, Davar ve arkadaşlarının (2021) ortaya koyduğu gibi, dışkı mikrobiyota nakli, ICIs direncinin üstesinden gelmek için umut vaat eden bir yöntemdir. Fekal mikrobiyota transportu ile melanom hastalarında kansere karşı bağışıklık tepkisinin geliştiği gösterilmiştir. Bu yöntemin aktifleşmiş CD8 T hücrelerini arttırdığı ve IL-8 seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir (Davar ve ark. 2021). Bununla birlikte, bağırsak bakterilerinin tümör immünoterapisini etkileme mekanizması hala bilinmemektedir ve bu konuda birçok hipotez bulunmaktadır. Sonuçta, canlı hücreler veya metabolik olarak mikrobiyom, tümörle ilişkili antijen tanımayı desteklemekte ve bağışıklık hücrelerini düzenlemektedir (Fessler ve ark. 2019). Mikrobiyomun immünoterapi etkinliğindeki rolü ile ilişkili birçok olası mekanizma önerilmiştir (Şekil 2.7).

1. Bağırsak mikrobiyotası, ICI'lerin etkinliğini artırmak için tümör mikroçevresini yeniden şekillendirir ve antitümör immün yanıtı düzenleyebilir. Melanom fare modellerinde, *Faecalibacterium*, Ruminococcaceae ve Clostridiales açısından zengin Fekal mikrobiyota transportu, doğuştan gelen efektör hücreleri geliştirmiş ve baskılayıcı miyeloid hücrelerini azaltarak PD-1 inhibitör etkinliğini artırmıştır (Lu ve ark. 2022).
2. Barsak mikrobiyotası, doğuştan gelen bağışıklığı düzenleyerek ICI yanıtlarını geliştirir. Örneğin, *Bifidobacterium* içeren oral probiyotiklerin, iyi olmayan bir bağırsak mikrobiyotasına sahip farelere verilmesi dendritik hücre aktivasyonunu sağlamış ve böylelikle tümöre özgü CD8+ T hücre tepkilerinde iyileşme gözlenmiştir. Sonuçta, anti-PD-L1 tedavisinin terapötik etkinliğinde artış sağlanmıştır. Ayrıca, *Bacteroides fragilis*, makrofaj fenotipik polarizasyonunu M1'e yönlendirerek ve hücrel CD80 ile CD86 ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyerek doğuştan gelen bağışıklığı artırmıştır. *Lactobacillus plantarum* da doğal sitotoksik reseptör (NCR) proteininin ekspresyonunu etkili bir şekilde artırmış ve doğal öldürücü hücrelerin aktivasyonunu desteklemiştir. Sonuç olarak, doğuştan gelen bağışıklık aktive edilmiştir (Lu ve ark. 2022).
3. Bağırsak mikrobiyotası, ICI'yi iyileştiren tümör hücresi immünojenitesini etkiler. Tümör immünojenitesinin azalması, tümör hücrelerinin T hücresi yıkımına direnmesinin önemli bir yoludur. Bir yandan, bağırsak mikrobiyomu doğuştan gelen immünojeniteyi artırabilir (Lu ve ark. 2022). Bağırsak mikrobiyomunda üretilen antijenler ile tümör hücreleri arasında bir miktar çapraz reaktivite vardır. Örneğin T lenfositler, kommensal bakteri *Bifidobacterium breve*'de eksprese edilen, B16 melanom hücrelerindeki neoepitop antijen SIYRYYGL (SIY) ile benzerlik gösteren ve SVYRYYGL (SVY) olarak adlandırılan bir epitopu hedeflemektedir. Sonuçta T hücresi aktivasyonu, tümör gelişimini azaltmakta ve sağkalımı artırmaktadır (Bessell ve ark. 2020).
4. ICI'lere verilen immünolojik cevaba bağırsak mikrobiyotası metabolitleri aracılık eder. İnosin, kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) anakardik asit vb. metabolitler, bağırsak mikrobiyotası ve konakçıları arasındaki ilişkiyi bulmak için incelenmiştir. *Akkermansia muciniphila* ve *Bifidobacterium pseudolongum* tarafından üretilen bir pürin metaboliti olan inosinin, ICI'nin etkinliğini arttırmak için gerekli olduğu bulunmuş ve inosinin bağışıklık hücresi aktivasyonunu desteklediği gösterilmiştir. Fareler ile oluşturulan bağırsak kanseri, mesane

kanseri ve melanom modellerinde, bağırsak mikrobiyotası metaboliti olan inozin, T hücreleri üzerindeki adenosin 2A reseptörüne etki ederek ICI etkinliğini artırmıştır (Gao ve ark. 2021). SCFA'ların konakçı bağışıklık sistemini güçlendirmede, tümör hücrelerinin büyümesini baskılamada ve apoptozu teşvik etmedeki temel rollerini kanıtlayan birçok çalışma vardır. Bu nedenle, SCFA-ICI sinerjisinin mekanizması güncel bir araştırma konusudur. Örneğin, *Faecalibaculum rodentium* PB1 ve *Haemophilus biformis* metaboliti olan butirik asit histon deasetilazı (HDAC) inhibe etmiş, asetilasyonu artırmış ve T hücrelerinin C3 nükleer faktörünün kalsinörin aracılı aktivasyonunu azaltarak tümör hücre proliferasyonunu baskılamıştır. Buna ek olarak SCFA, bağışıklık hücreleri için bir enerji sağlayıcısıdır (Lu ve ark. 2022). *Bacteroides caccae* kaynaklı *anakardik* asit, mitojenle aktive olan protein kinazları (MAPK'lar) fosforile ederek makrofajları aktive etmekte, dolayısıyla doğuştan gelen bağışıklığın da aktivasyonunda rol oynamaktadır. Anakardik asit ayrıca adaptif ve antitümör bağışıklığı değiştirmek için makrofajlar, NK hücreleri ve T lenfositler gibi tümör infiltrate edici bağışıklık hücrelerinin oluşumunu uyaran bir nötrofil hücre dışı tuzağının (NET) gelişimini de uyaramaktadır (Lu ve ark. 2022).

5. Antitümör immün yanıtları, peptidoglikan (PG) ve polisakkarit (PSA) gibi bağırsak mikrobiyotası belirteçleri tarafından yönlendirilir. Bazı Enterokoklar, NlpC /p60 peptidoglikan hidrolaz SagA'nın ortologlarını eksprese ederek ve salgılayarak immün aktif muropeptidler üretmektedir ve SagA ekspresyonu, immünoterapi yanıtını arttırmak için yeterlidir (Griffin ve ark. 2021). *Leuconostoc mesenteroides* suşu NTM048 veya *Bacteroides fragilis* tarafından üretilen PSA ayrıca, mukozal bariyeri güçlendiren ve sistemik bağışıklık tepkilerini etkileyen bir bağışıklık uyarıcı olarak işlev görür. PSA, ince bağırsakta dendritik hücreler ve aktive edilmiş CD4 T hücreleri tarafından tanımlanır ve sitokin üretilmesine, T hücre proliferasyonunu artırmalarına, Th1/Th2 hücre dengesini güçlendirmelerine ve lenfoid doku büyümesini teşvik etmelerine neden olur (Lu ve ark. 2020).



Şekil 2.7. Bağırsak mikrobiyomu doğuştan gelen bağışıklığı, uyarlanabilir bağışıklığı ve tümör antijenlerini değiştirir. A) Doğuştan bağışıklık; CD8⁺ T hücreleri ve Th1 hücreleri, *Bifidobacterium*, metabolitleri ve *Bacteroides fragilis* tarafından kolaylaştırılan DC'lerin olgunlaşması veya aktivasyonunun bir sonucu olarak daha sonra aktive edilir. *Lactobacillus plantarum*, NK hücrelerinin aktivasyonunu destekler. Yüksek tuzlu bir diyet, antikanser bağışıklığını desteklemek için NK hücre aktivasyonunu artırır. Monosit-IFN-I-NK-hücre-DC kaskadı, yüksek lifli bir diyetle beslenerek tetiklenebilir. *Bacteroides fragilis*, makrofaj fenotipinin M1'e polarizasyonuna neden olur. B) Adaptif bağışıklık; Phyla Firmicutes ve Actinobacteria, ICI yanıt verenlerin periferik kanındaki CD56⁺CD8⁺ T hücrelerinin aktivasyonunu iyileştirir ve sistemik dolaşımdaki efektör IFN⁺CD8⁺ T hücrelerinin oranını artırır. *Faecalibacterium* iken, *Bifidobacterium*, tümör dokularında CD8⁺ T hücre sızıntılarını destekler. *Faecalibacterium*, CD4⁺ T hücre oranını artırır. C) tümör antijeni; Antijen epitopları TMP1 ve SVY'nin yanı sıra ICI'lerin etkinliğini artıran diğer tümör çapraz antijenleri, tümör hücrelerini daha immünojenik yapan bağırsak mikrobiyotası tarafından sağlanır (Lu ve ark. 2022).

2.4. Probiyotikler

Nobel ödüllü Elie Metchnikoff, 20. yüzyılın başında probiyotik ("yaşam için" anlamına gelen) fikrini ortaya atmıştır (Wang ve ark. 2021). Probiyotiklerin modern tanımı, yeterli miktarlarda sağlandığında konakçı üzerinde bir sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar olsa da geleneksel olarak, yoğurt gibi fermente sütler, süt ürünleri ile daha yakın zamanlarda süt tozları ve peynirler de probiyotik vermek için kullanılmaktadır (Angelis & Gobbetti 2016).

Probiyotikler tek tür veya çok tür olabilir, çünkü bazı teorilere göre çeşitli probiyotik bakteriler etkileşime girmekte, rekabet etmekte ve hatta birbirlerini olumlu şekilde etkilemektedir. Bu etkileşim, her bir bakteriyi bağımsız olarak kullanmanın bazı etkiler sağlayabileceğini, ancak onları bir arada almanın daha az başarılı olabileceğini veya hiç faydalı olmayabileceğini belirterek, bakteri türleri arasındaki bağlantının terapötik ilişkisini vurgulamaktadır (Krawczyk ve ark. 2021).

Probiyotikler, GI kanalında yaşama yeteneği, tasarlandıkları konakçılardan izolasyon ve bakteriyostatik etkiye sahip maddelerin üretimi dahil olmak üzere bir dizi kriteri karşılamalıdır (Krawczyk ve ark. 2021). Gıda ve İlaç İdaresi'ne (FDA) (Medicine, 2006) göre probiyotik bakterilerin "Genellikle Güvenli Olarak Tanınması" gerekmektedir.

Bugün, literatürdeki çok sayıda çalışma, konağın bağışıklık tepkisinde bir gelişme, bazı vitaminlerin üretimi, çeşitli diyare durumlarının tedavisinde etkinlik, laktoz intoleransı semptomlarının hafifletilmesi, patojenik mikroorganizmaların rekabeti ve inhibisyonu, mikroorganizmalar ve gastrointestinal sistemdeki (GIT) antibakteriyel bileşenlerin üretimi (laktik asit, bakteriyosinler, hidrojen peroksit ve diğer antibakteriyel bileşikler gibi) (Łagowska ve ark. 2022) dahil olmak üzere probiyotik kültürlerin birçok avantajını özetlemektedir. Bununla birlikte, probiyotik suşların vücuda fayda sağlamak için çalıştığı bu yolların birçoğu çoğunlukla bilinmiyor, belirsiz veya doğrulanmamaktadır (Paula ve ark. 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu'nun 2020/2753 karar sayılı onayı alınarak (EK.1) Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarları ile Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Kit-Argem'de gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın gereç ve yöntem kısmı, mikrobiyolojik çalışmalar ile hücre kültürü ve moleküler çalışmalar olmak üzere iki başlık altında toplanmıştır. Mikrobiyolojik çalışmalar probiyotik bakteri izolasyonu, tanımlanması ve bakterinin hücre kültürü deneylerine hazırlanmasını içermektedir. Hücre kültürü ve moleküler çalışmalar ise hücre proliferasyonu, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR), western blot ve ELISA analizlerini kapsamaktadır.

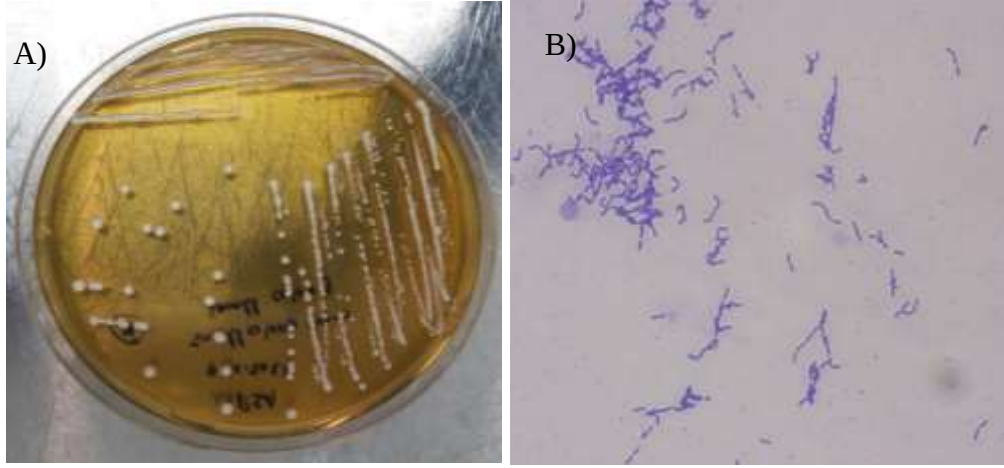
3.1. Mikrobiyolojik Çalışmalar

3.1.1. Probiyotik Bakterilerin İzolasyonu

Çalışmada kullanılacak probiyotik bakteriler, mevcut literatür göz önüne alınarak *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus licheniformis* olarak belirlenmiştir (Parvez ve ark. 2006; Lee ve ark. 2019).

L. rhamnosus izolasyonu

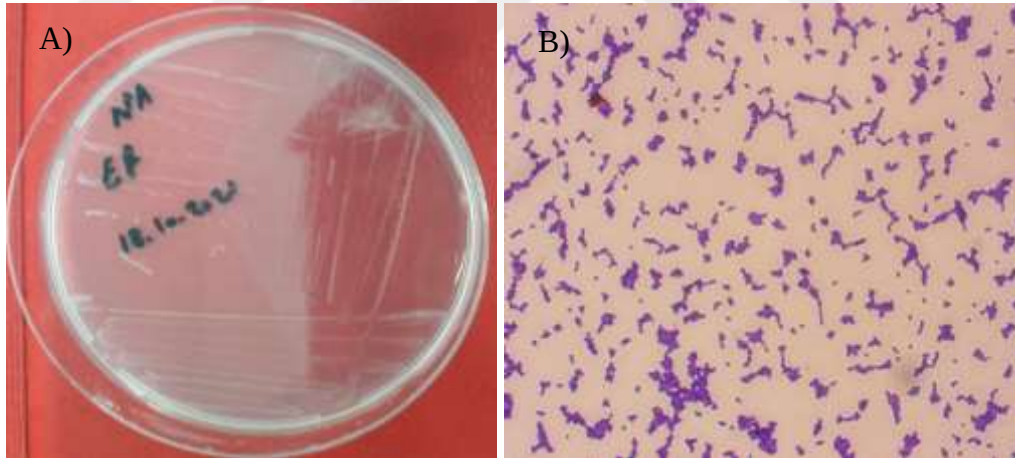
L. rhamnosus izolasyonu için, içerisinde *E. faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* suşları bulunan NBL Probiyotik GOLD ®'den 0.1 gr tartılmış ve 10 ml De Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. Anaerobik koşullarda 37 °C'de 48 saat inkübasyonun ardından 10^{-1} - 10^{-7} dilüsyonları yapılmış ve tek koloni elde etmek için MRS agara ekilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *L. rhamnosus* A) MRSA'da koloni görüntüsü B) Gram boyama görüntüsü 100X

***E. faecium* izolasyonu**

E. faecium izolasyonu için NBL Probiyotik GOLD[®]'dan 0.1 gr tartılarak 10 ml hacmindeki MRS sıvı besiyerine ekim yapılmış ve anaerobik koşullar altında 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 10^{-1} - 10^{-7} dilüsyonları tek koloni elde etmek için Nutrient agar (NA)'a ekilmiştir (Şekil 3.2).

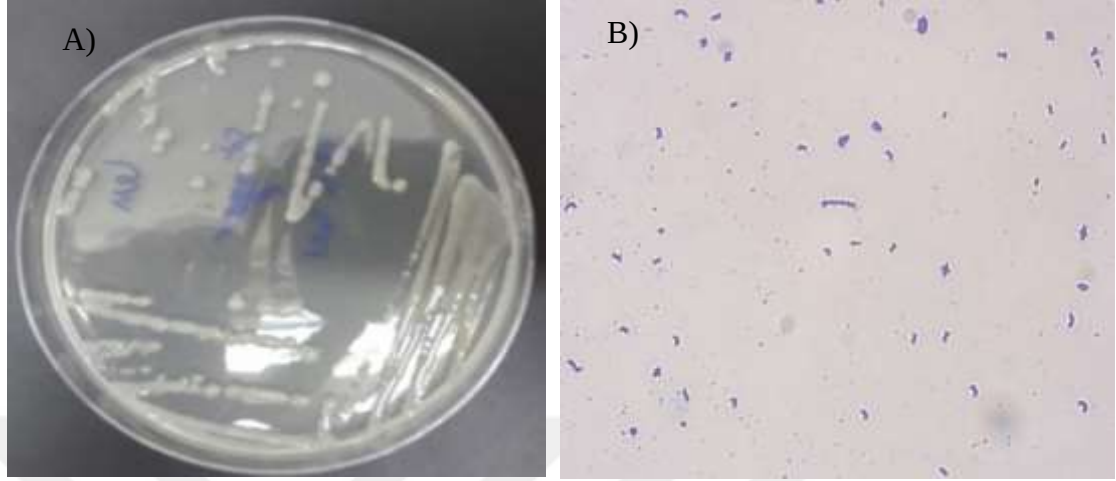


Şekil 3.2 *E. faecium* A) NA'da koloni görüntüsü B) Gram boyama görüntüsü 100X

***L. mesenteroides* izolasyonu**

L. mesenteroides izolasyonu için *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *L. mesenteroides*, *Lactobacillus delbrueckii* spp bulgaricus, *L. acidophilus* suşlarını içeren закваска Кефир VIVO[®]'dan 0.1 gr tartılmış ve %10 sakkaroz'lu 10 ml hacmindeki tripton besi ortamına ekim yapılmıştır. 25°C'de 24-48 saat inkübasyonun ardından kültür ortamından 1 ml alınarak, agar eklenmiş ve 1 litresinde 100 gr sakkaroz, 2.5 gr maya özütü, 5 gr K₂HPO₄, 0.5 gr (NH₄)₂ SO₄, 0.2

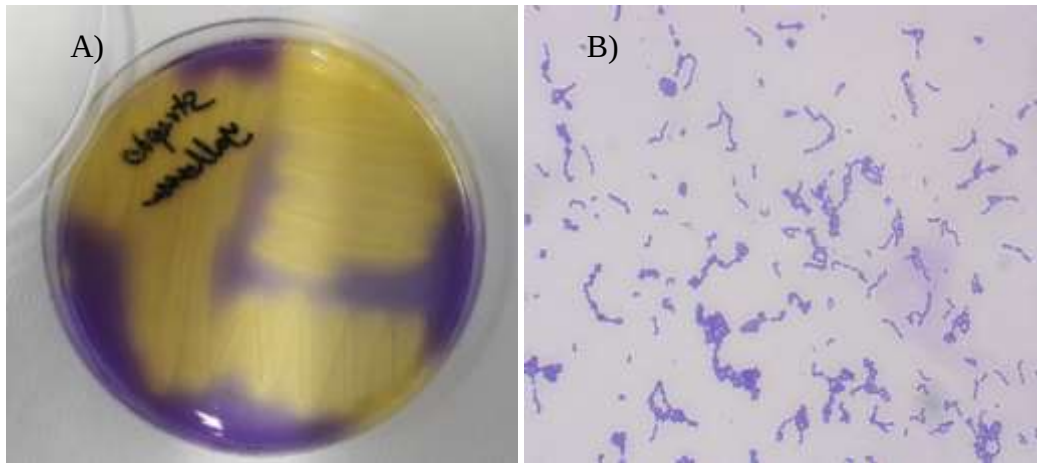
gr MgSO₄ x7H₂O ve 0.6 gr NaCl bulunan seçici besiyerine (pH: 6,8) ekim yapılmıştır (Dimic, 2006).



Şekil 3.3. *L. mesenteroides* A) *L. mesenteroides* ortamında koloni görüntüsü B) Gram boyama görüntüsü 100X

***S. thermophilus* izolasyonu**

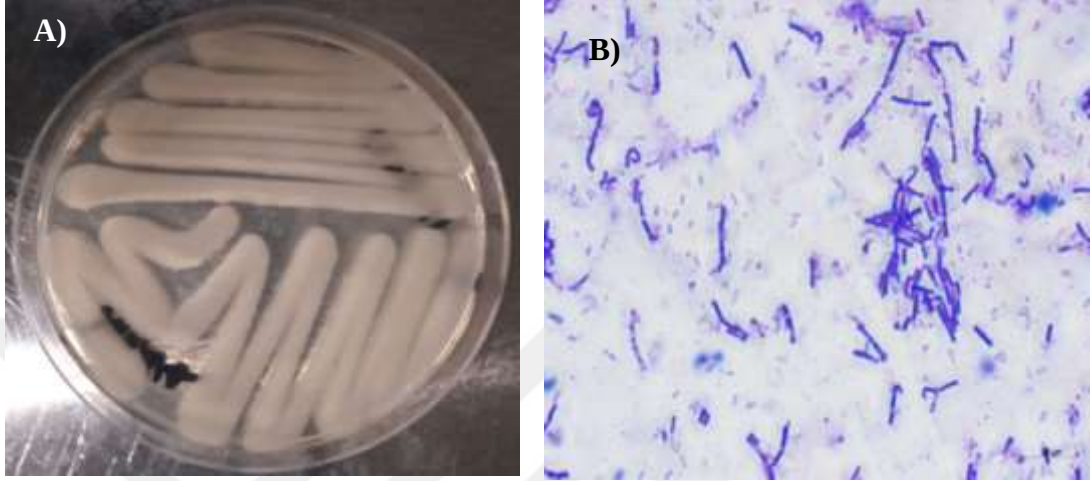
S. thermophilus izolasyonu için Torku[®] yoğurt numunesi kullanılmış ve 1 ml numune örneği %0,85 NaCl ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş örnekten 0.1 ml alınarak HIMEDIA[®] (*S. thermophilus* İzolasyon Agarı)'dan modifiye edilmiş, 1 litresinde 10gr sakkaroz, 5gr maya özü, 2gr K₂HPO₄, 10 gr Tripton, 6 ml % 0,5'lik bromokresol mor ve 12 gr agar içeren besiyeri ortamına (pH 6,8) ekim yapılmıştır. Ardından petriler 48°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. *Streptococcus* sp. A) *S. thermophilus* ortamında koloni görüntüsü B) Gram boyama görüntüsü 100X

B. licheniformis

B. licheniformis KGTU Mikrobiyoloji Laboratuvarı stoklarından temin edilmiştir. Bu bakteri ticari kefirde izole edilmiş ve tanımlaması önceden yapılmıştır (Şekil 3.5)



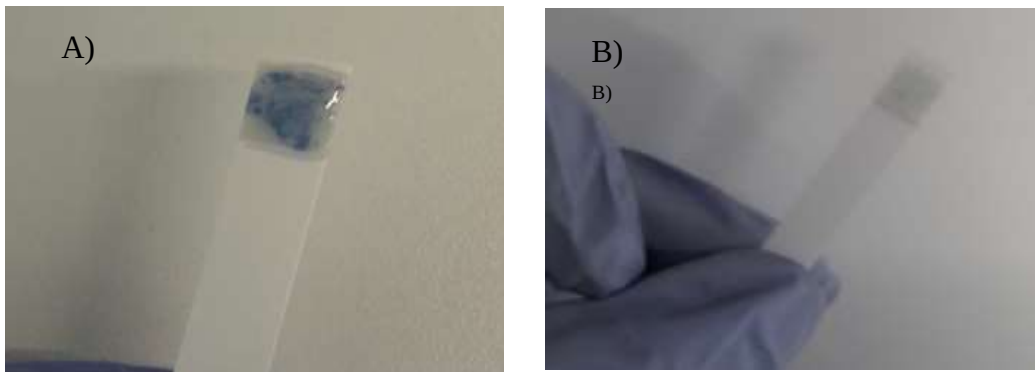
Şekil 3.5. *B. licheniformis* A) NA'da koloni görüntüsü B) Gram boyama görüntüsü100X

3.1.2. Bakterilerin Tanımlanması

Bakterilerin tanımlanması için gram boyama ve seçici besiyerlerinin kullanılmasının yanı sıra oksidaz ve katalaz testleri de yapılmıştır. Bununla beraber bakteriler moleküler düzeyde 16S rRNA'larına göre tanımlanmıştır.

