

**MEME KANSERİ HÜCRELERİNE mTOR ANTİSENS
OLİGONÜKLEOTİTLERİNİ HEDEFLEYECEK TRANSFERRİN
KAPLANMIŞ ALTIN NANOPARTİKÜLLERİN TASARIMI SENTEZİ
VE UYGULANMASI**

**DESIGN, SYNTHESIS AND APPLICATION OF TRANSFERRIN
COATED GOLD NANOPARTICLES FOR TARGETING mTOR
ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES TO BREAST CANCER CELLS**

EZGİ BEKTAŞ

PROF. DR. AYŞE KEVSER ÖZDEN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

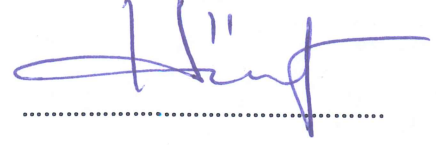
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak hazırlanmıştır.

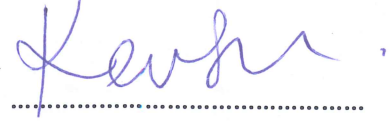
2017

EZGİ BEKTAŞ'ın hazırladığı “**Meme Kanseri Hücrelerine mTOR Antisens Oligonükleotitlerini Hedefleyecek Transferrin Kaplanmış Altın Nanopartiküllerin Tasarımı Sentezi Ve Uygulanması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

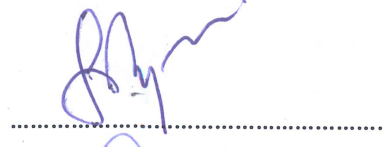
Prof. Dr. Hülya Yavuz ERSAN
Başkan



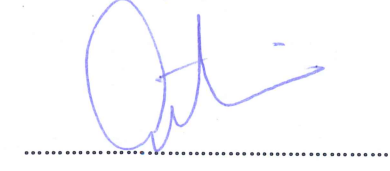
Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN
Danışman




Prof. Dr. Serenay ELGÜN ÜLKAR
Üye



Doç. Dr. N. Dilara ZEYBEK
Üye



Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun 25.10.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

25.10.2017


(İmza)

Öğrencinin Adı Soyadı

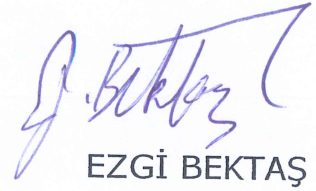
Ergi BEKTAŞ

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

13 /10 /2017


EZGİ BEKTAŞ

ÖZET

MEME KANSERİ HÜCRELERİNE mTOR ANTİSENS OLİGONÜKLEOTİTLERİNİ HEDEFLEYECEK TRANSFERRİN KAPLANMIŞ ALTIN NANOPARTİKÜLLERİN TASARIMI SENTEZİ VE UYGULANMASI

Ezgi BEKTAŞ

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN

Ekim 2017, 71 Sayfa

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir. Meme kanserinin tipi ve moleküler özellikleri prognozu belirleyip etkin tedavi protokollarının tasarlanmasını da yönlendirmektedir. mTOR, memelideki Rapamisin hedefi, son yıllarda ilaç tasarlanan hedef moleküllerden birisidir. Hedeflenmiş tedavi gen tedavisini de içermektedir. Antisens oligonükleotit ve benzeri inhibitör nükleik asitlerin hücrelere aktarımı DNA ve RNA'nın polianyonik yapısı nedeniyle zordur. Dolayısıyla, etkin gen aktarımı için çok çeşitli vektörler tasarlanmakta ve kullanılmaktadır. Optoelektronik özellikleri, düşük toksitesi ve geniş yüzey alanıyla altın nanopartiküller (AuNP) potansiyeli olan nanoilaçlar olarak

görülmektedirler. Bu çalışma, transferrin ve antisens oligonükleotit (AS-ODN) veya küçük inhibitör RNA (siRNA) ile işlevselleştirilmiş altın nanopartiküllerin oluşturulması ve metastatik potansiyeli yüksek insan meme kanser hücre hattı, MDA-MB-231 hücrelerine gen aktarımında kullanılmasını amaçlamaktadır. Transferrin reseptörlerinin bu hücrelerde aşırı eksprese olduğu göz önüne alınarak, transferrin bağlı altın nanopartiküllerin AS ODN veya siRNA aktarmak üzere özgül reseptör aracılığıyla alınması öngörülmüştür. mTOR'a özgü AS ODN'lerin altın nanopartiküllere indirgenmiş transferrin aracılığıyla bağlandığı poliakrilamid ve agaroz jel elektroforeziyle belirlenmiştir. Meme kanseri hücrelerine uygulanan serbest AS-ODN moleküllerinin hücre çoğalmasını kontrol hücrelerine göre 24 saatte % 24, 48 saatte %14 ve 72 saatte % 0.9 oranında azalttığı; AuNP bağlı şekilde ise 24 saatte % 38; 48 saatte % 30 ve 72 saatte % 10 oranında azalttığı ancak bu farkların istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir. Hücrelere transferrin bağlanıp, AS-ODN ile işlevselleştirilmiş AUNP uygulandığında ise 24 saatte % 85, 48 saatte % 89 ve 72 saatte ise %93 oranında azalttığı saptanmıştır. Sonuçlar kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında sonuç anlamlı bulunmuştur.

Benzer şekilde, meme kanseri hücrelerine uygulanan serbest mTOR'a özgü siRNA moleküllerinin de hücre çoğalmasını 24 saatte % 10, 48 saatte % 23 ve 72 saat sonra %16 oranında azalttığı, ancak bu farkların istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir. Hücrelere transferrin bağlanıp mTOR'a özgü siRNA ile işlevselleştirilmiş AuNP uygulandığında ise hücre çoğalmasının 24 saatte % 82, 48 saatte % 58 ve 72 saatte % 93 oranında azaldığı saptanmıştır. Sonuçlar kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında sonuç anlamlı bulunmuştur. Uygulama sonrasında mTOR ekspresyonu immünohistokimya yöntemiyle incelenmiş ve ekspresyonun da hücre sayısının da önemli oranda azaldığı belirlenmiştir.

Dolayısıyla, altın nanopartiküllerin hem nükleik asitleri bağlayan hem de reseptör aracılı hücre içine alınmasını sağlayan transferrinle

işlevselleştirdiğinde AS-ODN ve siRNA için etkin vektörler oluşturabileceği belirlenmiştir. Sonuç olarak, oluşturulan bu yapıların biyouyumluluğu, in vivo etkinliği ve tedavide kullanım olanaklarını belirleyecek ileri çalışmalar gerekli olduğu düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler; Meme kanseri; MDA-MB-231 hücreleri; antisens oligonükleotit; mTOR; transferrin; altın nanopartikül



ABSTRACT

DESIGN, SYNTHESIS AND APPLICATION OF TRANSFERRIN COATED GOLD NANOPARTICLES FOR TARGETING mTOR ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES TO BREAST CANCER CELLS

Ezgi BEKTAŞ

Master of Science, Bioengineering Division

Supervisor: Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN

October 2017, 71 Pages

Breast cancer is the most frequent cancer in women. The type and molecular characteristics of breast cancer determines prognosis and helps design effective therapy regimes. mTOR, the mammalian target of Rapamycin is one of the molecular targets to which novel drugs are being designed recently. Targeted breast cancer therapy may take the advantage of gene therapy. Delivery of antisens oligonucleotides or similar inhibitory nucleic acids is hampered by the polianionic nature of DNA or RNA. Therefore, a variety of vectors are used and designed for efficient gene delivery. Gold nanoparticles (AuNP) are potent nanodrugs having optoelectronic properties, low toxicity and wide surface area. This study aims to forming gold nanoparticles functionalized with transferrin and antisense oligonucleotides (ASODN) and small inhibitory

RNA (siRNA) for gene delivery to highly metastatic human breast cancer cell line, namely MDA-MB-231. Since transferrin receptors are over expressed in these cells, it is postulated that transferrin attached gold nanorticles will be taken up by specific receptors to deliver the ASODN or siRNA. mTOR specific ASODN was found to bind on gold nanopaticles through reduced transferrin as depicted by polyacrylamide and agarose gel electrophoresis. ASODN molecules reduced cell viability 24%, 14% and 0.9 % in 24h, 48h, 72h respectively as compared to control cells. In AuNP bound form cell viability was 38% , 30% and 10% in 24h, 48h and 72 hours respectively. However, this was not statistically significant. Transferrin bound ASODN functionalized AuNPs led to a decrease of 85% , 89% and 93% in 24h, 48h and 72 hours respectively. These results were found to be statistically important. Similarly, free mTOR specific siRNA applied to cells led to a decrease of 10 % , 23%and 15.8% in 24h, 48h and 72 hours but this was not significant. On the other hand, when transferrin bound and mTOR siRNA functionalized AuNPs were applied the cell viability was decreased by 82% , 57 % and 93 % in 24h, 48h and 72 hours significantly. mTOR expression of treated cells were analysed by immunehistochemistry and the expression as well as cell number was found to be significantly decreased. Therefore, gold nanoparticles may be suitable vectors for AS ODN or siRNA when functionalized with transferrin that allowed attachment of nucleic acid agents as well as their receptor mediated delivery. It is concluded that further studies are needed to understand the biocompatibility and in vivo efficiency of these constructs, thus, the feasibility of their use in therapy.

Key Words: Breast cancer; MDA-MB-231 cell line; antisense oligonucleotides; mTOR; transferrin; gold nanoparticles

TEŞEKKÜR

*Bu tez çalışmasının her aşamasında engin bilgi ve tecrübesiyle hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen daima bana yol gösteren değerli hocam tez danışmanım **Prof.Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN'e,***

*Bu güne kadar benim hep arkamda olduklarını bildiğim, varlıklarıyla bana güç veren, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan en değerlilerim canım babam **Sadrettin Bektaş'a,** annem **Yeter Bektaş'a** ve abim **Emrah Bektaş'a,***

*BAP Hızlı Destek Projesi kapsamında bu teze maddi olarak destek sağlayan **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ,***

*Tez çalışmamı yaparken hücre kültürü ve immünohistokimya çalışmalarında bilgisi ve desteğiyle çalışmamıza her anlamda katkıda bulunan değerli hocam **Doç. Dr. N. Dilara ZEYBEK'e** ve ekibine,*

*Jürimde bulunarak bana zaman ayıran değerli hocalarım **Prof. Dr. Serenay ELGÜN ÜLKAR'a,** **Prof. Dr. Hülya YAVUZ ERSAN'a,** **Doç.Dr.Eda ÇELİK AKDUR'a,***

Çalışmamda desteği bulunan herkese,

..... Sonsuz teşekkürler.....

EZGİ BEKTAŞ

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından Hızlı Destek Projesi olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER.....	x
ŞEKİLLER.....	xi
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİ.....	3
2.1 Kanser	3
2.2 Meme Kanseri	5
2.2.1 Risk Faktörleri.....	6
2.2.2 Sınıflandırma	7
2.2.2.1 Histopatolojik Sınıflandırma	8
2.2.2.2 Moleküler Sınıflandırma.....	10
2.3 mTOR (Mammalian Target of Rapamycin).....	15
2.3.1 mTORC1 ve Etkileştiği Moleküller	16
2.3.2 mTORC1'in Substratları ve Hücresel Fonksiyonları	18
2.3.3 mTORC2 ve Etkileştiği Moleküller	22
2.3.4 Kanserde mTOR Sinyal Yolağının Rolü	22
2.3.5 PI3K /Akt Sinyal Yolağı	23
2.4 Transferrin ve Reseptörü	24
2.4.1 Transferrin	24
2.4.2 Transferrin Reseptörleri.....	24
2.4.3 Transferrin Reseptörü ile Demirin Taşınması	25
2.4.4 Kanser Hücresinde Transferrin Reseptörü ve Demir Metabolizması	26
2.5 Gen Tedavisi.....	27
2.5.1 Gen aktarımı.....	27
2.5.2 Altın Nanopartiküller	28
2.5.3 Antisens Oligonükleotitler	29

2.5.4	siRNA'lar	30
3	DENEYSEL ÇALIŞMALAR	32
3.1	Kimyasal Maddeler ve Hücreler	32
3.1.1	MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı.....	32
3.2	Hücre Kültürü Çalışmaları	32
3.2.1	Besiyeri Hazırlanması.....	32
3.2.2	Hücrelerin Dondurulması	33
3.2.3	Donmuş Hücrelerin Çözülmesi.....	33
3.2.4	Hücrelerin Altkültürü (Pasajlama)	34
3.2.5	Tripan Mavisi Atma Testi ile Hücre Sayımı	34
3.2.6	MTT Hücre Canlılığı Testi	35
3.3	Altın Nanopartiküller	37
3.4	Antisens Oligonükleotitler	37
3.5	siRNA'lar	37
3.6	Poliakrilamid Jel Elektrofrez Çalışmaları	37
3.6.1	Elektrofrez Stok Çözeltileri Hazırlanması	38
3.6.2	Jellerin Hazırlanması	40
3.6.2.1	Ayırıcı Jel	40
3.6.2.2	İstifleme Jeli.....	40
3.6.3	Örneklerin Hazırlanması	41
3.6.3.1	Transferrinin Jelde Yürütülmesi İçin Hazırlanan Örnekler.	41
3.6.3.2	Transferrin ,Antisens Oligonükleotit ve Altın Nanopartikül Etkileşimleri	41
3.6.4	Örneklerin Poliakrilamid Jel Elektrofrezine Eklenmesi.....	43
3.6.5	Poliakrilamid Jelin Boyanması	43
3.7	Agaroz Jel Elektrofrez Çalışmaları.....	43
3.7.1	Elektrofrez Stok Çözeltilerinin Hazırlanması.....	43
3.7.2	Örneklerin Agaroz Jel Elektrofrezine Yüklenmesi	44
3.8	AuNP bağlı AS-ODN ve siRNA'ların MDA-MB-231 Hücrelerine Uygulanması	45
3.9	İmmünohistokimya Çalışmaları	45
3.9.1	Hücelere Örneklerin Uygulanması.....	45
3.9.2	Floresan Boyama.....	46

4	BULGULAR.....	47
4.1	Hücre Kültürü Çalışmaları Sonucunda Edilen Veriler	47
4.2	Poliakrilamid Jel Elektforezi Çalışmaları Sonuçları	48
4.3	Agaroz Jel Elektforezi Çalışmaları Sonuçları.....	51
4.4	AuNP bağlı ASODN ve siRNA'ların MDA-MB-231 Hücrelerine Uygulanması Sonuçları	52
4.5	İmmünohistokimya Çalışmaları Sonuçları	56
4.6	Tartışma.....	57
5	SONUÇLAR	61
6	KAYNAKLAR	63



ÇİZELGELER

Tablo 1. Meme kanserlerinin sınıflandırılması.....	14
Tablo 2 Kültür kaplarının özellikleri	36
Tablo 3 transferrin ve AuNP etkileşimi için hazırlanan preparatların miktarları	41
Tablo 4 Transferrinin AuNP'lere bağlanmasının incelendiği preparat miktarları	42
Tablo 5 Transferrinin oligonükleotit etkileşimlerinin PAGE'te incelenmesi için hazırlanan preparat miktarları	42
Tablo 6 Transferrin oligonükleotit ve AuNP etkileşimlerinin agaroz jelde incelenmesi için hazırlanan preparat miktarları	44

ŞEKİLLER

Şekil 1 Meme kanserinin histopatolojik sınıflandırılması.....	8
Şekil 2. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması	10
Şekil 3. mTORC1'in hücre büyümesi ve proliferasyonundaki etkisi.....	19
Şekil 4. mTORC2'nin hücre proliferasyonuna ve canlılığına etkisi.....	20
Şekil 5 Transferrin reseptörüyle demirin taşınması	25
Şekil 6 Antisens oligonükleotitlerin etki mekanizması	30
Şekil 7. Altın nanopatiküllerin amin grupları ile bağlanması	37
Şekil 8. MDA-MB-231 insan metastatik meme kanseri hücrelerinin çoğalma profili.	48
Şekil 9. Serbest transferrin ve altın nanopartikülle etkileşmiş transferrinin elektroforetik analizi.	49
Şekil 10. İndirgenmiş ve indirgenmemiş transferrinle etkileştirilmiş AuNP lerin altın nanopartikül ve AS-ODN ile bağlanmalarının elektroforezle incelenmesi	50
Şekil 11 Transferrin ile mTOR antisens oligonükleotitlerin etkileşiminin poliakrilamid jelde incelenmesi	51
Şekil 12 mTOR antisens oligonükleotitlerin altın nanopartiküllere bağlanmasının ve bağlanmada transferrinin rolünün agaroz jel elektroforezinde incelenmesi.....	52
Şekil 13 Transferrinle modifiye edilmiş ve mTOR antisens oligonükleotit bağlı altın nanopartiküllerin uygulandığı MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin çoğalma grafiği.....	54
Şekil 14 Meme kanseri hücrelerine transferrinle modifiye edilmiş ve mTOR siRNA bağlı altın nanopartikül uygulanmış meme kanseri hücrelerinin çoğalması..	55
Şekil 15. Kontrol (A) ve serbest ASODN (B), ASODN bağlı AuNP (C) ve Tf ve ASODN ile işlevselleştirilmiş altın nanopartikül uygulanan hücrelerde(D) mTOR ekspresyonu.	56
Şekil 16. Transferrin ve mTOR siRNA ile işlevselleştirilmiş altın nanopartikül uygulanan hücrelerde mTOR ekspresyonu	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

µg: mikrogram

µl: mikrolitre

α: alfa

° C: santigrat derece

kDa: kilodalton

nm: nanometre

Kısaltmalar

Tf: Transferrin

AuNP: Altın nanopartikül

ASODN: Antisens oligonükleotit

DNA: Deoksiribonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

siRNA: Küçük inhibitör RNA (Small Interfering RNA)

mTOR: Mammalian target of rapamycin (memelilerde rapamisin hedefi)

PI3 K: Fosfatidilinositol-3-kinaz

Akt: Serin /treonin protein kinaz

RSK: Ribozomal protein S6 kinaz

P70 S6 K: P70 S6 protein kinaz

PTEN: Fosfataz ve tensin homolog

PIP 3: Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat

PIP 2: Fosfatidilinositol (4,5)-bifosfat

P450 2E1: Sitokrom 450 2E1 enzim

Her 2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2

BRCA: Meme kanseri geni

DCIS: İn situ duktal karsinoma

LCIS: İn situ lobuler karsinoma

ER: Östrojen reseptörü

PR: Progesteron reseptörü

CK: Sitokeratin

MKI 67: Monoklonal antibodi Ki 67 tarafından tanımlanmış antijen

MAPK: Mitojen aktive protein kinaz

CD 44: Hücre adhezyonunda görevli glikoprotein

PARPC: Poli-ADP-ribozpolimeraz 1

TFF-1: Troid transkripsiyon faktör-1

CCND1: Siklin D1 i kodlayan gen

DEP: **D**ishevelled, **E**gl-10 and **P**leckstrin domain

DEPTOR: DEP domaini içeren mTOR etkileşim proteini

TSC1/2: Tüberöz skleroz proteinini kodlayan gen

RHEB: Ras homolog enriched in brain (GTP bağlayıcı protein)

GTP: Guanozin trifosfat

GTPaz: GTP'yi GDP'ye çeviren enzim

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü

IKK β : Nükleer faktör kappa β kinaz inhibitörü

AMPK: Adenozin monofosfat aktive protein kinaz

REDD1: Regulated in development and DNA damage responses 1

Rag A/B/C/D: Rekombinasyon aktive edici gen

c-myc: Myelositomatosis viral onkogen homologu

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

PKC- α : Protein kinaz C- α

SREBP1: Sterol regülatör element bağlayıcı protein

RISC: RNA indüklenmiş susturma kompleksi

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

PBS: Fosfat buffered saline

DMSO: Dimetil Sülfoksit

MTT: 3-(4,5-Dimetilthiazol-2-)-2,5-Difeniltetrazolium Bromid

SDS: Sodyum dodesil sülfat

TEMED: Tetrametiletildiamin

BSA: Bovine serum albümin

MetOH: Merkaptoetanol

TE: Tris EDTA

TBE: Tris Borat EDTA

1 GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda görülen en yaygın kanser türüdür. Kanserin neden olduğu ölümlerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Meme kanseri hücrelerinin moleküler özellikleri ayrıntılı biçimde anlaşıldıkça bu hücrelere karşı oluşturulacak yeni tedavi stratejilerinin gelişmesi beklenmektedir. Meme kanseri hücrelerinin metastatik özellikleri farklılık gösterir. Bu farklılık, östrojen reseptörü gibi çeşitli moleküllerin ifade düzeyleri ile ilişkili olup tedavi ve prognozda önemli bir yer tutar. Metastazla ilişkili olduğu belirlenen birçok gen ve protein saptanmıştır. Bunlar arasında onkogenler, hücre döngüsü ile ilişkili moleküller, adhezyon molekülleri, motilite faktörleri, büyüme faktörleri ve onların reseptörleri yer almaktadır [1]. Memeli hücrelerindeki rapamisin hedefi (mammalian Target of Rapamycin) olarak adlandırılan mTOR (serin/treonin kinaz), hücrenin besin alımına göre protein sentezini düzenleyerek hücre çoğalmasını kontrol eder [2].mTOR'un PI3K/Akt (Protein kinaz B) sinyal yolağı etkisiyle fosforile olarak aktive olduğu bilinmektedir. mTOR, hücrelerin çoğalması için gereken yolları, örneğin p70 S6 kinaz (RSK) gibi ribozom biyosentezini arttırarak translasyonu hızlandıracak mekanizmayı aktifleştirir. Büyüme faktörlerinin tirozin kinaz reseptörleriyle (RTK) tetiklenen Akt/mTOR sistemi hücre büyümesindeki etkilerine ek olarak hücre sağ kalımını ve apoptozdan korunmasını da sağlar[3]. Birçok kanser hücre türünde mTOR kanser hücrelerine normal hücrelerden farklı olarak sağ kalım yönünden önemli avantajlar sağlar. Meme kanserinde mTOR'u aktifleştiren ve onun hedefi olan moleküllerde aşırı ifadelenme görülmüştür. Örneğin, Akt de ve bu yolağın kontrolunda yer alan PTEN (Fosfataz ve tensin homoloğu), PIP3 gibi moleküllerde mutasyonlar saptanmıştır Bu moleküllere yönelik olarak ilaç tasarımları ve uygulamaları bulunmaktadır. Örneğin, mTOR'un kanser tedavisi için hedef olarak seçilmesi yönünde çalışmalar yapılmaktadır. mTOR'un kanser tedavisi için hedef olarak seçilmesi deneysel klinik tedavi

yöntemlerinde oldukça önemli bir rol almıştır. mTOR inhibitörleri olan rapamisin türevleri CCI-779 ve RAD001'in deneysel klinik tedavilerde birçok kanser tipinde antitümör etki göstermiştir [4]. Konvansiyonel ilaçlarla birlikte mTOR inhibisyonu MDA-MB-231 hücrelerinin hücre sağ kalımını azaltarak radyasyona duyarlılığını arttırmıştır [5] [6] [7] . Bu tezde MDA-MB-231 hücrelerinde mTOR ekspresyonunun antisens oligonükleotitlerle (AS-ODN) baskılanması için etkin bir taşıyıcı sistem oluşturulması amaçlanmaktadır. Bu amaçla, hazırlanacak altın nanopartiküller mTOR mRNA'sına özgü antisens oligonükleotitleri hücrelere aktarmakta kullanılacaktır. Aynı şekilde mTOR için tasarlanmış küçük inhibitör RNA "small interfering RNA (siRNA)" ile de paralel deneyler yürütülecektir. Altın nanopartikülleri meme kanseri hücrelerine hedefleyebilmek için bu hücrelerde aşırı eksprese olan bir diğer molekül, transferrin reseptörü seçilmiştir [8]. Transferrin kaplı altın nanopartiküllerle (AuNP) meme kanseri hücrelerine özgül ve yüksek afiniteli reseptör ve ligant ilişkisi kavramına dayanarak mTOR antisens oligonükleotitlerini ve/veya siRNA moleküllerini hedefleyip aktarması beklenmektedir.