Oksidaz Testi

Bakteride sitokrom tespiti için kullanılan bu test, Bactident ® Oxidaes (Merck, KGaA, 64271) ile gerçekleştirilmiştir. İndikatör kağıdında beyazdan maviye renk değişimi oksidaz pozitif olarak tanımlanmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. A) Oksidaz pozitif

B) Oksidaz negatif

Katalaz Testi

Katalaz, H_2O_2 'nin oksijen ve suya parçalanmasını sağlamaktadır. Bu test için, tek ve saf bir koloni, lam üzerindeki bir damla %3'lük H_2O_2 ile karıştırılmıştır. Oksijenin oluşumu (5-10 saniye içinde), kabarcıklanma ile kendini göstermekte ve bu pozitif bir sonuç olarak değerlendirilmektedir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. A) Katalaz pozitif

B) Katalaz negative

Bakterilerin Moleküler Düzeyde Tanımlanması

Bakterilerin moleküler düzeyde tanımlanması 16S rRNA'larına göre yapılmıştır. Bunun için öncelikle bakterilerden fenol kloroform yöntemi kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla her bir bakteri için tek bir koloni alınmış ve uygun sıvı besiyerlerinde 24 saat süresince inkübe edilmiştir. Ardından kültür ortamından 1,5 ml alınarak 8000 rpm'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırılmış ve pellet üzerine 467 µl Tris-EDTA (TE; pH=8), 30 µl SDS, 3 µl proteinaz K eklenmiştir. 60 °C'de 3 saat inkübasyonun ardından üzerlerine 500 µl fenol-kloroform ilave edilmiş ve örnekler 8000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası supernatant yeni bir eppendorf tüpe aktarılmış ve üzerine 500 µl kloroform- izoamilalkol (CI 24:1) eklenmiştir. 8000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüjden sonra supernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır. Ardından DNA'yı çöktürmek için tüp içerisine 50 µl 3M sodyum asetat (pH=4) ve 1 ml %100'lük etanol eklenmiştir. 5000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırılmış ve pellet 1 ml %70 etanol ile yıkanmıştır. Tekrar 5000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de gerçekleştirilen santrifüj işleminin ardından supernatant uzaklaştırılmış ve kurutulan pellet 100 µl nükleaz içermeyen su ile çözdürülmüştür. İzole edilen DNA'ların kalitesi ve miktarı nanodrop

(MaestroNano®) cihazında ölçülmüştür. A260/A280'da 1.8 ve A260/A230'da 1.8±0.1 olan DNA örnekleri çalışmada kullanılmıştır. DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile 16S rRNA Bölgesinin Çoğaltılması

Bakteri türlerinin tanımlamasında mutasyon oranının düşük olduğu bilinen 16S rRNA bölgesi (1500 bp) yaygın olarak kullanılmaktadır (Janda & Abbott, 2007). Bu çalışmada da izole edilen bakterilerin tanımlanması 16S rRNA bölgelerine göre yapılmıştır. Bu amaçla, bakterilerden izole edilen DNA'lar ile 16S rRNA bölgesine yönelik hedef primerler kullanılarak PZR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PZR için kullanılan primer ile PZR bileşenleri Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de sunulmuştur. Uygun PZR bileşenleri ve hedef primerler kullanılarak PZR amplifikasyonu 95°C'de 10 dk ön denatürasyon ile 95°C'de 45 saniye, 57°C'de 45 saniye ve 72°C'de 1,15 dakikadan oluşan 35 döngü şeklinde gerçekleştirilmiştir. PZR sonrası çoğaltılan bölgeler sekanslanmıştır. Ardından diziler NCBI rRNA veri tabanı ile (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) karşılaştırılmıştır.

Tablo 3.1. 16s rRNA amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri

Primer dizisi	Uzunluk (bp)
İleri primer (008F) 5' -AGAGTTTGATCMTGGC-3'	1387bp
Geri primer (1387r) 5'-GGGCGGWTGTACAAGRC-3'	

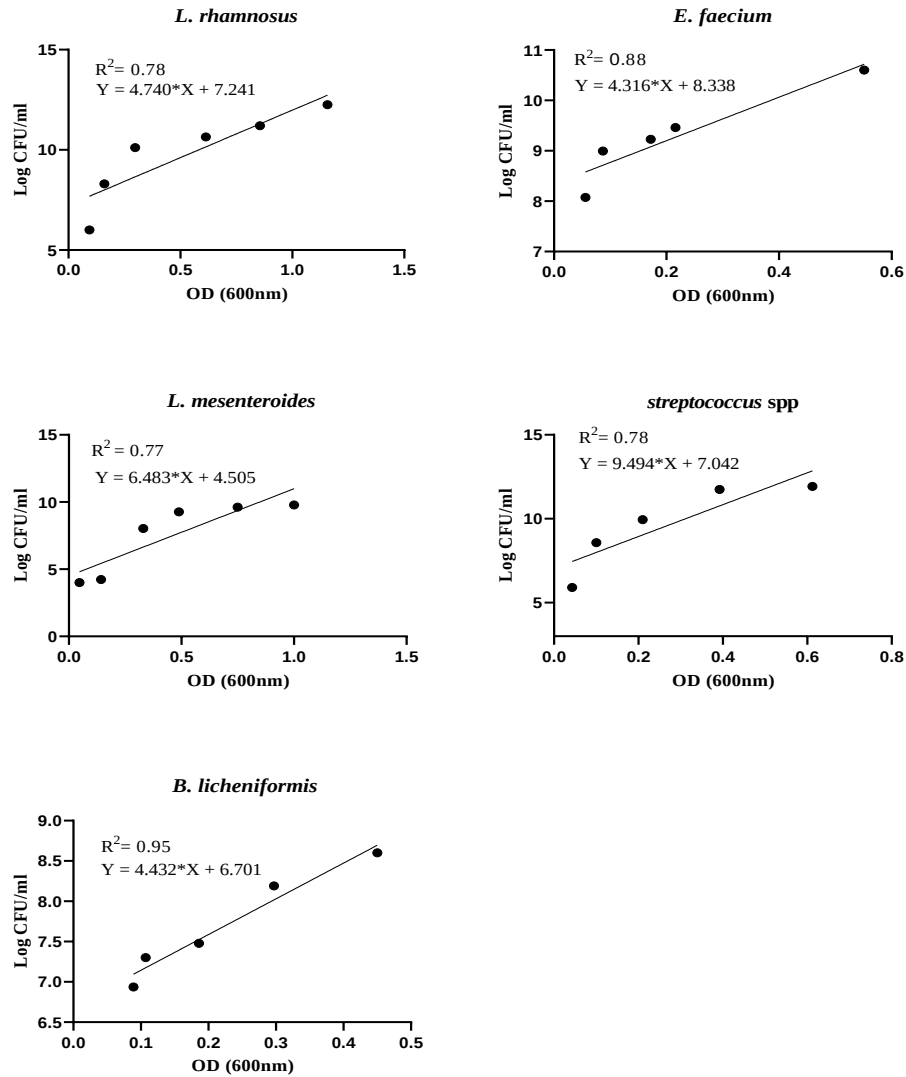
Tablo 3.2. PZR bileşenleri

PZR bileşeni	Miktar (µl)
dH ₂ O	26,6 µl
İleri Astar	0,2 µl
Ters Astar	0,2 µl
Polimeraz enzimi	2 µl
dNTP	2 µl
MgCl ₂	4 µl
Tampon	5 µl
DNA	1 (1 µl= 20 ng)
Toplam hacim	50 µl

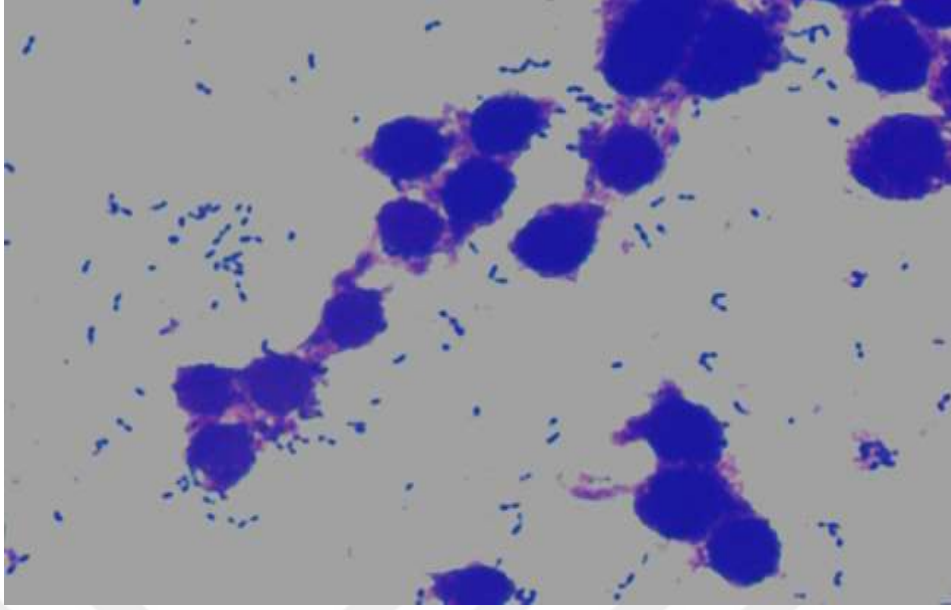
3.1.3. Bakterilerin Hücre Kültürü Deneyleri için Hazırlanması

Çalışma kapsamında kolon kanseri hücreleri canlı bakteri hücreleri, ısı ile öldürülmüş bakteri hücreleri ve hücre içermeyen bakteri supernatantları ile muamele edilmiştir.

Kolon kanseri hücrelerinin canlı bakteriler ile muamelesi için, uygun sıvı besiyeri ortamında 37°C'de kültüre edilen bakterilerden 1ml alınmış ve 4500 rpm'de 10 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edilerek toplanmıştır. Santrifüj sonrası pellet PBS ile bir kez yıkanmış ardından OD ölçümü için PBS ile çözdürülmüştür. Bakteri sayısı (CFU/ml), seri seyreltmelerin uygun agar ortamı üzerinde oluşturdukları kolonilerin sayılması ile belirlenmiştir. Bakteriye optik yoğunluk (OD) ile CFU/ml arasındaki ilişki ise şekil 3.10'de bakteri standart eğrisi olarak sunulmuştur (Tiptiri-Kourpeti ve ark. 2016). Buna göre 10^6 , 10^7 , 10^8 ve 10^9 CFU/hücre kolon kanseri hücreleri için büyüme ortamı olan antibiyotiksiz yüksek glikozlu Dulbecco'nun Modifiye Eagle besiyerinde (DMEM) besiyerine ilave edilerek kanser hücrelerine uygulanmıştır (Şekil 3.9) (Guo ve ark. 2020)



Şekil 3.8. Bakteriye optik yoğunluk (OD) ile CFU/ml arasındaki ilişkiyi gösteren standart eğri grafikleri



Şekil 3.9. Kristal viyole ile boyanmış bakteri ve Caco-2 kolon kanseri hücreleri ile oluşturulmuş kokültür

Kolon kanseri hücrelerinin ısı ile öldürülmüş bakteriler ile muamele edilmesi için uygun sıvı besiyeri ortamında 37°C'de kültüre edilen bakteriler 4500 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Pellet iki kez PBS ile yıkanmış ve tekrar PBS içinde çözündürülerek 1 saat 95°C'de bekletilmiştir (Aliabadi ve ark. 2014). Bakterilerin ısı ile öldüğünü doğrulamak için uygun besi ortamlarına tekrar ekim yapılmış, çoğalmanın olmaması halinde pellet dondurularak kurutulmuştur (Karimi Ardestani ve ark. 2019). Buna göre kolon kanseri hücreleri 0.25, 0.5, 1 ve 2 mg/ml konsantrasyonlarında ısı ile öldürülmüş bakteriler ile muamele edilmiştir.

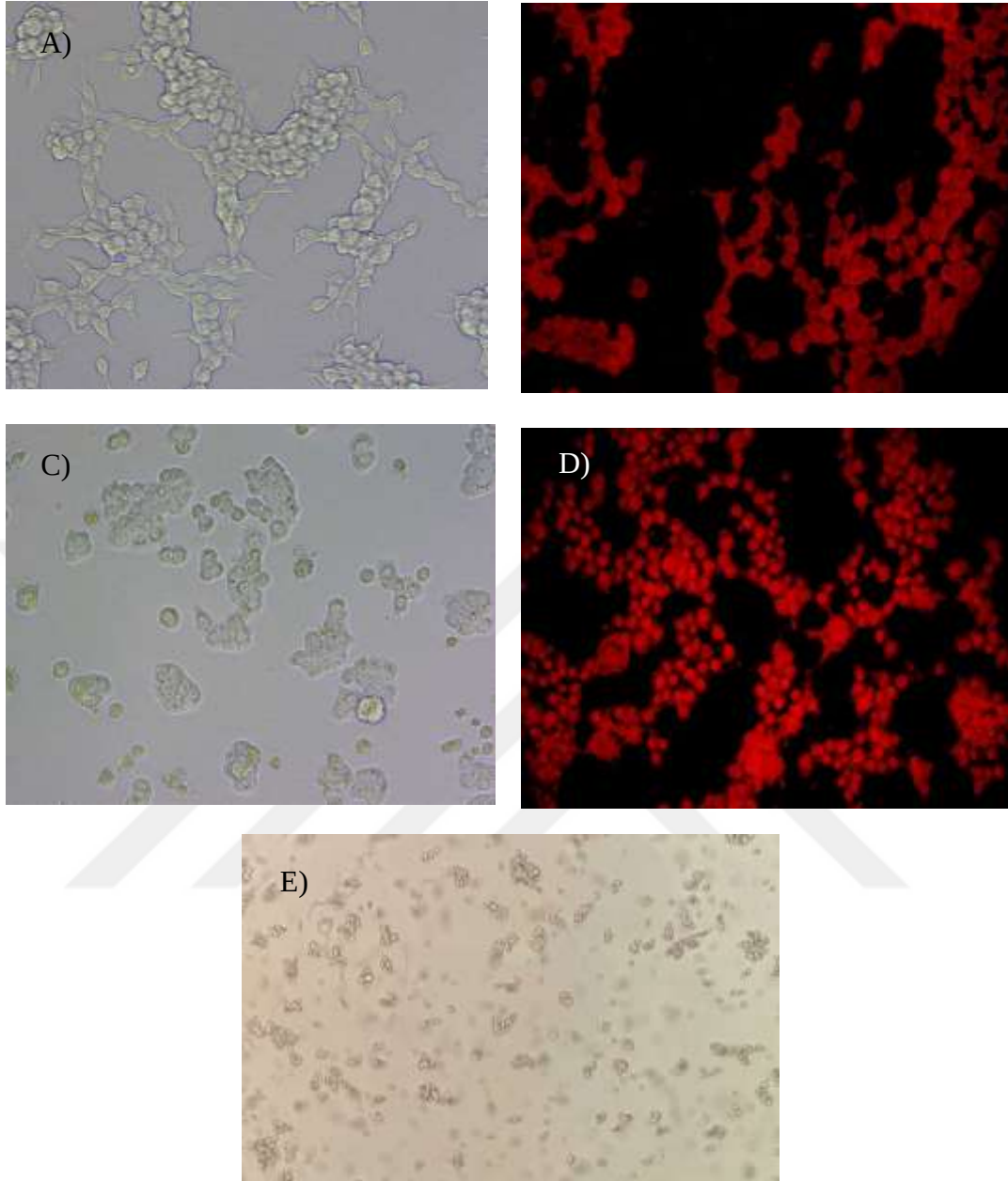
Kolon kanseri hücrelerinin hücre içermeyen bakteri supernatantları ile muamele edilmesi için uygun sıvı besiyeri ortamında 37°C'de kültüre edilen bakteriler 4500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası supernatant 0.22 µm'lik bir bakteri filtresi kullanılarak süzölmüştür. Ardından pH'ı NaOH kullanılarak 7±0.2'ye ayarlamıştır. Hücresiz süpernatant dondurarak kurutmaya tabi tutulmuştur (Aliabadi ve ark. 2014). Kolon kanseri hücreleri 12,5, 25, 50 ve 100 mg/ml konsantrasyonlarında hücre içermeyen bakteri supernatantları ile muamele edilmiştir.

3.2. Hücre Kültürü ve Moleküler Çalışmalar

3.2.1. Hücre kültürü

Bu çalışmada laboratuvar bünyemizde bulunan Caco-2 (ATCC[®] HTB-37[™]) ve HT-29 (ATCC[®] HTB-38[™]) insan kolon kanseri hücre hatları ile Jurkat, Clone E6-1 (ATCC[®] TIB-152[™]) insan T lenfoblast hücre hattı olmak üzere üç hücre hattı kullanılmıştır. Caco-2 hücreleri (Şekil 3.10), kolorektal kanserli 72 yaşındaki beyaz bir erkeğin kolon dokusundan elde edilmiştir (<https://www.atcc.org/products/htb-37>). HT-29 (Şekil 3.12), kolorektal adenokarsinomu olan 44 yaşındaki beyaz bir kadın hastadan toplanan bir primer tümörden türetilen epitel hücre dizisidir (<https://www.atcc.org/products/htb-38>). Jurkat hücre hattının bir türevi olan Jurkat-FHCRC Klon E6-1 (Şekil 3.12), akut T hücreli lösemili 14 yaşındaki bir erkek hastanın periferik kanından üretilmiştir. Bu hücre dizisi, bağışıklık sistemi bozuklukları, immünoloji ve immün-onkoloji üzerine yapılan çalışmalarda kullanılabilmektedir (<https://www.atcc.org/products/tib-152>).

Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücre hatları, %10 Fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren (DMEM) kültüre edilmiştir. Jurkat T hücrelerinin kültüre edilmesinde %5 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 besiyeri kullanılmıştır. Tüm hücreler 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 nem ortamında çoğaltılmıştır.



Şekil 3.10. Tezde kullandığımız hücrelerin görüntüsü. A) Caco-2 inverted mikroskop (20X) B) Caco-2 floresan mikroskop görüntüsü. C) HT-29 inverted mikroskop (20X). D) HT-29 floresan mikroskop görüntüsü. E) Jurkat T hücre inverted mikroskop (10X) (Floresan mikroskop görüntüsü için %100 etanol ile fikse edilmiş hücreler %0,1'lik kristal viyole boyası ile boyanmıştır).

3.2.2. XTT Testi Kullanılarak Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Canlı bakteriler, ısı ile öldürülmüş bakteriler ve hücre içermeyen bakteri supernatantlarının kolon kanseri hücre canlılığı üzerine etkisi XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid) analizi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde canlı hücreler, XTT'yi turuncu renkli formazan kristallerine dönüştürür. Formazan kristallerinin oluşumu, doğrudan metabolik olarak

aktive olan hücrelerle ilgilidir ve formazanın oluşumu belirli dalga boylarında bir spektrofotometre kullanılarak ölçülebilmektedir.

XTT analizi için 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş (2×10^3 hücre/kuyucuk) Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücreleri değişen konsantrasyonlarda canlı bakteri (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/ml), ısı ile öldürülmüş bakteri (0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml) ve hücre içermeyen bakteri supernatantları (12.5, 25, 50, 100 mg/ml) ile 24 saat süresince 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası üretici firmanın talimatları doğrultusunda (Biological Industries, 20-300-100) her kuyucuğa XTT reaktifi eklenmiş ve 4 saat sonra ELISA cihazında (BioTek Epoch) 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında absorbans değerleri belirlenmiştir. % Hücre canlılığı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Hücre canlılığı} = (\text{Örnek absorbans değeri}) / (\text{Kontrol absorbans değeri}) \times 100$$

3.2.3. Adhezyon Testi

Canlı bakterilerin Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerine yapışma oranlarını belirlemek için adhezyon testi gerçekleştirilmiştir. Bunun için 96 kuyucuklu plakalara ekimi yapılmış (4000 hücre/kuyu) kolon kanseri hücrelerine 10^6 , 10^7 , 10^8 ve 10^9 CFU/ml konsantrasyonlarında canlı bakteri uygulanmıştır. 2 saat inkübasyonun ardından PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve kuyulara 100 µl %5’lik TritonX-100 ilave edilmiştir. Ardından oluşan hücre lizatları alınmış ve NaCl ile dilüe edilerek uygun besiyeri ortamına ekimi gerçekleştirilmiştir (Guo ve ark. 2020). % Adhezyon oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Adherent bakteri} = (\text{Adherent bakteri CFU sayısı} / \text{inokulumun CFU sayısı}) \times 100 \text{ (Letourneau ve ark. 2011).}$$

3.2.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi

Sitotoksosite analizi sonuçları göz önüne alınarak devam eden analizlerde hücrelerin 10^6 CFU/ml canlı bakteri ile muamele edilmesine karar verilmiştir. Uygun inkübasyon süresi, her iki hücre hattındaki PD-L1 mRNA seviyesine göre belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada *in vivo* ortamı taklit etmek için, tümör dokularında PD-L1 ekspresyonunu artıran ve ekspresyonu, IBD gibi kronik inflamatuvar hastalıklarda yükselen IFN- γ (Stem cell, 78141) da hücrelere uygulanmış

(10 ve 50 ng/ml) ve uygun dozun belirlenmesi yine PD-L1 mRNA seviyesine göre yapılmıştır (Lee ve ark. 2021). Ayrıca; apoptoz ve PD-L1 ile ilişkili çeşitli yollarda görev yapan genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyeleri de araştırılmıştır. Bunun için kontrol ve doz grubu hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve ardından cDNA sentezi yapılmıştır. mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyeleri ise Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR) ile belirlenmiştir.

Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu için 6-kuyucuklu plakalara ekimi yapılmış hücreler (5×10^5 hücre/kuyucuk) bir kez PBS ile yıkanmış, ardından kuyulara 500 µl RiboEx (GeneAll, 301-001) eklenmiştir. Sonrasında homojenizatlar eppendorf tüplere akarılmış ve üzerlerine 100 µl kloroform eklenerek 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından supernatant yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 250 µl izopropanol ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra supernatant uzaklaştırılmış ve pelet üzerine 1 ml %70 etanol ilave edilmiştir. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 7000 rpm'de 5 dk gerçekleştirilen santrifüj işleminden sonra oluşan pellet 50 µl nükleaz içermeyen su ile çözdürülmüştür. İzole edilen RNA'ların kalitesi ve miktarı Nanodrop cihazı (Maestrogen®) ile belirlenmiştir. A260/A280 değerleri 2 ± 0.1 ve A260/A230 değerleri 2 ± 0.1 olan RNA örnekleri ile çalışılmıştır. İzole edilen RNA'lar -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Olası bir DNA kontaminasyonu önlemek için RNA örnekleri cDNA sentezi öncesinde DNase-I enzimi (Thermo Scientific, EN0521) ile muamele edilmiştir. Bunun için 2 µg RNA örneğine 2 µl DNase-I, 2 µl 10X reaksiyon tamponu ilave edilerek toplam hacim nükleaz içermeyen su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Ardından örnekler enzim aktivasyonu için 37°C 'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası enzim aktivitesini durdurmak için örnekler 50 mM EDTA'dan 2 µl eklenmiş ve örnekler 65°C 'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

cDNA Sentezi

İzole edilen total RNA'lardan cDNA, üretici firmanın (iScript™ cDNA sentez kiti, Bio-Rad, 170-8891) talimatlarına göre sentezlenmiştir. Kısaca 1 µg total RNA örneğine 5X iScript reaksiyon karışımından 4 µl, Ters Transkriptaz enziminden

1 µl eklenmiş ve toplam hacim nükleaz içermeyen su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. cDNA sentezi için örnekler 25°C'de 5 dakika, 46°C'de 20 dakika ve 95°C'de 1 dakika süreyle inkübe edilmiştir.

Primer Tasarımı ve qRT-PZR

qRT-PZR'de kullanılmak üzere hedef genlere yönelik primerler IDT Primer Quest programı ile tasarlanmıştır (<https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). Hedef genlerin mRNA dizilerine Gen Bankası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)'ndan ulaşılmıştır. Çalışma kapsamında qRT-PZR analizi ile mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiş genler ile hedef ve referans genlerine ait primer dizileri Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. qRT-PZR analizi ile ekspresyon seviyesi değerlendirilmiş genler

Gen Sembolü	Açılımı
IL-2	İnterlökin 2
IFNG	İnterferon-gama
PD-L1/CD274	Programlanmış ölüm ligandı 1
TLR2	Toll-benzeri reseptör 2
TLR3	Toll- benzeri reseptör 3
TLR4	Toll- benzeri reseptör 4
NFKB1	Nükleer faktör kappa B alt birimi 1
BECN1	Beclin-1
ATG5	Otofaji ile ilgili 5
ATG7	Otofaji ile ilgili 7
NOD 1	Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı içeren 1
NOD 2	Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı içeren 2
KART9	Caspase işe alım alanı aile üyesi 9
ATG16L1	Otofaji ile ilgili 16 beğeni 1
BCL-2	B hücreli lenfoma 2
BAX	BCL2 ile ilişkili X, apoptoz düzenleyici
Cas-3	Kaspaz 3, apoptozla ilişkili sistein peptidaz
Cas-7	Kaspaz 7, apoptozla ilişkili sistein peptidaz
CYCS	Sitokrom c
GPCR43/FFA2R	Serbest yağ asidi reseptörü 2
GPCR41/42/FFAR3	Serbest yağ asidi reseptörü 3
ERK2/ HARİTA1	Mitojenle aktive olan protein kinaz 1
ERK1	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1
YAP 1	Yes1 ilişkili transkripsiyonel düzenleyici
TAZ/ WWTR1	Transkripsiyon düzenleyici 1 içeren WW alanı
STK4/ MST1	Serin/treonin kinaz 4
MYD88	MYD88 doğuştan gelen bağışıklık sinyal iletim adaptörü
TIRAP	Adaptör proteini içeren TIR alanı
TRIF/TICAM1	Bağdaştırıcı molekül 1 içeren TIR alanı

Tablo 3.4. Primer dizileri ve amplikon uzunlukları

Gen	İleri primer (5'→3')	Geri primer (3'→5')	Amplikon
IL-2	CTCACCAGGATGCTCACATTTTA	CTCCCAGAGGTTTGAGTTCTTC	97
IFNG	ATGTCCAACGCAAAGCAAATAC	ACCTCGAAACAGCATCTGAC	104
PD-L1	GCTGAATTGGTCATCCAGAA	CAGTGCTACACCAAGGCATAA	102
TLR2	GGGCTCACAGAAGCTGTAAAA	TCTGTAGGTCACTGTGTGCTAATG	76
TLR3	CCCTGGTGGTCCCATTTATTT	CTCAACTGGGATCTCGTCAAAG	91
TLR4	TTTCAGCTCTGCCTTCACTAC	GACACCACAAACAATCACCTTTC	107
NFKB1	CACCCTGACCTTGCTTATTT	AGCTGCTTGGCGGATTAG	87
BECN1	GCAGCGGATAAGCTGAAGA	CGACCCAGCCTGAAGTTATT	99
ATG5	AGCAACTCTGGATGGGATTG	AGGTCTTTCAGTCGTGTGCTG	140
ATG7	GGATGGTGAACCTCAGTGAAT	AGTAGGAACCAATCTCCAACAC	98
SQSTM1	ATTGAGTCCCTCTCCAGAT	CGCTCCGATGTCATAGTTCTT	96
NOD 1	GACAACAACAATCTCAACGACTAC	ACCGTCAGTGATCTGGTTTAC	99
NOD 2	CTGTCTTCTCATGGATGGTGTC	TGCAGAATCAGCAGGTACATATC	100
KART9	AGGAAGATGCAGAAAGGATGG	CCTCAGTGTCGGTGTGTGTC	79
ATG16L1	CGCAGCAAAGTCTGCATAAAAG	CTCTGATCGAATGTCCCAGAAA	126
BCL-2	GTGGATGACTGAGTACCTGAAC	AGACAGCCAGGAGAAGAATCAA	125
BAX	GGAGCTGCAGAGGATGATTG	GGCCTTGAGCACCAGTTT	151
Cas-3	GAGCCATGGTGAAGAAGGAATA	TCAATGCCACAGTCCAGTTC	162
Cas-7	CGAAACGGAACAGACAAAGATG	TTAAGAGGATGCAGGCGAAG	169
CYCS	GGAGAGGATACACTGATGGAGTA	GCTGCCCTTCTTCCTTCTT	102
GPCR43	CCCTGCTCTTCTATTTCTCTTCTT	CTGCTGTGTCTTTGCCCTCT	114
GPCR41	GGGCTATATCTGCGGTGAAA	GGAGGAGGAGAAGTAGTAGACA	103
GPCR142	GAGTCGGCACTGGACTTTC	GATGAGGAAGATGCTGGCATAG	99
ERK2	GTACAGGACCTCATGGAACAG	CCTCTGAGGATCTGGTAGAGAA	97
ERK1	GCTCCTGACGGAGTATGTG	CAGATGTCGATGGACTTGGTATAG	91
YAP 1	ATGATGAACTCGGCTCTCAGG	GAGGTGGTCTTGTCTTATGGT	101
TAZ	CATATCATTCGAGGGAGCAGAG	CCTGTATCCATCTCATCCCACATT	109
STK4	KATAAGAGACCGGCCAGATT	GCGTCCACATTGCTGCATTATAG	102
MYD88	CTGTGTCTGGTCTATTGCTAGTG	TTCTTGCTCTGCAGGTAATC	115
TIRAP	GCGCTGGAGCAAAGACTAT	CAGTGCTGCCTTCCAAGTA	96
TRIF	CCACCTTCTGCGAGGATTT	CGAAGTTGAGGTGAGAGTAG	108
ACTB	AGCACGGCATCGTCACCAACT	TGGCTGGGGTGTGAAGGTCT	179
GAPDH	GTC AACGGATTGGTCTGATTG	TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG	106

qRT-PZR, çift sarmallı DNA'ya bağlanabilen ve Bio Rad CFX sistemi tarafından okunabilen BrightGreen boyası (BrightGreen 2X qPZR MasterMix) içeren qPZR mastermix ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için 2µl cDNA, 5µl BrightGreen qPZR karışımı, 5 pMol ileri primer, 5 pMol geri primer içeren ve toplam hacmi nükleaz içermeyen su ile 10 µl'ye tamamlanmış karışımlar oluşturulmuştur. Amplifikasyon, 95°C'de 10 dakika ön denatürasyonun ardından 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 60 saniye basamaklarından oluşan PZR protokolü uygulanarak 40 döngü olacak şekilde Gerçek zamanlı PZR Sistemi (Bio-Rad, CFX Connect)'nde gerçekleştirilmiştir. Her reaksiyona ait eşik döngü değerleri (Ct) kaydedilmiş ve GAPDH ve ACTB referans genleri ile normalize edilmiştir.

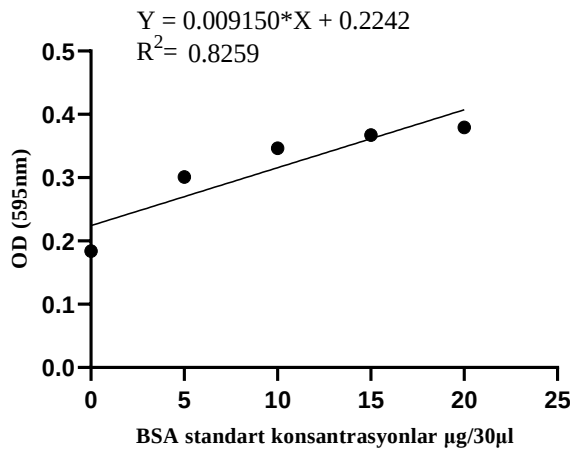
3.2.5. Western Blot Analizi

Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerinde PD-L1 proteini seviyesi western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Western blot analizi protein izolasyonu ve ölçümü, SDS-PAGE jel elektroforezi, PVDF membranına proteinlerin aktarılması, primer ve sekonder antikorlar ile muamele ve görüntüleme basamaklarından oluşmaktadır.

Protein İzolasyonu ve Miktarının Belirlenmesi

Protein izolasyonu için 6-kuyucuklu plakalara ekimi yapılmış hücreler (5×10^5 hücre/kuyucuk) iki kez PBS ile yıkanmış ve ardından kuyucuklara 10 µl proteaz inhibitör karışımı (Halt TM Protease Inhibitor Cocktail 100X, Thermo Scientific, 78410) içeren 1X RIPA lizis solüsyonundan (RIPA Bffer 10X, Cell signaling, 9806) 500 µl konmuştur. Buz üzerinde karanlık bir ortamda 10 dakika inkübasyonun ardından hücre lizatları eppendorf tüplerine aktarılmış ve +4°C'de 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası total protein içeren supernatantlar toplanmış ve yeni bir eppendorf tüplere aktarılmıştır. Proteinler -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Bunun için 2 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich, P0834-10X1ML)'den 0 µg/30 µl, 5 µg/30 µl, 10 µg/30 µl, 15 µg/30 µl ve 20 µg/30 µl olacak şekilde BSA standartları oluşturulmuştur. Miktarı belirlenecek protein örnekleri ile standartlardan 30 µl alınmış ve üzerlerine 90 µl Bradford solüsyonu (Sigma-Aldrich, B6916) ilave edilmiştir. 595 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirilmiş ve BSA standart eğri grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.11). Bu grafik kullanılarak protein örneklerinin konsantrasyonları belirlenmiştir.



Şekil 3.11. BSA standart eğri grafiği

Primer ve Sekonder Antikorlar ile Muamele ve Görüntüleme

Primer antikorlar ile muamele için, membran TBST içerisinde 1:500 oranında seyreltilerek hazırlanmış anti-PD-L (Bioss Antibodies, BS10159R) ve anti-ACTB (Bioss Antibodies, BS-0061R) primer antikorları ile +4°C'de gece boyunca

çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası TBST ile üç 10 dakika boyunca yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işleminin ardından membran sekonder antikor (Jackson Immuno Research, 211-035-109) ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. Ardından yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Görüntüleme işlemi için membran kemilüminesans solüsyonu (Bio-Rad, 1705061) ile 5 dk süresince muamele edilmiştir. Ardından membran görüntüleme sistemine (Azure Biosystems, Bioanalytical Imaging System c 280) yerleştirilmiştir.

3.2.6. PD-L1 Ekspresyonunda Görülen Artışın Fonksiyonel Analizi

Caco-2 ve HT-29 hücre hatlarının *L. mesenteroides* ile muamele edilmesinin ardından PD-L1 ekspresyonunda görülen artışın fonksiyonel analizi için kolon kanseri hücreleri ile Jurkat T hücreleri, blokaj PD-L1 antikor (Anti-Human CD274/PD-L1 Antikoru, E-AB-F11330) varlığında kokültüre edilmiştir. Kokültürün sonunda T hücreleri ile sitokin ölçümü gerçekleştirilmiş ve apoptoz analizleri yapılmıştır.

3.2.6.1. Kolon Kanser ve Jurkat T Hücrelerinin Kokültürü

Kokültür öncesi, Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücreleri T hücre ortamına uyum sağlamaları için bir hafta boyunca RPMI-1640 besiyeri ile kültüre edilmiştir. Bu aşamada T hücrelerinin de aktivasyonu sağlanmıştır. Bunun için Jurkat T hücreleri (5×10^4) 25 µl/ml anti-insan monospesifik CD3 ve CD28 (ImmunoCut TM İnsan CD3/CD28 T hücreleri Aktivatör, STEMCELL, 10971) T hücre aktivatörü ile 3 gün boyunca %5 CO₂'li ortamda 37°C'de kültüre edilmiştir.

Kokültüre hazır hale getirilen Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücreleri 6-kuyucuklu plakalara ekilmiş (2×10^4 hücre/kuyucuk) ve 24 saat inkübasyonun ardından hücreler 1×10^6 CFU/ml *L. mesenteroides*, 10 ng/ml (Caco-2 için) ve 50 ng/ml (HT-29 için) IFN-γ ile muamele edilmiştir. Bu aşamada da western blot analizinde olduğu gibi Caco-2 hücreleri *L. mesenteroides* ve 10 ng/ml IFN-γ ile 6 saat süresince muamele edilirken, HT-29 hücreleri *L. mesenteroides* ve 50 ng/ml IFN-γ ile 24 saat süresince muamele edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyerleri uzaklaştırılmış ve hücreler üretici firmanın talimatlarına uygun olarak blokaj PD-L1 antikor ile muamele edilmiştir. Bir saat inkübasyon süresinin ardından aktive edilmiş Jurkat T hücreleri kolon kanseri hücrelerine 10:1 efektör hedef oranında ilave edilmiş (2×10^5 Jurkat T hücresi, 2×10^4 kolon kanseri hücresi) ve hücreler 24

saat kokültüre edilmiştir. 24 saatin sonunda hücre ortamı toplanmış ve 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan supernatant ELISA analizinde kullanırken pellet ile apoptoz analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.2. ELISA Yöntemi ile Sitokin Miktarlarının Belirlenmesi

Jurkat T hücrelerinde IL-2 (BT LAB, E009 Hu), ve IFN- γ (BT LAB, E0105Hu) sitokinlerinin miktarı üretici firmanın talimatları doğrultusunda ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Bunun için 96-kuyucuklu plakada örnek ve standart kuyuları oluşturulmuştur. Standart kuyularına 50 μ l IL-2 veya IFN- γ standart örnekleri konmuştur, örnek kuyuları ise 40 μ l örnek ve 10 μ l anti-IL-2 (IL-2 analizi için) veya anti-IFN- γ (IFN- γ analizi için) ile hazırlanmıştır. Ardından örnek ve standart kuyularına 50 μ l streptavidin-HRP ilave edilmiştir. Plakanın üzeri kapatılmış ve 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkanmış ve kuyucuklara 50 μ l substrat solüsyonu A ve 50 μ l substrat solüsyonu B eklenmiştir. Karanlıkta 37°C'de 10 dakika inkübasyonun ardından her kuyucuğa 50 μ l durdurma solüsyonu eklenmiştir ve 10 dakika içinde 450 nm'de kuyucuklardaki absorban değerleri ölçülmüştür. Standartlar ile oluşturulan standart eğri grafikleri kullanılarak örneklerdeki IL-2 veya IFN- γ miktarları belirlenmiştir.

3.2.6.3. Akış Sitometrisi Yöntemi ile Apoptoz Tayini

Apoptoz analizi kokültür sonrasında toplanan Jurkat T hücreleri ile FITC Annexin V apoptoz kiti (BioLegend, 640922) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için santrifüj sonrası elde edilen pellet 100 μ l Annexin V tamponu ile süspanse edilmiş ve 5 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Ardından tüp içerisine 5 μ l FITC Annexin V ve 5 μ l 7-ADD boyası eklenmiştir. Karanlık ortamda 15 dakika inkübasyondan sonra tüplere 400 μ l Annexin V tamponu ilave edilmiş ve tüplerin akım sitometri cihazına (BD FACSAria™ III) yerleştirilmelerinin ardından analiz gerçekleştirilmiştir.

3.3. İstatistiksel Analiz

Gen ekspresyon sonuçlarının kantitatif analizi $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ metodu ile yapılmıştır. Gen ekspresyon ve western blot sonuçları referans gen/protein ile normalize edilerek sunulmuştur. Kontrol ve doz grupları arasındaki karşılaştırma “Student t-test”, gruplar arasındaki karşılaştırma ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak

GraphPad Prism 5® programı ile yapılmıştır. Tüm analizlerde $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

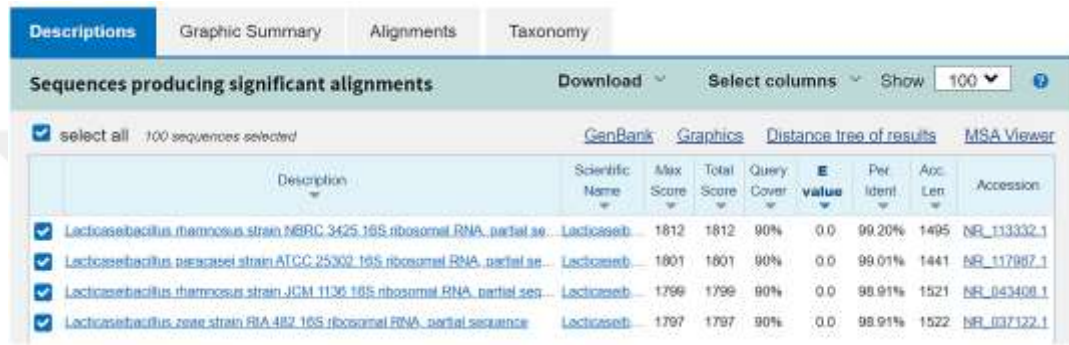


4. BULGULAR

4.1. Bakterilerin Tanımlaması

4.1.1. *L. rhamnosus*'un Tanımlanması

MRSA üzerinde üreyen beyaz kremi, yuvarlak ve orta büyüklükteki kolonilerden gram pozitif, basil pozitif, katalaz ve oksidaz testlerinin her ikisi için de negatif olanlar *Lactobacillus* spp. olarak tanımlanmıştır. 16S rRNA dizilemesi ile bu bakterilerin *L. rhamnosus* olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1).

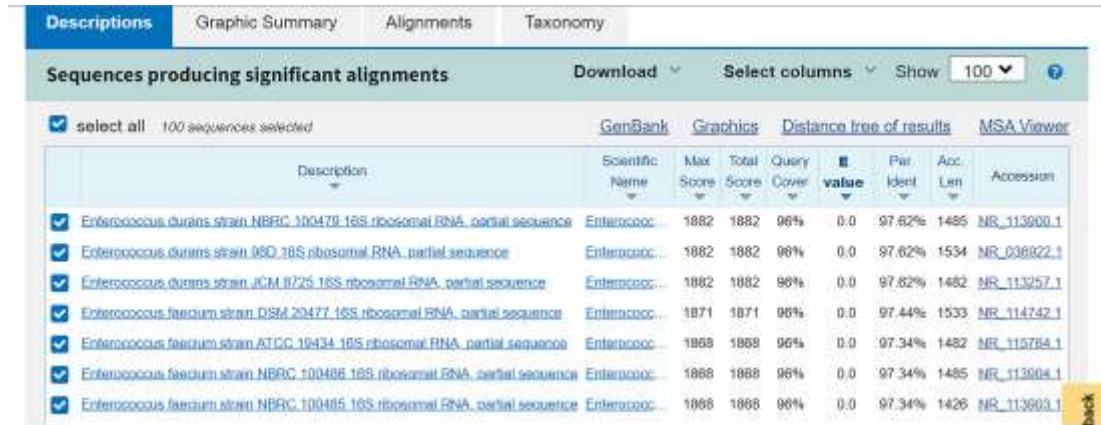


Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc Len	Accession
Lactobacillus rhamnosus strain NBRC 3425 16S ribosomal RNA, partial se...	Lactobac...	1812	1812	90%	0.0	99.20%	1495	NR_113332.1
Lactobacillus paracasei strain ATCC 25302 16S ribosomal RNA, partial se...	Lactobac...	1801	1801	90%	0.0	99.01%	1441	NR_117067.1
Lactobacillus thiamnosus strain JCM 1136 16S ribosomal RNA, partial seq...	Lactobac...	1799	1799	90%	0.0	98.91%	1521	NR_043408.1
Lactobacillus zoster strain FIA 482 16S ribosomal RNA, partial sequence	Lactobac...	1797	1797	90%	0.0	98.91%	1522	NR_037122.1

Şekil 4.1. *L. rhamnosus*'un 16S rRNA dizisi BLAST sonuçlarının ekran görüntüsü

4.1.2. *E. faecium*'un Tanımlanması

Enterococcus, MRSA üzerinde büyüme yeteneğine sahiptir. Koloni NA'da beyaz iken, MRSA'da renksiz, yuvarlak ve küçüktür. Bu bakteriler kok şeklinde olup gram pozitifdir, katalaz ve oksidaz testleri için ise negatiftir. 16S rRNA dizilemesi ile bu bakteriler *E. faecium* olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.2).



Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc Len	Accession
Enterococcus durans strain NBRC 100479 16S ribosomal RNA, partial sequence	Enterococ...	1882	1882	96%	0.0	97.62%	1485	NR_113900.1
Enterococcus durans strain 050 16S ribosomal RNA, partial sequence	Enterococ...	1882	1882	96%	0.0	97.62%	1534	NR_036822.1
Enterococcus durans strain JCM 11725 16S ribosomal RNA, partial sequence	Enterococ...	1882	1882	96%	0.0	97.62%	1482	NR_113257.1
Enterococcus faecium strain DSM 20477 16S ribosomal RNA, partial sequence	Enterococ...	1871	1871	96%	0.0	97.44%	1533	NR_114742.1
Enterococcus faecium strain ATCC 19434 16S ribosomal RNA, partial sequence	Enterococ...	1868	1868	96%	0.0	97.34%	1482	NR_115764.1
Enterococcus faecium strain NBRC 100486 16S ribosomal RNA, partial sequence	Enterococ...	1868	1868	96%	0.0	97.34%	1485	NR_113904.1
Enterococcus faecium strain NBRC 100485 16S ribosomal RNA, partial sequence	Enterococ...	1868	1868	96%	0.0	97.34%	1426	NR_113903.1

Şekil 4.2. *E. faecium*'un 16S rRNA dizisi BLAST sonuçlarının ekran görüntüsü

4.1.3. *L. mesenteroides*'in Tanımlanması

L. mesenteroides закваска Кефир VIVO®'dan izole edilmiştir. Seçici ortam 100g/L sakaroz içermektedir. Bu bakterilerin dikkat çekici özelliklerinden biri dekstran üretme yetenekleridir. Dekstran renksizdir ve bu besiyerindeki kolonilere mukus görünümü kazandırmıştır. Kok şeklinde, gram pozitif, katalaz ve oksidaz için negatif olan *L. mesenteroides*, 16S rRNA dizilemesi ile tanımlanmıştır (Şekil 4.3).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc Len	Accession
Leuconostoc mesenteroides strain ATCC 8293 16S ribosomal RNA, partial sequ...	Leuconosto...	1803	1803	88%	0.0	96.69%	1549	NR_074857.1
Leuconostoc mesenteroides strain NBRC 100486 16S ribosomal RNA, partial se...	Leuconosto...	1803	1803	88%	0.0	96.69%	1476	NR_113912.1
Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum strain NBRC 100495 16S ribos...	Leuconosto...	1803	1803	88%	0.0	96.69%	1476	NR_113911.1
Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum strain NCFB 529 16S ribosome...	Leuconosto...	1803	1803	88%	0.0	96.69%	1449	NR_040817.1
Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum strain JCM 8700 16S ribosomal...	Leuconosto...	1803	1803	88%	0.0	96.69%	1473	NR_113254.1
Leuconostoc mesenteroides strain JCM 8124 16S ribosomal RNA, partial sequ...	Leuconosto...	1803	1803	88%	0.0	96.69%	1473	NR_113251.1
Leuconostoc mesenteroides subsp. jangjeonbikimbui strain DRC1506 16S riboso...	Leuconosto...	1797	1797	88%	0.0	96.60%	1551	NR_157602.1

Şekil 4.3. *L. mesenteroides*'in 16S rRNA dizisi BLAST sonuçlarının ekran görüntüsü

4.1.4. *Streptococcus* sp'nin Tanımlanması

Bu bakteri termofilik koşullar altında yoğurttan izole edilmiştir ve seçici besiyeri olarak bromokresol moru pH indikatörü içeren ST kullanılmıştır. pH 5.2'nin altında bromokresol moru sarıya dönmektedir. *Streptococcus* gibi laktik asit bakterileri sakkarozu ortamda fermente ederek rengin sarıya dönmesine neden olmaktadır. Ayrıca gram pozitif olan bu bakteriler zincir şeklinde koklar oluşturmaktadır. Katalaz ve oksidaz negatif özellik gösteren *Streptococcus* spp.'ler için 16S rRNA dizilemesi *S. thermophilus*'a ek olarak *S. vestibularis* ve *S. salivarius* ile de eşleşme göstermiştir (Şekil 4.4).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc Len	Accession
Streptococcus thermophilus strain ATCC 19288 16S ribosomal RNA, partial sequ...	Streptococc...	1888	1888	98%	0.0	97.64%	1539	NR_042778.1
Streptococcus salivarius strain ATCC 7073 16S ribosomal RNA, partial sequence	Streptococc...	1877	1877	98%	0.0	97.46%	1546	NR_042776.1
Streptococcus vestibularis ATCC 49124 16S ribosomal RNA, partial sequence	Streptococc...	1860	1860	98%	0.0	97.19%	1538	NR_042777.1
Streptococcus thermophilus strain DSM 20817 16S ribosomal RNA, partial sequ...	Streptococc...	1840	1840	98%	0.0	96.83%	1540	NR_118898.1

Şekil 4.4. *Streptococcus* spp'nin 16S rRNA dizisi BLAST sonuçlarının ekran görüntüsü

4.2. Hücre Canlılığı Sonuçları

4.2.1. Canlı Bakterilerin (LC) Kolon Kanseri Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücreleri 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/ml konsantrasyonlarında *L. rhamnosus*, *E. faecium*, *L. mesenteroides*, *Streptococcus* sp. ve *B. Licheniformis* ile 24 saat süresince muamele edilmiştir. Her iki hücre hattında da LC uygulaması doza bağlı olarak hücre canlılıklarını inhibe etmiştir (Şekil 4.5).

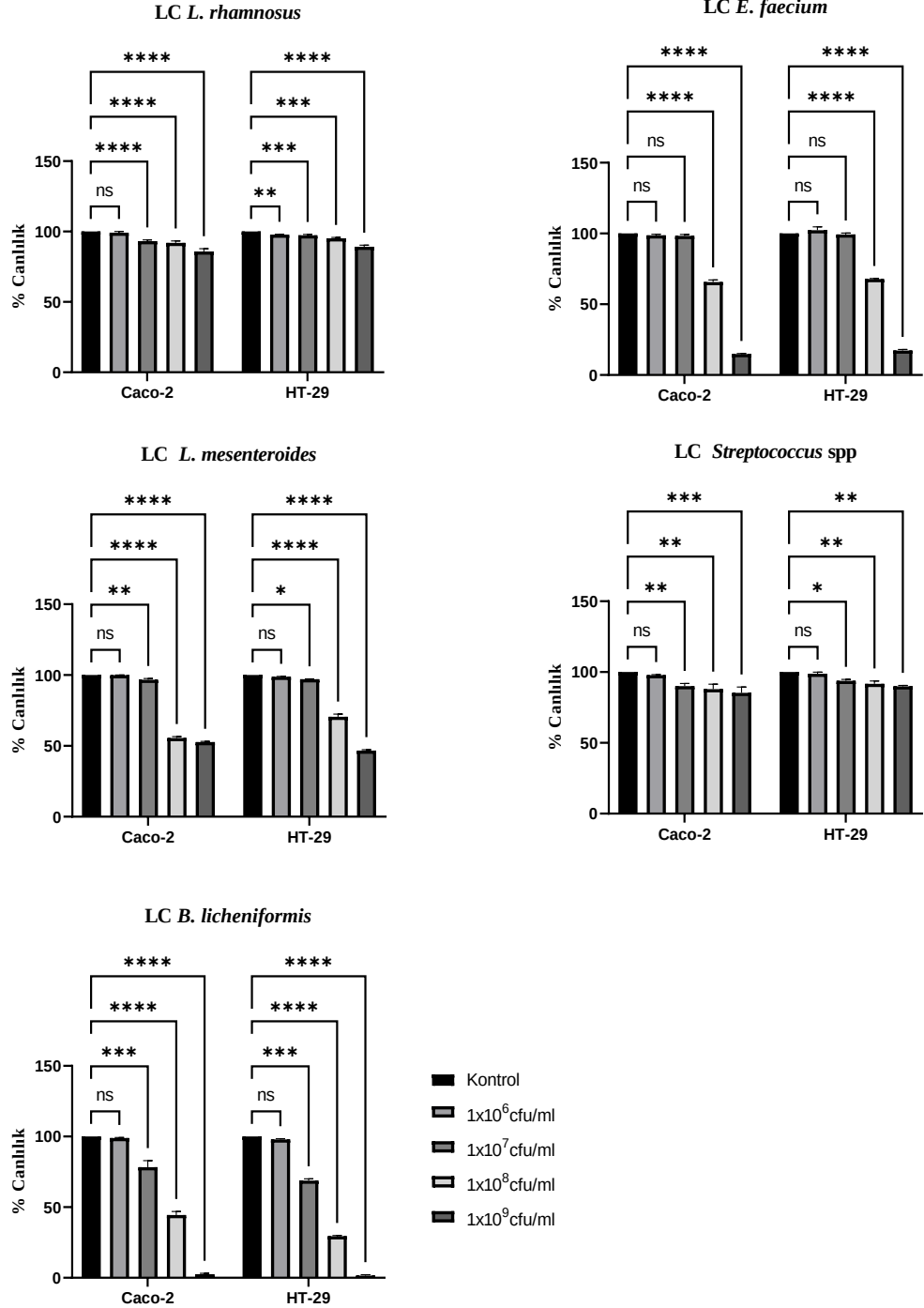
XTT analizi ile gerçekleştirilen hücre canlılığı sonuçlarına göre, canlı *L. rhamnosus* bakterileri Caco-2 için 10^6 CFU/ml konsantrasyonu dışındaki tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığını anlamlı şekilde inhibe etmiştir. Buna göre 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/ml LC uygulaması sonrasında Caco-2 hücrelerinin canlılığı sırası ile %99,15, %93,17, %91,95 ve %85,87 olarak bulunmuştur. HT-29 hücrelerinde ise uygulanan tüm konsantrasyonlar hücre canlılığını anlamlı şekilde azaltmış ve hücre canlılıkları sırası ile %97,75, %97,36, %95,12 ve %89,21 olarak belirlenmiştir.

Canlı *E. faecium* uygulaması ise her iki hücre hattında 10^6 ve 10^7 CFU/ml konsantrasyonlarında hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmazken, 10^7 , 10^8 ve 10^9 CFU/ml LC uygulaması hücre canlılığını anlamlı şekilde azaltmıştır. Buna göre Caco-2 hücreleri için hücre canlılıkları sırası ile %98,7, %98,29, %65,69 ve %14,82; HT-29 hücreleri için sırası ile %102,26, %99,3, %67,85 ve %17,31 olarak bulunmuştur.

Canlı *L. mesenteroides* uygulaması ise her iki hücre hattında 10^6 CFU/ml konsantrasyonunda hücre canlılığında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Diğer konsantrasyonlarda canlı *L. mesenteroides* uygulaması ise hücre canlılığı anlamlı şekilde azaltmıştır. Buna göre 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/ml konsantrasyonlarında *L. mesenteroides* uygulaması sonrasında Caco-2 hücre canlılığı sırası ile %99,9, %96,7, %55,52 ve %52,67; HT-29 hücre canlılığı ise sırası ile %98,85, %97,02, %70,56 ve %46,69 olarak bulunmuştur.

10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/ml konsantrasyonlarında *Streptococcus* sp. uygulaması ile Caco-2 hücre canlılığı sırası ile %97,85, %90,07, %87,95 ve %85,36; HT-29 hücre canlılığı sırası ile %98,79, %93,85, %91,74 ve %89,94 olarak belirlenmiştir. 10^6 CFU/ml LC uygulaması her iki hücre hattında da hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

Benzer şekilde 10^6 CFU/ml *B. licheniformis* Caco-2 ve HT-29 hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır. Bununla birlikte diğer dozlar her iki hücre hattında da hücre canlılığı anlamlı şekilde azaltmıştır. Buna göre 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/ml konsantrasyonlarında *B. licheniformis* uygulaması sonrasında Caco-2 hücre canlılığı sırası ile %98,9, %78,25, %44,4 ve %2,5; HT-29 hücre canlılığı sırası ile %97,98, %68,82, %29,43 ve %1,5 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.5. Canlı bakterilerinin kolon kanseri hücre canlılığı üzerindeki etkisi. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001, ns p>0,05.

4.2.2. Isı ile Öldürülmüş (HK) Bakterilerin Kolon Kanseri Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücreleri 0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml konsantrasyonlarında ısı ile öldürülmüş (HK) *L. rhamnosus*, *E. faecium*, *L. mesenteroides*, *Streptococcus* sp. ve *B. licheniformis* ile 24 saat süresince muamele edilmiş ve % hücre canlılıkları Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

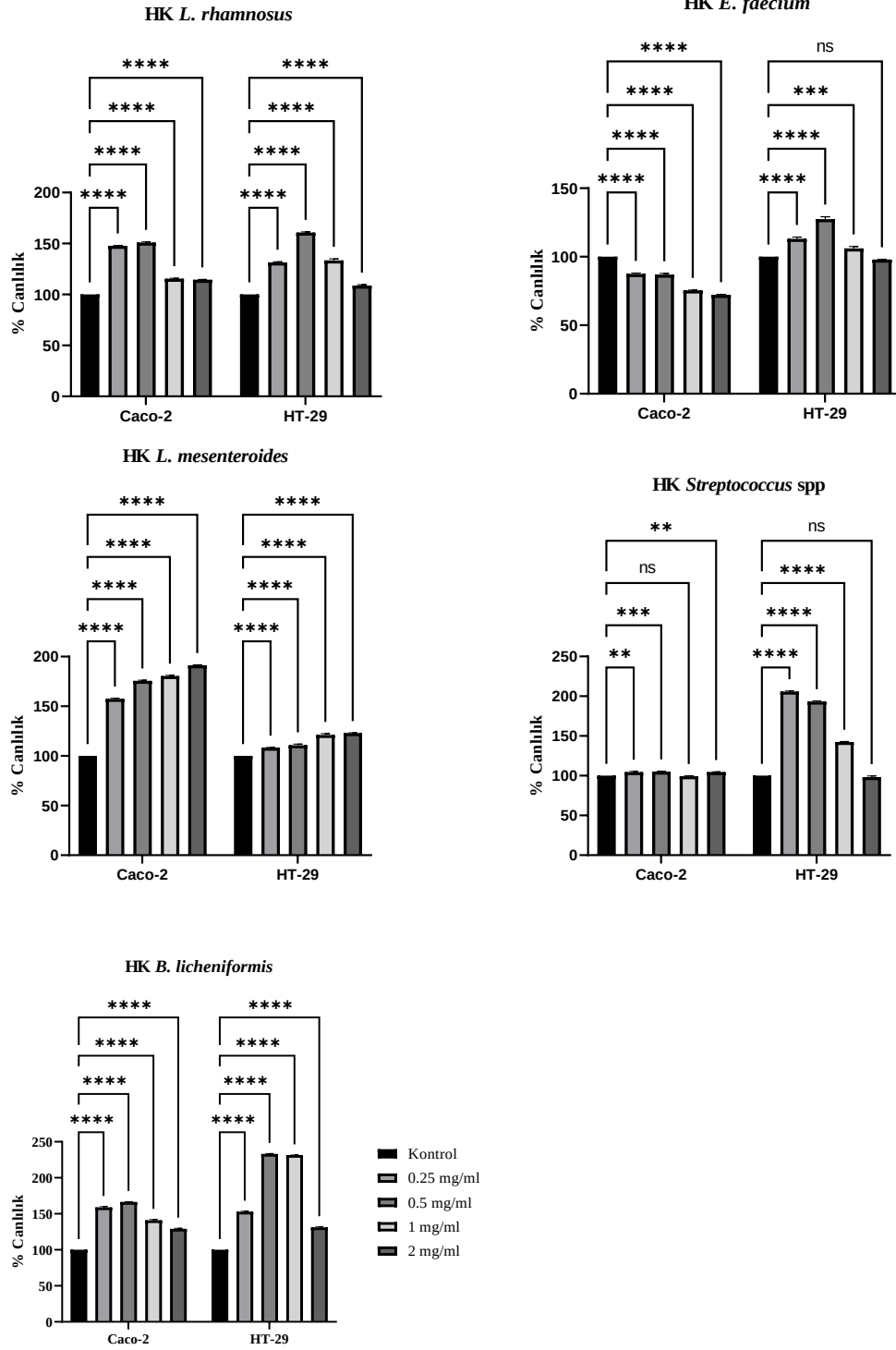
Buna göre 0,25, 0,5, 1, 2 mg/ml konsantrasyonlarında HK *L. rhamnosus* uygulaması Caco-2 ve HT-29 hücre canlılıklarını anlamlı şekilde artırmıştır. Caco-2 hücre canlılıkları sırası ile %147,75, %150,99, %115,40, %114,49; HT-29 hücre canlılıkları ise sırası ile %131,40, %160,78, %133,44, %108,83 olarak bulunmuştur.

HK *E. faecium* uygulaması ise Caco-2 hücre canlılığını anlamlı şekilde azaltmıştır. Buna göre 0,25, 0,5, 1, 2 mg/ml konsantrasyonlarında HK *E. faecium* uygulaması sonrası Caco-2 hücre canlılığı sırası ile %87,46, %86,88, %75,43, %72,22 olarak bulunmuştur. HT-29 hücrelerinde ise HK *E. faecium* uygulaması genel olarak hücre canlılığını 2 mg/ml dışında anlamlı şekilde artırmış ve hücre canlılığı sırası ile %113,03, %127,48, %106, %97,91 olarak belirlenmiştir.

0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml konsantrasyonlarında HK *L. mesenteroides* uygulaması sonrasında ise her iki hücre hattında da hücre canlılığı anlamlı şekilde artış göstermiştir. Buna göre Caco-2 hücre canlılığı sırası ile %157,46, %175,57, %180,45, %191,305 olarak; HT-29 hücre canlılığı ise sırası ile %108,28, %110,81, %121,155, %122,99 olarak belirlenmiştir.

Aynı konsantrasyonlarda HK *Streptococcus* sp. uygulaması sonrasında ise Caco-2 hücre canlılığı sırası ile %104,39, %105,12, %99,24, %104,37 olarak bulunmuştur. HT-29 hücre canlılığı ise sırası ile %209,66, %193,25, %142,34, %98,33 olarak belirlenmiştir. Genel olarak HK *Streptococcus* sp. uygulamasının hücre canlılığını anlamlı şekilde artırdığı belirlenmiştir.

Benzer şekilde 0,25, 0,5, 1, 2 mg/ml konsantrasyonlarında HK *B. licheniformis* uygulaması sonrasında her iki hücre hattında da hücre canlılığında anlamlı artış gözlenmiştir. Caco-2 için hücre canlılığı sırası ile %158,78, %166,26, %140,84, %129,02 olarak bulunmuştur. HT-29 için ise bu değerler sırası ile %152,89, %233,1, %231,5, %191,08 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. HK bakterilerinin kolon kanseri hücre canlılığı üzerindeki etkisi. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001, ns p > 0,05.

4.2.3. Hücre İçermeyen Supernatantın (CFS) Kolon Kanseri Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücreleri 12,5, 25, 50 ve 100 mg/ml konsantrasyonlarında hücre içermeyen bakteri supernatantları (CFS) 24 saat süresince muamele edilmiştir. Kullanılan tüm bakteri-CFS konsantrasyonları, doza

bağlı olarak her iki hücre hattında da hücre canlılığını anlamlı şekilde inhibe etmiştir (Şekil 4.7).

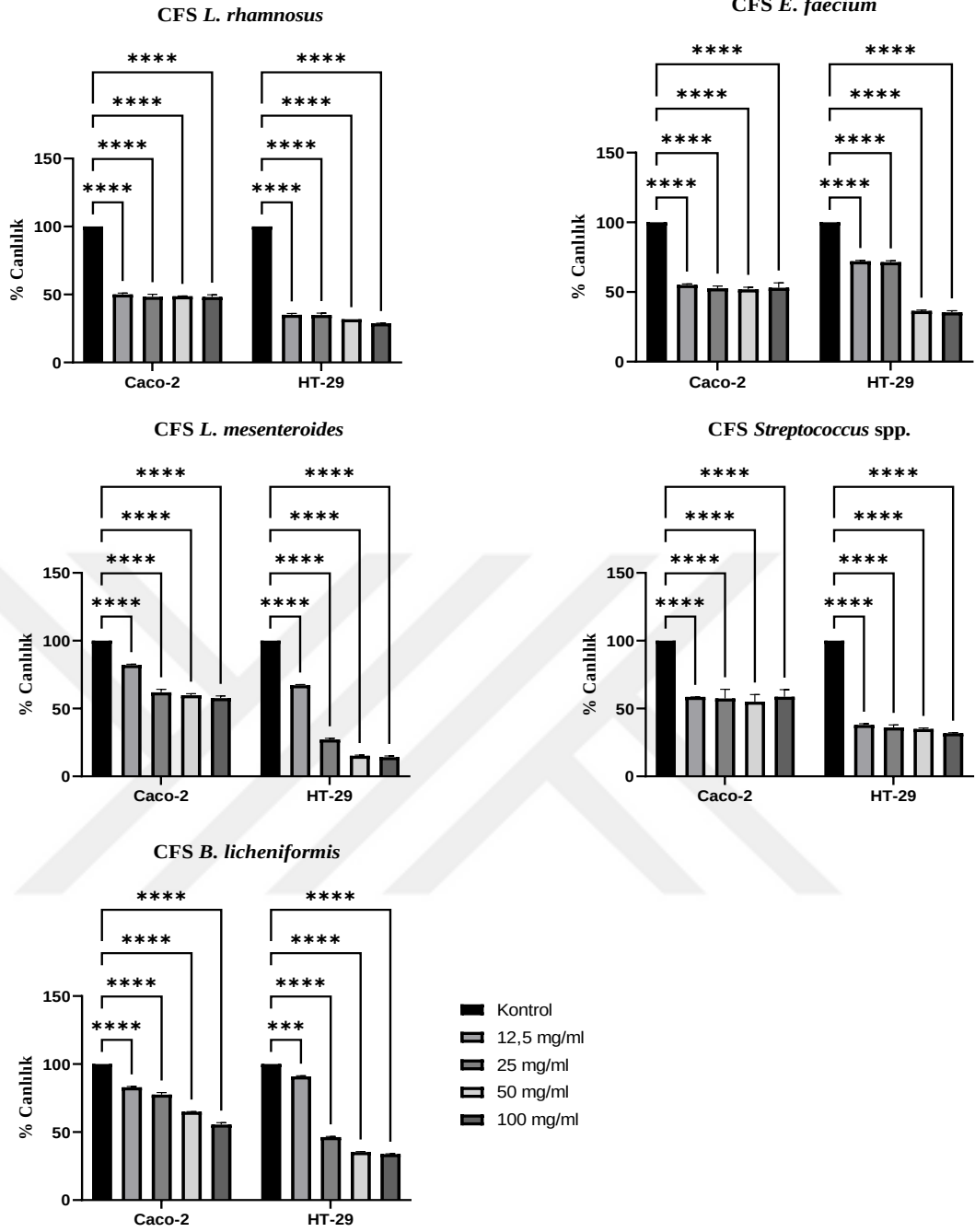
XTT analizi sonuçlarına göre *L. rhamnosus* ait 12,5, 25, 50 ve 100 mg/ml konsantrasyonlarındaki CFS uygulaması sonrasında Caco-2 hücre canlılığı sırası ile %50,12, %48,33, %48,69, %48,17 HT-29 hücre canlılığı ise sırası ile %35,11, %34,96, %31,86, %28,77 olarak bulunmuştur.

E. faecium’a ait CFS uygulaması sonrasında ise bu değerler Caco-2 hücreleri için sırası ile %55,05, %52,72, %51,93, %53,64; HT-29 için sırası ile %72,09, %71,46, %36,46, %35,40 olarak belirlenmiştir.

Caco-2 hücreleri aynı konsantrasyonlarda *L. mesenteroides*’e ait CFS ile muamele edildiğinde ise hücre canlılıkları %82,04, %61,93, %59,81, %57,73 olarak bulunmuştur, bu değerler HT-29 hücreleri için %67,23, %27,18, %15,19, %14,19 olarak belirlenmiştir.

Streptococcus sp.’e ait CFS uygulaması sonrasında Caco-2 hücre canlılığını sırası ile %58,55, %57,37, %55,11, %58,74 olmuş, bu değerler HT-29 hücreleri için sırası ile %37,94, %36, %34,87, %31,81 olarak bulunmuştur.

Benzer şekilde *B. licheniformis*’e ait CFS uygulaması da her iki hücre hattında sitotoksik etkiye neden olmuştur. Hücre canlılıkları Caco-2 için sırası ile %82,97, %77,55, %64,92, %55,58; HT-29 için sırası ile %90,99, %46,32, %35,28, %33,75 olarak belirlenmiştir.