2 GENEL BİLGİ

2.1 Kanser

Kanser anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve köken aldığı birincil alanından vücudun diğer bölgelerine yayılması (metastaz) ile karakterize olan; yayılmanın önlemediği durumlarda ölümlerle sonuçlanan önemli bir hastalık grubudur. Bu tanımla, kanserin bir hastalık grubu olduğu ve 100'den fazla kanser sınıflandırmasının bulunduğu vurgulanmaktadır. Köken aldığı doku, tümör hücrelerinin özelliklerini belirlemektedir. Kanserlerin yaklaşık % 85'i epitel hücrelerinde görülür ve bu grup karsinoma olarak sınıflandırılır. Mezoderm hücrelerinden (kemik, kas, vb.) köken alanlar sarkoma, glandüler (meme vb.) köken alanlar ise adenosarkoma olarak anlandırılır. Tümörler, buldukları vücut bölgesinden başka bir bölgeye yayılmayan (metastaz yapmayan) iyi huylu "benign" tümör; enkapsüle halde bulunmayan, invazyon ve metastaz özellikleri gösteren kötü huylu "malignant" tümör olarak iki temel gruba ayrılır. İyi huylu tümörler kanser özelliği göstermemekle birlikte buldukları vücut bölgesine göre tedavisi zor olabilir. Örneğin; menejiyom tipi beyin tümörlerinin alınması zordur.

2000 yılında, Hanahan ve Weinberg kanser hücreleri için tipik olan 6 temel özellik belirlemişlerdir [9] .

- Normal hücreler bölünmek için büyüme faktörlerinden gelen sinyallere ihtiyaç duyarken kanser hücreleri bu sinyallerden bağımsızdır. Büyüme faktörü sinyal yollarında meydana gelen mutasyonlar sonucu kanser hücrelerinde düzensiz büyümeler meydana gelir.
- Normal hücreler, büyümeyi inhibe eden sinyallere cevap verirken kanser hücreleri; inhibisyon yollarındaki mutasyonlar ya da gen susturulması sonucunda bu sinyallerden kaçabilirler.
- Normal hücreler DNA hasarlarına karşı apoptoz yoluyla yok edilirken kanser hücreleri apoptotik sinyallerden etkilenmeyebilir.

- Normal hücrelerde, bölünmesinin sayısını kontrol eden mekanizmalar varken kanser hücrelerinde telomerlerin uzunluğunu kontrol eden mekanizmalardaki değişikliklerden dolayı bu hücreler sınırsız bölünme yeteneğine sahiptir.
- Normal hücrelerin oksijen ve besin ihtiyaçları kan damarları aracılığıyla sağlanır. Kanser hücrelerinde, anjiyogenik uyarıcılar ve inhibitörler arasındaki denge değiştiğinden tümör sağ kalımı ve yayılması yeni kan damarı oluşumlarıyla sağlanır.
- Normal hücreler buldukları vücut bölgesinden başka yere göç etmezken kanser hücrelerinde genom değişikliklerinin hücre-hücre, hücre- ekstraselüler adhezyon enzimleri üzerindeki olası etkisiyle bu hücreler farklı vücut bölgelerine göç edebilirler.

Hanahan ve Weinberg daha sonra yaptıkları düzenlemede bu özelliklere yenilerini eklemişlerdir. İlk iki özellik kanser oluşumuna olanak sağlayanlar olarak nitelendirilmiştir. Son iki özelliğin ise karsinogenezde çok önemli rolleri olmasına rağmen daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir [10].

- Kanserleşmenin oluşması çoğunlukla genomik değişimlere ve DNA onarım yolağındaki bozukluktan dolayı meydana gelen genomik instabiliteyle ilişkilidir.
- Hemen hemen bütün tümör hücreleri inflamatuvar bağışıklık hücreleri içerir. İnflamatuvar hücreler anjiyogenezi ve invazyonu arttıracak büyüme faktörleri ve enzimler sağlayabilmeleri yanında mutajenik olabilecek oksijen türleri de salabilirler.
- Kontrolsüz hücre bölünmesi enerjinin ve biyosentetik öncüllerin artmasına ihtiyaç duyar. Normal hücrelerden farklı olarak kanser hücreleri oksijen varlığında dahi glikolize devam ederek glikoliz ara ürünlerini biyosentetik yolaklarda kullanırlar.
- Kanser hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınıp yok edildiği teorisine kanıtlar mevcuttur. Ancak kurnaz (malign)

kanser hücreleri bağışıklık sisteminden gizlenerek bağışıklık sisteminin yıkıcı etkisinden kaçmaktadır.

Hücreler kültür kaplarında temas ile büyümenin inhibe edilmesi anlamına gelen kontakt inhibisyon sonucu tek tabakalı yani 'monolayer' olarak çoğalır. Kanser hücreleri ise bu özelliklerini kaybederek; tek tabaka yerine yığınlar halinde büyüme gösterirler. Düşük serum düzeylerinde yaşabilirler ve uzun ya da yassı yerine yuvarlak morfolojiye uyum gösterebilirler. Normal hücrelerde çoğalma için bir yüzeye temasın gerekliliği (yüzey bağımlı: anchorage dependent) kanser hücrelerinde bulunmamaktadır [11].

Kanser; sigara, bulaşıcı mikroorganizmalar, sağlıksız beslenme gibi dış faktörlerin yanında genetik mutasyonlar, hormonlar ve yetersiz bağışıklık sistemi koşulları gibi iç faktörlerden de kaynaklanabilir [12]. Sigara içmek karsinogenezin temel risk faktörlerindedir. Çünkü tütün ve katran; polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitrozaminler ve diğer promoterler gibi tam anlamıyla bir kanserojen karışım içerir [13] .

Alkol, kanser oluşumunda eşkarsinojen (kokarsinojen) olarak etki eder. Eş karsinojenler karsinojenlerin etkisini aktive eden ya da arttıran ve mutajen ya da promoter olan moleküllerdir. Promoterler ise hücrede mutasyon olsun veya olmasın hücre bölünmesini uyaran farklılaşma ve apoptoz indüklenmesinde yetersizliğe neden olan moleküllerdir. Eş karsinojen bir madde olarak alkol, glutatyon gibi detoksifiye edici maddelerin azalmasına ve karsinojen öncüllerinin karsinojenlere dönüşmesine neden olan hepatik sitokrom P450 2E1'in uyarılmasına neden olur [14] .

2.2 Meme Kanseri

Meme kanseri dünya çapında akciğer kanserinden sonra en yaygın görülen kanser türüdür ve kanserden kaynaklı kadın ölümlerinin de en önemli sebeplerindedir. Meme kanserinin etkisi giderek artmakta ve diğer kanser türlerini de geçmektedir [15]. Meme kanserinin heterojenitesi tanı ve tedavi aşamalarında zorlayıcı etki yapmaktadır.

Özellikle 3'lü negatif meme kanserlerini tanımlamak zordur. Bu tümörlerde her2, östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü ekspresyonu yoktur dolayısıyla her2 hedefleme tedavilerine ve hormon tedavilerine cevap vermezler.

Meme, süt yapan meme bezlerinden ve sütü meme başına taşıyan ince kanallardan oluşur. Meme dokusu ayrıca yağ, bağ doku, lenf nodları ve kan damarları içerir. Meme kanserinin en yaygın türü duktal karsinoma kanal hücrelerinde başlar. Aynı zamanda meme kanseri süt bezlerinde başlayabildiği gibi memenin diğer dokularında da meydana gelebilir. İnvaziv meme kanserleri kanal ya da bezlerde başlayarak etraftaki dokulara yayılır.

Östrojen birçok meme kanserinde merkezi rol oynar. Östrojen hücrelere çok küçük derişimlerde etki eder. Hücre içerisinde özgül östrojen reseptörlerine bağlanarak hızlı çoğalmayı ve farklılaşmayı uyarır. Hücre çoğalmasının hızlı olması DNA onarımının yetersiz kalması ve dolayısıyla DNA hasarına ve mutasyonlara sebep olur.

2.2.1 Risk Faktörleri

Meme kanseri tek bir basit nedenle açıklanamaz. Nedenler yerine risk faktörleri ele alınmalıdır.

Biyolojik risk faktörleri ;

- Östrojen: hücre bölünme oranını arttırdığı için östrojen reseptör yanıtı tümörlerin büyümesine neden olur.
- Yaş: yaş ilerledikçe DNA mutasyonları birikir ve mutasyona bağlı kanser riski artar [16]. Bunun yanında kadınlarda progesteron seviyelerinin düşmesiyle progesteronun meme tümörü baskılayıcı etkisi azalır.
- Cinsiyet: kadınlar yaşam boyu östrojene daha çok maruz kalırlar. Menapozdan sonra da yağ dokusu östrojen için ana kaynak haline gelir [17].

- Gebelik: genç yaşlarda çocuk sahibi olan kadınlarda meme kanseri riski azalır. Gebeliğin hormon reseptör pozitif hücrelerin oranını ve kanserle ilgili genlerin ekspresyonunu azalttığı düşünülmektedir.
- Aile öyküsü ve genetik faktörler: genetik yapı meme kanserleri üzerinde %20-30 etkilidir [18]. Örneğin, BRCA genini etkileyen tek gen mutasyonları % 5-10 oranında meme kanseriyle sonuçlanır. BRCA mutasyonu taşıyan ebeveynlerin bu geni çocuklarına aktarma olasılıkları % 50dir. BRCA1 ve BRCA2 genleri tümör baskılayıcıdır, bu genlerde meydana gelen bozukluk hücreleri mutasyona daha yatkın hale getirir sonunda kanserli hücre meydana gelir [19].
- Benign meme hastalığı: kanserli olmayan memede bulunan kistler meme kanseri geliştirme riski taşır [20].

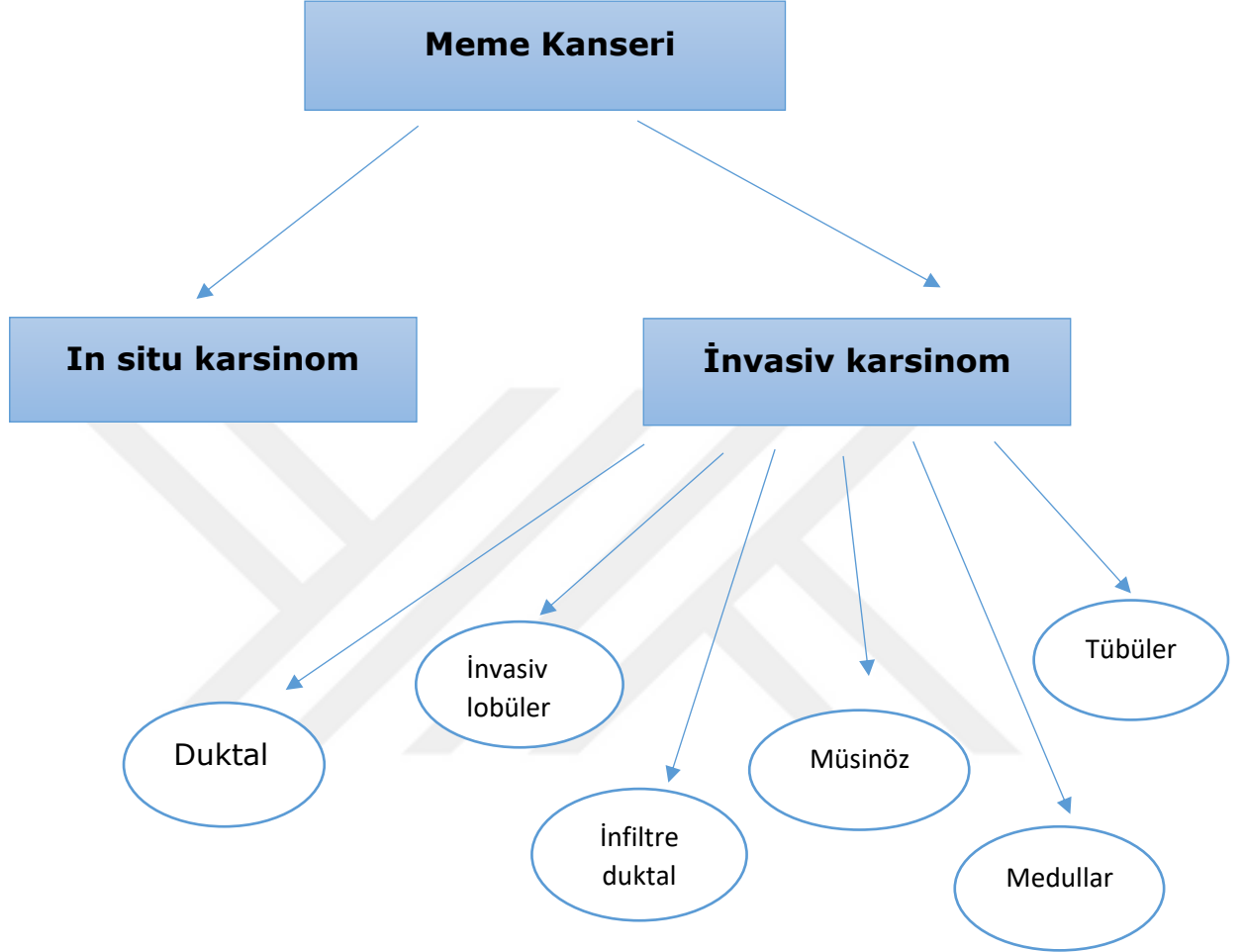
Çevresel faktörler;

- Kilo: obezite vücutta yüksek östrojen seviyesiyle ilgilidir. Yüksek östrojen seviyesi ise meme hücresi büyümesi ve bölünmesini arttırır [21].
- Alkol kullanımı: alkol metabolizması sonucu oksijen içeren reaktif moleküller oluşur. Bu reaktif moleküller hücre proliferasyonunu arttırarak sonuçta meme kanserine neden olabilir. Ayrıca alkol metabolizması sonucu oluşan asetaldehit kanserle ilgili DNA hasarını indükleyebilir [22].
- İyonize radyasyon: radyasyon DNA hasarına ve mutasyonlara neden olmaktadır [23].
- Kanserojenler: dioksinler, poliklorin hidrokarbonlar ve tütün dumanına maruz kalma meme kanserine neden olmaktadır [24].

2.2.2 Sınıflandırma

Meme kanseri klinik ve genetik olarak heterojen bir hastalıktır. Bu heterojeniteyi düzenleyebilmek ve belli bir standart oluşturmak amacıyla meme kanseri sınıflandırmaları geliştirilmiştir. Bu sınıflandırma şemaları

ilerleyen zamanlarda hastalığın tedavisini ve seyrini belirlemek amacıyla kullanılan bir araç haline dönüşmüştür[25].



Şekil 1. Meme kanserinin histopatolojik sınıflandırılması

2.2.2.1 Histopatolojik Sınıflandırma

Genel olarak meme kanseri in situ ve invaziv karsinoma olarak ikiye ayrılır. İn situ meme kanserleri bazal membranı aşmayarak sadece geliştiği bölgede kalırken invaziv kanserler geliştiği bölgeden bazal membranı aşarak başka vücut bölgelerine metastaz yaparlar. İn situ meme kanseri, büyüme modellerine ve sitolojik özelliklerine göre duktal ve lobuler karsinoma olarak iki gruba ayrılır. İn Situ Duktal Karsinoma (DCIS) İn Situ Lobuler Karsinomadan (LCIS) daha yaygındır. Duktal

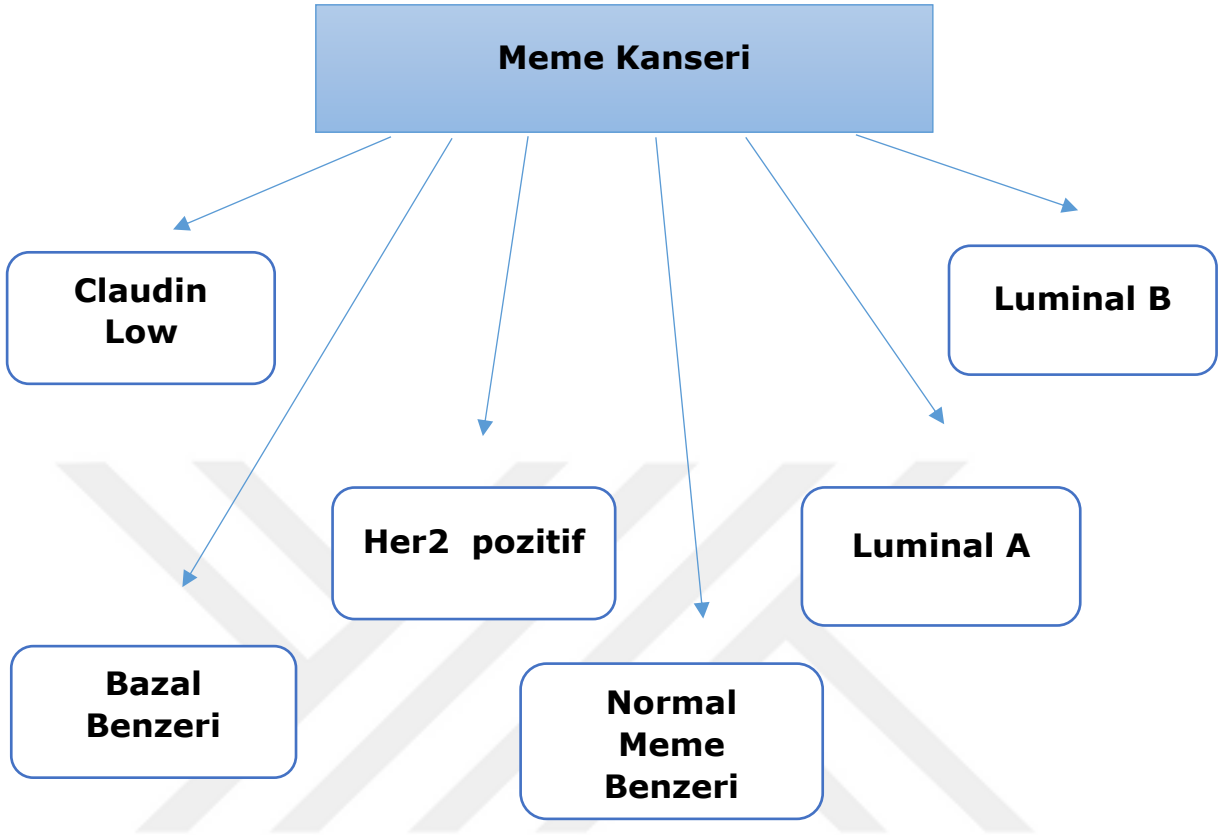
karsinoma ise, yapısal özelliklerine göre papiller vb. gibi 5 adet alt gruba ayrılır. Bu sınıflandırma şemasında, hastalığın prognozunun önemli bir kanıtı olan moleküler markırlar (belirteçler) dikkate alınmayıp yalnızca histoloji esas alınmıştır.

Meme koruyucu cerrahinin gelişimiyle birlikte hastalığın nüksetmesi ya da ilerlemesi ile ilgili kesin bilgiler daha da önem kazanmıştır. Bu ihtiyaçlar sonucunda östrojen reseptörü (ER), Progesteron reseptörü (PR), ErbB2 (Her2/neu) onkogenleri ve p53 gibi moleküler belirteçlerle yapılan birkaç yeni sınıflandırma ortaya çıkarılmıştır. Bu belirteçlerin duktal karsinoma in situ için rutin olarak kullanılması klinikte geniş çaplı olarak kullanılmasa da, "National Comprehensive Cancer Network", DCIS tetkiklerine ER durumu incelenmesini de eklemiştir.

İnvaziv karsinomalar da, in situ karsinomalara benzer şekilde histolojik alt tiplere ayrılan heterojen bir gruptur. Temel invaziv tümör tipleri: infiltratif duktal, invaziv lobüler, duktal/lobüler, müsinöz, tübüler, medüller ve papiller karsinomadır. Bu alt tiplerden infiltratif duktal karsinoma (IDC), invaziv lezyonların %70-80'ini oluşturur. IDC ise nükleer pleomorfizm, glandüler/ tübül formasyonu ve mitotik indeksine göre; iyi diferansiye (evre 1), orta diferansiye (evre 2) az diferansiye (evre 3) olmak üzere 3 alt gruba ayrılır.

DCIS'in aksine ER, PR, ve HER2/neu gibi moleküler belirteçler özellikle IDC için kabul edilmekle birlikte bütün invaziv karsinomalarda bu belirteçlerin durumlarının incelenmesi tavsiye edilmektedir. Bu tümör belirteçlerinin durumları hastaların tamoksifen, aromataz inhibitörü gibi hedeflenmiş tedaviler için uygunluğuna karar vermede rehber olarak kullanılır.

2.2.2.2 Moleküler Sınıflandırma



Şekil 2. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması

Meme kanseri için yapılan sınıflandırmalar prognostik değere sahip olsa da bu sınıflandırmalarda moleküler komponentlerin bulunmaması tedaviye cevap verecek hedeflenmiş uygulamaların kullanılmasını engellemektedir. Bu sorunlar göz önüne alındığında meme kanserinin çeşitli moleküler alt gruplara ayrılması doğru bulunmuştur ve şu şekilde bir sınıflandırma yapılmıştır: bazal benzeri, ErbB2+, normal meme benzeri, luminal A ve luminal B [26]. Daha sonra bu alt gruplara 'Claudin-low' sınıfı eklenmiştir. Bazal benzeri/ üçlü negatif (ER-/PR-/ErbB2-) alt tipleri genellikle kötü prognoz gösterirken moleküler alt grupların sağ kalım tahminleri büyük farklılar gösterir [27]. Meme kanseri moleküler sınıflandırılmasında temel olarak östrojen reseptörü pozitif ve negatif

ayrımı yapılmaktadır. Östrojen reseptörü pozitif kanserler luminal gruplardır. Diğer gruplar ise östrojen reseptörü bulundurmayıp her 2 reseptörünün ve diğer moleküler markırların varlığı/yokluğuna göre sınıflandırılır.

- Luminal A: invaziv meme kanserlerinin % 50- 60'ını oluşturan bu alt tip, özellikle meme kanalı lüminal epitelyumunda eksprese olan ER transkripsiyon faktörü tarafından aktive edilen genlerle belirgindir. Hücre proliferasyonu ile ilgili genler düşük oranda eksprese edilir. Luminal A'nın histokimyasal profili; ER, PGR, Bcl-2 ve sitokeratin CK8/18 ekspresyonu, HER2 ekspresyonu bulunmayışı, Kİ67 ile ölçülen düşük proliferasyon oranı ve düşük histolojik aşamayla ifade edilebilir. GATA 3 belirteci ise yüksek seviye luminal A alt grubunda sunulabilir. Prognozu iyi olan bu alt tipin nüksetme oranı diğer alttiplerden çok düşüktür [28].
- Luminal B: invaziv meme kanserlerinin % 10- 20'sini oluşturan bu grup; yüksek proliferatif indeks ve kötü prognozla luminal A meme kanserinden daha agresif bir fenotipe sahiptir. Karaciğer ve kemik gibi dokularda yüksek oranda nüksetme özelliği gösterir. Luminal A ve B alttipleri arasındaki fark temel olarak MKI67 ve siklin B1 gibi proliferasyon genlerinin ekspresyonunun, EGFR ve HER2 genlerinin de sıkça ifade edildiği luminal B alt tipinde artmış olmasından kaynaklanır. Luminal A ve B immünohistokimyasal açıdan incelendiğinde aradaki farkın Kİ67 protein ekspresyonundan kaynaklanabileceği anlaşılmıştır [29]. Luminal A tipi ER+/HER2- ve düşük Ki67 olarak tanımlanırken luminal B tipindeki tümörler ER+/HER2- ve yüksek Kİ67 ya da ER+/HER2+ olarak tanımlanmıştır. Luminal B meme kanseri tedavisi için PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının çeşitli aşamaları için inhibitör moleküller tasarlanıp denenmektedir [30].
- Her2 pozitif: bu alt tip her2 geni ve her2 yolaklarıyla ilgili genlerin yüksek oranda eksprese edilmesiyle karakterizedir. Hücre

proliferasyonuyla ilgili genler aşırı ifade edilmektedir. her2 geni her1, her2, her3 ve her4 olmak üzere 4 tane üyesi olan büyüme faktörü gen ailesinde yer alır; hücre büyümesi, bölünmesi ve çoğalmasında rol oynar. Normal koşullarda her 17. kromozomda bir her2 geni bulunurken, meme kanseriyle birlikte bu genlerin ek kopyaları üretilmeye başlanır yani gen güçlenir, amplifiye olur. her2 geninin aktive olması ras/raf/ MAPK ve PI3K/akt yollarını aktive ederek tümör büyümesinde görev yapan genlerin transkripsiyonunu artırır. PI3K/ AKT yolağının aktivasyonu ile hücre proliferasyonu için gerekli proteinlerin sentezi artar ve apoptoz inhibe olur. her2 pozitif tümörler yüksek proliferatif özellik gösteren, yaklaşık % 75'i yüksek evrede, yaklaşık % 40'ı p53 mutasyonuna sahip bir alt tiptir. her2 pozitifliği lüminal B'den daha kuvvetli olan bu alt grup çoğunlukla yüksek evreli invaziv duktal karsinoma olarak karşımıza çıkan agresif tümörlerdir [31].

- Bazal Benzeri: bazal benzeri alt tipi toplam meme kanserlerinin % 10-20 sini oluşturur. Normal meme miyoepitel hücrelerinde de sunulan yüksek moleküler ağırlıklı sitokeratinler (CK5,CK14ve CK17), p-kaderin, kaveolin1 ve 2, nestin, CD44 ve EGFR genlerinin eksprese olmasından dolayı bu şekilde isimlendirilmiştir. ER/ PR / her2 genleri eksprese olmaz (üçlü negatiflik). Aynı zamanda bu alt tip luminal karsinomadan az olmak üzere CK8/18 ve kit gibi lüminal epitelin tipik genlerini de eksprese eder. Klinik olarak tanıda büyük tümör boyutu, yüksek histolojik evre ve lenf düğümü tutulumu ile tanımlanır [32]. Bazal benzeri tümörler kemoterapiye iyi yanıt vermelerine rağmen, ilk 3 yılda nüksetme oranlarının yüksek olmasıyla birlikte prognozları lüminal tümörlerden kötüdür. Bazal benzeri tümörler yaygın p53 mutasyonlarından dolayı agresiftir ve kötü prognoz gösterir. Mutasyon ya da epigenetik mekanizmalarla BRCA1 tümör baskılayıcı geninin işlevinde meydana gelen yetersizlik sonucu bazal benzeri tümörlere eğilim gelişmektedir. BRCA1 geni DNA onarım mekanizmalarında kritik rol oynar ve bu

genin inaktivasyonu DNA da meydana gelen hataların birikimine ve genetik instabilite sonucu tümör büyümesine yol açar [33]. Özellikle üçlü negatif tümörler için geliştirilen PARP (poli-ADP-ribozpolimeraz 1) inhibitörleri bu tümörlerin tedavisinde önemlidir. PARP-1 DNA onarımında görev alan bir enzimdir. PARP inhibitörlerinin etkisi iki şekilde olabilir: 1) DNA zincir kırıkları nedeniyle homolog rekombinasyonun yetersiz kalması sonucu hücre ölümü gerçekleşir. 2) Tümör hücreleri DNA hasarına duyarlı hale gelir[34] .

- Claudin low: Meme kanseri moleküler sınıflandırmalarına daha sonradan bu alt tip eklenmiştir. Claudin-3,-4,-7 cingulin, okludin ve e-kaderin gibi intraselüler adhezyon ve sıkı bağlantı genlerinin düşük ekspresyonuyla belirgindir. Bazal benzeri tümörlere benzer olarak düşük her2 ve luminal gen ekspresyonu göstermelerinin yanında bağışıklık sistem yanıtı ile ilgili 40 genin aşırı ekspresyonuyla bu gruptan farklıdır. Bu grupta her ne kadar hücre proliferasyonu ile ilgili genlerin ekspresyonu düşük olsa da prognoz kötüdür. Diğer yandan mezankimal farklılaşma ve epitelyal-mezankimal geçiş ile yakından ilgili genlerin aşırı ekspresyonu söz konusudur. Bu özellikler kanser kök hücresi fenotipiyle yakından ilişkilidir. Morfoloji olarak metaplastik ve medüller benzeri yapı gösterirler [35].

Tablo 1. Meme kanserlerinin sınıflandırılması [36, 37]

	Lüminal A	Lüminal B	her2/ neu	Bazal Benzeri
Gen ekspresyon profili	Lüminal (düşük molekül ağırlıklı) sitokeratinlerin ekspresyonu, hormon reseptörleri ve ilişkili genlerin yüksek ekspresyonu	Lüminal sitokeratinlerin ekspresyonu , hormon reseptörleri ve ilişkili reseptörlerin orta-düşük ekspresyonu	her2/neu yüksek ekspresyonu ve ER ve ilişkili genlerin düşük ekspresyonu	Bazal epitelyal genlerin ve bazı sitokeratinlerin yüksek ekspresyonu, ER ve ilişkili genlerin düşük ekspresyonu, her/neu düşük ekspresyonu
ER	+++	+	-	-
PR	+++	+/-	-	-
HER2	-	+/-	+	-
Bazal belirteç	-	+/-	+/-	+
Moleküler yollar	Lüminal sitokeratinler, CCND1,TFF1, GATA3	Lüminal sitokeratinler, CCND1, TFF1,GATA3; TP53 mutasyonu	GRB7, TOPO2A, GATA4; TP53 mutasyonları	Bazal sitokeratinler, TP53 mutasyonları, BRCA1 yolağı
Proliferasyon	Düşük	Yüksek	Yüksek	Yüksek

Histolojik karşılığı	Tubuler karsinom, Kribriiform kar. Düşük dereceli İnvaziv duktal karsinoma, Lobuler karsinoma	İnvaziv duktal karsinom Mikropapiller karsinoma	Yüksek dereceli invaziv duktal karsinoma	Yüksek dereceli invaziv duktal karsinoma Metaplastik karsinoma. Medullar karsinoma
Tedaviye cevap	Endokrin tedavi ve kemoterapiye cevap verir. En iyi prognozlu gruptur.	Tamoksifen ve aromataz inhibitörleri gibi endokrin tedavilere ve kemoterapiye cevap lüminal A kadar iyi olmayabilir. Prognozu lüminalA kadar iyi değildir.	Genellikle kötü prognozludur, antrasiklin grubu kemoterapiye cevap verebilir.	Genellikle kötü prognozludur. Platinum grubu kemoterapiye ve PARP inhibitörlerine duyarlıdır.

2.3 mTOR (Mammalian Target of Rapamycin)

mTOR; Streptomyces Hygroscopicus bakterisi tarafından üretilen antiproliferatif özelliği ile dikkat çekmiş olan rapamisin ya da sirolimus isimli makrolidin hedef molekülüdür. Doksanlı yıllarda, TOR1 ve TOR2 tomurcuklanan mayalarda rapamisinin toksik etkisinin aracısı olarak tanımlanmıştır. Antifungal özelliğinin yanında rapamisinin belirgin bir şekilde hücre büyümesini ve çoğalmasını inhibe etmesi bu molekülü hücre büyümesi kontrol çalışmalarında değerli bir araç haline getirmiştir. Kısa bir süre sonra da memelilerde yapılan kimyasal incelemeler sonucu mTOR'un, rapamisinin fiziksel hedefi olduğunu göstermiştir [38].

mTOR fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) ilişkili kinaz ailesine ait olan ve mTORC1 (mTOR içeren kompleks 1) ve mTORC2 (mTOR içeren kompleks 2) isimli iki farklı kompleks formuna dönüşmek için çeşitli proteinlerle etkileşen bir serin-treonin kinazdır. Her iki kompleks de büyük olmakla birlikte mTORC1 6, mTORC2 7 protein bileşenine sahiptir. Bunun yanında katalitik mTOR alt ünitesini, mammalian lethal with sec- 13 protein (mLST8, GbL olarak bilinen), DEP bölümü içeren m-TOR etkileşme proteini (DEPTOR) ve Tti1/Tel2 kompleksini paylaşırlar [39]. Komplekslerin farklı protein yapılarının yanı sıra, rapamisine karşı hassasiyetleri, bir önceki basamaktan aldıkları sinyaller, etkiledikleri substratlar ve kontrol ettikleri biyolojik süreçler değişiklik gösterir.

2.3.1 mTORC1 ve Etkileştiği Moleküller

mTORC1 rapamisine karşı hassas olmakla birlikte; büyüme faktörleri, genotoksik stres, enerji durumu, oksijen ve amino asitler gibi hücre büyümesi ve çoğalmasında etkili olan 5 temel sinyalle etkileşir [40]. Bunların aminoasit dışında hepsi TSC1 (tuberous sclerosis 1, diğer adıyla 'Hamartin') ve TSC2 (tuberous sclerosis 2) proteinlerinin aktivitesini kontrol ederek mTORC1 aktivitesini düzenlerler [41].

TSC1 ve TSC2 Rheb (ras homolog enriched in brain, Rheb geni tarafından kodlanan GTP bağlayıcı protein) GTPaz için GTPaz aktive edici protein (GAP) olarak görev yapar [42]. GTP bağlı Rheb proteini mTORC1 ile etkileşip onun kinaz aktivitesini uyarır. TSC1-2 Rheb proteinini GDP bağlı inaktif haline dönüştürerek mTORC1 aktivitesini negatif olarak düzenler [43]. Büyüme faktörleri TSC1-2' nin aktivitesini engelleyip mTORC1'i aktive ederken genotoksik stres, enerji açığı, oksijen azlığı gibi durumlar ters etki yaparak mTORC1'i inhibe eder [44].

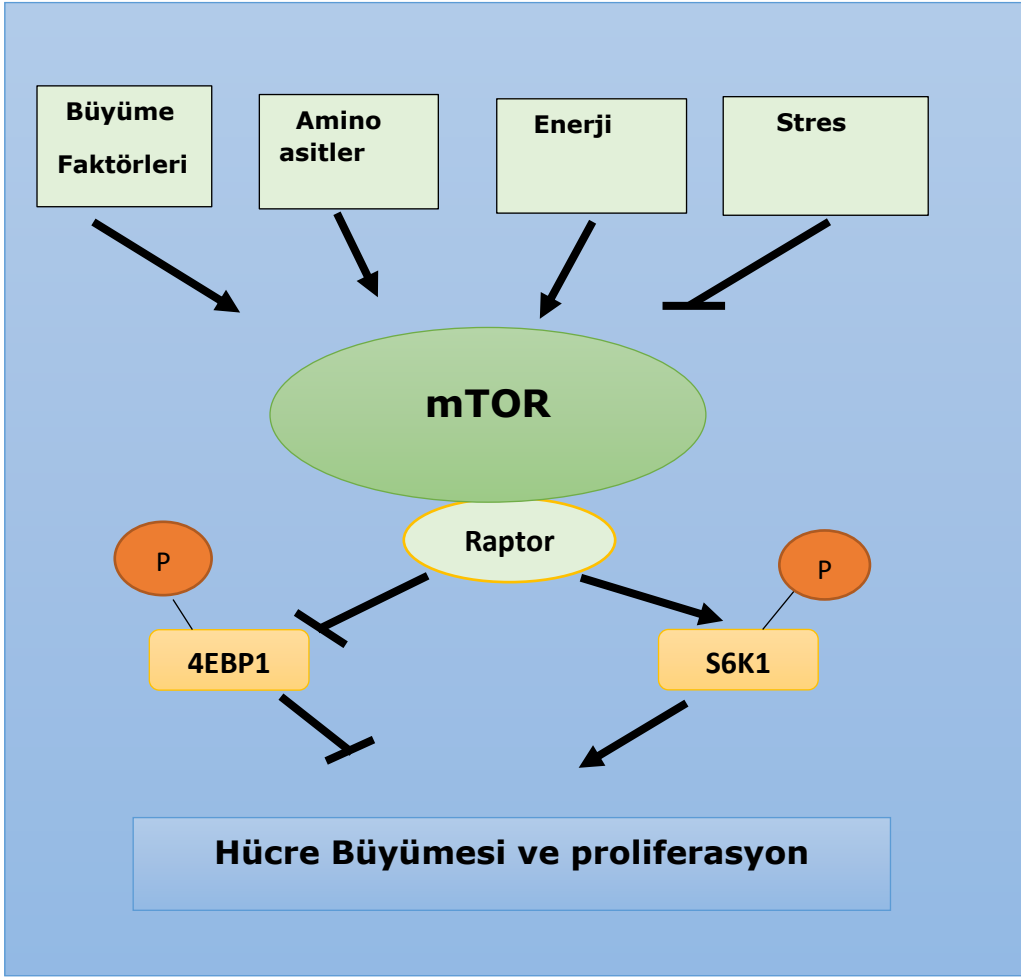
İnsülin ve insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF ler), PI3K ve ras yolağını aktive eder[45]. Bu yollarda efektör kinaz olarak görev yapan protein kinaz B (akt/ PKB), ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2 (ERK 1 / 2) ve ribozomal S6 kinaz (RSK 1) TSC1/2 kompleksini fosforilasyon yoluyla inaktive ederek mTORC1'i aktiveleştirir [46]. Tümör nekroz faktörü- α

(TNF- α) gibi proinflatuar sitokinler büyüme faktörlerine benzer bir mekanizmayla mTORC1'i aktive eder. IkB kinase β (IKKb) TSC1'i fosforile ederek bu kompleksin inhibe olmasına neden olur [47]. Hücre büyümesi, çoğalması ve gelişmesinde temel düzenleyicilerden biri olan Wnt sinyal yolağı normalde TSC1/2 proteinini aktive eden glikojen sentaz kinaz 3b (GSK3-b)'i inhibe ederek mTORC1 aktivasyonunu sağlar [48]. Büyüme faktörü uyarımlarına benzer olarak, düşük enerji ve oksijen seviyeleri, DNA hasarı gibi birçok stres faktörü de TSC1/2 üzerinden mTORC1i etkiler. Hücrede hipoksi ve düşük enerji durumlarına cevap olarak adenozin monofosfat aktive protein kinaz (AMPK) tarafından TSC2'nin GAP aktivitesi arttırılarak mTORC1 inhibisyonu gerçekleştirilir. Hipoksi aynı zamanda TSC2'nin fonksiyonlarını arttıran REDD1 (regulated in development and DNA damage response, DDIT4) proteininin ekspresyonunu indükler [49]. DNA hasarı da TSC2 ve PTEN (fosfataz ve tensin homoloğu) ekspresyonunu uyaran; p53 bağımlı transkripsiyona gereksinim duyan birçok mekanizma ile mTORC1'e sinyal iletir [50].

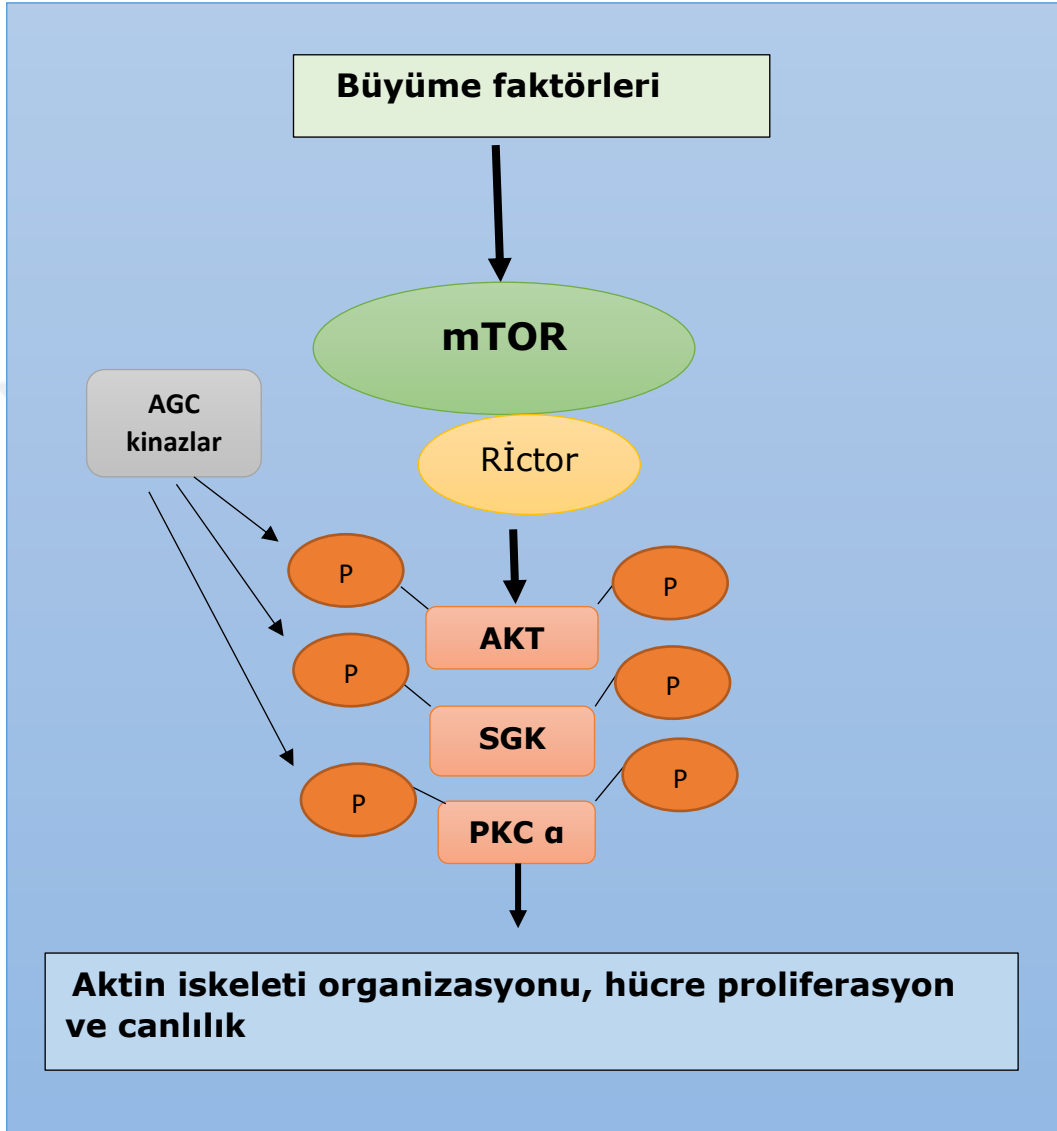
Lösin ve arjinin gibi aminoasitler de mTORC1'i aktive edebilir ve mTORC1'i aktive eden büyüme faktörleri sinyalleri için de gereklidir [51]. mTORC1'in aminoasit bağımlı aktivasyonu için Rag GTP az'ların gerekli olduğu anlaşılmıştır [52]. Memeliler, Rag A ya da Rag B ile Rag C ya da Rag D içeren heterodimerler halinde Rag A' dan Rag D'ye kadar 4 çeşit Rag protein formuna sahiptirler. Heterodimerlerin iki üyesi nükleotit bağlama bölgelerinde karşılıklı bulunduğu için Rag A/B GTP'ye bağlanırken Rag C/D GDP'ye bağlanır. Bilinmeyen bir mekanizma yoluyla aminoasitler, heterodimerlerin mTORC1 in raptor bileşeni ile etkileştiren GTP ile Rag A/B nin bağlanmasını sağlar [53]. Bu etkileşim sonunda mTORC1 sitoplazmadan Rag GTPazların regülatör isimli yapının üzerinde bulunduğu lizozom yüzeyine yerleşir [54]. Rag GTPazlar gibi regülatör yapı da mTORC1'in aminoasitlerle uyarımı için gereklidir.

2.3.2 mTORC1'in Subsratları ve Hücresel Fonksiyonları

Büyüme faktörleri ve besinler (örneğin aminoasitler, enerji) mTORC1 bağımlı olarak gerçekleşen protein sentezi, hücre kütlesinde ve boyutunda artış (hücre büyümesi), proliferasyon ve hücre metabolizması gibi süreçleri uyarır [55]. Bu durumun aksine bahsedilen faktörlerin yetersizliği ya da hücrelerin strese girmesi durumunda suboptimal hücresel koşullara uyum sağlamak için mTORC1'in aktivitesi azaltılır. İndirgenmiş mTORC1 sinyal seviyeleri hücrelerin besin yetersizliği durumunda hücresel yapıları parçalayıp küçük moleküllere çevirmek suretiyle sağ kalım süresini uzatıp degradatif bir süreç olan makrootofajiyi uyarır. TORC1 mayalarda ve memelilerde, mTORC1'in ribozomal RNA ve ribozom proteinlerinin transkripsiyonunu arttırma yoluyla ribozom biyogenezini uyarır [56].



Şekil 3. mTORC1'in hücre büyümesi ve proliferasyonundaki etkisi



Şekil 4. mTORC2'nin hücre proliferasyonuna ve canlılığına etkisi

S6 kinaz1 (S6K1) ve 4E-BP1 (ökaryotik translasyon başlama faktörü 4E bağlayıcı protein), raptor-mTOR'a bağlandığı bilinen memeli proteinleridir [57]. Raptor-mTOR S6K1'in AGC ailesinden kinazlarla korunmuş hidrofobik kısmı ile fosforile ederek aktivasyonunu sağlar.

Raptor mTOR sinyal yolağındaki S6K1 (ribozomal S6 protein kinaz) ve 4EBP1 (ökaryotik translasyon başlama faktörü 4E bağlayıcı protein) gibi

alt hedeflere bağlanarak mTORC1 ile etkileşimlerini sağlar [58]. mTOR sinyal yolağında S6K1'in hidrofobik motifi (thr389) ve 4EBP1'in farklı alanlarının (Thr37/46, Thr70, Ser65) mTOR/Raptor aracılı fosforilasyonu gerçekleşir[59]. Raptor proteininde meydana gelen bir mutasyon 4EBP1'e bağlanmayı ve mTORC1 aracılı 4EBP1 fosforilasyonunu engeller. Bu durum da, mTORC1 sinyal yolağında raptor-4EBP1 etkileşiminin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Besin ve büyüme faktörü yetersizliğinde raptor-mTOR etkileşimi artar.

Hücre büyümesi, hücre döngüsü aşamaları, hücre çoğalması gibi olaylar TORC1'in fonksiyonlarından [60]. mTORC1'e bağlı olarak kontrol edilen hücre boyutu organların ve organizmaların boyutunu belirler. mTORC1,S6K1'i fosforile ederek yoluyla ribozomal proteinlerin ekspresyonunu sağlar[61]. Diğer taraftan, 4EBP1'i fosforile ederek eIF4E (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E) üzerindeki inhibisyon etkisini ortadan kaldırır. Siklin-D1,c-myc, Bcl-2, Bcl-XL, VEGF gibi proteinlerin ekspresyonunu sağlar.

mTORC1 mekanizması yoluyla hücre büyümesi ve çoğalmasının inhibe edilmesi tamamen anlaşılammış olsa da, protein sentezinin azalmasına bağlanmaktadır. Kısacası mTORC1 sinyal yolağının en iyi tanımlanan 2 substratı olan S6K1 ve 4EBP1 translasyonda rol oynamaktadır [62]. S6K1 inaktivasyonu mRNA başlığı 5-metilguanozinde bulunan eIF3 translasyon başlatıcı kompleks ile ilişkilendirilmektedir. mTORC1 translasyonu arttırmak için S6K1'i fosforile ederek eIF3 kompleksini aktifleştirir [63].