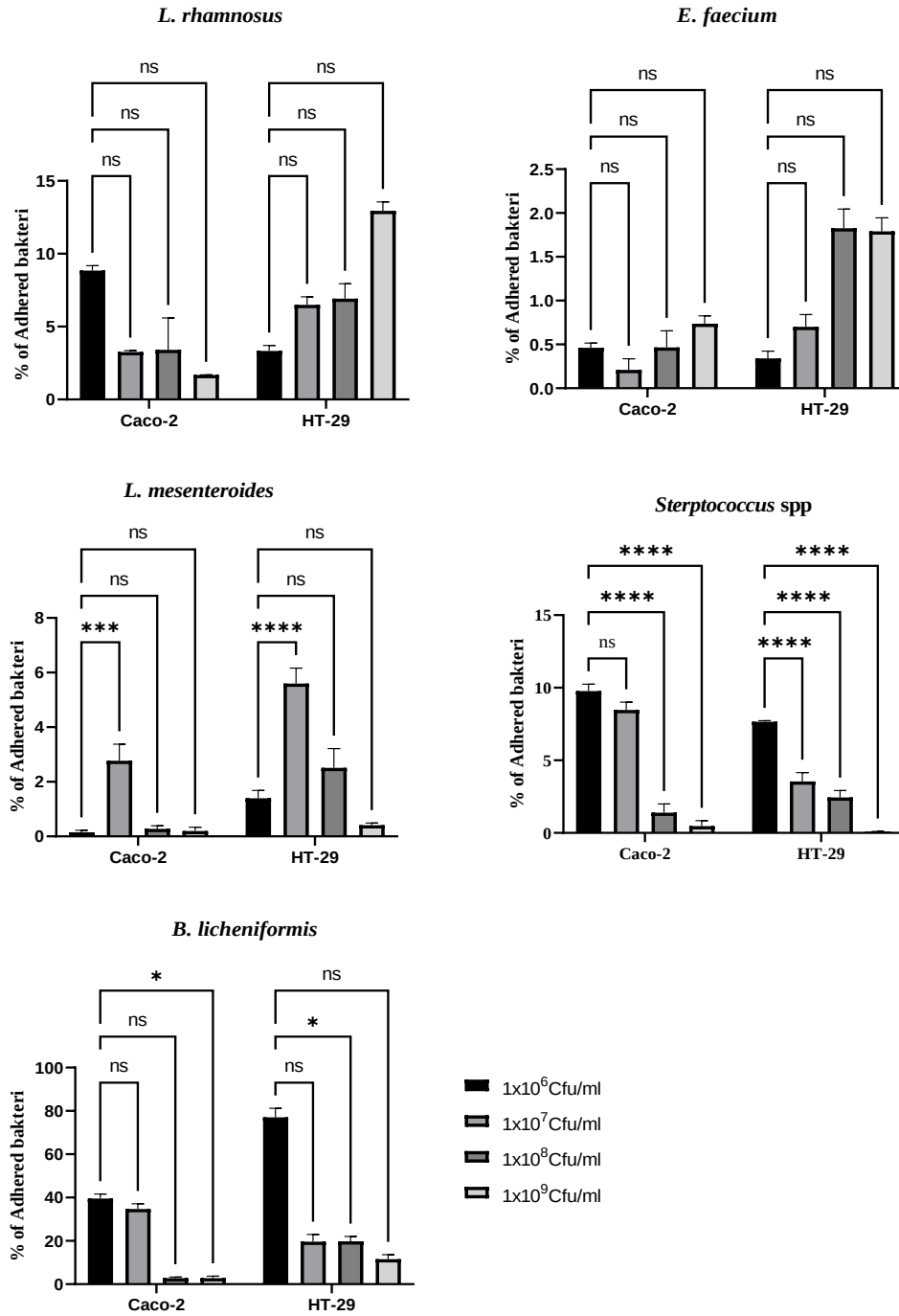


Şekil 4.7. Bakterilere ait CFS örneklerinin kolon kanseri hücre canlılığı üzerindeki etkisi. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001, ns p > 0,05.

4.3. Adhezyon Testi Sonuçları

Adhezyon testi sonuçlarına göre *L. rhamnosus* ve *E. faecium* açısından her iki hücre hattında da anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. *L. mesenteroides* ilişkili olarak ise, 1×10^7 CFU/ml inokulumun her iki hücre hattında da en yüksek ve anlamlı aderans oranına sahip olduğu gözlenmiştir. Caco-2 için bu değer %2,3, HT-29 için ise %5,2'dir. Bununla birlikte diğer inokulumlarda anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. *Streptococcus sp.* ile ilişkili olarak ise inokulum 1×10^6 'nın her iki

hücre hattında diğer inokulumlara kıyasla önemli ölçüde aderans oranına sahip olduğu bulunmuştur. Diğer taraftan, her iki hücre hattında da *B. licheniformis* için aderans oranı, çalışılan bakteriler arasındaki en yüksek oran olarak belirlenmiştir. Bu değer 1×10^6 CFU/ml inokulum için Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde sırası ile % 41 ve %80'e ulaşmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Kolon kanseri hücre hatlarında bakteriyel aderans oranı. *p <0,05, ***p <0,001, ****p <0,0001, ns p>0,05.

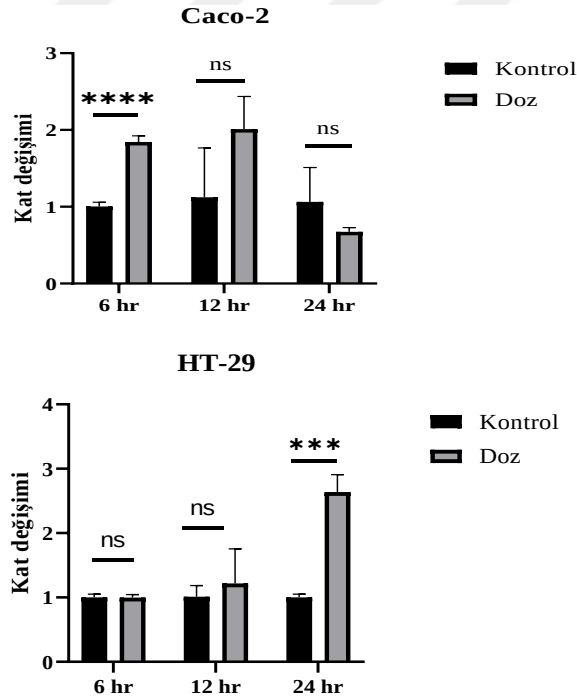
4.4. qRT-PZR Sonuçları

Canlılık ve adhezyon testleri sonuçları göz önüne alınarak devam eden analizlerde hücrelerin canlı *L. mesenteroides* ile 1×10^6 CFU /ml konsantrasyonunda muamele edilmesine karar verilmiştir.

4.4.1. Canlı *L. mesenteroides*'in PDL-1 Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Kolon kanseri hücrelerine 1×10^6 CFU /ml konsantrasyonunda canlı *L. mesenteroides*'in ne kadar süre ile uygulanacağı PD-L1 mRNA seviyesinin değerlendirildiği qRT-PZR analizi ile belirlenmiştir. Buna göre Caco-2 hücrelerine 6, ve 12 saat süresince 1×10^6 CFU /ml konsantrasyonunda canlı *L. mesenteroides* uygulaması sonrasında PD-L1 ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre sırası ile 1,84, 2 kat artarken, 24 saat uygulaması sonrasında 0,66 kat azalmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı değişim 6 saatlik uygulamada tespit edilmiştir (Şekil 4.9A).

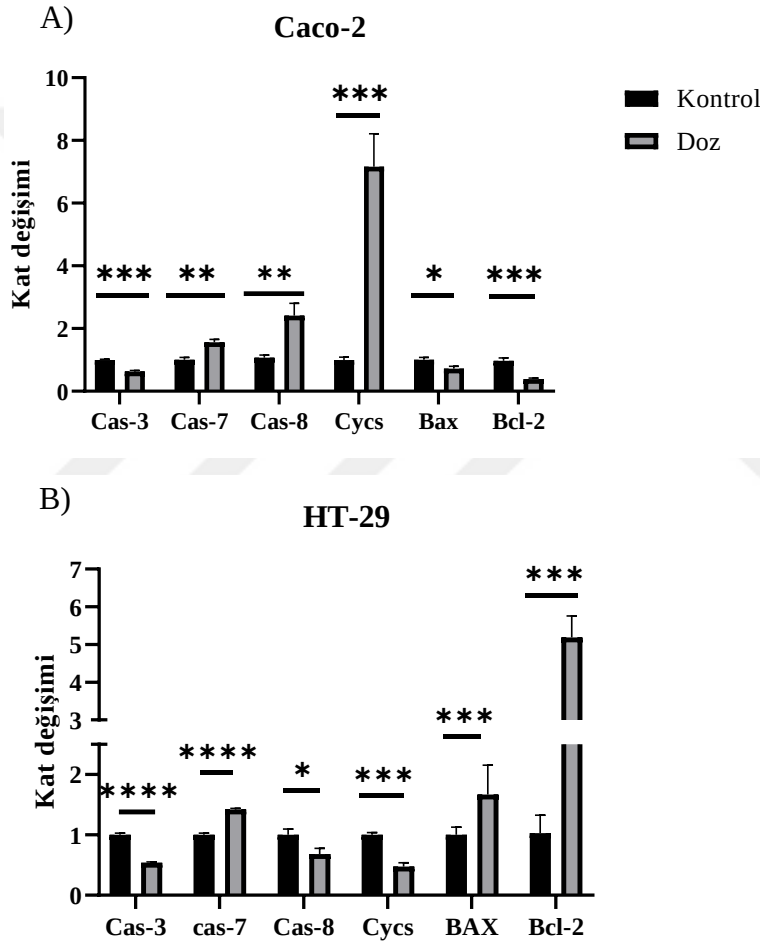
HT-29 hücrelerinde ise kontrol grubuna göre PD-L1 ekspresyon seviyesindeki anlamlı artış 2,63 kat şeklinde 24 saatlik uygulamada gözlenmiştir. Bu hücrelerde 6 ve 12 saat süresince 1×10^6 CFU /ml konsantrasyonunda canlı *L. mesenteroides* uygulaması kontrol grubuna göre PD-L1 gen ekspresyonunda anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.9 B)



Şekil 4.9. A) Caco-2 ve B) HT-29 kolon kanseri hücrelerine 6, 12 ve 24 saat süresince canlı *L. mesenteroides* uygulamasının PDL-1 ekspresyonu üzerindeki etkisi. ***p < 0,001, ****p < 0,0001, ns p > 0,05.

4.4.2. Canlı *L. mesenteroides*'in Apotoz ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi

L. mesenteroides'in 24 saat süresince Caco-2 hücrelerine uygulanması, kontrol grubuna kıyasla CASP3, CASP7 ve CYCS genlerinin ekspresyon seviyelerini anlamlı şekilde artırırken; BAX ve BCL2 genlerinin ekspresyon seviyelerini anlamlı şekilde azaltmıştır (Şekil 4.10A). HT-29 hücrelerinde ise bu uygulama sonrasında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CASP3, CASP8 ve CYCS genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı azalma; CASP7, BAX ve BCL-2 genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.10B).



Şekil 4.10. A) Caco-2 ve B) HT-29 kolon kanseri hücrelerine canlı *L. mesenteroides* uygulamasının apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001, ns p > 0,05.

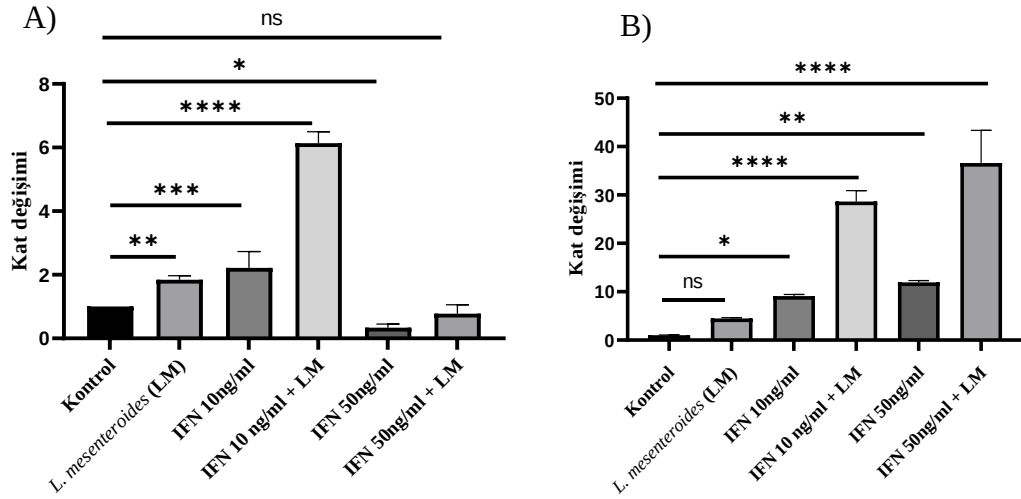
4.4.3. Farklı IFN- γ Konsantrasyonlarının PD-L1 Ekspresyonu Üzerine Etkisi

IFN- γ , aktive edilmiş T hücrelerinden salgılanır ve doğal öldürücüdür (Tau & Rothman, 1999). Probiyotik gibi bakteriler de IFN- γ üretmek için T hücrelerini indükler (Kekkonen ve ark. 2008). Bu tür çalışmalarda *in vivo* koşulları taklit etmek

için deneye IFN- γ eklenmesi önemlidir, çünkü IFN- γ , PD-L1 ekspresyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Ancak, IFN- γ aynı zamanda hücre ölümünü indükleyebilir (Rakshit ve diğerkleri, 2014). Bu nedenle devam eden deneylerde uygulanacak olan IFN- γ belirlenmesi PD-L1 ekspresyon seviyesine göre belirlenmiş ve bunun için 10 ve 50 ng/ml olmak üzere iki IFN- γ konsantrasyonu seçilmiştir.

Caco-2 hücreleri 6 saat süresince tek başına canlı *L. mesenteroides*, 10 veya 50 ng/ml IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* ya da sadece 10 veya 50 ng/ml IFN- γ ile muamele edilmiştir. Buna göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 10 ng/ml IFN- γ PD-L1 gen ekspresyonunu 2,14 kat anlamlı şekilde artırırken, 50 ng/ml IFN- γ PD-L1 gen ekspresyonunu 0,27 kat anlamlı şekilde azaltmıştır. Bununla birlikte tek başına canlı *L. mesenteroides* uygulaması kontrol grubuna göre PD-L1 gen ekspresyonunu 1,7 kat anlamlı şekilde artırırken, bakterinin 10 ng/ml IFN- γ varlığında uygulanması bu genin ekspresyonunu kontrole kıyasla 6,13 kat anlamlı şekilde artırmıştır. 50 ng/ml IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* uygulaması ise kontrol grubuna göre PD-L1 gen ekspresyonunu 0,74 kat anlamlı şekilde azaltmıştır (şekil 4.11A).

HT-29 hücrelerinde ise 24 saat süresince 10 ng/ml ve 50 ng/ml IFN- γ uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PD-L1 gen ekspresyonunu sırası ile 10 ve 12 kat anlamlı şekilde artırmıştır. 10 ng/ml ve 50 ng/ml IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* uygulaması sonrasında ise bu genin ekspresyon seviyesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırası ile 28,59 ve 36,19 kat anlamlı artış tespit edilmiştir (şekil 4.11B). Bu sonuçlar göz önüne alındığında devam eden analizlerde Caco-2 hücreleri 6 saat süresince 10 ng/ml IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* ile muamele edilirken, HT-29 hücreleri 24 saat süresince 50 ng/ml IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* ile muamele edilmiştir.

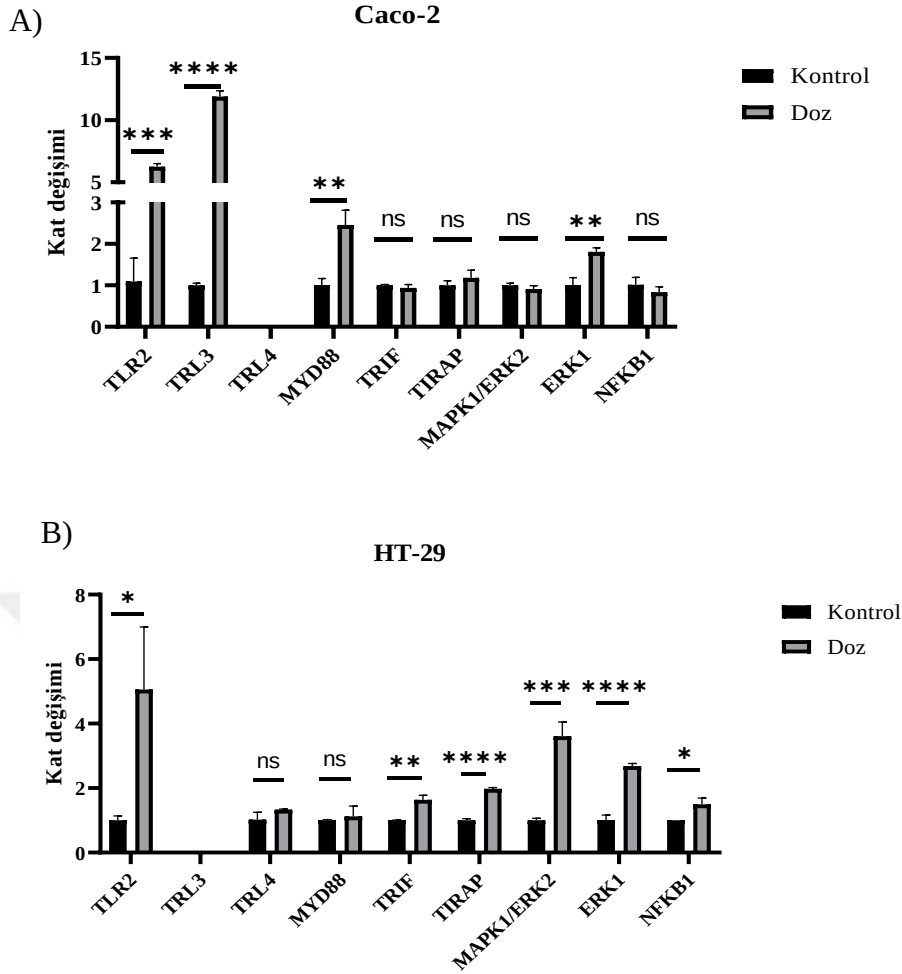


Şekil 4.11. A) Caco-2 ve B) HT-29 hücrelerinde farklı IFN- γ konsantrasyonlarının PD-L1 ekspresyonu üzerine etkisi. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001, ns p>0,05.

4.4.4. *L. mesenteroides* ve IFN- γ 'nın TLR Yolağı ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi

Caco-2 hücrelerinde IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TLR2, TLR3, MYD88 ve ERK1 genlerinin ekspresyon seviyelerini sırasıyla 6,25, 11,88, 2,44 ve 1,8 kat anlamlı şekilde artırmıştır (Şekil 4.12A).

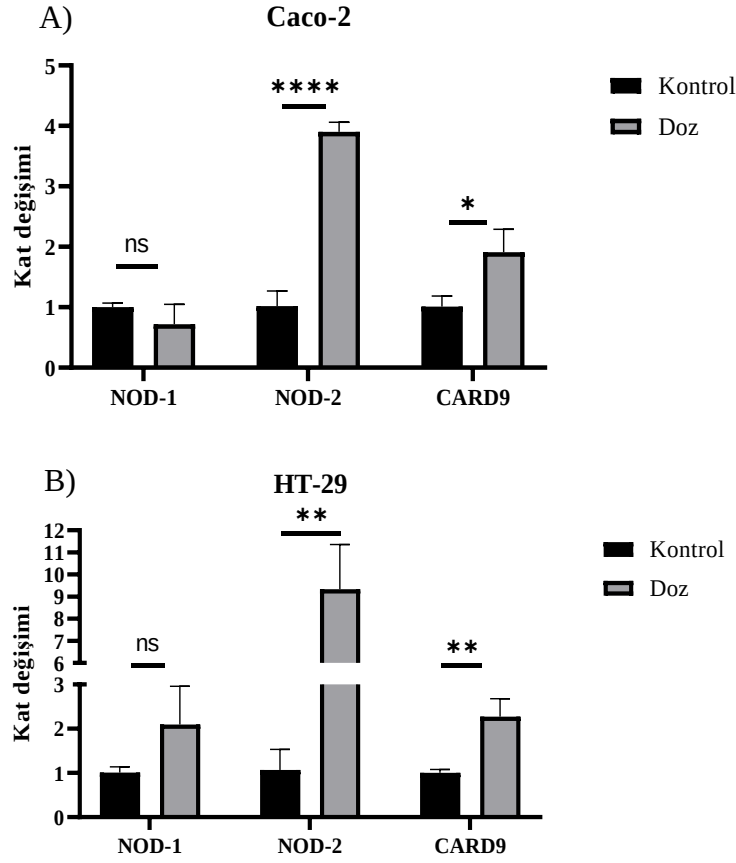
HT-29 hücrelerinde ise IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* uygulaması sonrasında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TLR2 gen ekspresyonunda 4,81 kat anlamlı artış gözlenmiştir. Ayrıca TIRAP, TRIF, ERK1, ERK2 ve NFKB1 gen ekspresyon seviyelerinde gözlenen artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (şekil 4.12B).



Şekil 4.12. A) Caco-2 ve B) HT-29 hücrelerinde IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* uygulamasının TLR yolu ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001, ns p>0,05.

4.4.5 *L. mesenteroides* ve IFN- γ 'nın NOD Benzeri Reseptörlerin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi

NOD benzeri reseptörler, bakteri varlığında aktive olan, PD-L1 ekspresyonu üzerinde etkili olan ERK ve NFKB1 ile bağlantılı hücre yollarında biridir. Bu çalışma bu yolak ile ilgili olarak IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* uygulaması NOD1, NOD2 ve CARD9 genlerinin ekspresyon seviyeleri de değerlendirilmiştir. Buna göre bu uygulama sonrasında Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde NOD2 gen ekspresyon seviyesi sırası ile 3,9 ve 9,45 kat; CARD9 ekspresyon seviyesi ise sırası ile 1,89 ve HT-29 2,25 kat anlamlı şekilde artmıştır (Şekil 4.13).

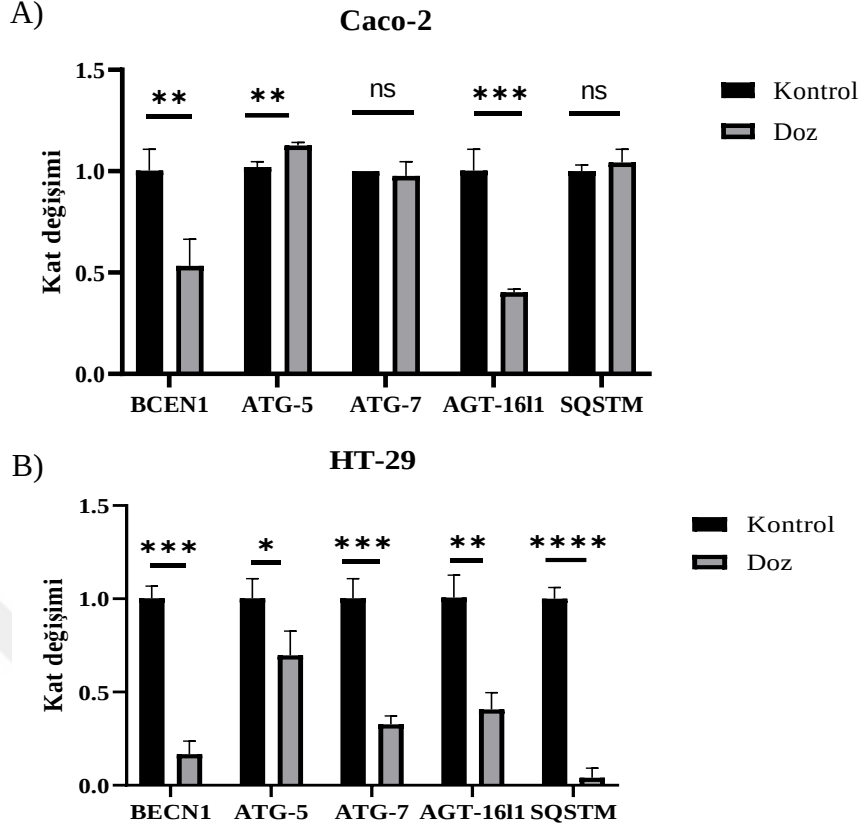


Şekil 4.13. A) Caco-2 ve B) HT-29 hücrelerinde IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* uygulamasının NOD benzeri reseptörlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001, ns p>0,05.

4.4.6 *L. mesenteroides* ve IFN- γ 'nın Otofaji ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi

Her iki hücre hattında da IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* uygulaması genel olarak otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesini kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaltmıştır. Caco-2 hücrelerinde bu uygulama otofaji ile ilişkili BECN1 ve ATG-16L1 genlerinin ekspresyon seviyelerini sırası ile 0,52 ve 0,4 kat anlamlı şekilde azaltmış, ATG-5 ekspresyon seviyesini ise 1,13 kat anlamlı artırmıştır (Şekil 4.14A).