S6K1'in substratları, translasyonun kontrolünde görev alan ribozomal protein S6, eIF4B, eEF2K (eukaryotic elongation factor 2 kinase) PDCD4 (programmed cell death 4),CBP80 (cap-binding protein of 80 kDa) ve SKAR (S6K1 Aly/REF-like target) gibi proteinleri içerir. 4EBP1, mRNA5-cap' a bağlanan başlatıcı faktör eIF4E bağlanıp inhibe ederek translasyon baskılayıcı olarak görev yapar. 4EBP1 mTORC1 aracılığıyla fosforile edilince eIF4E' den ayrılır ve bu yapı üzerindeki inhibitör etkisi ortadan kalkar. eIF4E, eIF4G ve eIF4A ile birleşerek translasyon başlatıcı kompleksi oluşturur [64].

mTORC1 ayrıca transkripsiyonel peroksizom proliferatör-aktive reseptörü ve sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinleri aktive ederek lipogenezi uyarır. Sonuç olarak mTORC1 protein ve lipit sentezini kontrol ederek hücre büyümesinde görev alır [65].

2.3.3 mTORC2 ve Etkileştiği Moleküller

mTORC1'e göre daha az bilinen metabolik yoldur. mTORC2 besinlere karşı duyarsız olmasına rağmen insülin gibi büyüme faktörlerine cevap verir. mTORC2 akt, serum ve glukokortikoid indüklenmiş protein kinaz 1 (SGK1) ve protein kinaz C- α gibi AGC alt familyasına ait kinazları kontrol eder. Akt çeşitli yapıların fosforilasyonu yoluyla metabolizma, canlılık, apoptoz, büyüme ve çoğalma gibi birçok hücresel aşamada rol oynar. mTORC2 akt'yi hidrofobik motifinden (Ser473) fosforile ederek aktive eder [66]. mTORC2 hücre iyon transferi ve büyümesinde görevli SGK 1'i aktive eder.

mTORC2 tarafından aktive edilen bir diğer AGC kinaz ise PKC- α 'dır. mTORC2 PKC- α uyarımıyla hücre aktin iskeletini etkileyerek hücre şeklini kontrol eder [67].

2.3.4 Kanserde mTOR Sinyal Yolağının Rolü

Güncel araştırmaların sonuçları mTOR sinyal yolağının kanser patojenitesindeki önemini vurgulamaktadır. mTORC1 ve mTORC2 tarafından kontrol edilen PI3K sinyal yolağı insan kanserlerinde mutasyona uğramış haldedir. mTORC1 tarafından aktive edilen p53'ün azlığı birçok kanserde görülen bir durumdur [68]. Ayrıca bazı kanserlerde mTOR kompleksi tarafından kontrol edilen Tsc1/2, serin tireonin kinaz 11 (Lkb1), PTEN, nörofibromatozis tip 1 (Nf1) gibi proteinleri kodlayan genlerin mutasyona uğradığı görülmüştür [69]. mTOR sinyal yolunun onkojenik aktivasyonu kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını sağlayan prosesleri indükler. mTORC1 tarafından kontrol edilen 4E-BP1/eIF4E seviyeleri tümör oluşumunda merkezi bir rol oynamaktadır. 4EBP1/2 azlığı sonucu aktive olan translasyon, hücre döngüsü ve çoğalmasını destekler. Ayrıca 4E-BP1/eIF4E Akt sinyalinin onkojenik

etkisi mRNA translasyonu, hücre büyümesi ve tümör ilerlemesi gibi hücrel olayları kontrol eder [70]. eIF4E, hücre canlılığı, hücre döngüsünün ilerlemesi, anjiyogenez, enerji metabolizması ve metastazi düzenleyen protoonkogenik proteinlerin sentezlenmesi için gerekli olan mRNA translasyonunu etkiler. mTOR aktivasyonu ile artan ribozom biyogenezi hücre çoğalmasını destekler.

Kanser hücrelerinde lipid sentezi artışı tipik bir belirtidir ve bazı hücreler zar oluşumu için yağ asitleri sentezlemek zorundadır. PI3K sinyali prolipojenik faktör SREBP1 aktivasyonunu sağlar ve mTORC1 onkogenik ve büyüme faktörü sinyallerinin SREBP1'e geçişinde görev alır [71]. SREBP1, lipogenez ve nükleotit biyosentezi için gerekli olan riboz-5 fosfatın olduğu pentoz fosfat sinyal yolağı bileşenlerinin ekspresyonunu da etkiler.

2.3.5 PI3K /Akt Sinyal Yolağı

Fosfolipid kinazlar (PI3K) lipid kinaz ailesini oluştururlar. İnositol fosfolipidlerin inositol halkasında 3' OH grubunu fosforile ederek ikincil mesajcı fosfolipid inositol-3,4,5-trifosfat'ı (PI-3,4,5-P₃) oluştururlar. Akt bu fosfolipidlerle etkileşime geçerek membran iç zarına yerleşir ve burada PDK1 ve PDK2 tarafından aktive edilir. Akt, aktive olarak hücre canlılığı, hücre döngüsü prosesleri ve hücre büyümesinde görev alan çeşitli substratları kontrol eder [72].

Akt, tümör büyümesi ve anjiyogenezde temel düzenleyici olarak görev alır. Hayvanda yapılan bir çalışmada, Akt'nin siRNA tekniğiyle inhibisyonu yumurtalık tümörünün büyümesini ve anjiyogenezi engellemiştir.

mTOR ise Akt tarafından kontrol edilir ve protein sentezi, hücre proliferasyonu, tümör büyümesinde görev alır. Rapamisin ve analogları (CCL-779, RAD001, AP-23573) mTOR aktivasyonunu FK506-bağlayıcı proteine bağlanarak inhibe eder [73]. Yapılan çalışmalara göre bu bileşenler geleneksel olarak kullanılan kemoterapi araçlarıyla sinerjistik olarak çalışır ve tümör büyümesini inhibe eder. Akt mTOR'u ve P70 S6K1'i aktive ederek tümör büyümesini düzenler. Dolayısıyla kanserde PI3K,

Akt, mTOR ve p70 S6K1 inhibisyonu PI3K/Akt'nin aktivasyonunu inhibe eder. Bu sinyal yolağı normal hücrelerde hücre proliferasyonu ve canlılığında görev alır [74].

2.4 Transferrin ve Reseptörü

2.4.1 Transferrin

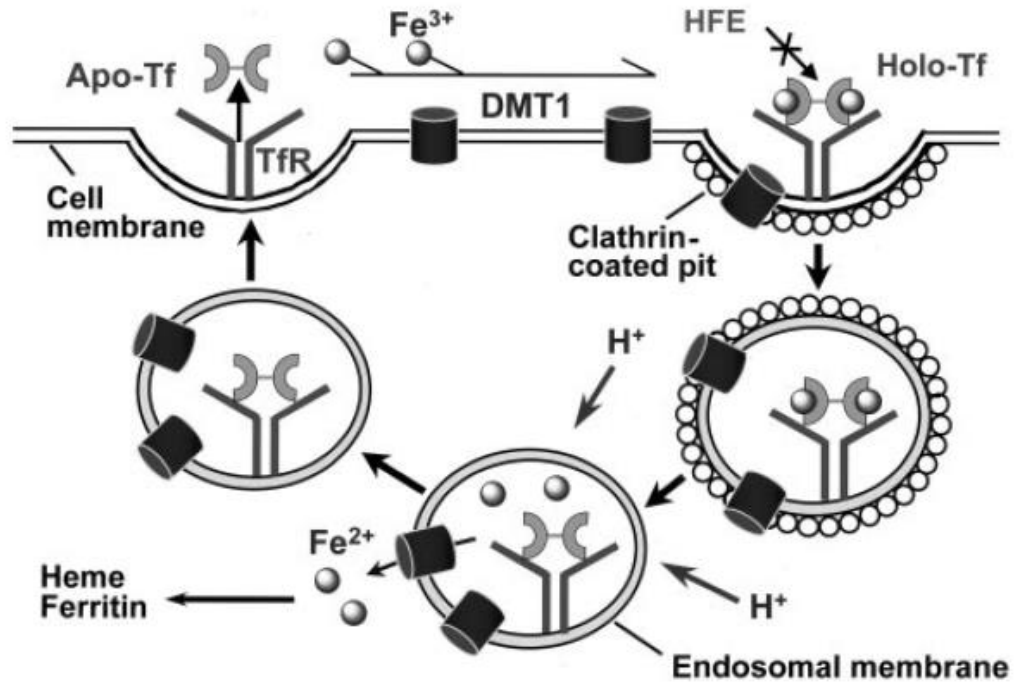
Transferrinler 80 kDA moleküler ağırlıkta olan 679 aminoasitlik diziden oluşan demir bağlayıcı büyük glikoprotein ailesidir. Transferrinin temel olarak 3 çeşidi vardır. Serum transferrini kanda, amniyotik sıvıda, serebrospinal sıvıda, lenf ve süt gibi yapılarda bulunur [75]. Ovo transferrin kuşlarda ve sürüngenlerin yumurta salgılarında bulunur. Laktoferrin ise sütte, gözyaşında, tükürükte ve diğer salgılarda bulunur. Serum transferrini hücrelere ve dokulara demir sağlamakla görevlidir. Transferrin polipeptit zinciri yapısal olarak benzer fakat görev olarak farklı olan N- ve C- lob olarak tanımlanan 2 homolog yarıdan oluşur. 2 lob kısa bir peptid ile bağlanır [76]. Her iki lob da demir bağlayan bölgelere sahiptir. Metal bağlanma bölgesinde Fe⁺³, trozinden gelen 2 Oksijen, histidinden gelen 1 nitrojen, aspartik asitten gelen 1 oksijen ve sinerjist anyon olan karbonattan gelen 2 oksijenle oluşan oktahedral yapı ile koordine edilir. Bu yapı ile transferrinin her 2 lobuna 2 tane Fe⁺³' in yüksek ilgiyle bağlanması sağlanır. pH 7.4'te transferrin iki adet Fe⁺³ (ferrik demir) 'i bağlayıp transferrin reseptörüne bağlanır ve daha sonra PH'nın düşmesiyle konformasyonel değişikliğe uğrayan transferrin sayesinde demir salınır. Bikarbonat demirin transferrinin spesifik bölgesine yüksek affiniteyle bağlanması için gereklidir ve aynı zamanda demirin salınmasında da görev alır. Transferrin, demiri tutarken ve salarken konformasyonel değişikliğe uğrar bu durum transport protein reseptörünün seçici olarak tanımasında önemli rol oynar [77].

2.4.2 Transferrin Reseptörleri

İnsan transferrin reseptörü 1 (TfR1): yaklaşık 90 kDa moleküler ağırlıkta olan 2 özdeş monomerden oluşan transmembran proteindir. Monomerler

Cys89 ve Cys 98 'de 2 disülfid bağıyla bağlanır. NH₂ -terminal sitoplazmik bölgeye (1-67 birimleri), tek transmembran geçişine (68-88 birimleri) , büyük hücre dışı bölüme (89-760 birimleri) sahiptir. Ekstrasüler kısım transferrin bağlayıcı bölge içerir [78]. TRF1, endoplazmik retikulumda sentezlenir ve post translasyonel modifikasyonu fosfat ve açil gruplarıyla olur. Eritrositler dışında bütün hücrelerde bulunan transferrin reseptörünün sayısı hücrenin demir ihtiyacının bir belirteçidir. Hücre içine transferrin reseptörleriyle demir alınması endositik bir işlemdir [79]. Transferrin reseptörünün 90 kDa 'luk birimlerinin her ikisi de birer transferrin molekülü bağlayabilmektedir.

2.4.3 Transferrin Reseptörü ile Demirin Taşınması



Şekil 5 Transferrin reseptörüyle demirin taşınması [80].

Transferrin molekülü apo formdayken iki bölümü birbirinden ayrı durumdadır. pH 7.4 ortamında apo transferrin bir demir iyonunun bağlanmasıyla monoferrik, iki demir iyonunun bağlanmasıyla diferrik yani holo transferrin haline gelir. Diferrik transferrin hücre yüzeyindeki transferrin reseptör 1' e bağlanır. Oluşan diferrik transferrin- transferrin

reseptörü kompleksi klatriin kaplı endozom ile sitoplazmada taşınır. Proton pompasının etkisi sonucu ortamın asitleşmesiyle demir transferrinden salınır ve 2 değerlikli metal taşıyıcı yoluyla endozomdan dışarı verilir. Apo transferrin ve transferrin reseptör 1 hücre yüzeyine geri döner ve nötral pH' ta birbirinden ayrılırlar [81].

2.4.4 Kanser Hücresinde Transferrin Reseptörü ve Demir Metabolizması

Tümör hücrelerinde transferrin reseptörünün aşırı ifadenmesinden dolayı transferrin, tümör hücre hedeflemesinde yaygın olarak kullanılan araçlardan biridir [82]. Transferrin reseptörlerinin meme, yumurtalık, glioma ve glioblastoma gibi beyin kanserlerinde yüksek derecede ifade olan transferrin reseptörü bulunmuştur [83] [84]. Bunlara benzer bulgular transferrin protein ailesini potansiyel kanser belirteci haline getirmiştir.

Çeşitli dokuların malign hücrelerinde yapılan analizlerin sonucunda reseptör ekspresyonuyla hücre proliferasyonu arasında pozitif ilişki olduğu görülmüştür [85]. Malign hücrelerde DNA sentezinde demir kofaktör olarak görev alır ve hücre döngüsü prosesleri demir aracılığıyla kontrol edilir [86]. Tümör hücrelerinin canlılığı için TfR1 reseptörünün bolluğu oldukça önemlidir. Bu durum özellikle adaptif immün sistem fonksiyonlarında ve gelişmesinde transferrin reseptörü 1'in merkezi rol oynamasından dolayı hematopoetik tümörler için geçerlidir [87].

Demir, DNA sentezinde ve dolayısıyla hücre proliferasyonunda görev alan ribonükleotit redüktaz gibi intraselüler enzimlerin kofaktörüdür [88]. TfR1'in ekspresyonu malign hücreler gibi hızlı bir şekilde çoğalan hücrelerde yüksek seviyededir ve kötü prognozla ilişkilidir [89]. Meme kanseri üzerine yapılan araştırmalar da kötü huylu meme kanseri hücrelerinde normal meme hücresine oranla daha fazla TfR sentezlendiği gözlenmiştir. Bu sonuç kanser hücrelerinin bölünme hızındaki artış ve yüksek proliferasyon özelliği nedeniyle demire normal hücrelerden daha fazla ihtiyaç duymasından kaynaklıdır [88].

2.5 Gen Tedavisi

Gen tedavisi, hastalığın iyileşmesini sağlayan ya da ilerlemesini yavaşlatan genetik materyallerin bir vektör aracılığıyla hücrelere gönderilmesini konu alır. Bu hedefte başarılı olabilmek için gerekli en temel aşama; genetik materyali güvenilir ve etkili bir biçimde hücre içine iletebilecek vektörler geliştirmektir [90] .

Gen tedavisi karmaşık ve yeni gelişmeler gerektiren bir süreçtir. Varsayılan sorunlar iyi anlaşılmalı, hatalı gen doğru tespit edilebilmeli ve bu genin çalışan kopyası kullanılabilir olmalıdır. Tedaviye ihtiyaç duyan hücreler iyi tanımlanabilir ve ulaşılabilir olmalıdır.

Gen tedavisi iki şekilde olabilir;

- Gamet gen tedavisi: gametlerin (sperm ve yumurta) genomlarına entegre edilen fonksiyonel genlerle değişikliğe uğratılmasıdır. Bu sayede yapılan değişiklikler kalıtsal hale gelir ve bir sonraki nesile aktarılabilir. Teorik olarak, bu yaklaşım genetik hastalıkların önlenmesi için etkili bir tedavidir. Fakat teknik zorluklar ve etik nedenler bu yaklaşımın uygulanabilirliğini engellemektedir [91].
- Somatik gen tedavisi: tedavi amaçlı kullanılan genlerin hastaların somatik hücrelerine transfer edilmesi yaklaşımıdır. Genlerde yapılan modifikasyonlar yalnızca hastayı etkiler kalıtsal olarak yavrulara aktarılmaz [92].

2.5.1 Gen aktarımı

Gen tedavilerinin çoğunda amaç, hastalığa neden olan genin normal genle değiştirilmesidir. Burada temel sorun bu genlerin hastanın hedef hücrelerine nasıl iletileceğidir. Bu amaç için kullanılan ve vektör olarak adlandırılan moleküller mevcuttur. Vektörler çok spesifik olmakla birlikte bir ya da birkaç genin iletimini etkili bir şekilde sağlamalı, immün sistem tarafından tanınmamalı, stabil olmalı ve uzun süreli gen ifadesi sağlamalıdır. Hastaya gönderilen bu moleküller alerjik reaksiyona ya da inflamasyona neden olmamalıdır.

Vektörlerin iletimi in-vivo ve ex-vivo olmak üzere iki şekilde yapılabilir. Yaygın olan metod hastadan elde edilen hücrelerin kullanılmasıdır. Ex vivo gen terapide hücreler vücut dışında modifiye edildikten sonra tekrar hücre içine transplante edilir. Klinikte uygulanan bazı tedavilerde, kandan ya da kemik iliğinden alınan hücreler laboratuvar ortamında çoğaltıldıktan sonra istenilen geni taşıyan virüslerle etkileştirilir. Virüsler hücre içine girerek istenilen geni hücre DNA'sına iletir. Daha sonra laboratuvar ortamında çoğaltılan hücreler damar yoluyla hastaya enjekte edilir. İn vivo yöntemde ise hastanın hastanın vücudundan hücreler alınmayıp, vektörler ve normal genler hedeflenen hücreyi bulmak üzere hastanın damar sistemine enjekte edilir.

2.5.2 Altın Nanopartiküller

Son yıllarda yapılan araştırmalarda altın nanopartiküller ilaç hedefleme kontrollü salım gibi birçok nanoteknolojik uygulamada önemli yer tutmaktadır [93]. Küresel altın nanopartiküller optoelektronik özellikler, geniş yüzey hacim oranı, yüksek biyouyumluluk ve düşük toksisite gibi boyut ve şekil ile ilgili birçok avantaja sahip olmasından dolayı biyonanoteknoloji alanında önemli bir yere sahiptir. Altın, inert bir madde olduğundan dolayı asidik ortamdan etkilenip oksidasyona uğramaz. Küresel altın nanopartiküller sulu çözeltide farklı renklerde bulunur (kahverengi, turuncu, kırmızı, mor vb.). Çekirdek boyutu 1'den 100 nm 'ye kadar değişebilir ve boyuta bağlı olarak 500 den 550 nm 'ye kadar pik verir [94]. Altın nanopartiküller yüzey plazmon rezonans özelliği sayesinde görünür ve yakın kızılötesi ışık bölgesinde ışık absorpsiyonu ve saçılımı yaparak görüntüleme ve algılama problemlerinde kullanılabilir [94].

Altın nanopartiküller üzerindeki sitrat, tiyol ve diğer gruplar, tiyol yer değiştirme reaksiyonları sayesinde oligonükleotitler gibi birçok biyomolekülle bağlanabilir. Altın nanopartiküllerin bu özelliği antisens tedavi gibi hedefleme çalışmalarında önemli hale gelmesini sağlamıştır [95]. Yer değiştirme reaksiyonları organik moleküllerin ve

biyomoleküllerin altın nanopartiküller üzerine bağlanmasını sağlar. Bunun yanında elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler gibi kovalent olmayan bağlanma şekli de daha basit bir yol olarak kullanılabilir. Kovalent olmayan etkileşimler salım kolaylığı ve geri dönüşebilir doğası nedeniyle iletim ve sensör çalışmalarında daha geniş kullanım alanına sahiptir. Kovalent bağlanma daha önemli olduğu görüntüleme çalışmalarında tercih edilmektedir.

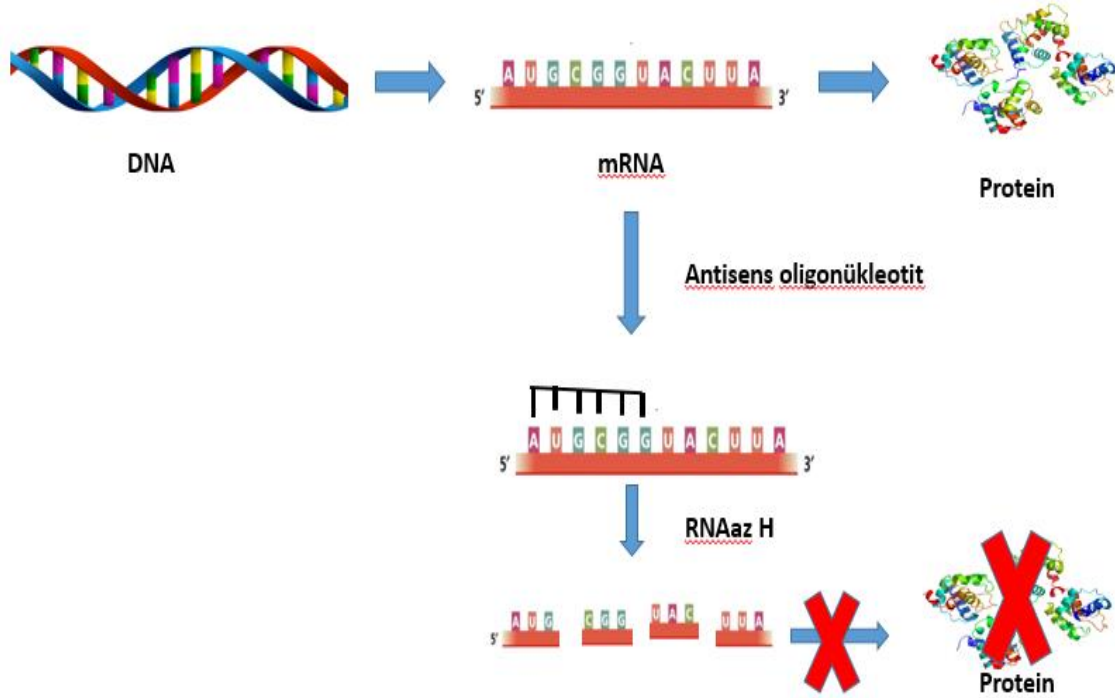
Altın nanopartiküller yüzeylerine iliştirilen molekülleri (antikanser ilaçları, oligonükleotitler vb.) hücre içi etkileşimlerle (pH) ya da dışarıdan verilen uyarımlarla hedeflenen hücrelere bırakmakadır [96]. Nanopartiküllerin hücre içerisine girişini kolaylaştırmak için kullanılan ligandlar hücre zarındaki reseptörlerle etkileşerek oluşturulan altın nanopartikül kompleksinin sitoplazmaya yönelmesini sağlar. Altın nanopartikül kullanılan aktarım çalışmalarında yüzeye yerleştirilen ligandlar bu açıdan çok önemlidir.

2.5.3 Antisens Oligonükleotitler

Antisens oligonükleotitler yaklaşık 15-20 nükleotit uzunluğunda olan hedef RNA'nın spesifik bölgesiyle baz eşleşmesi yapabilen DNA veya RNA parçalarıdır [97]. Antisens oligonükleotitler RNA transportunu, birleştirme ve translasyon işlemlerini engelleyerek etki ederler. Lipozomlar gibi yapılarla hücre içine gönderilebilirler [98]. Antisens oligonükleotitler hedef mRNA molekülü ile baz eşleşmesi yapar ve oluşan RNA AS-ODN heterodubleks yapı RNAaz H aracılığıyla parçalanır, bu yolla translasyon durmuş olur.

Antisens oligonükleotitlerin hücre içerisinde endojen nükleazlar tarafından parçalanmasını engellemek amacıyla AS-ODNler üzerinde birçok modifikasyon yöntemi geliştirilmiştir. Bunlar arasında fosfortiat oligonükleotit, fosfodiester ile RNA nükleotitlerinde bulunan 2' (OH) grubuna sahip riboz şekerinin modifiye edilmesiyle fosfotiorat oligonükleotitler sayılabilir [99].

Başka bir modifikasyon şekli de ribozun 2' OH grubundan alkillenmesi şeklinde olmuştur. 2' O-(2 metoksietil) MOE grupları ya da 2'-O,4-C metilen köprüsü eklenmiştir. Fakat bu modifikasyon antisens oligonükleotitlerin endojen nükleazlardan kaçmasını sağlarken hedef mRNA'ya olan ilgisini azaltmıştır.



Şekil 6. Antisens oligonükleotitlerin etki mekanizması

2.5.4 siRNA'lar

Küçük inhibitör RNAlar "Small interfering RNA (siRNA)", aynı zamanda "short interfering RNA" ya da "silencing RNA" olarak da bilinir. 20-25 baz çifti uzunluğunda kodlanmayan RNA'lardır. Hücrede yapılan siRNA'lar memelilerde bulunmaz ancak, dsRNA ve shRNA'dan "Dicer" enzimi yardımıyla üretilir. SiRNA'lar RNAaz III nükleaz kullanarak ya da kimyasal sentez yoluyla da üretilir.

RNA düzenleyici enzim olarak görev yapan adenozin deaminaz ADAR, dsRNA dan dicer tarafından siRNA üretilmesini engeller. Dicer enzimi

siRNA'yı RNA aracılı baskılama kompleksine (RISC) taşır. Burada bulunan katalitik bileşen argonat siRNA'yı tek zincirli hale getirerek mRNA'ya bağlanmasını sağlar. Bu süreç, mRNA'nın parçalanması ve gen susturulması şeklinde ilerler [100].

siRNA'nın hedef mRNA'yla yüksek ilgiyle eşleşmesi siRNA'nın gen susturulması çalışmalarında uygun araç olarak görülmesini sağlamıştır. Bu spesifik bağlanma hastalık yapıcı genlere müdahalede ilaç geliştirilmesi için kullanılmıştır. siRNA'lar kullanılarak istenmeyen bir proteinin ifadesi engellenebilir ya da mRNAsı baskılanabilir. Sonuçta, inhibitör RNAlar kanser tedavisi için de üretilmekte ve kullanılabilirliği incelenmektedir.

3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kimyasal Maddeler ve Hücreler

Hücre kültürü ve elektroforez malzemeleri; dMEM-high glukoz, fetal siğir serumu (FBS), L-glutamin, antibiyotik (Penisilin- Streptomisin), tripsin EDTA, PBS, DMSO, tripan mavisi, MTT, SDS, %30 akril-bisakril solüsyonu, merkaptotanol, etidyum bromür, agaroz, APS, TEMED, tris baz, HCL, NaOH, tris-HCL, gliserol, brom fenol mavisi, ksilen siyanol, glisin, coomasie brillant blue, methanol, asetik asit, borik asit, EDTA, BSA Sigma (ABD) firmasından temin edilmiştir.

Amin fonksiyonize altın nanopartiküller, Sigma (ABD) firmasından sipariş edilmiştir.

mTOR poliklonal antikoru ve anti rabbit sekonder antikor Proteintech (Manchester) firmasından alınmıştır. mTOR'a karşı siRNA Dharmacon, (Almanya) mTOR antisens oligonükleotitler Sentegen (Ankara) firmalarına siparişle sentezlettirilmiştir. MDA-MB-231 insan metastatik meme kanseri hücreleri Sigma (ABD) firmasından temin edilmiştir.

3.1.1 MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı

İnsan epitelyal meme adenokarsinomudur. Plevral efüzyondan elde edilmiştir. Yüksek derecede invaziv ve kötü prognozludur. Başlangıçta üçlü negatif olan bazal benzeri grupta yer alsa da daha sonra kludin 3 - 4 ve Ki67 proliferasyon markırının düşük ifadesiyle 'Claudin Low' sınıfında yer almıştır. Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve transforming growth factor alpha (TGF α) pozitifdir.

3.2 Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.1 Besiyeri Hazırlanması

% 88 DMEM-high glikoz, %10 fetal bovine serum, %1 antibiyotik ,%1 L-glutamin olacak şekilde maddeler bir tüpte karıştırılmış ve vortekslenmiştir. Daha sonra, +4 °C` de saklanmıştır. Hücreler, %5 CO₂

içeren ortamda 37⁰C'de inkübe edilmiştir. İki günde bir pasajlanarak çoğaltılmıştır.

3.2.2 Hücrelerin Dondurulması

Deneyle arasında hücreler dondurularak saklanmıştır. Hücrelerin dondurulması dereceli olarak aşağıda açıklandığı biçimde yapılmıştır.

Kullanılan araçlar: Faz kontrast mikroskop (OLYMPUS-CKX53SF, JAPAN), CO₂ etüvü (Sanyo, MCO-18AC,JAPAN), tripsin EDTA, besiyeri, FBS, DMSO, santrifüj, pasteur pipeti, ependorf tüp, 1000 ml lik pipet ve pipet uçları, buz, +4⁰C , -20⁰C, buzdolabı (Arçelik), derin dondurucu, sıvı azot tankı.

Etüvdeki hücreler, ağzı etüv içerisinde kapatılarak dışarı alınır ve mikroskopta hücrelerin canlılığı değerlendirilir. Hücre kabının hücre olmayan köşesinde biriktirilen besiyeri, pasteur pipeti ile çekilir. Başka bir pipet ile 2-3 ml tripsin kültür kabına eklenir. 37⁰C'de etüvde 2 dk beklenir. Etüvden alınan hücrelerin tripsin ile muameleleri sonrası kalkıp kalkmadığı mikroskopta incelenir. Pipet ile hücreler ve tripsin bir tüpe alınır ve üzerine bir miktar besiyeri eklenir. Santrifüjde 5 dk 1200 devirde santrifüjlenir. Dondurma tüpü üzerine hücre tipi, işlem tarihi, kaç kez pasajlandığı ve kullanılan besiyeri yazılır. Dondurma tüpü içine 700 µl kültür ortamı, 200 µl FBS, 100 µl DMSO konulup buz üzerinde bekletilir. Santrifüj sonrası tüpün dibinde oluşan hücre peletinin üzerindeki süpernatant pasteur pipeti ile çekilerek atılır. Dondurma tüpünde hazırlanan solüsyonla hücre peleti karıştırılıp hücrelere zarar verilmeden hepsi çekilir. Dondurma tüpüne alınır. +4⁰C 'de 3-4 saat-20⁰C'de 1 gece(8-10 saat), varsa bir süre -80⁰C'de bekletilir. Sonra da azot tankına alınır.

3.2.3 Donmuş Hücrelerin Çözülmesi

Kullanılan araçlar: Su banyosu (Hacettepe Üniversitesi / markasız)/, CO₂ etüvü, beher, distile su, ocak, % 70 lik alkol, tüp, besi yeri, pipet, santrifüj (MPW, 350R, Polonya,) pasteur pipeti, kültür kabı, faz kontrast mikroskop.

Dondurma tüpü ısınan su banyosu (37⁰C) içine koyulur. 1-2 dk beklenir. Su banyosundan dondurma tüpü alınır. Bir t p içerisine 7-9 ml besiyeri eklenir. Dondurma tüpü içerisindeki hücre karışımı çekilip tüpe koyulur. Pipetaj yapıldıktan sonra 1200 devirde 5 dk santrifüjlenir. Santrifüj sonrası süpernatan pasteur pipeti ile çekilerek atılır. Tüpün dibindeki pelet üzerine besiyeri eklenir. Pipetleyerek karıştırılır. Karışım kültür kabına aktarılır. Kültür kabına 2 ml besiyeri eklenir. Faz kontrast mikroskopta hücreler kontrol edilir. Kültür kabı hafifçe ağzı açılarak inkübatöre yerleştirilir.

3.2.4 Hücrelerin Altk lt r  (Pasajlama)

Kullanılan araçlar: Faz kontrast mikroskop, tripsin EDTA, besiyeri, santrif f, pasteur pipeti.

Etüvdeki hücreler ağzı kapalı bir Şekilde etüvden alınır ve mikroskopta incelenir. Hücre kabının hücre olmayan köşesinde biriktirilen besiyeri pasteur pipeti ile çekilir. Başka bir pipet ile 2-3 ml tripsin EDTA kültür kabına eklenir. 37⁰C'de etüvde 2 dakika bekletilir. Etüvden alınan hücrelerin tripsin ile muamele sonrası kapta serbestleşmesi mikroskopta incelenir. Pipet ile hücreler ve tripsin bir tüpe alınıp üzerine bir miktar besiyeri eklenir. Santrifüjde 5 dk 1200 devirde santrifüjlenir. Santrifüj sonrası tüpün dibinde oluşan hücre peleti üzerindeki süpernatan pasteur pipeti ile çekilerek atılır. Pelet  zerine besiyeri eklenir. Eklenen besiyeri ile bir iki kez pipetaj yapılır. Hücreler ve besiyerinden oluşan karışım 4'e bölünür. Hücrelere zarar vermeden 4 kültür kabına eşit olarak hücreler ekilir. Kültür kaplarının üzerine 2 ml besiyeri eklenir. Kültür kabına ekilen hücreler mikroskopta kontrol edilir. Kültür kabı üzerine hücre tipi işlem tarihi ve kullanılan besiyeri yazılır. Kültür kapları ağzı hafifçe kapatılarak etüv içerisine yerleştirilir.

3.2.5 Tripan Mavisi Atma Testi ile Hücre Sayımı

Kullanılan araçlar: Hücre süspansiyonu, tripan mavisi, cam pipet, mikrot p, hemositometre, mikroskop.

Santrifüjlenen hücre pelleti 10 ml besi ortamı eklenerek çözülmüştür. 100 µl hücre süspansiyonu mikrotüpe eklenmiştir. Hücre süspansiyonunun üzerine 100 µl %4'lük tripan mavisi çözeltisi eklenmiştir. Karışımdan bir damla alınarak hemositemetreye konulmuştur. Hemositometrenin incelenecek kısmı mikroskop altında bulunup mikroskop altında boyanmamış hücreler sayılmıştır. Ortalama hücre sayısı hesaplanmıştır(N). Sulandırma oranımız 2 olduğundan mililitredeki hücre sayısı $A = N \times 2 \times 10^4$ ml formülüyle hesaplanmıştır. Hücre süspansiyon hacmimiz 10 ml olduğundan sonuç 10 ile çarpılmıştır. Tüm sayım işlemi spesifik olmayan boyanmanın engellenmesi için 5 dakikada bitirilmiştir.

MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ile tripan mavisi atma testi ile hücre sayımı ve MTT testi deneyi planlanarak hücre büyüme eğrisi çizilmiştir. Deney 3 adet 6'lı kuyularda her adet bir güne denk gelecek şekilde 24h,48h,72h olarak planlanmıştır. Her kuyuya $1,7 \times 10^5$ hücre /ml olacak şekilde ekim yapılmıştır.

3.2.6 MTT Hücre Canlılığı Testi

Her kuyuya $1,7 \times 10^5$ hücre /ml olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır ve hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca üretilmek üzere etüve yerleştirilmiştir. 2,5mg/ 1ml steril PBS içinde MTT stok çözeltisi hazırlanmıştır. 24 saat sonunda her kuyudaki örnekler üzerindeki besi ortamı çekilerek 600 µl serumsuz besi yeri ve 60 µl MTT çözeltisi olacak şekilde kuyulara eklenmiştir ve örnekler 3 saat boyunca CO₂ etüvünde inkübe edilmiştir. 3 saatin sonunda etüvden alınan örnekler üzerindeki ortam çekilerek 400'er µl DMSO eklenmiştir. Formazan kristallerinin DMSO ile çözünmesi için beklendikten sonra her kuyudan 200 µl süpernatant alınarak 96 gözlü kültür kabına konulmuştur. Optik yoğunluk için 570 nm'de mikroplate okuyucu (Molecular Devices, Sunyvale) ile spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır.

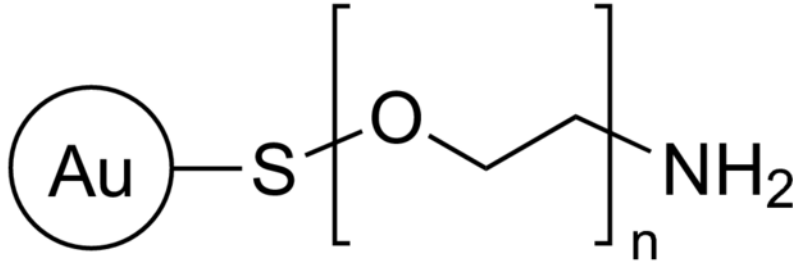
Tablo 2 Kültür kaplarının özellikleri

Petri Kapları	Ortalama Çalışma Yüzey Alanı (cm ²)	Çalışılan Besi ortamı Miktarı (ml)
35mm	8	2
60mm	21	5
100mm	55	12
150mm	152	30-40

Kültür kapları	Ortalama Çalışma Yüzey Alanı (cm ²)	Çalışılan Besi ortamı Miktarı (ml)
	25	6
	75	15
	150	30-40

Çok Kuyulu Plaklar	Ortalama Çalışma Yüzey Alanı (cm ²)	Çalışılan Besi ortamı Miktarı (ml)
6 kuyu	9.5	2
12 kuyu	4	1
24 kuyu	2	0.5
48 kuyu	1	0.25
96 kuyu	0.32	0.1

3.3 Altın Nanopartiküller



Şekil 7. Altın nanopatiküllerin amin grupları ile bağlanması

15 nm çapında, amin grubu ile işlevselleştirilmiş, PEG 5000 kaplı H₂O içinde süspanse haldeki altın nanopatiküller Sigma- Aldrich firmasından temin edilmiştir. Nanopartiküller, 1 ml' lik küçük tüp halinde gelmiştir ve +4 °C'de saklanmıştır. Nanopartiküllerin pozitif yüklü yüzeyi sayesinde transferrin proteini, antisens oligonükleotitler ve siRNA ile elektrostatik etkileşimi sağlanması amaçlanmıştır.

3.4 Antisens Oligonükleotitler

mTOR mRNA'sına eşlenik 5'-CTTCGAGACATGAGTCAGCTTTT-3' dizisine sahip AS-ODN Sentegen firmasında sentezlenmiş, HPLC saflaştırması yapılmış olarak temin edilmiştir [101]. mTOR oligonükleotitleri bilgilendirme kılavuzunda belirtildiği gibi 716,70 µl Tris EDTA (TE) tamponu ile çözülüp 100 mM stok çözelti elde edilmiştir. Elde edilen çözelti yaklaşık 20 µl'lik bölümler halinde -20 °C'de saklanmıştır.

3.5 siRNA'lar

mTOR mRNA'sının katalitik bölgesine komplementer olan 5'-CUUCGAGACAUGAGUCAGCUUTT-3' dizisine sahip siRNA tasarlanmış ve (Dharmacon, Almanya) firmasından sağlanmıştır [101]. 1ml deiyonize suda çözülüp hücrelere 10 µl olarak uygulanmıştır.

3.6 Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Çalışmaları

Protein karışımlarının homojenliği, saflığı veya alt birim kompozisyonu gibi özelliklerin incelenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Poliakrilamid jel

elektroforezinde (PAGE) proteinler destek materyali jel üzerinde uygulanan elektriksel alanın etkisiyle jel boyunca hareket ederler. Protein büyüklüğü, protein yükü, protein şekli ve jelin por büyüklüğü protein yürüme hızına etki eder. Yüklü moleküllerin elektrik alanda ayrılmalarını elektroforez sağlar. Eksi yüklerle çevrili proteinler akım verilince pozitif kutba doğru yürürler. Proteinler moleküler ağırlık ve yüklerine göre birbirinden ayrılır.

- SDS: sodyum dodesil sülfat (deterjan). Proteinlerin etrafında negatif yük katmanı oluşturur.
- PAGE: poliakrilamid jel elektroforezi. Akrilamid çapraz bağlayıcı, poliakrilamidli porlu matriksi oluşturur
- APS: amonyum persülfat. Akrilamid polimerizasyonunu katalize etmek için tetrametilendiamin ile birlikte kullanılır (% 10'luk APS). Polimerizasyon başlatıcıdır.
- TEMED: Hızlı jelleşmeyi sağlar. Katalizördür.
- AKRİLAMİD ve BİSAKRİLAMİD: Protein analizinde jel bileşeni olarak kullanılırlar.
- TRİS HCL: Tampon olarak kullanılır. Birbirine zıt iyonları emme yeteneğine sahiptir. Böylece pH seviyesini sabit tutar.

3.6.1 Elektroforez Stok Çözeltileri Hazırlanması

%30 Akrlamid/Bisakrilamid çözeltisi(100 ml)

29.2 g akrilamid ve 0.8 g N,N'-Metilen-bis-akrilamid tartılmıştır. Distile su ile çözülüp 100 ml'ye tamamlanmıştır.

%10 (W/V) SDS (100ml)

10 gr SDS tartılmıştır 90 ml distile su ile manyetik karıştırıcıda karıştırıcıda çözünmesi sağlanmıştır ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

1.5 M Tris-HCL, pH 8.8 (100 ml)

18.15 g tris baz tartılıp 80 ml distile suda çözülmüştür. 6N HCL kullanılarak pH 8.8'e ayarlanmıştır. Toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

1.0 M Tris-HCL pH:6.8 (100 ml)

12 g tris baz tartılıp 80 ml distile su ile çözülmüştür. 6N HCL kullanılarak pH 6.8'e ayarlanmıştır. Son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Örnek yükleme çözeltisi, Laemmlı sample buffer (4x), 10 ml

1M tris-HCL.....	250 mM.....	2.5 ml
Gliserol	%40.....	4.0 ml
SDS.....	%8.....	800 mg
Brom fenol mavisi.....	%0.01.....	1.0 ml

Yürütme tamponu, pH 8.3, 1L (1x)

3,03 g (25mM) tris baz, 14.4 g(192 mM) glisin ve 1g (%0.1) SDS distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

%10 (W/V) APS

100 mg amonyum persülfat tartılıp 1 ml distile su içerisinde çözülmüştür. APS kullanmadan hemen önce hazırlanmıştır.

3.6.2 Jellerin Hazırlanması

AYIRICI JEL	% 10 'luk
H2O	4.0 ml
%30 akril-bisakril	3.3 ml
1.5M, pH8.8 Tris-HCL	2.5 ml
%10 SDS	0.1 ml
%10 APS	0.1 ml
TEMED	0.004 ml

İSTİFLEME JELİ	% 5'lik
H2O	1.4 ml
%30 akril-bisakril	0.33 ml
1.0 M, pH6.8 Tris-HCL	0.25 ml
%10 SDS	0.02 ml
%10 APS	0.02 ml
TEMED	0.02 ml

3.6.2.1 Ayırıcı Jel

Proteinlerin yürüdüğü kısım, ayırıcı "running ya da resolving" jel olarak tanımlanır. Jel için gerekli olan malzemeler yukarda listelenmiştir. Malzemeler karıştırılmadan önce jelin döküleceği camlar hazırlanmıştır. İnce cam ön tarafa gelecek şekilde ince ve kalın camlar üst üste getirilmiş, düz bir zemin üzerinde camların alt kısımları sıfırlandıktan sonra jel dökme aparatına yerleştirilmiştir. İki cam arasında sızma olmadığından emin olunduktan sonra özel taraklar iki camın arasına yerleştirilmiştir. Taraktan yaklaşık 1 cm aşağısına çizik atılıp istifleme ve ayırma jeli çözeltilerin sınırları belirlenmiştir. Çizik hizasına kadar ayırıcı jel dökülmüştür. Bu jel için gerekli malzemeler tüpe konulmuştur, APS ve en son TEMED eklenmiştir. Jelin donmaması için hazırlanan çözelti beklemeden iki cam arasına pipet yardımıyla dökülmüştür. Jel tamamen donduktan sonra istifleme jeline geçilmiştir.

3.6.2.2 İstifleme Jeli

Tarakların olduğu kısım istifleme "stacking" jel olarak tanımlanır. Bu jel için gerekli malzemeler bir tüpte hazırlanmış ve donmuş ayırıcı jelin üzerine cam hizasına kadar eklenmiş ve tarak takılmıştır. Jelin donması beklenmiştir.

3.6.3 Örneklerin Hazırlanması

3.6.3.1 Transferrinin Jelde Yürütülmesi İçin Hazırlanan Örnekler

Transferrin 0,04 g olarak tartılıp 1 ml distile su içerisinde çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. 200, 100, 50, 25 µg transferrinin farklı dozları seri sulandırma yoluyla elde edilmiştir. Transferrin örneklerinin disülfid bağlarının kırılmasıyla jelde yürütmesi arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla örneklere % 0.5 olacak şekilde merkaptotanol eklenmiştir.

3.6.3.2 Transferrin, Antisens Oligonükleotit ve Altın Nanopartikül Etkileşimleri

Tablo 3 transferrin ve AuNP etkileşimi için hazırlanan preparatların miktarları

1	2	3	4	5	6	7	8
5 µg TF	10µg TF	25µg Tf	50 µg TF	5µg TF+	10µg TF+	25µg TF+	50µg TF+
				2,5µl AuNP	2.5µl AuNP	2.5 µl AuNP	2.5 µl AuNP

Transferrin 0,04 g olarak tartılıp 1 ml distile su içerisinde çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Transferrinin farklı miktarlardaki çözeltileri seri sulandırma yoluyla elde edilmiştir. Örnekler 1.jelde 5, 10, 25, 50 µg transferrin ve aynı örneklere 2.5 µl altın nanopartikül olacak şekilde ayarlanmıştır. Farklı miktardaki transferrinler ependorf tüplerde altın nanopartikül ile etkileştirilmiş 37°C'de sıcak su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. 2. Jel için disülfid bağlarının kırılmasıyla transferrin ve altın nanopartiküllerin etkileşimi arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla transferrin örneklerine % 0.5 olacak şekilde merkaptotanol eklenmiştir ve daha sonra altın nanopartiküllerle etkileştirilmiştir.

Tablo 4 Transferrinin AuNP'lere bağlanmasının incelendiği preparat miktarları

1	2	3	4
200µg Tf	100µg Tf	200 µg Tf (MetOH) + 2,5 µl AuNP	100 µg Tf (MetOH) + 2,5 µl AuNP

5	6	7	8	9
200µg Tf + 2,5 µl AuNP	100µg Tf + 2,5 µl AuNP	200µg Tf + 2,5µl AuNP + 4,08 µg ASODN	200µg Tf(MetOH) + 2,5µl AuNP + 4,08 µg ASODN	200µg Tf (MetOH) + 2,5µl AuNP + 4,08 µg ASODN (kaynatılmış)

Tablo 5 Transferrinin oligonükleotit etkileşimlerinin PAGE'te incelenmesi için hazırlanan preparat miktarları

1	2	3	4	5	6	7	8
4,08µg ASODN	2,72 µg ASODN	2,72µg ASODN + 50µg Tf	2,72µg ASODN + 100µg Tf	4,08µg ASODN + 2,5µl AuNP	2,72 µg ASODN + 2,5 µl AuNP	2,72 µg ASODN + 2,5µl AuNP + 50µg Tf	2,72 µg ASODN + 2,5 µl AuNP + 100µgTf

Tablolardaki örnekler 1:1 oranında yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Örnekler 100 voltta 25 dakika yürütülmüştür. Altın nanopartiküllerin agregasyonunu engellemek için her çalışmadan

önce uzun süre vorteksleme işlemi yapılmıştır. Transferrin, altın nanopartiküller ve oligonükleotitler tabloda belirtilen miktarlarda ependorf tüpler içinde 37°C'de sıcak su banyosunda 1 saat etkileştirilmiştir.