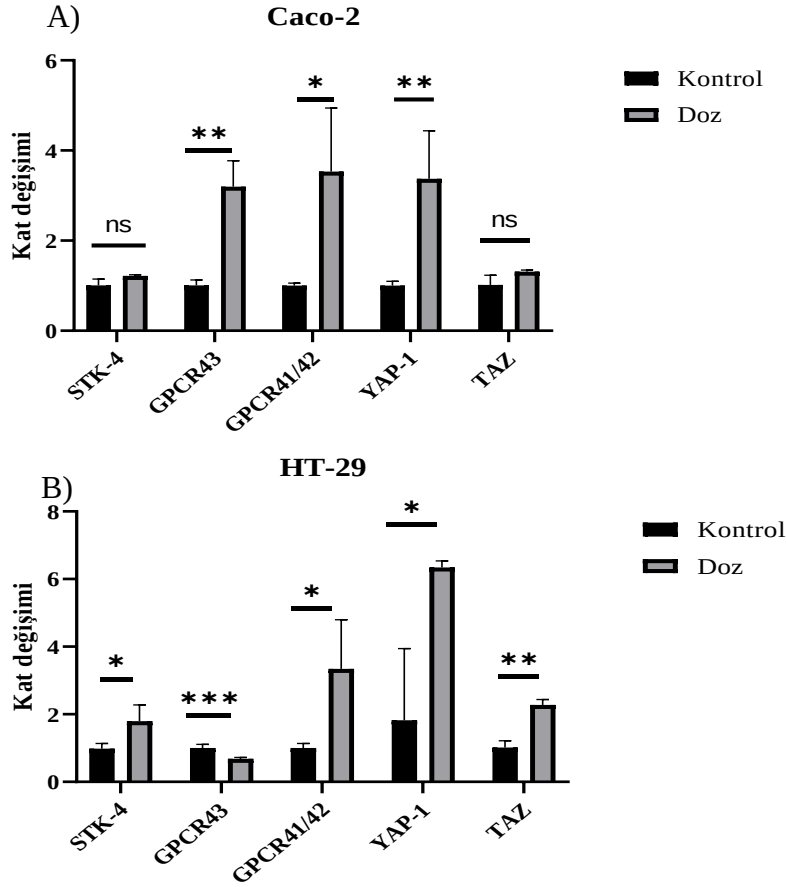
HT-29 hücrelerinde ise BECN1, ATG-5, ATG-7, ATG-16L1 ve SQSTM genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırası ile 0.16, 0,69, 0,33, 0,4 ve 0,04 kat anlamlı azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.14B).



Şekil 4.14. A) Caco-2 ve B) HT-29 hücrelerinde IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* uygulamasının otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001, ns p>0,05.

4.4.7 *L. mesenteroides* ve IFN- γ 'nın ve Hippo Yolağı ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi

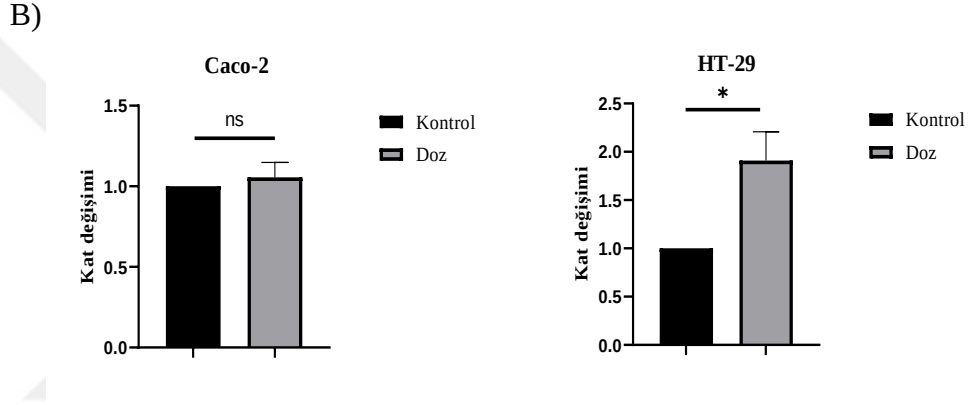
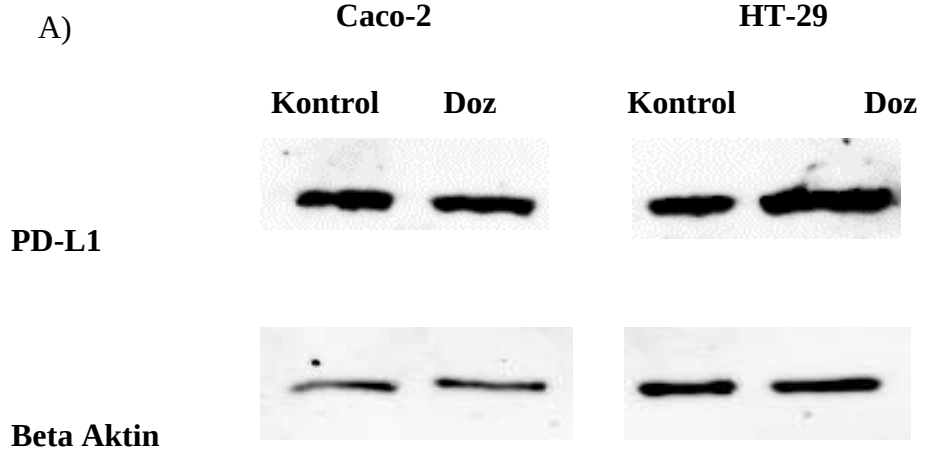
Hippo yolağı belirteçlerinin artan PD-L1 ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir. Bu nedenle bakteri, Hippo yolağı ve PD-L1 arasındaki bağlantıyı bulmak, hücrel yolaklardaki bakteriyel rolü anlamak için oldukça önemlidir. Bu amaçla gerçekleştirilen qRT-PZR sonuçlarına göre IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* uygulaması Caco-2 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GPCR43, GPCR41/42 ve YAP-1 genlerinin ekspresyon seviyelerini sırası ile 3,53, 3,34 ve 3,26 kat anlamlı şekilde artırmıştır (Şekil 4.15A). HT-29 hücrelerinde ise bu uygulama sonrasında STK-4, GPCR41/43, YAP-1 ve TAZ genlerinin ekspresyon seviyelerinde kontrole kıyasla sırası ile 1,75, 3,14, 6,34 ve 2,27 kat anlamlı artış tespit edilmiştir, GPCR43 gen ekspresyonu ise 0,69 kat anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 4.15B).



Şekil 4.15. A) Caco-2 ve B) HT-29 hücrelerinde IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* uygulamasının Hippo yolağı ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ns p>0,05.

4.5. *L. mesenteroides* ve IFN- γ 'nın PD-L1 Protein Seviyesi Üzerine Etkisi

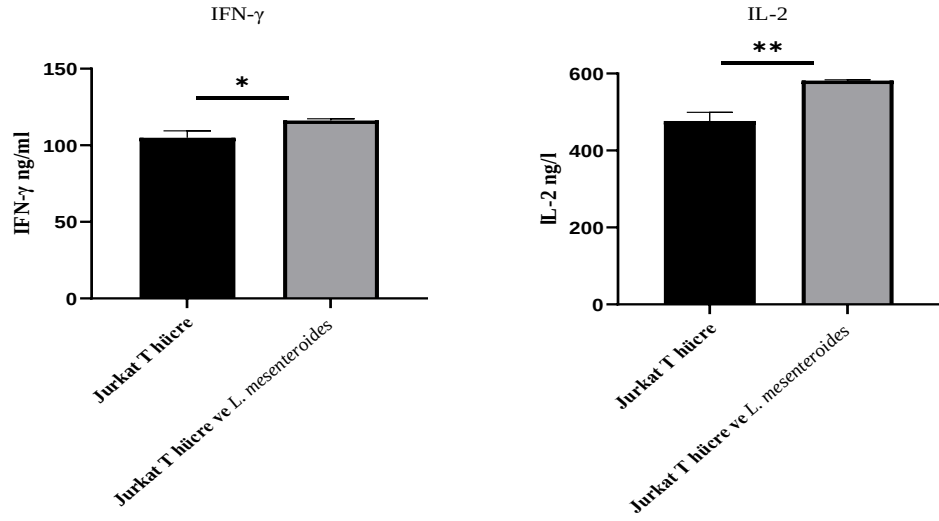
Kolon kanseri hücrelerinde IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* uygulamasının PD-L1 protein seviyesi üzerine etkisi western blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Buna göre bu uygulama sonrasında Caco-2 hücrelerinde PD-L1 protein seviyesi kontrole göre 1,01 kat artsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Diğer taraftan HT-29 hücrelerinde IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* uygulaması kontrol grubuna kıyasla bu proteinin ekspresyon seviyesini 1,9 kat anlamlı şekilde artırmıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* uygulamasının PD-L1 protein seviyesi üzerine etkisi. A) Western blot jel görüntüsü B) Protein seviyesindeki kat değişimi. *p < 0,05, ns p > 0,05.

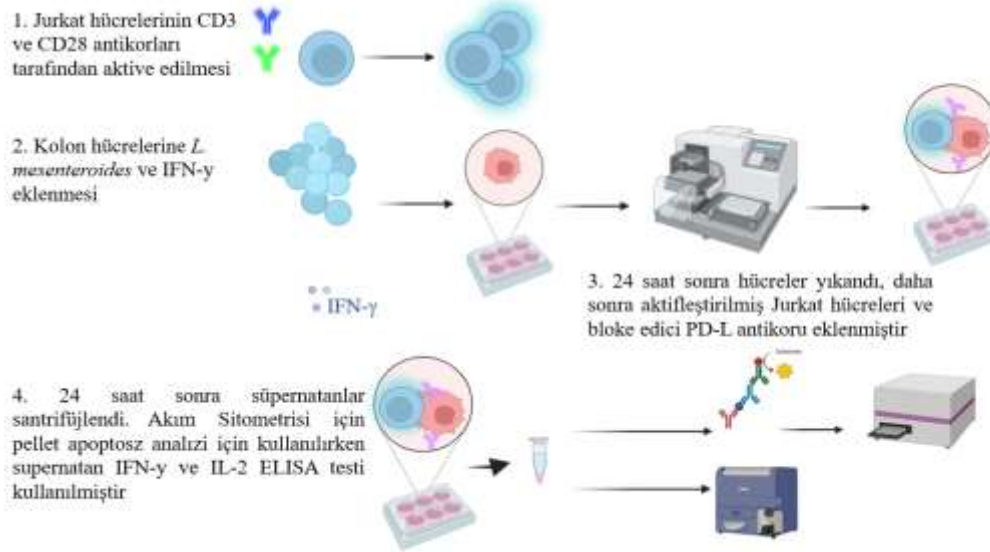
4.6. *L. mesenteroides* ve IFN- γ 'nın T Hücrelerinde Sitokin Salınımı ve Apoptoz Üzerine Etkisi

L. mesenteroides'in bağışıklık hücrelerini çeşitli sitokinleri üretmek üzere indüklediğinden emin olmak için Jurkat T hücreleri, *L. mesenteroides* ile ve *L. mesenteroides* olmadan inkübe edilmiştir. Ardından T hücrelerinde IFN- γ ve IL-2 seviyeleri değerlendirilmiştir. Buna göre *L. mesenteroides*'in T hücrelerinden IFN- γ ve IL-2 salınımını indüklediği belirlenmiştir (Şekil 4.17).

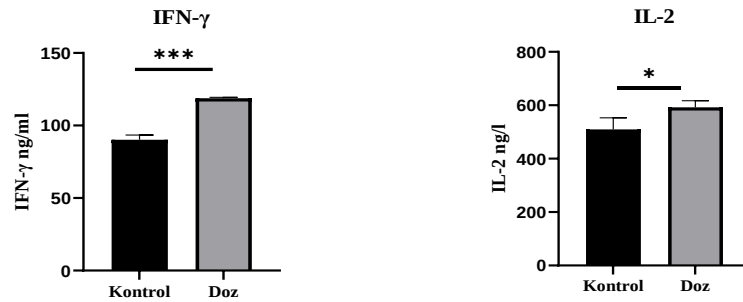


Şekil 4.17. *L. mesenteroides*'in Jurkat T hücrelerinde IFN- γ ve IL-2 üretimi üzerindeki etkisi *p <0,05, **p <0,01.

PD-L1 indüksiyonunun kolon kanseri hücreleri üzerindeki etkisini araştırmak için önceden aktive edilen Jurkat T hücreleri, kolon kanseri hücreleriyle birlikte kültürlenmiştir. Bu aşamada hücreler IFN- γ varlığında *L. mesenteroides* ile muamele edilmiş ve aynı zamanda immünoterapi koşullarını taklit etmek için PD-L1 blokaj antikoru da kullanılmıştır (Şekil 4.18). Kontrol olarak kullanılan kolon kanseri hücrelerine herhangi bir muamele olmamıştır. Elde edilen sonuçlara göre uygulama sonrasında Caco-2 hücreleri ile kokültüre edilen T hücrelerinde IFN- γ ve IL-2 miktarları kontrole göre anlamlı şekilde artmıştır. Buna göre kontrol ve doz gruplarında IFN- γ miktarı sırası ile 94 ng/ml ve 119 ng/ml; IL-2 miktarı ise sırası ile 517ng/L ve 592 ng/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4.19).

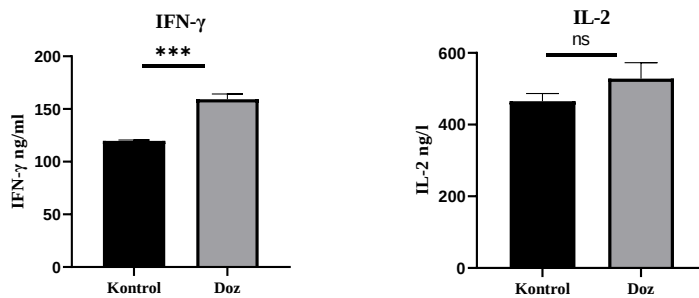


Şekil 4.18. *L. mesenteroides* deney düzeneği ile indüklenen PD-L1'in fonksiyonel analizi



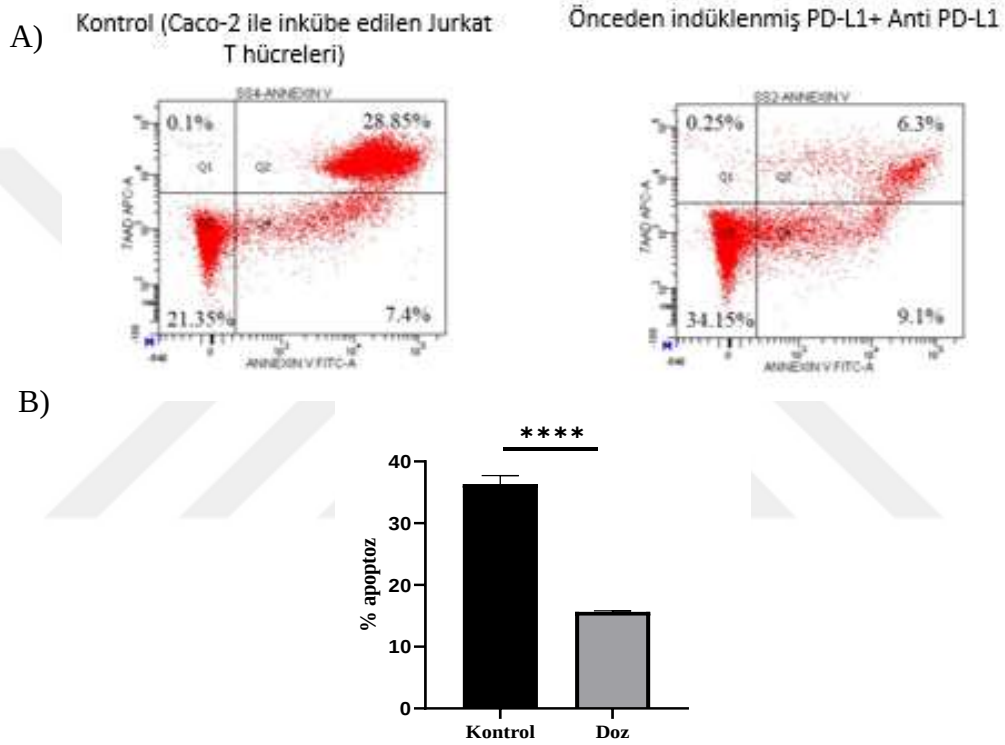
Şekil 4.19. Caco-2 ve Jurkat T hücrelerinin kokültürü sonrasında kontrol ve doz gruplarında IFN-γ ve IL-2 miktarları. *p < 0,05, ***p < 0,001.

Bununla birlikte, uygulama sonrasında HT-29 hücreleri ile kokültüre edilen T hücrelerinde IFN-γ miktarı kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artmıştır. Bununla birlikte IL-2 miktarında gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.20).



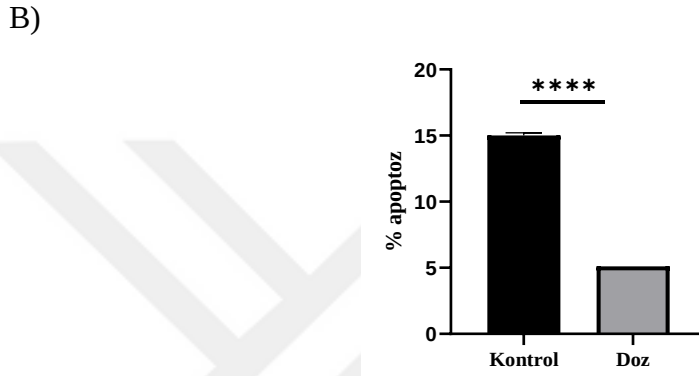
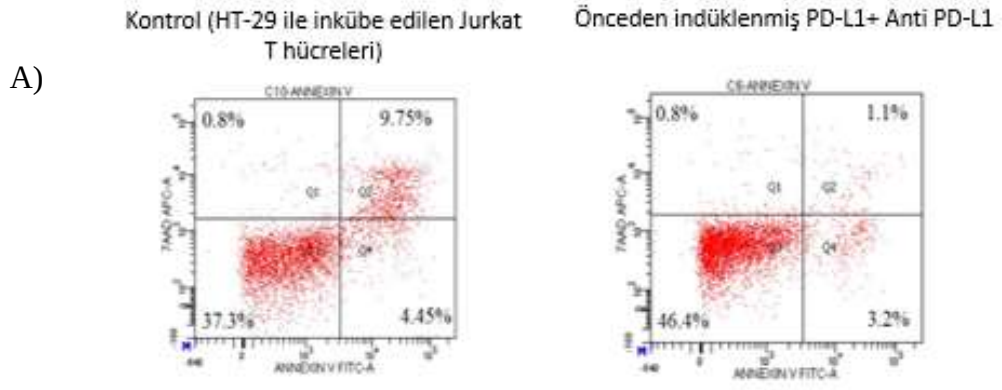
Şekil 4.20. HT-29 ve Jurkat T hücrelerinin kokültürü sonrasında kontrol ve doz gruplarında IFN- γ ve IL-2 miktarları. ***p < 0,001, ns p > 0,05.

Kolon hücrelerinde *L. mesenteroides* tarafından indüklenen PD-L1'in Jurkat T hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi, FITC Annexin V apoptoz analizi ile değerlendirilmiştir. Buna göre IFN- γ varlığında *L. mesenteroides* ile muamele edilmiş ve aynı zamanda immünoterapi koşullarını taklit etmek için PD-L1 blokajı uygulanmış Caco-2 kolon kanseri hücreleri ile kokültüre edilmiş T hücrelerinde apoptoz oranının kontrole kıyasla anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Apotoz oranları kontrol ve doz gruplarında sırası ile %36,35 ve %15,65 olarak bulunmuştur (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Caco-2 ve Jurkat T hücrelerinin kokültürü sonrasında kontrol ve doz grupları ile gerçekleştirilen apoptoz analizi sonuçları. A) Akış sitometri görüntüsü B) % apoptoz oranları. $p < 0,0001$.

Benzer şekilde HT-29, Jurkat T hücrelerinde apoptozu indüklemiş ve apoptoz oranı %15 olarak bulunmuştur. IFN- γ varlığında *L. mesenteroides* ile muamele edilmiş ve aynı zamanda immünoterapi koşullarını taklit etmek için PD-L1 blokajı uygulanmış doz grubu hücrelerinde ise apoptoz anlamlı şekilde azalmış ve %5,1 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. HT-29 ve Jurkat T hücrelerinin kokültürü sonrasında kontrol ve doz grupları ile gerçekleştirilen apoptoz analizi sonuçları. A) Akış sitometri görüntüsü B) % apoptoz oranları. $p < 0,0001$.

5. TARTIŞMA

Bakteriler, mantarlar, virüsler ve diğer mikroorganizmalar, insan vücudu toplam hücresinin 1:1 oranını oluşturur; yapılan çalışmada bu oran 10:1'e indirildiğinde, mikroorganizmaların insan vücudu üzerindeki baskın etkisi ortadan kalkmamıştır (Sender ve ark. 2016). Mikrobiyomun çeşitliliğine ilişkin tahminlerin, insan genomunun tahminlerinin çok ötesinde olduğuna dikkat etmek önemlidir. İnsan genomunda bulunan 22.000 genin aksine, Meta-HIT grubu, yalnızca insan bağırsak mikrobiyomunda 3,3 milyon genin katalogunu ortaya çıkarmıştır (Usell ve ark. 2012). Bu nedenle, insan vücudundaki mikroorganizmaların rollerini anlamak önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. İnsan mikrobiyomunda disbiyoz birçok hastalığa yol açmaktadır (Carding ve ark. 2015). Disbiyozdan sonra faydalı bağırsak mikrobiyomunu zenginleştirmenin yollarından biri probiyotik ve prebiyotik ürünler kullanmaktır (Wang ve ark. 2021). Yeni probiyotikleri tanımlamak ve yararlı rollerini anlamak için birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar, birçok probiyotığın antikanserojenik etkiye sahip olduğunu ve çeşitli tedavilerin kanserin yan etkisini azaltma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Lu ve ark. 2021). Son çalışmalar, sağlıklı mikrobiyomun immünoterapiye yanıt verme ve bağışıklık sürveyansını artırmadaki rolüne işaret etmektedir (Shui ve ark. 2020).

PD-L1 blokaj antikoru, tümöre karşı T hücrelerinin etkinliğini arttırmak için PD-1 blokajı ile birlikte kullanılan immünoterapi yaklaşımlarından biridir. PD-1'in ligandı olan PD-L1'in aşırı ekspresyonunun, T hücrelerinin sitolitik aktivitesini bozduğu ve tümör oluşumunu ve tümör invazivliğini önemli ölçüde artırdığı bulunmuştur. Bu etkiler, anti-PD-L1 monoklonal antikorları kullanılarak anti-PD-L1 tedavisi ile de tersine çevrilebilmektedir. Bu durum, tümör bağışıklığına aracılık etmede rol oynayan PD-1 sinyal yolunun kanser tedavisindeki önemli bir yerinin olduğunu göstermektedir. Ek olarak, tümöre özgü T hücre klonlarının enjeksiyonu ve PD-1'in hücre dışı alanının DNA aşılması gibi PD-1 sinyal sistemini bozmak için bir dizi yöntem kullanıldığında, daha hızlı tümör eradikasyonu gösterilebilmektedir (Wu ve ark. 2019).

Mikrobiyom ve kanser ilişkisinin aydınlatılmasında *Bifidobacterium* spp ile anti-PD-1/PD-L1 arasındaki etkileşim öncü olmuştur (Sivan ve ark. 2015). Bu bakterilerin uyarılmasının anti-PD-L1'in etkinliğini de artırdığını bulunmuş, ayrıca

Bifidobacterium'un içinde bulunduğu sağlıklı kontrol grubundan fekal transplantasyonun tümör mikroçevresine sitotoksik T hücrelerinin infiltrasyonunu artırdığını gösterilmiştir. Sivan çalışmasından sonra, bağırsak mikrobiyomlarının anti-PD-1/PD-L1 sonuçları üzerindeki etkisini vurgulamak ve mikrobiyomun bağışıklık kontrol noktası blokaj yanıtları için bir belirteç olarak kullanılma olasılığını artırmak için birçok çalışma yapılmıştır (Peng ve ark. 2020).