3.6.4 Örneklerin Poliakrilamid Jel Elektroforezine Eklenmesi

Elektroforez tankının içi koşturma tamponu ile doldurulup hazırlanan jel tanka yerleştirilmiştir. Tarak dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Hazırlanan örnekler örnek yükleme tamponuyla 1:1 oranında karıştırılarak her kuyuya 20 µl olarak yüklenmiştir. 100 voltta 2 saat boyunca brom fenol mavisinin jeldeki hareketi takip edilerek örnekler yürütülmüştür.

3.6.5 Poliakrilamid Jelin Boyanması

Elektroforez işleminden sonra proteinlerin görünür hale getirilmesi Coomassie Brilliant Blue(CBB) R-250 ile boyama işlemi yapılmıştır.% 40 metanol, % 10 asetik asit içinde hazırlanmış % 0.1 lik CBB R-250 içinde jeller 30 dakika boyanmıştır. %40 metanol, % 10 asetik asit içerisinde boya açma işlemi yapılmıştır.

3.7 Agaroz Jel Elektroforezi Çalışmaları

3.7.1 Elektroforez Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

10X Tris borat EDTA tamponu (TBE) 100ml

10.8 g tris-bas tartılıp 5.5g borik asit 60 ml distile suda manyetik karıştırıcıda ısıtılarak çözdürülmüştür. Karışıma 4 ml 0.5 M EDTA (pH:8.0) eklenerek son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

6X Yükleme tamponu

0.025 g brom fenol mavisini ve 0.025 g ksilen siyanol tartılıp 7 ml distile suda çözülmüştür. Karışıma 3 ml gliserol eklenerek son hacim 10 ml'ye tamamlanmıştır.

Tris EDTA tamponu (TE) 100ml

12.11gr tris baz tartılıp 100 ml distile suda çözdürülmüştür pH 7.5'e ayarlanmıştır. 1.86 g EDTA 10 ml distile suda çözdürülüp pH 8.00'e ayarlanmıştır. Hazırlanan EDTA çözeltisinden 2 ml alınıp 10 ml tris baz çözeltisine eklenmiştir.

Etidyum bromür

0.25 g etidyum bromür 25 ml distile suda çözülmüştür.

0.5 M EDTA (50ml)

9.3 g EDTA tartılıp 20 ml distile suda çözülmüştür. NaOH ile PH 8'e ayarlanmıştır. Son hacim distile su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.

% 3' LÜK Agaroz Jel

1x 50 ml TBE tampon içerisinde 1.5 g agaroz çözülmüştür. Çözelti çeker ocakta kaynayana kadar ısıtılmıştır ve rengi saydamlaştıktan sonra ateşten alınarak 60°C'ye kadar soğuması beklenmiştir. Soğumadan sonra 50 ml'lik çözeltiye 2 µl etidyum bromür çözeltisi eklenmiştir. Yatay elektroforez sisteminde taraklar yerleştirilip jel dökülmüştür.

3.7.2 Örneklerin Agaroz Jel Elektroforezine Yüklenmesi

Tablo 6 Transferrin oligonükleotit ve AuNP etkileşimlerinin agaroz jelde incelenmesi için hazırlanan preparat miktarları

1	2	3	4	5	6	7	8
4,08µg ASODN	2,72 µg ASODN	4,08µg ASODN + 100 µg Tf	2,72µg ASODN + 100 µg Tf	4,08µg ASODN + 2,5 µl AuNP	2,72 µg ASODN + 2,5µl AuNP	4,08 µg ASODN (kaynatılmış) + 2,5µl AuNP + Tf(MetOH)	4,08 µg ASODN (kaynatılmış) + 2,5 µl AuNP

3.8 AuNP bağı ASODN ve siRNA'ların MDA-MB-231 Hücrelerine Uygulanması

MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine mTOR'a özgü AS-ODN ve siRNA, transferrinli veya transferrinsiz AuNP içeren preparatlar uygulanmıştır. Hücrelerin çoğalması/canlılığı 24, 48 ve 72 saat olmak üzere 3 günlük MTT deneyleriyle takip edilmiştir. -80 °C'de saklanan hücreler çözülüp 75 cm² lik kültür kaplarına ekilip istenilen yoğunluğa ulaşması için etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler istenilen yoğunluğa ulaştıktan sonra 6 kuyulu kültür kaplarına ekim yapılmıştır. Her bir örnek için 3 adet 6 kuyulu kültür kabı olmak üzere toplamda 7 örnek için 21 adet 6 kuyulu kültür kabına her kuyuya 100.000 hücre gelecek şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler, monolayer olması için 1 gün inkübe edildikten sonra örnekler hücrelerle etkileştirilmiştir. 24 saat sonunda her örneğin üzerindeki besiyeri çekilerek 600 µl serumsuz besiyeri 60 µl MTT çözeltisi her kuyuya eklenmiş 3 saatlik inkübasyon sonunda çekilen ortamlar yerine 400'er µl DMSO eklenmiş 30 dakika beklenmiştir. Optik yoğunluk ölçümü için her kuyudan 200'er µl ve 3'er örnek alınarak 96 kuyulu kaplarda mikropilaka okuyucuda (Molecular Devices, 100-250V, 3.5 A) 570 nm de okuma gerçekleştirilmiştir. Diğer 2 gün içinde aynı işlemler tekrarlanmıştır.

3.9 İmmünohistokimya Çalışmaları

3.9.1 Hücrelere Örneklerin Uygulanması

-80 °C'de saklanan MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri çözülüp, 75 cm² lik kültür kaplarına ekilmiştir ve hücrelerin çoğalması için 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İmmünohistokimya çalışmalarında kullanılan 8'li plaklara ekim yapabilmek için tripan mavisi ile hücre sayımı yapılmıştır. (0.4 g tripan mavisi 100 PBS içinde çözülmüştür.) Her kuyuya 12.800 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin monolayer olması için 1 gün beklendikten sonra farklı örneklerle hücreler etkileştirilmiştir. Çukurlarda sırasıyla kontrol hücreleri, siRNA, AS-ODN, siRNA+AUNP+Tf, siRNA+AUNP, AS-ODN+AuNP, AS-ODN+ AuNP+Tf uygulanmış hücreler

üretlmifltir. Preparatlar kuyulara eklendikten sonra hücreler 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

3.9.2 Floresan Boyama

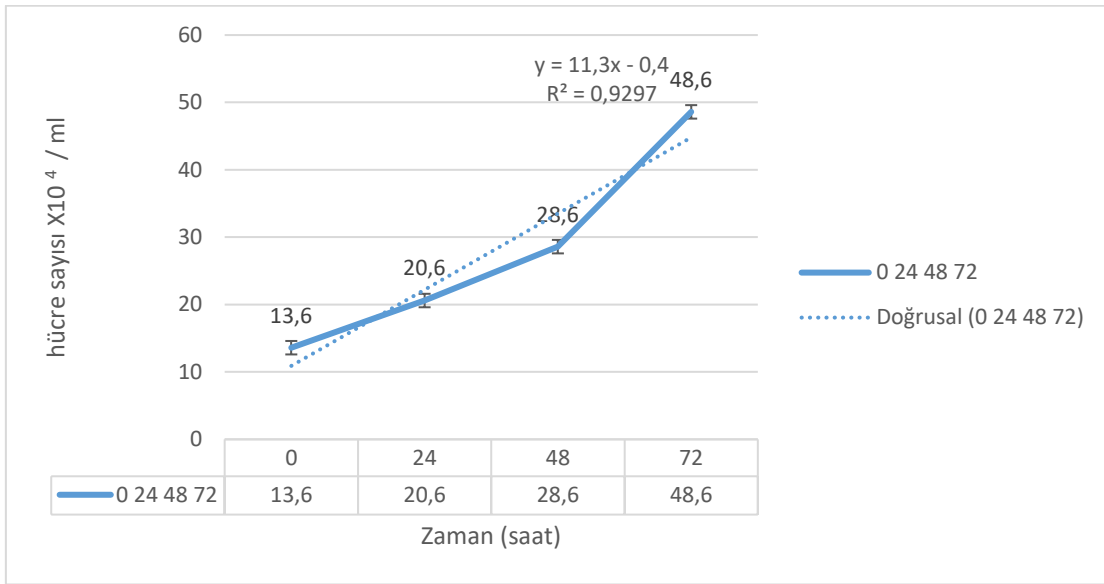
Kültür ortamından çıkarılan hücreler üzerindeki besi ortamı çekilerek atılmıştır. Her kuyu 3'er kez fosfat buffered saline (PBS) ile yıkanmıştır. Fiksasyon işlemi için ortama aseton eklenip 10 dakika beklenip ve 30 dk boyunca kurumaya bırakılmıştır. PBS ile 3 kez yıkama yapıldıktan sonra blokaj işlemi gerekleştirilmifltir. %1 lik bovine serum albümin (BSA), %10 normal keçi serumu, % 0.1 PBS-Tween ile çözelti hazırlanıp 200'er µl kuyulara eklenmiştir ve 1 saat beklenmiştir. Primer antikor 1:1000 oranında %1 PBS-BSA ile sulandırılıp 200'er µl kuyulara eklenmiştir ve oda sıcaklığında 2.5 saat inkübasyona bırakılmıştır. PBS ile yıkama işleminden sonra sekonder antikor eklenip oda sıcaklığında 30 dakika karanlık ortamda beklenmiştir. Yıkama işleminden sonra DAPI ile 2 dakika etkileştirilen hücreler tekrar yıkanmıştır ve alkolle seri muamele yoluyla kapama işlemi gerekleştirilmifltir.

4 BULGULAR

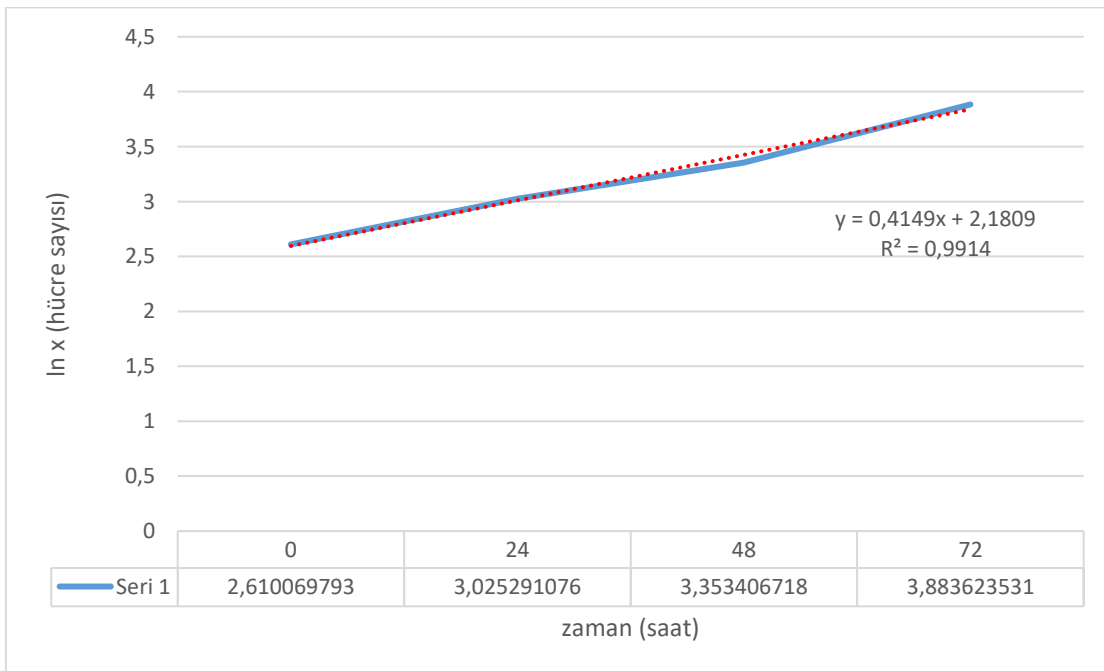
4.1 Hücre Kültürü Çalışmaları Sonucunda Edilen Veriler

MDA-MB-231 hücrelerini (Sigma, ABD) laboratuvar şartlarımızda çoğaltmak ve deneyler için yeterli hücre sağlayabilmek için hücrelerin üreme özellikleri belirlenmiştir.

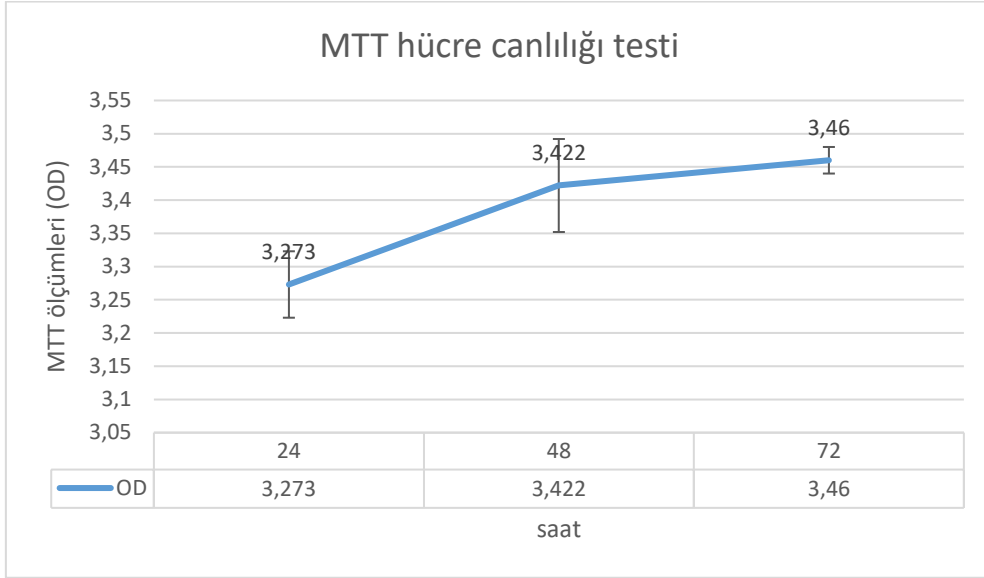
A



B



C

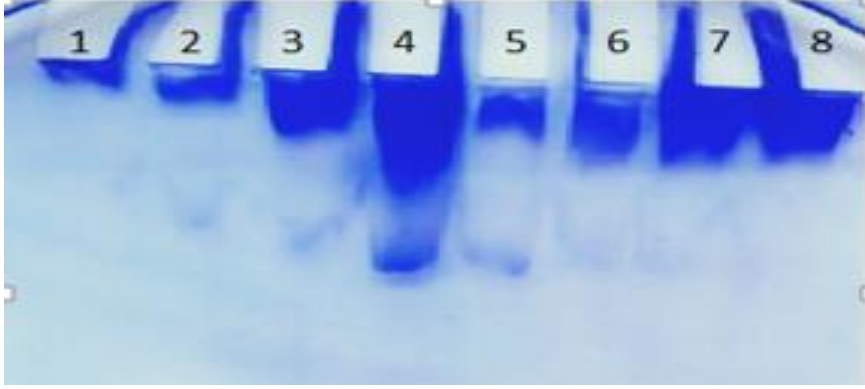


Şekil 8. MDA-MB-231 insan metastatik meme kanseri hücrelerinin çoğalma profili. Tripan mavisi atma testi ile hücre sayımı (A), Hücre çoğalmasının logaritmik ifadesi ve ikilenme süresinin saptanması (B). MTT testiyle hücre çoğalmasının standardize edilmesi (C)

Şekil 7A'da görüldüğü gibi, hücrelerin çoğalması üç gün boyunca izlenmiş, tripin mavisi ile boyanmayan hücreler sayılmış ve ikilenme süresi logaritmik çoğalma üzerinden hesaplanmıştır (B). Hücrelerin özgül üreme hızı 0.018 sa^{-1} , ikilenme süresi ise 39 saat olarak hesaplanmıştır. MTT testi ile spektroskopik değerlendirmede hücrelerin verdiği absorbansın, 24, 48 ve 72 saatlik değerleri; 3.273 ± 0.05 , 3.4 ± 0.07 , 3.46 ± 0.02 olarak bulunmuştur.

4.2 Poliakrilamid Jel Elektforezi Çalışmaları Sonuçları

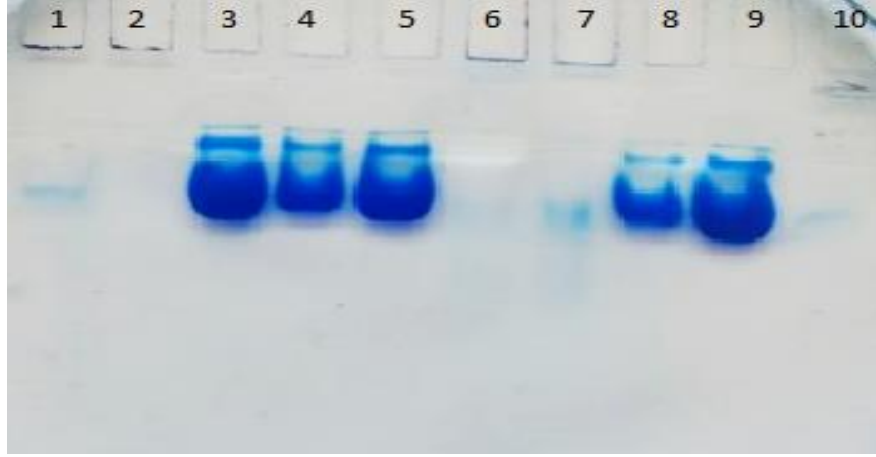
Transferrin AuNP'lere bağlandıktan sonra poliakrilamid (PAGE) elektrofrezinde yürütülerek bağlanma incelenmiştir. 5, 10, 25 ve 50 μg olmak üzere farklı miktarlarda transferrin, altın nanopartikül ile 37°C 'lik sıcak su banyosunda 1 saat etkileştirilmiş ve 100 mV akımda poliakrilamid jelde koşturulmuştur. ŞEKİL 9'da serbest ve AuNP ile etkileştirilmiş transferrinlerin elektforez görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 9. Serbest transferrin ve altın nanopartikülle etkileşmiş transferrinin elektroforetik analizi. 1) 5 µg Tf, 2) 10µg Tf, 3) 25µg Tf, 4) 50 µg Tf, 5) 5 µg Tf + 2,5 µl AuNP 6) 10 µg Tf + 2.5 µl AuNP 7)25 µg Tf+2.5 µl AuNP 8) 50 µg Tf+2.5 µl AuNP

Transferrinin altın nanopartiküllerle etkileştirilmesi sürecinde ilk 3 miktarda geri kalma gözlenmezken 50 µg TF kuyucuğunda bir miktar geri kalma gözlenmiştir.

Altın nanopartiküllere transferrin bağlanmasını sağlayabilmek için nanopartiküllerle etkileştirme öncesinde transferrin % 0.5 v/v eklenen farklı miktarlardaki transferrin çözeltileri 37°C'de 30 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Bu deneylerin sonucunda elde edilen preparatlara AS-ODN'ler de eklenmiştir. Bu preparatların PAGE profili Şekil 10' da verilmektedir.



Şekil 10. İndirgenmiş ve indirgenmemiş transferrinle etkileştirilmiş AuNP lerin altın nanopartikül ve AS-ODN ile bağlanmalarının elektroforezle incelenmesi

- 1.)200 µg Tf (MetOH) + 2,5 µl AuNP +4,08 µg ASODN(kaynatılmış)
- 2.)200 µg Tf (MetOH) + 2,5 µl AuNP +4,08 µg ASODN
- 3.)200 µg Tf + 2,5 µl AuNP+ 4,08 µg ASODN
- 4.)100 µg Tf+ 2,5 µl AuNP
- 5.)200 µg Tf + 2,5 µl AuNP
- 6.) 100 µg Tf (MetOH) + 2,5 µl AuNP
- 7.)200 µg Tf(MetOH) + 2,5 µl AuNP
- 8.)100 µg Tf
- 9.) 200 µg Tf
- 10.)Boş

Şekil 10'da görüldüğü gibi, AuNP etkileşimi öncesi indirgenen transferrin ile ilgili bantlar (1,2,6 ve 7) jelin çukurlarında takılı kalırken indirgenmemiş transferrin preparatları jelde yürüyüp ilerleyebilmişlerdir. AS-ODN'lerin altın nanopartiküllere transferrin üzerinden bağlanıp bağlanmadığını anlayabilmek için yapılan PAGE sonucu Şekil 11.de görülmektedir.



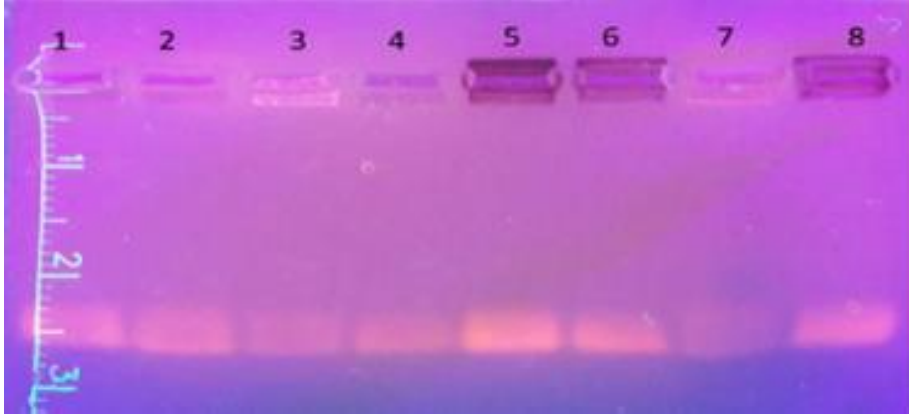
Şekil 11. Transferrin ile mTOR antisens oligonükleotitlerin etkileşiminin poliakrilamid jelde incelenmesi

- 1.) Boş
- 2.) 200 µg Tf
- 3.) 100 µg Tf
- 4.) 200 µg Tf(MetOH) + 4,08 µg ASODN
- 5.) 100 µg Tf(MetOH) + 4,08 µg ASODN
- 6.) 200 µg Tf + 4,08 µg ASODN
- 7.) 100 µg Tf + 4,08 µg ASODN
- 8.) 200 µg Tf (MetOH) + 4,08 µg ASODN (kaynatılmış)
- 9.) 200 µg Tf + 4,08 µg ASODN (kaynatılmış)
- 10.) Boş

Oligonükleotitlerle transferrin etkileşimi transferrin yine indirgenmiş ve ASODN ile bağlanan indirgenmiş transferrin jelde geri kalmıştır (4,5 ve 8 numaralı kuyucuklar). Oligonükleotitlerin ısıtılarak denatüre edilmesinin transferrine bağlanmasında bir katkısı olmadığı gözlenmiştir.

4.3 Agaroz Jel Elektrofrezisi Çalışmaları Sonuçları

AS_ODN leri serbest ve bağlı biçimde takip edebilmek için agaroz jel elektrofrezisi ile deneyler tekrarlanmıştır. Şekil 12 ASODN'lerin AuNPlere bağlanmasını ve transferrinin bağlanmadaki rolünü göstermektedir.



Şekil 12 mTOR antisens oligonükleotitlerin altın nanopartiküllere bağlanmasının ve bağlanmada transferrinin rolünün agaroz jel elektroforezinde incelenmesi.

1. 4,08 µg ASODN
2. 2,72 µg ASODN
3. 4,08 µg ASODN + 100 µg Tf
4. 2,72 µg ASODN + 100 µg Tf
5. 4,08 µg ASODN + 2,5 µl AuNP
6. 2,72 µg ASODN+2,5 µl AuNP
7. 4,08 µg ASODN (kaynatılmış) + 2,5 µl AuNP+ Tf(MetOH)
8. 4,08 µg ASODN (kaynatılmış) + 2,5 µl AuNP

Antisens oligonükleotitlerin serbest transferrine bağlandığı 3. ve 4. kulvarlardaki oligonükleotit bantlarının zayıflığı büyük bir kısmının bağlı olduğunu ve çukurda kaldığını göstermektedir. Transferrin bağlı AuNP lere de bağlanma olduğu (7 numaralı kulvar) ancak tek başına AuNP yüzeyine bağlanmadığı (5. Ve 6. kulvarlar) görülmektedir. Böylece, transferrin moleküllerinin AuNP'leri reseptöre yönlendirmek dışında ASODN bağlanmasını da sağladığı görülmüştür.