Bu tez çalışması için ticari olarak satılan probiyotik gıda takviyelerinden *L. rhamnosus* ve *E. faecium*, kefirde *L. mesenteroides*, yoğurttan *Streptococcus* sp olmak üzere probiyotik bakteri izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin tanımlanması morfolojik ve biyokimyasal testlere ilaveten 16S rRNA dizilemesine göre yapılmıştır.

Laktik asit bakterilerinin en büyük cinsine *Lactobacillus* denir. Çoğunlukla probiyotik olarak veya fermente süt, ekşi hamur, et ve sebze yemeklerinin üretiminde kullanılmaktadırlar. *L. rhamnosus*, Firmicutes filumunu ve *Lactobacillus* cinsini içeren Lactobacillaceae familyasındandır. Bu bakteriler gram pozitif, çubuk şeklinde laktobasillerdir. Fermantasyon son ürünü olarak laktik asit üretmektedirler Karmaşık beslenme gereksinimleri arasında karbonhidratlar, yağ asitleri veya yağ asidi esterleri, tuzlar, nükleik asit türevleri ve vitaminler bulunmaktadır. Bugüne kadar resmi olarak bildirilen tüm türlerin DNA-DNA homolojisi ve 16S rRNA dizilimi gibi teknikler kullanılarak yapılan genetik analizleri sonucunda çok sayıda laktobasil yeniden sınıflandırılmıştır (Angelis & Gobetti, 2016). *L. rhamnosus*, *lactobacillus* cinsi için seçici besiyeri olan MRSA besiyeri üzerinde büyütülmüştür, çünkü bu besiyeri polisorbitat 80 içermektedir, sodyum asetat ve amonyum sitrat metabolizması için gerekli yağ asitlerini sağlar, gram-negatif bakteri ve mantarları engellemektedir. *L. rhamnosus*, hem katalaz hem de aktif elektron taşıma zincirinden yoksun olduğundan, oksidaz ve katalaz testleri negatif olmuştur (Zotta ve ark. 2014). 16S rRNA gen dizilimi, BLAST sonuçları, referans *L. rhamnosus* NCBI veri tabanı ile %98,64'ünün eşleştiğini göstermiştir.

Enterococcus spp. gram pozitif, fakültatif, anaerobik koklar olarak da bilinirler, ağızda ve vajinada da bulunmaktadır. Enterokoklar hem insanlarda hem de hayvanlarda gastrointestinal sistemi kolonize eden ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde rol alan kommensallerdir. Uzun yıllardır enterokok suşları,

bağırsak disbiyozu ve diğer bozuklukların tedavisi için takviye olarak önerilmiştir. Öte yandan, çoklu virülans faktörlerinin kolayca kazanılması ve farklı antibiyotik türlerine karşı direnç kazanması, *Enterococcus* suşlarının probiyotik olarak kullanılması noktasında tartışma yaratmıştır. Firmicutes filumunu *E. faecium* takip etmekte ve geniş bir tür yelpazesine sahip olan Enterococcaceae familyası enterokoklardan oluşmaktadır (Krawczyk ve ark. 2021). Çalışmamızda MRSA üzerinde üreyen *E. faecium*, büyümek için lactobacillus genleri gibi özel gereksinimlere ihtiyaç duymadığından NA üzerinde beyaz küçük yuvarlak koloni oluşturmuştur. *E. faecium* gram pozitif ve kok şeklinde görünmektedir. Bu test sitokrom c için sentetik bir elektron donörü olarak tetra-metil-p-fenilendiamin dihidroklorür içerdiğinden oksidaz testi negatiftir, ancak renk değişmemiştir. Ek olarak, *E. faecium* katalaz enzimi için negatiftir. 16S rRNA gen dizilimi açısından, bu bakteri NCBI veri tabanında *E. faecium* ile %97,83 eşleşmeye sahiptir.

L. mesenteroides gram pozitif, heterofermentatif ve kokoid benzeri bir forma sahip olup Firmicutes filumundandır. Bu bakteriler çoğunlukla şarap, sebze, meyve, tahıl, balık, et ve süt ürünlerinde bulunmaktadır. Hareketsiz, spor oluşturmayan, anaerobik fakültatifler ve tipik olarak çiftler veya kısa zincirler halinde bulunurlar (Paula ve ark. 2015). Sonuçlarımızda *L. mesenteroides*, dekstran oluşturması nedeniyle %10 sakaroz oluşturan dışbükey, pürüzsüz, yarı saydam koloniler içeren besiyerlerinde büyütülmüştür (Dimic, 2006). Ortamın asitliği gram negatifin büyümesini engellemektedir. Ek olarak, bu bakterinin katalaz ve sitokrom c'den yoksun olması nedeniye oksidaz ve katalaz testleri için negatiftir. Son olarak, 16S rRNA gen dizilimi ile ilgili olarak BLAST sonuçları, bu bakterinin NCBI veri tabanındaki referans *L. mesenteroides* ile %98,50 oranında uyumlu olduğunu göstermiştir.

Gıda fermentasyonlarında, özellikle yoğurt üretiminde sıklıkla kullanılan tek streptokok türü, *Streptococcus thermophilus*'tur. Binlerce yıldır *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus yoğurt yapmak için, *S. thermophilus*, belirli peynirler ve fermente süt de dahil olmak üzere çeşitli ticari ve geleneksel süt ürünlerinde de kullanılmıştır. *S. thermophilus*'un antioksidan aktivite, bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesi, belirli patojenlerin baskılanması gibi çeşitli probiyotik faydaları olduğu keşfedilmiştir (Cui ve ark. 2016). Sonuçlarımızda bu bakteri, ST seçici ortam üzerinde 48°C'de ticari yoğurttan izole edilmiştir. Morfolojik olarak sarı, küçük,

yuvarlak koloniler oluşturmuştur. Gram pozitif olan bu bakteri mikroskop altında küre şeklinde görselleştirmiştir. Bu bakteriler ayrıca, stafilokok cinsinden ayırt etmek için ideal bir test olan katalazdan yoksundur. Ve pozitif *Neisseria gonorrhoeae* ile negatif *Streptococcus* cinsi arasında ayırım yapan sitokrom c eksikliğine sahiptir. *S. thermophilus*'u *S. salivarius* ve *S. vestibularis*'ten tanımlamak için 16S RNA dizilimi, 16S RNA'nın bu türler arasında oldukça benzer olması nedeniyle ideal bir yöntem değildir. Bu nedenle *S. thermophilus*'u belirlemek için başka yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Saito ve ark., 2020).

In vitro araştırmaların temel ilkeleri canlılık testleridir. Hücrenin moleküler ağları daha sonra temel canlılık testlerinden toplanan bilgiler kullanılarak ortaya çıkarılmaktadır. Sonuç olarak, klinik öncesi onkolojik araştırmaların birincil odak noktası, belirli bir kimyasalın kültürlenmiş hücreler üzerindeki antiproliferatif etkilerini değerlendirmektir. Hücre kültürü araştırmalarında sıklıkla kullanılan XTT yöntemi mitokondriyal dehidrojenazların aktivitesine bağlı olarak canlı hücrelerin aktivitesini belirlemektedir (Noel ve ark. 1994).

Genel olarak, 24 saatlik inkübasyondan sonraki sonuçlarımızda HK bakterileri hücre sitotoksitesini önemli ölçüde etkilememiştir. Tam tersi olarak HK *L. mesenteroides*'de hücre canlılığı her iki hücrede de doza bağlı şekilde arttırmıştır. CFS açısından, CFS kullanılan tüm bakterileri kullanılmaktadır ve 24 saatlik inkübasyondan sonra her iki hücre hattında hücre sitotoksitesini indüklemiştir. Öte yandan, tüm canlı bakteriler, hücelere bağlı olarak sitotoksiteyi indklediler. Değerlen canlılık yüzdesi bakteri türlerine bağlıdır. nceki araştırmalar, ısıyla öldürülen probiyotikler, peptidoglikanlar, ekzopolisakkarit zleri, hücresel zler ve diğer hücresel bileşenler gibi probiyotik bakterilerin de kanser önleyici özelliklere sahip olabileceğini göstermiştir (Dehghani ve ark. 2021). Bir alışmada HK, CFS ve canlı *L. rhamnosus*, proapoptotik p38/mitojenle aktive olan protein kinazın tümör nekroz faktörü tarafından aktive edilmesini önlediği gösterilmiştir (Yan & Polk 2002). Bu, probiyotik mikroplar ve epitel arasında bağırsak hücrelerinin hayatta kalmasını sağlayan mekanizmalar olduğu gösterilmiştir (Karczewski ve ark. 2010)

Dehghni ve ark. kullanılan tüm konsantrasyonlarda bakteri spernatantının HT-29'da hücre ölümünü indüklediğini göstermiştir (Dehghani ve ark. 2021). Aynı şekilde, Sharma çalışmasına göre CFS, HT-29 ve Caco-2'de hücre sitotoksitesini

indüklemektedir (Sharma ve ark. 2020). Başka bir çalışmada, *E. faecium*'dan enterosin 12a ekstraktının birçok kanser hücresi üzerinde antikanser etkisi olduğu bulunmuştur (Sharma ve ark. 2021). Ve *L. mesenteroides* kültürlerinden ekstraksiyonlar, HT-29 hücrelerinin çoğalmasını engelleyen NF-kB alt birimi üzerinde engelleyici etkiye sahiptir (Vahed ve ark. 2017). Ayrıca Li, *Streptococcus*'un β -Galaktosidaz üretmeye kadar antikanserojenik özelliklere sahip olduğunu bulmuştur (Li ve ark. 2021).

Bir bakterinin sitotoksik etkisi, canlı hücrelerde ve HK bakterilerinde bulunanlardan farklı makromoleküllerden kaynaklanabilir. Örneğin, probiyotik bakteriler, antikanserojenik materyaller olarak iyi bilinen SCFA üretir (Nakkarach ve ark. 2021). Doz konsantrasyonları, inkübasyon süresi ve bakteri suşları probiyotik etkisi ile örtüşen en önemli faktörlerdir.

Adezyon, bakteri yüzeyinin bileşenleri ile konakçı hücre yüzeyinin karşılık gelen yapısı arasında özel bir temas olan sindirimdeki bakteri kolonizasyonu için gerekli bir aşamadır (Du ve ark. 2022). Çoğu zaman yapışma daha fazla patojenik etkiye işaret etmektedir (Letourneau ve ark. 2011).

Probiyotik bakterilerin konakçıya yapışma kapasitesi her zaman bir sağlık avantajını garanti etmese de, bağırsak mukozasına bağlanmaları, potansiyel olarak konakçı hücre bağlanma bölgeleri için rekabet ederek patojenlere karşı bir bariyer görevi görebilir. Ek olarak, probiyotik bakterilerin yapışma kapasitesi, konakçı ile etkileşime girme şanslarını artırabilir, kısa kolonizasyona yol açabilir ve bağırsakta amaçlanan olumlu etkileri üretmeleri için gereken süreyi uzatabilir (Monteagudo-Mera ve ark. 2019).

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, bakteri türleri arasında yapışma yüzdesinde farklılık olduğu gösterilmiştir. *E. faecium* daha düşük yapışma yüzdesine sahipken, *B. licheniformis* en yüksek yapışma oranına sahiptir. *L. rhamnosus*'ta görülenler gibi pili gibi birçok nedene ve çeşitli yüzey bileşenlerine (karbonhidrat, protein ve lipid) geri yapışma yüzdesindeki fark, LAB'nin epitel hücrelerine yapışma kabiliyetinde rol oynamaktadır (Martino, 2018). Bovgoic çalışmasında, Caco-2'ye *Lactobacillus gasseri* yapışmasının pH değerine bağlı olarak %7,8 ila %1,9 arasında değiştiğini bulmuştur (Bogovič Matijašić ve ark. 2003). Memeli hücrelerinin özelliklerine ek

olarak, SR-BI gibi lipoprotein için reseptör görevi gören bazı proteinler mevcut olup, bunlar bakteriyel yapışmayı arttırmaktadır (Vishnyakova ve ark. 2006). Hücrel proteoglikanlarda bulunan karbonhidrat alt birimlerinin sülfatlaşma düzeyi ve özgüllüğü de bakteriyel adhezyonda önemli bir role sahiptir (Noel ve ark. 1994).

Çalışmamızın sonraki bölümünde *L. mesenteroides*'in canlı hücrelerine odaklanıldı çünkü literatürde bu bakteri ile ilgili sınırlı çalışma bulunmaktaydı (Paula ve ark. 2015). Probiyotik bakterilerin bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerine ilişkin daha önceki araştırmaların çoğu, canlı hücrelerin en güçlü bağışıklık sistemi modüle edici etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Zheng ve ark. 2020), çünkü bakteri ve onun tüm üretilen bileşenleri aktif olarak etkileşimdedir. Bu durum, bakteriyel canlı hücrelerin yanı sıra, insan hücreleri ve probiyotik bakteriler arasındaki *in vivo* etkileşimi de yansıtacaktır.

Çalışmamızda, probiyotik *L. mesenteroides*'in kolon kanseri bağırsak Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde model sistemler olarak PD-L1 ekspresyonunu düzenleme potansiyeline sahip olup olmadığı araştırıldı. Aynı şekilde Groeger ve ark, canlı *Porphyromonas gingivalis*'in prostat kanserinde PD-L1'i yukarı regüle ettiğini bulmuştur (Groeger ve ark 2022).

Canlı *L. mesenteroides*'in, Caco-2'de 6 ve 12 saatlik inkübasyonda PD-L1 gen ekspresyonunu indüklediği, 24 saatlik inkübasyonun ise PD-L1 ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur. Proapoptotik gen belirteçlerinin artmasıyla PD-L1 gen ekspresyon bileşiğinin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Öte yandan, BCL-2 gen belirteçlerinin önemli ölçüde artmasıyla birlikte PD-L1 ekspresyonu, *L. mesenteroides*'in HT-29 ile 24 saat inkübasyonundan sonra önemli ölçüde artmıştır. Aynı şekilde Lee in çalışmada muamele edilen hücrelerde kontrole yakın CASP3 ve CASP7 aktivasyonu nedeniyle PD-L1 proteini ve mRNA'sının azaldığı Probiyotik bakteriler, T hücreleri gibi bağışıklık hücrelerini IFN- γ salgılamaya teşvik etmektedir (Kekkonen ve ark. 2008). Çalışmamızda *L. mesenteroides*'in Jurkat T hücrelerinden IFN- γ üretimini indüklediğini tespit edilmektedir (Şekil 4.11). IFN- γ , PD-L1'in *in vivo* düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu nedenle, *in vivo* koşulları taklit etmek için ileri deneylerde IFN- γ eklenmiştir.

PD-L1'in mRNA seviyelerinin IFN- γ varlığında artırır. Ancak Caco-2'de uygun IFN- γ dozunun belirlenmesi açısından, 10 ng/ml PD-L1 artışı indüklenirken, 50 ng/ml PD-L1 kontrole göre önemli ölçüde azalmıştır. Bu, IFN- γ 'nin doza bağlı bir şekilde hücre ölümünü indüklediği birçok çalışma gösterilmiştir (Rakshit ve ark. 2014, Veldman ve ark. 1998).

10 veya 50 ng/ml IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* ya da sadece 10 veya 50 ng/ml IFN- γ ile muamele edilmiştir. Buna göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 10 ng/ml IFN- γ PD-L1 gen ekspresyonunu 2,14 kat anlamlı şekilde artırırken, 50 ng/ml IFN- γ PD-L1 gen ekspresyonunu 0,27 kat anlamlı şekilde azaltmıştır. Bununla birlikte tek başına canlı *L. mesenteroides* uygulaması kontrol grubuna göre PD-L1 gen ekspresyonunu 1,7 kat anlamlı şekilde artırırken, bakterinin 10 ng/ml IFN- γ varlığında uygulanması bu genin ekspresyonunu kontrole kıyasla 6,13 kat anlamlı şekilde artırmıştır. 50 ng/ml IFN- γ varlığında canlı *L. mesenteroides* uygulaması ise kontrol grubuna göre PD-L1 gen ekspresyonunu 0,74 kat anlamlı şekilde azaltmıştır

Çalışmamızda, *L. mesenteroides* ile kolon kanseri hücreleri arasındaki etkileşim sırasında PD-L1'in aktive olması muhtemel yolları araştırmayı amaçlanmıştır.

Genellikle, toll benzeri reseptörler (TLR'ler) ve Nod benzeri reseptörler (NLR'ler), patojenik istilaya veya doku hasarına hızlı tepkiler sunarlar. Bu sensörlerin aktivasyonu, doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin olgunlaşmasına ve adaptif bağışıklık sisteminin aktivasyonuna yol açmaktadır (Fukata ve ark. 2009). Genellikle bu yolların aktivasyonu, PD-L1'i düzenleyen NF-KB'yi aktive etmektedir (Antonangeli ve ark. 2020). *L. mesenteroides* artı IFN- γ 'nın, Caco-2'de TLR2 ve MYD88 ve HT-29'da TLR-2, TRIF ve TIRAP ile temsil edilen TLR'lerin aktivasyonunu indüklediği bulunmuştur. Her iki hücre hattı NOD2'de NOD2 tarafından temsil edilen NOD'ların aktivasyonu, CARD9'u aktive ederken, burada ERK1'i aktive etmektedir (Liu ve ark. 2022). Genel olarak, her iki yolun aktivasyonu, sadece HT-29'da hem hücrelerde hem de NF-KB'de önemli ölçüde ERK1'i aktive etmeye yol açmaktadır. Hem ERK1/2 hem de NF- κ B, PD-L1'i yukarı doğru düzenlemektedir. Literatüre uygun olarak, çalışmamızda bulduğumuz gibi

ERK1 ve NF- κ B ifadesinin PD-L1'i (Jiang ve ark. 2019, Antonangeli ve ark. 2020) yukarı regüle ettiğini bulunmuştur.

Otofaji, hasarlı veya yaşlanan organelleri, yanlış katlanmış veya mutant proteinleri ve diğer anormallikleri bir çift zarlı bir kesecik olan otofagozomda toplamayı amaçlayan orkestrasyonlu bir süreçtir; Otofagozomlar ve lizozomlar kombinasyonu ile otolizozomlar üretir. Bileşenleri daha sonra otolizozomların içeriğini parçalamak için kullanılabilir (Gao & Chen, 2021). Çalışmamızda, akciğerlerde PD-L1 ekspresyonunun dramatik olarak arttığını, otofaji ekspresyon seviyelerinin düştüğünü bulan Jiaming çalışmasında da benzer şekilde otofaji belirteç genlerinin önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Ayrıca, otofaji agonistlerinin ve inhibitörlerinin, sırasıyla LPS tarafından indüklenen PD-L1 ekspresyonunu artırma ve azaltma yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur (Jiamin ve ark. 2019).

Hippo-Yes ile ilişkili protein (YAP-1) yolu, doku homeostazını ve organ boyutunu düzenlemektedir. Bu yol evrimsel olarak korunmuştur. Hippo yolunun iki birincil transkripsiyon koaktivatörü YAP ve PDZ-bağlama motifidir (TAZ, bazen transkripsiyon düzenleyici 1 olarak adlandırılır). Yukarı akış kinaz, sitoskeletal proteinlerle ilişkilerini artıran, onları sitoplazmada tutan ve transkripsiyonel aktivasyon için çekirdeğe girişlerini engelleyen MST1/2-LATS1/2 fosforilatı YAP/TAZ'ı basamaklarıdır (Wang ve ark. 2020). Yap-1 ve Taz gen ekspresyonunun GPCR41/42 yoluyla upregüle edildiği bulunmuştur. GPCR41/42 reseptörler, kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar) tarafından aktive edilir ve hippo yolunun aktivasyonu, *L. mesenteroides* muamelesinden sonra PD-L1'i yukarı regüle edebilmektedir.

Son zamanlarda, immünoterapi tedavisi sırasında bakterilerin özellikle probiyotiklerin rolünü anlamaya yönelik çalışmalar yapılmıştır (Routy ve ark. 2018). Örneğin, Wang ve arkadaşları, *Bacillus calmette-guérin*'in mesane kanserinde PD-L1 gen ekspresyonunu indüklediğini bulmuştur. Bakteriler ve anti-PD-L1 blokajları arasındaki kombinasyon, CD8⁺'ı simüle ederek ve miyeloid türevli baskılayıcı hücreleri (MDSC'ler) inhibe ederek mesane kanserine karşı bağışıklık tepkisini indüklemektedir. Bu da *Bacillus calmette-guérin*'i immünoterapi sırasında olası bir adjuvan yapmaktadır (Wang ve ark. 2018). Aynı şekilde, *Fusobacterium nucleatum*'un CRC'de PD-L1 ekspresyonunu desteklediğini ve tümör infiltrate edici lenfositlerde (TIL'ler) IFN- γ ve CD8⁺ konsantrasyonunu ve ayrıca PD-L1 blokajına

karşı artan tümör duyarlılığını artırdığını bulmuştur (Gao ve Chen. 2021). Aynı şekilde çalışmamızda, *L. mesenteroides* varlığının Jurkat T hücrelerini aktive ettiği ve sitokin; INF- γ ve IL-2'üretimini arttırdığı bulunmuştur. Çalışmamızda, Aktive Jurkat T hücreleri ile kolon kanseri ko-kültürünün Jurkat T hücrelerinde apoptozu indüklediğini ve INF- γ ve IL-2'yi azalttığını bulunmuştur. Öte yandan, Jurkat T *L. mesenteroides* ve anti-PD-L1 blokajı ile ko-kültürü, Jurkat T hücrelerinde apoptozu azaltmıştır ve ayrıca INF- γ ve IL-2 üretimini indüklenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, mevcut bakterinin blokaj PD-L1 antikör immün terapisi sırasında bir adjuvan ajan olarak koruyucu tedavi olarak kullanılabileceği olasılığını göstermektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Probiyotiklerin sağlık üzerine etkilerinin toplum tarafından anlaşılması ticari preparatların kullanımını dünyada ve ülkemizde yaygınlaştırmıştır. Ancak probiyotiklerin kanserin önlenmesi ve tedavisinde kullanılabilmesi için etki mekanizmalarını somut şekilde açıklayan ve olumlu sonuçları klinik denemelerle ispatlanmış birçok çalışmanın yapılması gerekmektedir.

Probiyotikler ve fermente süt ürünleri, son yıllarda gıda sektörü, sağlık hizmetleri, endüstri ve eczacılık dahil olmak üzere çeşitli disiplinlerdeki bilim insanlarından büyük ilgi görmüştür.

Fermente gıdalarda kullanılan probiyotikler tarihsel olarak alerji, hipertansiyon ve mide rahatsızlıkları gibi çok çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kullanılmıştır. Kolorektal kanser, meme kanseri, malign T lenfositleri ve akciğer karsinomu gibi çeşitli hastalıklarda anti-tümör, anti-çoğalma ve apoptoz indükleyicisi olarak probiyotiklerin kullanıldığı çok sayıda araştırma cesaret verici bulgular üretmiştir. Böylece probiyotikler, en az olumsuz etkiyle en etkili tedavi olabilir. Yapılan çalışmadan elde edilen bulgular özetle şunlardır:

Farmasötik ve kefir ürünlerinden izole edilen probiyotik bakterilerin kolon kanseri hücreleri üzerinde farklı etkileri vardır.