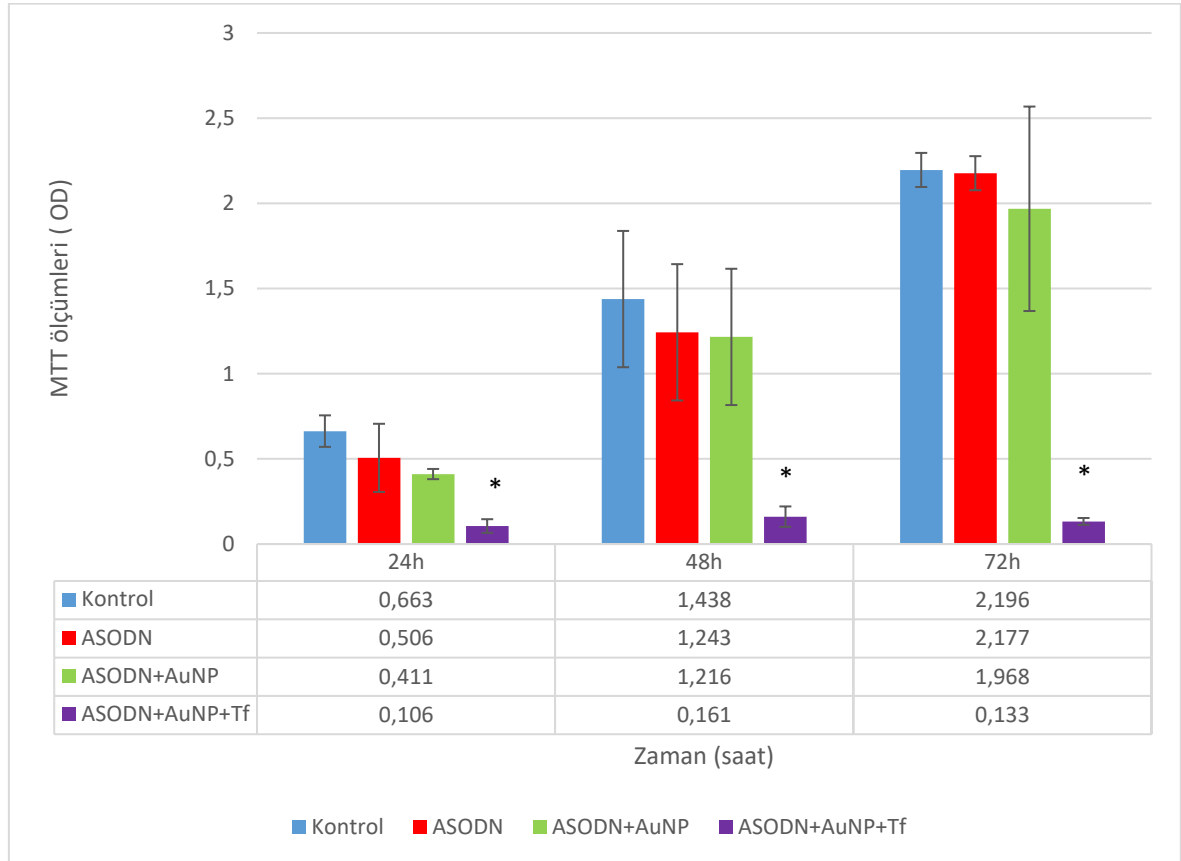
4.4 AuNP bağlı ASODN ve siRNA'ların MDA-MB-231 Hücrelerine Uygulanması Sonuçları

Serbest, AuNP'ye bağlı ve transferrinle işlevselleştirilmiş AuNPlerle bağlı ASODN'ler MDA-MB-231 hücrelerine uygulanmıştır. Uygulanan tüm

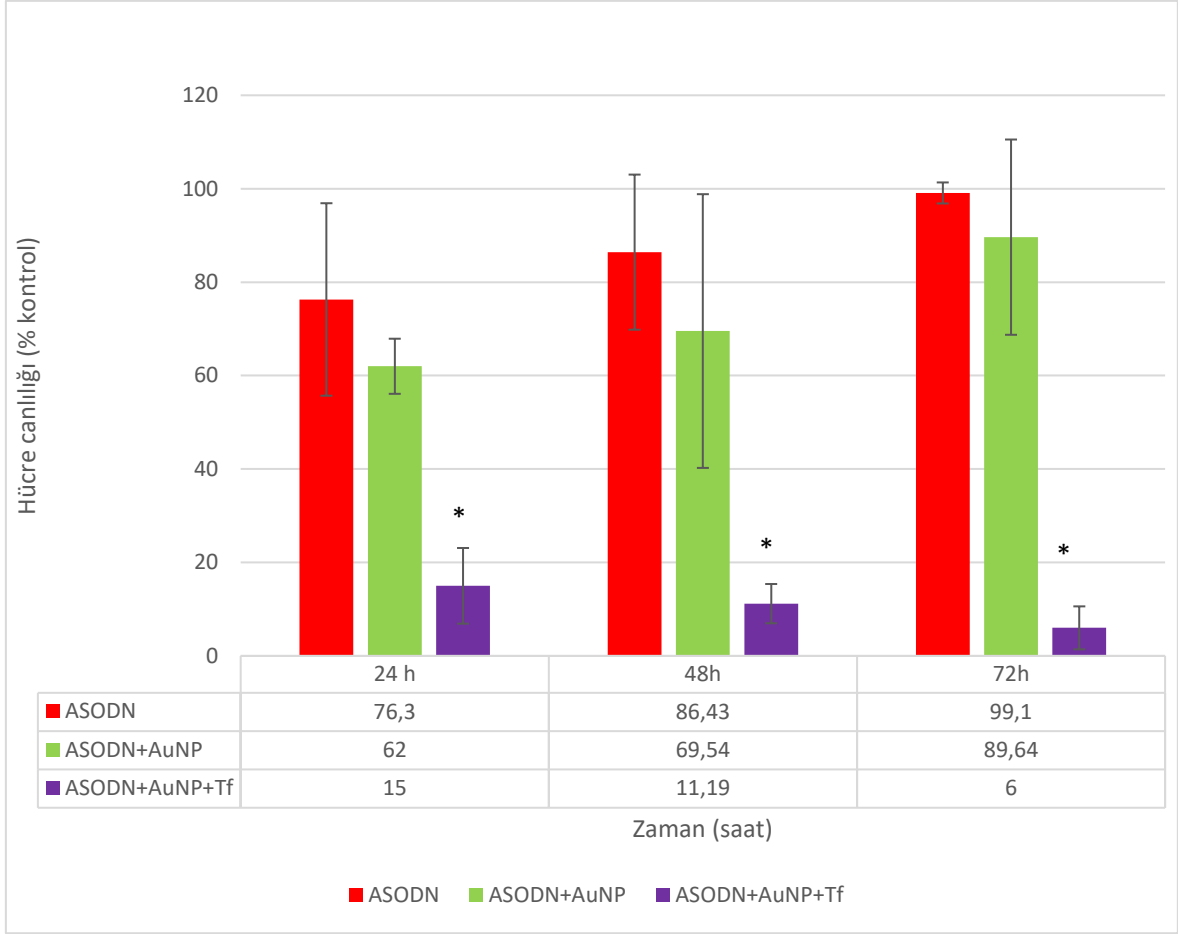
preparatlarda derişim 4.08 µg ASODN, 200 µg indirgenmiş transferrin ve 2.5 µl AuNP olacak şekilde uygulanmıştır.

Şekil 13'te hücre canlılığının MTT ile ölçüm sonuçları görülmektedir (A). Canlılık kontrol hücrelerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir (B). Sonuçlar, deney ortalaması ± standart sapma olarak verilmektedir.

A

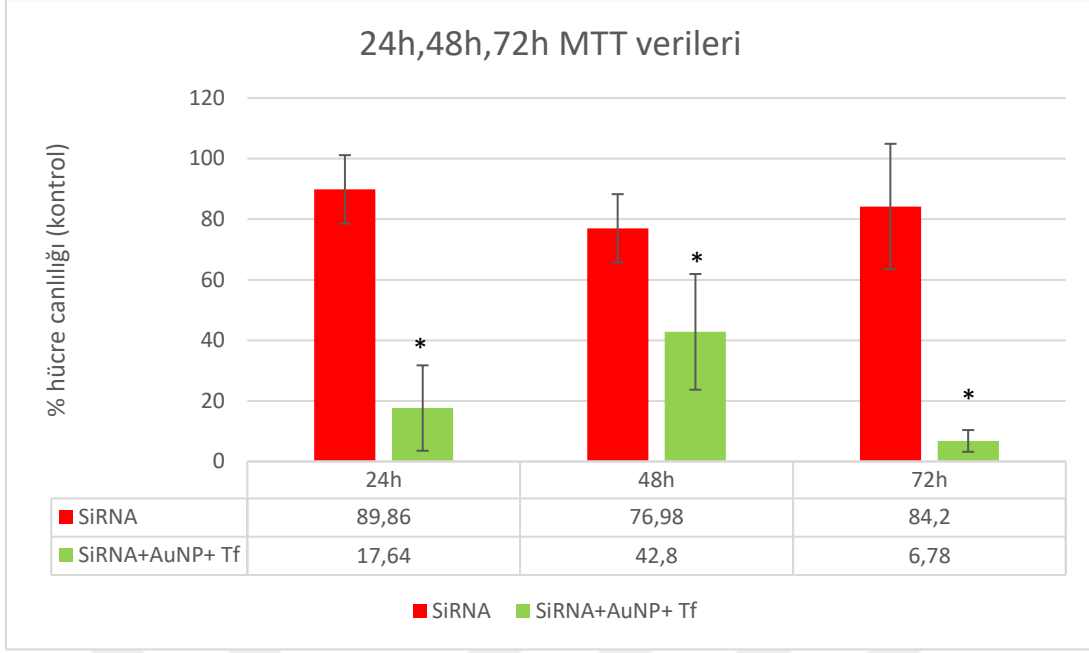


B



Şekil 13. Transferrinle modifiye edilmiş ve mTOR antisens oligonükleotit bağlı altın nanopartiküllerin uygulandığı MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin çoğalma grafiği. Hücre canlılığı 3 gün boyunca MTT ile izlenmiştir. Sonuçlar kontrole göre uygulanan örneklerin kontrol hücrelerine göre yüzde canlılık \pm standart sapma şeklinde verilmiştir.

Kontrol hücrelerine göre, hücre canlılığı serbest ASODN ve AuNP bağlı ASODN uygulanmasıyla ve ASODN+AuNP örnekleri için istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken AS-ODN +AuNP+Tf örneğindeki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

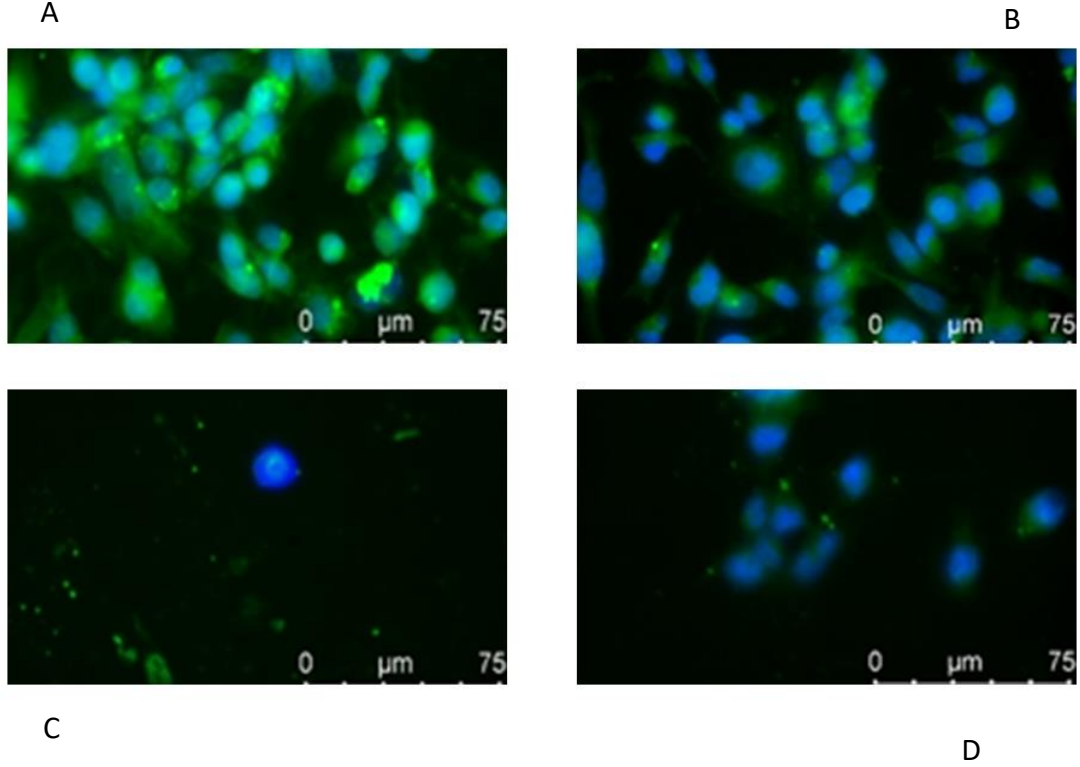


Şekil 14 Meme kanseri hücrelerine transferrinle modifiye edilmiş ve mTOR siRNA bağlı altın nanopartikül uygulanmış meme kanseri hücrelerinin çoğalması. Hücre çoğalması 3 gün boyunca MTT testi ile izlenmiştir.

Sonuçlar kontrole göre uygulanan örneklerin yüzde canlılığı \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. Kontrole göre hücre canlılığı siRNA için istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken siRNA +AuNP +Tf örneğindeki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

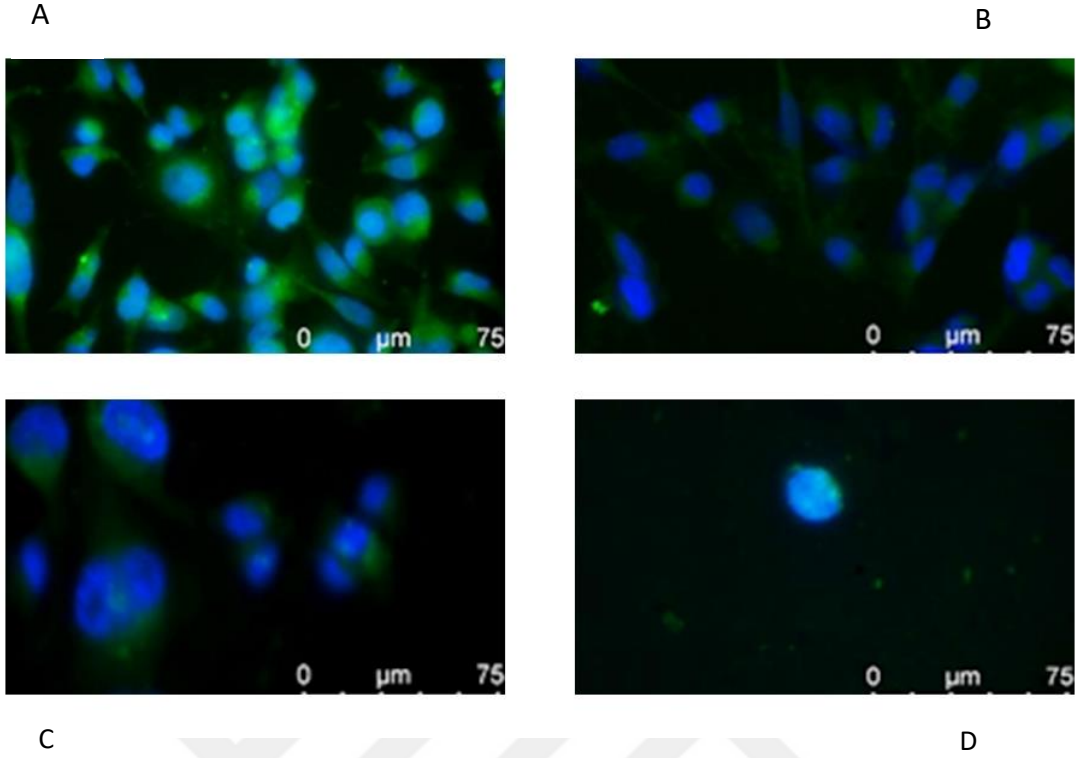
4.5 İmmünohistokimya Çalışmaları Sonuçları

ASODN ve transferrinle modifiye AuNP'lerin hücrelerdeki mTOR ekspresyonunu incelemek üzere immünohistokimya deneyleri yapılmıştır. Şekilde mTOR antikoru aracılığıyla boyanan hücrelerin mikrografları görülmektedir.



Şekil 15. Kontrol (A) ve serbest ASODN (B), ASODN bağlı AuNP (C) ve Tf ve ASODN ile işlevselleştirilmiş altın nanopartikül uygulanan hücrelerde(D) mTOR ekspresyonu.

MDA-MB-231 hücreleri 8 kuyulu plaklara ekildikten sonra yukarıda belirtilen preparatlar uygulanmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra mTOR antikoruyla yapılan immünohistokimya inceleme sonuçları kontrol hücrelerine oranla tüm uygulamaların mTOR ekspresyonunu azalttığını ancak en belirgin ekspresyon azalışı ile birlikte hücre sayısında da azalmaya transferrin ve AS-ODN ile işlevselleştirilmiş AuNPlerin neden olduğunu göstermektedir.



Şekil 16. Transferrin ve mTOR siRNA ile işlevselleştirilmiş altın nanopartikül uygulanan hücrelerde mTOR ekspresyonu A: Kontrol B: siRNA C: siRNA+AuNP D: siRNA+AuNP+Tf

SiRNA uygulanan hücrelerde de AS-ODN uygulamasına benzer sonuçlar elde edilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde, özellikle transferrin ve siRNA ile işlevselleştirilmiş AUNP uygulamasıyla mTOR ekspresyonunda azalma ve hücre sayısında düşme meydana gelmiştir.

4.6 Tartışma

Kanser tedavisinde önemli yaklaşımlardan biri de gen tedavisidir. Gen tedavisinde istenen bir proteinin ekspresyonunu sağlamak için genetik bilgi hücrenin DNA'sına aktarılır (gen aktarımı) ya da ekspresyonu istenmeyen proteinin oluşumu sentez öncesi mRNA düzeyinde eşleniği ile engellenir (ASODN, antisens oligonükleotit, tedavisi) [102]. ASODN hastalıkla ilişkili genlerin modülasyonunu sağlayan hedefe özgül tedavi ajanları olma potansiyeline sahiptir. DNA ilaçlar olarak da adlandırılan

antisens oligonükleotitlerin etkin olabilmesi için biyolojik bariyerleri aşarak hedef bölgeye ulaşması gerekmektedir. Bunun için çeşitli taşıma sistemleri geliştirilmektedir. Yapılan bir çalışmada akciğer kanserinde PKC- α hedeflenmesi için antisens oligonükleotitlerin katyonik olmayan lipozomlar içine enkapsüle edilmesiyle bir taşıma stratejisi geliştirilmiştir [103]. Oligonükleotit aktarımı için yapılan bir başka çalışmada siRNA, demir oksit nanopartiküllerinin iki farklı polimerle kaplanmasıyla elde edilen manyetik nanopartiküllerle hücrelere aktarılmıştır [104]. Ming-Zhen Zhang ve arkadaşları MCF-7 meme kanseri hücrelerinde folat reseptör alfanın inhibisyonu için ASODN'leri kuantum noktalarla taşımışlardır [105]. Bu çalışmaların yanında oligonükleotitlerin iletiminde kullanılacak miseller, dendrimerler, nanokürecikler, nanokapsüller gibi nanometrik yapılar mevcuttur [106] [107]. AuNP'ler (küreler, rodlar gibi farklı şekil ve boyutlarda, hem yalnız hem de manyetik çekirdek etrafında kaplama olarak) medikal uygulamalarda en yaygın olarak kullanılan nanopartiküllerin başında gelmektedir [108, 109]. Altının yüzey plazmon özelliği nedeniyle optik cihazlar ile izlenebilmesi yaygın kullanımının gerekçelerinden biridir. Altın inert ve biyouyumludur. -SH grubu taşıyan ajanlar altın yüzeylere kolaylıkla immobilize edilebilir [110]. Sang-Mi Ryou ve arkadaşları altın nanopartikül DNA konjgatlarıyla shRNA iletimi gerçekleştirmişlerdir. p53 genine özgün shRNA HEK293 ve HeLa insan hücre hattına altın nanopartikül aracılığıyla etkili bir şekilde iletilmiştir [111]. Taşıma sistemlerinin yanında hedefleme hem ilaç hem de gen tedavilerinin başarısında kritik öneme sahiptir. Genellikle kanser hücrelerine özgü ve/veya kanserleşme sürecinde ekspresyonu artan molekülleri (genellikle reseptörler) hedefleyen ajanlar (örneğin antikolar, aptamerler, folik asit ve transferrin) kullanılarak hedeflenir [112]. Ancak, aktif ajanları hem hücreye hedeflemek hem de hücre içine alınmalarını sağlamak sorundur. Burada hedefleme ajanının doğru seçilmesi ve taşıyıcıya doğru immobilizasyonu önemlidir. Literatürde transferrin ile başarılı hedefleme yapılabileceğini gösteren çalışmalar vardır [113-115]. Transferrin modifiye AuNPler transferrin kaplı olmayan

AuNPlere göre, teropatik ajanların kanser hücresine daha etkin biçimde iletmiştir [115]. Bir başka çalışmada transferrin konjuge lipit kaplı polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) nanopartikülleri SKBR-3 meme kanseri hücrelerine aromataz inhibitörü,7-(4-amino)feniltiyo-1,4-androstadin-3,17-dion (7-APTADD), iletiminde kullanılmıştır. Flow sitometri ile meme kanseri hücrelerinde transferrin reseptörünün yüksek derecede ifade edildiği gösterildikten sonra transferrin ile hedeflenmiş nanopartiküllerin hedeflenmemiş olanlara oranla hücre içine alınmada çok daha etkili olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçları destekleyecek şekilde tezde 24 saatlik sonuçlara göre MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine hedeflenmeyen AuNP-ASODN uygulandığında mTOR'a bağlı hücre canlılığı % 38 azalırken transferrin ile hedeflenmiş AuNP-ASODN uygulandığında hücre canlılığı %85 oranında azalmıştır. Sonuçta, transferrin ile hedeflenmiş nanopartiküllerin hedeflenmemiş nanopartiküllere göre daha etkili olduğu gözlenmiştir [116]. Bu tez çalışmasında da benzer şekilde transferrin gen aktarımını etkinleştirmiştir. 2007 yılında Iwamaru ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada glioma hücrelerinde mTOR'un rapamisin ve siRNA ile inhibisyonunun karşılaştırılması yapılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda mTOR'un rapamisin ile inhibisyonunda mTORC1-raptor (mTOR'un rapamisine duyarlı bölgesi) bölgesinin baskılandığı ve dolayısıyla mTOR'un bütün fonksiyonlarının baskılanamadığı anlaşılmıştır. Diğer taraftan siRNA ile yapılan incelemede siRNA'nın mTOR'un rapamisine hassas olmayan bölgeyede etki edebildiği için hem hücre çoğalmasının inhibisyonunda hemde hücrelerin rapamisine karşı duyarlılığının artmasında daha etkili bir mekanizma olduğu görülmüştür [101]. Yapılan çalışmaya benzer şekilde tezde mTOR'un yalnızca rapamisine hassas bölümü değil mTOR'un bütün fonksiyonlarını etkileyebilecek katalitik bölgesine hedefleme yapılmıştır ve oligonükleotitlerin hedef bölgesine iletilmesi için altın nanopartiküllerle taşıyıcı bir sistem oluşturulmuştur. Sonuçta baskılanmanın % 80-90 oranlarında olduğu görülmüştür. mTOR inhibisyonunun kanser tedavisinde kullanılma potansiyeli üzerine yapılan bir başka çalışmada

hem mTOR'a karşı geliştirilen siRNA'lar hem de rapamisin özofagus skuam hücreli karsinomada mTOR/P70S6k sinyal yolağının inhibisyonu için kullanılmıştır. Sonuçlar immünohistokimya ve western blot çalışmalarıyla incelendiğinde hücrelere ayrı ayrı siRNA ve rapamisin uygulandığında mTOR'un etkileştiği proteinler olan 4EBP1 ve P70S6K'ın fosforile olmuş formlarının önemli derecede azalmış olduğu görülmüştür. Hücrelere mTOR siRNA ve rapamisin birlikte uygulandığında ise baskılanmanın daha da arttığı rapamisin ve siRNA'nın birbirlerinin etkilerini arttırdığı sonucuna varılmıştır. Tezde immünohistokimya çalışmalarında mikrografları verilen siRNA ve siRNA-AuNP-Tf uygulanmış kanser hücrelerinde protein miktarının ve hücre sayısının önemli oranda azalması bu çalışmayı desteklemiştir [117]. Bu tezde mTOR, ASODN tedavisi için ilk kez kullanılmıştır. mTOR'un inhibisyonunun kanser tedavisinde kullanılma potansiyeli göz önüne alındığında meme kanseri hücrelerinde etki gösterecek bir nanopartikül sistemi oluşturulmuştur. Ayrıca, AuNPlerin inert ve biyouyumlu olmaları; yüksek afiniteyle gerçekleşen reseptör ligant etkileşiminden ve hücre içine alınmadan (reseptör aracılı endositoz) yararlanılması tezde geliştirilecek nanopartikül sisteminin diğer sistemlere üstünlüğüdür ve özgün yönüdür. Bu özellikler, bu tezin önemli çıktıları arasında sayılabilir. Sunulan tez kapsamında yapılan çalışmalarda AuNP'ler üzerine hedefleme ajanı transferrin ve mTOR inhibisyonu için eşlenik ASODN immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. ASODN'lerin yanında mTOR mRNA'sına özgü siRNA'lar da transferrinle işlevselleştirilmiş altın nanopartiküllere bağlanarak meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Dolayısıyla, tez kapsamında hazırlanıp, özellikleri saptanan ve meme kanseri hücreleri üzerindeki etkileri belirlenen işlevselleştirilmiş altın nanopartiküller, diğer nanoilaç geliştirme ve gen tedavisi yaklaşımları için bilgi verici olup tedavide kullanılma potansiyeli değerlendirilebilecek bir sistem oluşturabileceklerdir.