1. Tüm probiyotik bakterilerin CFS'si hücre sitotoksitesini indüklemiştir.
2. Canlı *L. mesenteroides*, her iki kolon kanseri hücre hattında PD-L1 genini ve protein ekspresyonunu indüklemiştir.
3. Canlı *L. mesenteroides*, Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde PD-L1 mRNA seviyesini artırırken HT-29 hücrelerinde PD-L1 protein seviyesini de artırmıştır.
4. Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde *L. mesenteroides* tarafından PD-L1'in regülasyonu, TLR, NOD ve Hippo yolları ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerini artırırken otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesini azaltmıştır.
5. Canlı *L. mesenteroides*, Jurkat T hücrelerini IFN- γ ve IL-2'nin salgılanmasına neden olmuş, bu durum mevcut bakterinin T hücrelerini aktive etme yeteneğini göstermiştir.

6. Canlı *L. mesenteroides*, kontrole kıyasla Jurkat T hücrelerinin aktivitesi ve canlılığını artırmıştır, bu da bakterinin kansere karşı bağışıklığı modüle etme yeteneğini göstermektedir.
7. İki hücre hattında PD-L1 ile ilişkili sonuçlar arasındaki farklılıklar, PD-L1 üzerinden yürütülecek immünoterapötik yaklaşımların kişiye özgü tedavi şeklinde olması gerektiğini ortaya koymaktadır.



7. KAYNAKLAR

- Altveş S, Yildiz HK, Vural HC. Interaction of the microbiota with the human body in health and diseases. *Biosci Microbiota, Food Heal*. 2020;39(2):23-32.
- Antonangeli F, Natalini A, Garassino MC, Sica A, Santoni A, Di Rosa F. Regulation of PD-L1 Expression by NF- κ B in Cancer. *Front Immunol*. 2020;11: 584626
- Appaiahgari MB, Vratı S. Adenoviruses as gene/vaccine delivery vectors: promises and pitfalls. 2015;15(3):337-51.
- Bessell CA, Isser A, Havel JJ, Lee S, Bell DR, et al. Commensal bacteria stimulate antitumor responses via T cell cross-reactivity. *JCI Insight*. 2020;5(8): e135597
- Bogovič Matijašić B, Narat M, Zorič M. Adhesion of Two *Lactobacillus gasseri* Probiotic Strains on Caco-2 Cells. *Food Technol Biotechnol*. 2003;41(1):83-88.
- Breakstone R. Colon cancer and immunotherapy—can we go beyond microsatellite instability? *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2021; 6:12.
- Budczies J, Denkert C, Györffy B, Schirmacher P, Stenzinger A. Chromosome 9p copy number gains involving PD-L1 are associated with a specific proliferation and immune-modulating gene expression program active across major cancer types. *BMC Med Genomics*. 2017;10(1):74.
- Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis*. 2015; 26:26191
- Cercek A, Lumish M, Sinopoli J, et al. PD-1 Blockade in Mismatch Repair–Deficient, Locally Advanced Rectal Cancer. *N Engl J Med*. 2022;386(25):2363-76.
- Chang SH, Patel N, Du M, Liang PS. Trends in Early-onset vs Late-onset Colorectal Cancer Incidence by Race/Ethnicity in the United States Cancer Statistics Database. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2022;20(6): e1365-77.
- Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(5):336-47.
- Crews DW, Dombroski JA, King MR. Prophylactic Cancer Vaccines Engineered to Elicit Specific Adaptive Immune Response. *Front Oncol*. 2021; 11:994.
- Cubillos-Zapata C, Avendaño-Ortiz J, Hernandez-Jimenez E, et al. Hypoxia-induced PD-L1/PD-1 crosstalk impairs T-cell function in sleep apnoea. *Eur Respir J*. 2017;50(4): 1700833.
- Cui Y, Xu T, Qu X, Hu T, Jiang X, Zhao C. New Insights into Various Production Characteristics of *Streptococcus thermophilus* Strains. *Int J Mol Sci*. 2016;17(10):1701.
- Davar D, Dzutsev AK, McCulloch JA, Rodrigues RR, Chauvin JM et al. Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. *Science*. 2021;371(6529):595-602.
- De Angelis and M. Gobbetti. Lactic Acid bacteria – *Lactobacillus* spp.: General Characteristics, *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2011, 78–90.
- de Paula AT, Jeronymo-Ceneviva AB, Todorov SD, Penna ALB. The Two Faces of *Leuconostoc mesenteroides* in Food Systems. *Food Reviews International*. 2015; 31(2):147-71.
- Dehghani N, Tafvizi F, Jafari P. Cell cycle arrest and anti-cancer potential of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* against HT-29 cancer cells. *Bioimpacts*. 2021;11(4):245.
- Dimic G. Characteristics of the *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strains from fresh vegetables. *Acta Period Technol*. 2006;192(37):3-11.
- Du Y, Li H, Shao J, Wu T, Xu W, et al. Adhesion and Colonization of the Probiotic *Lactobacillus plantarum* HC-2 in the Intestine of *Litopenaeus Vannamei* Are Associated with Bacterial Surface Proteins. *Front Microbiol*. 2022; 13:878874.
- Fessler J, Matson V, Gajewski TF. Exploring the emerging role of the microbiome in cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):1-15.
- Fukata M, Vamadevan AS, Abreu MT. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin Immunol*. 2009;21(4):242-53.

- Gao G, Ma T, Zhang T, Jin H, Li Y, et al. Adjunctive Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Probio-M9 Administration Enhances the Effect of Anti-PD-1 Antitumor Therapy via Restoring Antibiotic-Disrupted Gut Microbiota. *Front Immunol.* 2021;12: 772532
- Gao L, Chen Y. Autophagy controls programmed death-ligand 1 expression on cancer cells (Review). *Biomed Reports.* 2021;15(4):1-9.
- Granados-Romero JJ, Valderrama-Treviño AI, Contreras-Flores EH, Barrera-Mera B, Enríquez MH, et al. Colorectal cancer: a review. *Int J Res Med Sci.* 2017;5(11):4667.
- Griffin ME, Espinosa J, Becker JL, Luo JD, Carroll TS, et al. Enterococcus peptidoglycan remodeling promotes checkpoint inhibitor cancer immunotherapy. *Science.* 2021;373(6558):1040-46.
- Groeger S, Wu F, Wagenlehner F, Dansranjav T, Ruf S, et al. PD-L1 Up-Regulation in Prostate Cancer Cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022; 12:935806.
- Guo ZS. The 2018 Nobel Prize in medicine goes to cancer immunotherapy (editorial for BMC cancer). *BMC Cancer.* 2018;18(1):1-2.
- Hong SH. Hippo pathway as another oncogenic mediator to promote immune evasion by PD-L1 signaling. *J Thorac Dis.* 2019;11(3): S318-21.
- Huang C, Li M, Liu B, ZhuH, Dai Q, et al. Relating Gut Microbiome and Its Modulating Factors to Immunotherapy in Solid Tumors: A Systematic Review. *Front Oncol.* 2021; 11:760.
- Hudson K, Cross N, Jordan-Mahy N, Leyland R. The Extrinsic and Intrinsic Roles of PD-L1 and Its Receptor PD-1: Implications for Immunotherapy Treatment. *Front Immunol.* 2020; 11:2362.
- Jiamin H, Ran S, Xinxin Q, Lu L, Yunxi Y, et al. Effect of autophagy on expression of neutrophil programmed death ligand-1 in mice with sepsis. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2019;31(9):1091-6.
- Jiang L, Guo F, Liu X, Li X, Qin Q et al. Continuous targeted kinase inhibitors treatment induces upregulation of PD-L1 in resistant NSCLC. *Sci Reports.* 2019;9(1):3705.
- Jin Y, Dong H, Xia L, Yang Y, Zhu Y, et al. The Diversity of Gut Microbiome is Associated with Favorable Responses to Anti-Programmed Death 1 Immunotherapy in Chinese Patients With NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2019;14(8):1378-89.
- Karczewski J, Troost FJ, Konings I, Dekker J, Kleerebezem M, et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298(6):851-9.
- Katsaounou K, Nicolaou E, Vogazianos P, Brown C, Stavrou M, et al. Colon Cancer: From Epidemiology to Prevention. *Metab.* 2022;12(6):499.
- Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annurev.immuno.* 2008; 26:677-704.
- Kekkonen RA, Kajasto E, Miettinen M, Veckman V, Korpela R, et al. Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* and *Streptococcus thermophilus* induce IL-12 and IFN- γ production. *World J Gastroenterol.* 2008;14(8):1192.
- Krawczyk B, Wityk P, Gałęcka M, Michalik M. The Many Faces of Enterococcus spp.—Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. *Microorg* 2021;9(9):1900.
- Łagowska K, Bajerska J, Kamiński S, Bo' C Del. Effects of Probiotics Supplementation on Gastrointestinal Symptoms in Athletes: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Nutr.* 2022;14(13):2645.
- Lee CS, Bishop ES, Zhang R, Yu X, Farina EM, et al. Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes Dis.* 2017;4(2):43-63.
- Lee SA, Wang Y, Liu F, Riordan SM, Liu L, et al. *Escherichia coli* K12 Upregulates Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Expression in Gamma Interferon-Sensitized Intestinal Epithelial Cells via the NF- κ B Pathway. *Infect Immun.* 2021;89(1): e00618-20
- Letourneau J, Levesque C, Berthiaume F, Jacques M, Mourez M. In Vitro Assay of Bacterial Adhesion onto Mammalian Epithelial Cells. *J Vis Exp.* 2011;16 (51):2783.

- Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):834-41.
- Li L, Zhang Q, Lian K. Circular RNA circ_0000284 plays an oncogenic role in the progression of non-small cell lung cancer through the miR-377-3p-mediated PD-L1 promotion. *Cancer Cell Int.* 2020;20(1):1-11.
- Li Q, Hu W, Liu WX, Zhao LY, Huang D, et al. *Streptococcus thermophilus* Inhibits Colorectal Tumorigenesis Through Secreting β -Galactosidase. *Gastroenterology.* 2021;160(4):1179-93.
- Liu J, Fu M, Wang M, Wan D, Wei Y, et al. Cancer vaccines as promising immuno-therapeutics: platforms and current progress. *J Hematol Oncol.* 2022;15(1):1-26.
- Liu X, Jiang B, Hao H, Liu Z. CARD9 Signaling, Inflammation, and Diseases. *Front Immunol.* 2022; 13:1350.
- Lu C, Paschall AV, Shi H, Savage N, Waller Jet al. The MLL1-H3K4me3 Axis-Mediated PD-L1 Expression and Pancreatic Cancer Immune Evasion. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109(6): 283.
- Lu K, Dong S, Wu X, Jin R, Chen H. Probiotics in Cancer. *Front Oncol.* 2021; 11:408.
- Lu Y, Yuan X, Wang M, He Z, Li H, et al. Gut microbiota influence immunotherapy responses: mechanisms and therapeutic strategies. *J Hematol Oncol.* 2022;15(1):47.
- Malonis RJ, Lai JR, Vergnolle O. Peptide-Based Vaccines: Current Progress and Future Challenges. *Chem Rev.* 2020;120(6):3210.
- Martino P Di. Bacterial adherence: much more than a bond. *AIMS Microbiol.* 2018;4(3):563.
- McCarthy EF. The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *Iowa Orthop J.* 2006; 26:154.
- Monteagudo-Mera A, Rastall RA, Gibson GR, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103(16):6463.
- Mu L, Long Y, Yang C, Jin L, Tao H, et al. The IDH1 Mutation-Induced Oncometabolite, 2-Hydroxyglutarate, May Affect DNA Methylation and Expression of PD-L1 in Gliomas. *Front Mol Neurosci.* 2018; 11:82
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nat.* 2012;487(7407):330-7.
- Nakkarach A, Foo HL, Song AAL, Mutalib NEA, Nitisinprasert S, et al. Anti-cancer and anti-inflammatory effects elicited by short chain fatty acids produced by *Escherichia coli* isolated from healthy human gut microbiota. *Microb Cell Fact.* 2021;20(1):1-17.
- Noel GJ, Love DC, Mosser DM. High-molecular-weight proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate bacterial adhesion to cellular proteoglycans. *Infect Immun.* 1994;62(9):4028-33.
- Pankratz VS, Kosich M, Edwardson N, English K, Adsul P, et al. American Indian/Alaska Native and black colon cancer patients have poorer cause-specific survival based on disease stage and anatomic site of diagnosis. *Cancer Epidemiol.* 2022; 80:102229.
- Peng Z, Cheng S, Kou Y, Wang Z, Jin R, et al. The Gut microbiome is associated with clinical response to Anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in gastrointestinal cancer. *Cancer Immunol Res.* 2020;8(10):1251-61.
- Pinto C, Giordano DM, Maroni L, Marzioni M. Role of inflammation and proinflammatory cytokines in cholangiocyte pathophysiology. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2018;1864(4):1270-8.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nat.* 2010;464(7285):59-65.
- Rakshit S, Chandrasekar BS, Saha B, Victor ES, Majumdar S, et al. Interferon-gamma induced cell death: Regulation and contributions of nitric oxide, cJun N-terminal kinase, reactive oxygen species and peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2014;1843(11):2645-61.
- Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterol Rev Gastroenterol.* 2019;14(2):89-103.

- Roemer MG, Advani RH, Ligon AH, Natkunam Y, Redd RA, et al. PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. *J Clin Oncol*. 2016;34(23):2690.
- Rouanne M, Roumiguié M, Houédé N, Masson-Lecomte A, Colin P, et al. Development of immunotherapy in bladder cancer: Present and future on targeting PD(L)1 and CTLA-4 pathways. *World J Urol*. 2018;36(11):1727-40.
- Saito Y, Tonouchi A, Harada Y, Ogino R, Toba T. Isolation of *Streptococcus thermophilus* Strains from Plants in Japan and Their Application to Milk Fermentation. *Food Sci Technol Res*. 2020;26(1):1-8.
- Sarshekeh AM, Overman MJ, Kopetz S. Nivolumab in the treatment of microsatellite instability high metastatic colorectal cancer. *Futur Oncol*. 2018;14(18):1869.
- Saus E, Iraola-Guzmán S, Willis JR, Brunet-Vega A, Gabaldón T. Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential. *Mol Aspects Med*. 2019; 69:93-106.
- Schuster M, Nechansky A, Loibner H, Kircheis R. Cancer immunotherapy. *Biotechnol J*. 2006;1(2):138-47.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*. 2016;14(8): e1002533
- Sharma M, Chandel D, Shukla G. Antigenotoxicity and Cytotoxic Potentials of Metabiotics Extracted from Isolated Probiotic, *Lactobacillus rhamnosus* MD 14 on Caco-2 and HT-29 Human Colon Cancer Cells. *Nutr Cancer*. 2020;72(1):110-19.
- Sharma P, Kaur S, Chadha BS, Kaur R, Kaur M, Kaur S. Anticancer and antimicrobial potential of enterocin 12a from *Enterococcus faecium*. *BMC Microbiol*. 2021;21(1):1-14.
- Shen X, Zhang L, Li J, Li Y, Wang Y, Xu ZX. Recent findings in the regulation of programmed death ligand 1 expression. *Front Immunol*. 2019; 10:1-25.
- Shui L, Yang X, Li J, Yi C, Sun Q, Zhu H. Gut Microbiome as a Potential Factor for Modulating Resistance to Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2020; 10:2989.
- Shurin MR, Umansky V. The Journal of Clinical Investigation Cross-talk between HIF and PD-1/PD-L1 pathways in carcinogenesis and therapy Hypoxia-inducible factors in cancer. *J Clin Invest*. 2022;132(9): e159473
- Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*. 2015;350(6264):1084-9.
- Skafi N, Fayyad-Kazan M, Badran B. Immunomodulatory role for MicroRNAs: Regulation of PD-1/PD-L1 and CTLA-4 immune checkpoints expression. *Gene*. 2020; 754:144888.
- Tao LH, Zhou XR, Li FC, Chen Q, Meng FY, et al. A polymorphism in the promoter region of PD-L1 serves as a binding-site for SP1 and is associated with PD-L1 overexpression and increased occurrence of gastric cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66(3):309-18.
- Tau G, Rothman P. Biologic functions of the IFN- γ receptors. *Allergy*. 1999;54(12):1233.
- Thomas AM, Segata N. Multiple levels of the unknown in microbiome research. *BMC Biol*. 2019;17(1): 1-4
- Ting NLN, Lau HCH, Yu J. Cancer pharmacomicrobiomics: targeting microbiota to optimise cancer therapy outcomes. *Gut*. 2022;71(7):1412.
- Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the Human Microbiome. *Nutr Rev*. 2012;70(1): S38.
- Vaddepally RK, Kharel P, Pandey R, Garje R, Chandra AB. Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3):738
- Veldman RJ, Klappe K, Hoekstra D, Kok JW. Interferon- γ -Induced Differentiation and Apoptosis of HT29 Cells: Dissociation of (Glucosyl)ceramide Signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;247(3):802-8.
- Vishnyakova TG, Kurlander R, Bocharov AV, Baranova IN, Chen Z, et al. CLA-1 and its splicing variant

- CLA-2 mediate bacterial adhesion and cytosolic bacterial invasion in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(45):16888-93.
- Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(11):651-68.
- Wang D, He J, Huang B, Liu S, Zhu H, et al. Emerging role of the Hippo pathway in autophagy. *Cell Death Dis*. 2020;11(10):1-16.
- Wang W, Sun J, Li F, Li R, Gu Y, et al. A frequent somatic mutation in CD274 3'-UTR leads to protein over-expression in gastric cancer by disrupting miR-570 binding. *Hum Mutat*. 2012;33(3):480-4.
- Wang X, Zhang P, Zhang X. Probiotics Regulate Gut Microbiota: An Effective Method to Improve Immunity. *Molecules*. 2021;26(19): 6076
- Wang Y, Wang D, Xie G, Yin Y, Zhao E et al. MicroRNA-152 regulates immune response via targeting B7-H1 in gastric carcinoma. *Oncotarget*. 2017; 8(17):28125-34.
- Wang YF, Liu F, Sherwin S, Farrelly M, Yan XG, et al. Cooperativity of HOXA5 and STAT3 Is Critical for HDAC8 Inhibition-Mediated Transcriptional Activation of PD-L1 in Human Melanoma Cells. *J Invest Dermatol*. 2018;138(4):922-32.
- Weiner LM, Surana R, Wang S. Antibodies and cancer therapy: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(5):317.
- White A, Ironmonger L, Steele RJC, Ormiston-Smith N, Crawford C, et al. A review of sex-related differences in colorectal cancer incidence, screening uptake, routes to diagnosis, cancer stage and survival in the UK. *BMC Cancer*. 2018;18(1): 906
- Wu M, Bai J, Ma C, Wei J, Du X. The Role of Gut Microbiota in Tumor Immunotherapy. *J Immunol Res*. 2021;2021: 5061570
- Wu X, Gu Z, Chen Y, Chen B, Chen W, et al. Application of PD-1 Blockade in Cancer Immunotherapy. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019; 17:661-74
- Yamada A, Komaki Y, Komaki F, Micic D, Zullo S, et al. Risk of gastrointestinal cancers in patients with cystic fibrosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2018;19(6):758-67.
- Yan F, Polk DB. Probiotic Bacterium Prevents Cytokine-induced Apoptosis in Intestinal Epithelial Cells. *J Biol Chem*. 2002;277(52):50959
- Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, Estecio MR, Davanlou M, et al. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia*. 2014;28(6):1280-8.
- Yoon Y, Kim G, Jeon BN, Fang S, Park H. *Bifidobacterium* Strain-Specific Enhances the Efficacy of Cancer Therapeutics in Tumor-Bearing Mice. *Cancers (Basel)*. 2021;13(5):1-16.
- Zahary MN, Kaur G, Hassan MRA, Singh H, Naik VR, et al. Germline mutation analysis of MLH1 and MSH2 in Malaysian Lynch syndrome patients. *World J Gastroenterol*. 2012;18(8):814.
- Zaki TA, Liang PS, May FP, Murphy CC. Racial and Ethnic Disparities in Early-Onset Colorectal Cancer Survival. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2022; (22): 00563-8
- Zhang XL, Xu LL, Wang F. Hsa_circ_0020397 regulates colorectal cancer cell viability, apoptosis and invasion by promoting the expression of the miR-138 targets TERT and PD-L1. *Cell Biol Int*. 2017;41(9):1056-64.
- Zheng C, Huang WY, Sheridan S, Sit CHP, Chen XK, et al. COVID-19 Pandemic Brings a Sedentary Lifestyle in Young Adults: A Cross-Sectional and Longitudinal Study. *Int J Environ Res Public Heal*. 2020;17(17):6035.
- Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res*. 2020;30(6):492-506.
- Zotta T, Ricciardi A, Ianniello RG, Parente E, Rossi A, et al. Assessment of Aerobic and Respiratory Growth in the *Lactobacillus casei* Group. *PLoS One*. 2014;9(6): e99189
- Zununi VS, Barzegari A, Rahbar SY, Goreyshi A, Omid Y. *Leuconostoc mesenteroides*-derived anticancer pharmaceuticals hinder inflammation and cell survival in colon cancer cells by modulating

NF- κ B/AKT/PTEN/MAPK pathways. Biomed Pharmacother. 2017; 94:1094-100.



8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Safaa	Soyadı	ALTVEŞ
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
E-mail		Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Aleppo Üniversitesi	2010
Yüksek Lisans	Aleppo Üniversitesi	2014
Doktora	Necmettin Erbakan Üniversitesi	2022

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Biyoloji öğretmeni	Suriye Eğitim Bakanlığı	2011-2017
Araştırma asistanı	Aleppo Üniversitesi	

Yabancı Dil	İngilizce, Türkçe, Almanca
Ana Dil	Arapça

Yayınları

Altveş S, Yıldız HK, Vural HC. Interaction of the microbiota with the human body in health and diseases. Biosci Microbiota Food Health. 2020; 39(2):23-32.

Yıldız HK, **Altveş S**, Vural HC. Cancer Stem Cells as Therapeutic Target. Archives of Oncology and Cancer Therapy. 2019; 2(2): 18-25.

Çelik FS, Celen E, Yıldız HK, **Altweish S**, Donmez H, VURAL H., Investigation of Leptin Receptor and eNOS Gene Polymorphisms in Preeclamptic Umbilical Cords. W J Gynecol Women's Health. 1(3): 2018.

Altweish S, Youssef N, Abajy MY. Investigation of Metallo-Beta-Lactamase Produced from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* Research journal of Aleppo University. 2018; 123.

Altweish S, Jammo KH. The Optimal Conditions for Phenol Biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*" Research journal of Aleppo University. 2014; 97.

Altweish S, Jammo KH. Enhancing Phenol Biodegradation Efficiency by *Pseudomonas aeruginosa* Research journal of Aleppo University. 2014; 94.

Tebliğleri

Çelik FS, Yıldız HK, **Altveş S**, Güneş CE, Vural H, Kurar E. The effects of Sinapic acid on TRP channels expression in LNCAP prostate cancer cell line. 2nd International Cancer and Ion Channels Congress 2019. İzmir, Turkey.

Altweish S, Yıldız HK, Vural H. Interaction of Microbiota with the Human Body in Health and Diseases. First Agriculture, Environment, and health Congress 2018. Aydın, Turkey.

Altweish S, Youssef N, Abajy MY. Detection of metallo-beta-lactamases (MBL) produced from *Escherichia coli* at hospitals in Aleppo. First Agriculture, Environment, and health Congress 2018. Aydın, Turkey.

Üyelikler

Federation of European Microbiological Societies (FEMS)
Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti

9. EKLER

EK. 1: Etik kurul onayı

T.C. NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI	
Toplantı Sayısı: 112	Toplantı Tarihi: 17 Temmuz 2020
Karar Sayısı: 2020/2753: Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hasibe VURAL' ın "Kolon Kanseri Probiyotik Bakterilerin Etkisinin İmmün Sistem Açısından Araştırılması" başlıklı doktora tez çalışması ile ilgili 14.07.2020 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Safaa ALTVEŞ' in doktora tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hasibe VURAL' ın sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin ilaç ve tıbbi cihaz dışı araştırmalar etik kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir. Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir. Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Hasibe VURAL Yardımcı Araştırmacı: Safaa ALTVEŞ	