5 SONUÇLAR

1. MDA-MB-231 insan metastatik meme kanseri hücrelerinin laboratuvar şartlarımızda ikilenme süresinin 39 saat olduğu saptanmıştır.
2. Amin (NH₂) grubu taşıyan altın nanopartiküller (AuNP) indirgenmiş transferrin bağlanarak işlevselleştirilmiştir. Transferrinin indirgenmemiş formunun altın yüzeyine tutunmadığı saptanmıştır. Transferrinin indirgenmesiyle yapısında oluşan değişim karboksil ve histidin gibi negatif yüklü grupların AuNP yüzeyindeki amin gruplarıyla etkileşimini sağlamış olabileceği düşünülmüştür.
3. mTOR'a özgü antisens oligonükleotitler altın nanopartiküllere bağlanmıştır. Bağlanmanın transferrin üzerinden gerçekleştiği gözlenmiştir. Transferrinin polar bölümleriyle hem AuNP hem de ASODN'lere bağlanabildiği belirlenmiştir.
4. Meme kanseri hücrelerine uygulanan serbest ASODN moleküllerinin hücre çoğalmasını kontrol hücrelerine göre, 24 saatte % 24, 48 saatte %14 ve 72 saatte % 0.9 oranında azalttığı; AuNP bağlı şekilde ise 24 saatte % 38, 48 saatte % 30, 72 saatte % 10 oranında azalttığı ancak bu farkların istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.
5. Hücrelere transferrin ve ASODN ile işlevselleştirilmiş AuNP uygulandığında ise 24 saatte % 85, 48 saatte % 89 ve 72 saatte %93 oranında azalttığı saptanmıştır. Sonuçlar kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında sonuç anlamlı bulunmuştur.
6. Meme kanseri hücrelerine uygulanan serbest mTOR'a özgü siRNA moleküllerinin hücre çoğalmasını 24 saatte % 10, 48 saat sonra % 23 ve 72 saat sonra %16 oranında azalttığı ancak bu farkların istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.
7. Hücrelere transferrin ve mTOR'a özgü siRNA ile işlevselleştirilmiş AUNP uygulandığında ise 24 saatte % 82, 48 saatte % 57 ve 72

saatte %93 oranında azalttığı saptanmıştır. Sonuçlar kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında sonuç anlamlı bulunmuştur.

8. Kontrol MDA-MB-231 hücrelerinde immünohistokimya incelemesi ile mTOR ekspresyonu saptanmıştır.

mTOR ASODN ve siRNA bağlı altın nanopartiküllerle etkileşen hücrelerde mTOR ekspresyonu kontrole göre azaldığı görülmüş ancak transferrin ve ASODN ile veya siRNA ile işlevselleştirilen altın nanopartiküllerin uygulandığı hücrelerde mTOR ekspresyonu hiç görülmemiş ve hücre sayısının da etkin biçimde azaldığı histolojik bulgularla desteklenmiştir.

9. Sonuç olarak, hazırlanan transferrin ve ASODN veya siRNA ile işlevselleştirilmiş altın nanopartiküllerin metastatik meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu etkin biçimde engellediği belirlenmiştir. Geliştirilen AuNP'lerin etki mekanizmalarının, hücrelerin metastatik özelliklerine etkilerinin, diğer hücreler üzerindeki muhtemel sitotoksik etkilerinin ileri çalışmalarda açıklığa kavuşması ile terapötik potansiyeli olan bir malzeme elde edilebileceği düşünülmüştür. Ayrıca, deney hayvanları üzerinde tümör modelleri üzerinde daha ileri çalışmalara da yol açabilecektir.

6 KAYNAKLAR

1. Bertram, J.S., *The molecular biology of cancer*. Molecular Aspects of Medicine, 21(6): p. 167-223, 2000.
2. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling in growth control and disease*. Cell, 149(2): p. 274-93, 2012.
3. Castaneda, C.A., et al., *The phosphatidyl inositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer*. Cancer Metastasis Rev, 29(4): p. 751-9, 2010.
4. Xie, J., X. Wang, and C.G. Proud, *mTOR inhibitors in cancer therapy*. F1000Res, 5, 2016.
5. Albert, J.M., et al., *Targeting the Akt/mammalian target of rapamycin pathway for radiosensitization of breast cancer*. Mol Cancer Ther, 5(5): p. 1183-9, 2006.
6. LoPiccolo, J., et al., *Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations*. Drug Resist Updat, 11(1-2): p. 32-50, 2008.
7. Nagata, *Effect of rapamycin, an mTOR inhibitor, on radiation sensitivity of lung cancer cells having different p53 gene status*. International Journal of Oncology, 37(4), 2010.
8. Dufes, C., M. Al Robaian, and S. Somani, *Transferrin and the transferrin receptor for the targeted delivery of therapeutic agents to the brain and cancer cells*. Ther Deliv, 4(5): p. 629-40, 2013.
9. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 144(5): p. 646-74, 2011.
10. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. cell, 144(5): p. 646-674, 2011.
11. Mori, S., et al., *Anchorage-independent cell growth signature identifies tumors with metastatic potential*. Oncogene, 28(31): p. 2796-805, 2009.
12. Irigaray, P., et al., *Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 61(10): p. 640-658, 2007.
13. Hecht, S.S., *Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer*. Nature Reviews Cancer, 3(10): p. 733-744, 2003.
14. Stickel, F., et al., *Cocarcinogenic effects of alcohol in hepatocarcinogenesis*. Gut, 51(1): p. 132-139, 2002.
15. DeSantis, C., et al., *Breast cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin, 64(1): p. 52-62, 2014.
16. White, M.C., et al., *Age and cancer risk: a potentially modifiable relationship*. Am J Prev Med, 46(3 Suppl 1): p. S7-15, 2014.

17. Mammi, C., et al., *Androgens and adipose tissue in males: a complex and reciprocal interplay*. Int J Endocrinol, 2012: p. 789653, 2012.
18. Shiovitz, S. and L.A. Korde, *Genetics of breast cancer: a topic in evolution*. Ann Oncol, 26(7): p. 1291-9, 2015.
19. Ford, D., et al., *Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families*. The American Journal of Human Genetics, 62(3): p. 676-689, 1998.
20. Cichon, M.A., et al., *Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 15(4): p. 389-97, 2010.
21. Cleary, M.P. and M.E. Grossmann, *Minireview: Obesity and breast cancer: the estrogen connection*. Endocrinology, 150(6): p. 2537-42, 2009.
22. Klaunig, J.E., L.M. Kamendulis, and B.A. Hocevar, *Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis*. Toxicol Pathol, 38(1): p. 96-109, 2010.
23. Ravanat, J.L., et al., *Radiation-mediated formation of complex damage to DNA: a chemical aspect overview*. Br J Radiol, 87(1035): p. 20130715, 2014.
24. Zeilinger, S., et al., *Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation*. PLoS One, 8(5): p. e63812, 2013.
25. Malhotra, G.K., et al., *Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers*. Cancer Biology & Therapy, 10(10): p. 955-960, 2014.
26. Schnitt, S.J., *Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy*. Mod Pathol, 23 Suppl 2: p. S60-4, 2010.
27. Voduc, K.D., et al., *Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse*. J Clin Oncol, 28(10): p. 1684-91, 2010.
28. Brenton, J.D., et al., *Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application?* J Clin Oncol, 23(29): p. 7350-60, 2005.
29. Cheang, M.C., et al., *Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer*. Journal of the National Cancer Institute, 101(10): p. 736-750, 2009.
30. Tran, B. and P.L. Bedard, *Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets*. Breast Cancer Res, 13(6): p. 221, 2011.
31. Burstein, H.J., *The distinctive nature of HER2-positive breast cancers*. New England Journal of Medicine, 353(16): p. 1652-1654, 2005.

32. Rakha, E.A., J.S. Reis-Filho, and I.O. Ellis, *Basal-like breast cancer: a critical review*. J Clin Oncol, 26(15): p. 2568-81, 2008.
33. Liu, X., et al., *Somatic loss of BRCA1 and p53 in mice induces mammary tumors with features of human BRCA1-mutated basal-like breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(29): p. 12111-6, 2007.
34. Anders, C.K., et al., *Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition: "targeted" therapy for triple-negative breast cancer*. Clin Cancer Res, 16(19): p. 4702-10, 2010.
35. Prat, A., et al., *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer*. Breast Cancer Res, 12(5): p. R68, 2010.
36. Eliyatkin, N., et al., *Meme Karsinomunda Moleküler Sınıflama: Gelenekselden Yeni Döneme Yolculuk*. Meme Sagligi Dergisi/Journal of Breast Health, 11(2), 2015.
37. EROĞLU, A. and E. ÇİÇEK, *Meme Kanserinde Moleküler Alt Tiplere Göre Cerrahi Tedavi Yaklaşımları*. Yeni Tıp Dergisi, 31(2): p. 83, 2014.
38. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR Signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 4(2), 2012.
39. Yang, H., et al., *mTOR kinase structure, mechanism and regulation*. Nature, 497(7448): p. 217-23, 2013.
40. Sengupta, S., T.R. Peterson, and D.M. Sabatini, *Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress*. Mol Cell, 40(2): p. 310-22, 2010.
41. Huang, J., et al., *The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2*. Mol Cell Biol, 28(12): p. 4104-15, 2008.
42. Inoki, K., et al., *Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling*. Genes Dev, 17(15): p. 1829-34, 2003.
43. Long, X., et al., *Rheb binds and regulates the mTOR kinase*. Current Biology, 15(8): p. 702-713, 2005.
44. Brugarolas, J., et al., *Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex*. Genes & Development, 18(23): p. 2893-2904, 2004.
45. Hemmings, B.A. and D.F. Restuccia, *PI3K-PKB/Akt pathway*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 4(9): p. a011189, 2012.
46. Mendoza, M.C., E.E. Er, and J. Blenis, *The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation*. Trends in Biochemical Sciences, 36(6): p. 320-328, 2011.

47. Lee, D.F., et al., *IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway*. Cell, 130(3): p. 440-55, 2007.
48. Vadlakonda, L., M. Pasupuleti, and R. Pallu, *Role of PI3K-AKT-mTOR and Wnt Signaling Pathways in Transition of G1-S Phase of Cell Cycle in Cancer Cells*. Front Oncol, 3: p. 85, 2013.
49. Wolff, N.C., et al., *Cell-type-dependent regulation of mTORC1 by REDD1 and the tumor suppressors TSC1/TSC2 and LKB1 in response to hypoxia*. Molecular and cellular biology, 31(9): p. 1870-1884, 2011.
50. Feng, Z., et al., *The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways*. Cancer Res, 67(7): p. 3043-53, 2007.
51. Li, F., et al., *Leucine nutrition in animals and humans: mTOR signaling and beyond*. Amino Acids, 41(5): p. 1185-93, 2011.
52. Kim, S.G., G.R. Buel, and J. Blenis, *Nutrient regulation of the mTOR complex 1 signaling pathway*. Mol Cells, 35(6): p. 463-73, 2013.
53. Sancak, Y., et al., *The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1*. Science, 320(5882): p. 1496-501, 2008.
54. Sancak, Y., et al., *Ragulator-Rag Complex Targets mTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids*. Cell, 141(2): p. 290-303, 2010.
55. Zhang, Y.N., et al., *Coordinated regulation of protein synthesis and degradation by mTORC1*. Nature, 513(7518): p. 440-+, 2014.
56. Iadevaia, V., R. Liu, and C.G. Proud, *mTORC1 signaling controls multiple steps in ribosome biogenesis*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 36: p. 113-120, 2014.
57. Dann, S.G., A. Selvaraj, and G. Thomas, *mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer*. Trends in Molecular Medicine, 13(6): p. 252-259, 2007.
58. Kim, D.H., et al., *MTOR interacts with Raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery*. Cell, 110(2): p. 163-175, 2002.
59. Hara, K., et al., *Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR*. J Biol Chem, 272(42): p. 26457-63, 1997.
60. Loewith, R., et al., *Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control*. Molecular Cell, 10(3): p. 457-468, 2002.

61. Graff, J.R. and S.G. Zimmer, *Translational control and metastatic progression: Enhanced activity of the mRNA cap-binding protein eIF-4E selectively enhances translation of metastasis-related mRNAs*. *Clinical & Experimental Metastasis*, 20(3): p. 265-273, 2003.
62. Fingar, D.C., et al., *mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E*. *Molecular and Cellular Biology*, 24(1): p. 200-216, 2004.
63. Kwon, J.K., et al., *Dual inhibition by S6K1 and Eif4E is essential for controlling cellular growth and invasion in bladder cancer*. *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations*, 32(1), 2014.
64. Yanagiya, A., et al., *Translational homeostasis via the mRNA cap-binding protein, eIF4E*. *Mol Cell*, 46(6): p. 847-58, 2012.
65. Ricoult, S.J. and B.D. Manning, *The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism*. *EMBO Rep*, 14(3): p. 242-51, 2013.
66. Garcia-Martinez, J.M. and D.R. Alessi, *mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1)*. *Biochem J*, 416(3): p. 375-85, 2008.
67. Angliker, N. and M.A. Ruegg, *In vivo evidence for mTORC2-mediated actin cytoskeleton rearrangement in neurons*. *Bioarchitecture*, 3(4): p. 113-8, 2013.
68. Feng, Z., et al., *The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(23): p. 8204-9, 2005.
69. Cheung, M. and J.R. Testa, *Diverse Mechanisms of AKT Pathway Activation in Human Malignancy*. *Current Cancer Drug Targets*, 13(3): p. 234-244, 2013.
70. Hsieh, A.C., et al., *Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E*. *Cancer Cell*, 17(3): p. 249-61, 2010.
71. Porstmann, T., et al., *SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth*. *Cell Metabolism*, 8(3): p. 224-236, 2008.
72. Liu, P., et al., *Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer*. *Nat Rev Drug Discov*, 8(8): p. 627-44, 2009.
73. Carraway, H. and M. Hidalgo, *New targets for therapy in breast cancer - Mammalian target of rapamycin (mTOR) antagonists*. *Breast Cancer Research*, 6(5): p. 219-224, 2004.

74. Meng, Q., et al., *Role of PI3K and AKT specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway*. Cellular Signalling, 18(12): p. 2262-2271, 2006.
75. Gomme, P.T. and K.B. McCann, *Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions*. Drug Discovery Today, 10(4): p. 267-273, 2005.
76. Gomme, P.T., K.B. McCann, and J. Bertolini, *Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions*. Drug Discovery Today, 10(4): p. 267-273, 2005.
77. Huebers, H., et al., *Uptake and release of iron from human transferrin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 78(4): p. 2572-6, 1981.
78. Aisen, P., *Transferrin receptor 1*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 36(11): p. 2137-2143, 2004.
79. Dautry-Varsat, A., *Receptor-mediated endocytosis: The intracellular journey of transferrin and its receptor*. Biochimie, 68(3): p. 375-381, 1986.
80. Qian, Z.M., et al., *Targeted Drug Delivery via the Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis Pathway*. Pharmacological Reviews, 54(4): p. 561, 2002.
81. Thorstensen, K. and I. Romslo, *The role of transferrin in the mechanism of cellular iron uptake*. Biochem J, 271(1): p. 1-9, 1990.
82. Högemann-Savellano, D., et al., *The Transferrin Receptor: A Potential Molecular Imaging Marker for Human Cancer*. Neoplasia, 5(6): p. 495-506, 2003.
83. Chirasani, S.R., et al., *Transferrin-receptor-mediated iron accumulation controls proliferation and glutamate release in glioma cells*. J Mol Med (Berl), 87(2): p. 153-67, 2009.
84. Recht, L., et al., *Transferrin receptor in normal and neoplastic brain tissue: implications for brain-tumor immunotherapy*. J Neurosurg, 72(6): p. 941-5, 1990.
85. Trowbridge, I.S. and M.B. Omary, *Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 78(5): p. 3039-43, 1981.
86. Torti, S.V. and F.M. Torti, *Iron and cancer: more ore to be mined*. Nature reviews. Cancer, 13(5): p. 342-355, 2013.
87. Luria-Pérez, R., G. Helguera, and J.A. Rodríguez, *Antibody-mediated targeting of the transferrin receptor in cancer cells*. Boletín Médico del Hospital Infantil de México, 73(6): p. 372-379, 2016.

88. Le, N.T.V. and D.R. Richardson, *The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1603(1): p. 31-46, 2002.
89. Habashy, H.O., et al., *Transferrin receptor (CD71) is a marker of poor prognosis in breast cancer and can predict response to tamoxifen*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 119(2): p. 283, 2009.
90. Misra, S., *Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution*. *J Assoc Physicians India*, 61(2): p. 127-33, 2013.
91. Fletcher, J.C. and W.F. Anderson, *Germ-line gene therapy: a new stage of debate*. *Law Med Health Care*, 20(1-2): p. 26-39, 1992.
92. Dorin, J., *Somatic gene therapy*. *BMJ : British Medical Journal*, 312(7027): p. 323-324, 1996.
93. Yeh, Y.C., B. Creran, and V.M. Rotello, *Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology*. *Nanoscale*, 4(6): p. 1871-80, 2012.
94. Jain, P.K., et al., *Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine*. *J Phys Chem B*, 110(14): p. 7238-48, 2006.
95. Rosi, N.L., et al., *Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation*. *Science*, 312(5776): p. 1027-30, 2006.
96. Sperling, R.A., et al., *Biological applications of gold nanoparticles*. *Chem Soc Rev*, 37(9): p. 1896-908, 2008.
97. Dias, N. and C.A. Stein, *Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(5): p. 347, 2002.
98. Dias, N. and C.A. Stein, *Potential roles of antisense oligonucleotides in cancer therapy. The example of Bcl-2 antisense oligonucleotides*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 54(3): p. 263-269, 2002.
99. Urban, E. and C.R. Noe, *Structural modifications of antisense oligonucleotides*. *Il Farmaco*, 58(3): p. 243-258, 2003.
100. Aigner, A., *Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: Strategies based on the direct application of siRNAs*. *Journal of Biotechnology*, 124(1): p. 12-25, 2006.
101. Iwamaru, A., et al., *Silencing mammalian target of rapamycin signaling by small interfering RNA enhances rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells*. *Oncogene*, 26(13): p. 1840-51, 2007.

102. Spraggon, L. and L. Cartegni, *Antisense Modulation of RNA Processing as a Therapeutic Approach in Cancer Therapy*. Drug discovery today. Therapeutic strategies, 10(3): p. e139-e148, 2013.
103. Movassaghian, S., et al., *Efficient down-regulation of PKC-alpha gene expression in A549 lung cancer cells mediated by antisense oligodeoxynucleotides in dendrosomes*. Int J Pharm, 441(1-2): p. 82-91, 2013.
104. Boyer, C., et al., *Anti-fouling magnetic nanoparticles for siRNA delivery*. Journal of Materials Chemistry, 20(2): p. 255-265, 2010.
105. Zhang, M.Z., et al., *Tracking the Down-Regulation of Folate Receptor- α in Cancer Cells through Target Specific Delivery of Quantum Dots Coupled with Antisense Oligonucleotide and Targeted Peptide*. Small, 9(24): p. 4183-4193, 2013.
106. Steichen, S.D., M. Caldorera-Moore, and N.A. Peppas, *A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics*. Eur J Pharm Sci, 48(3): p. 416-27, 2013.
107. Kesharwani, P., V. Gajbhiye, and N.K. Jain, *A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA*. Biomaterials, 33(29): p. 7138-50, 2012.
108. Boisselier, E. and D. Astruc, *Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity*. Chem Soc Rev, 38(6): p. 1759-82, 2009.
109. Melancon, M., W. Lu, and C. Li, *Gold-Based Magneto/Optical Nanostructures: Challenges for In Vivo Applications in Cancer Diagnostics and Therapy*. Mater Res Bull, 34(6): p. 415-421, 2009.
110. Ghosh, R., et al., *A gold nanoparticle platform for the delivery of functional microRNAs into cancer cells*. Biomaterials, 34(3): p. 807-16, 2013.
111. Ryou, S.-M., et al., *Delivery of shRNA using gold nanoparticle-DNA oligonucleotide conjugates as a universal carrier*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 398(3): p. 542-546, 2010.
112. Daniels, T.R., et al., *The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer*. Biochim Biophys Acta, 1820(3): p. 291-317, 2012.
113. Tiwari, P.M., et al., *Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications*. Nanomaterials, 1(1): p. 31-63, 2011.
114. Wiley, D.T., et al., *Transcytosis and brain uptake of transferrin-containing nanoparticles by tuning avidity to transferrin receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 110(21): p. 8662-7, 2013.

115. Choi, C.H., et al., *Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 107(3): p. 1235-40, 2010.
116. Zheng, Y., et al., *Transferrin-conjugated lipid-coated PLGA nanoparticles for targeted delivery of aromatase inhibitor 7alpha-APTADD to breast cancer cells*. Int J Pharm, 390(2): p. 234-41, 2010.
117. Hou, G., et al., *An activated mTOR/p70S6K signaling pathway in esophageal squamous cell carcinoma cell lines and inhibition of the pathway by rapamycin and siRNA against mTOR*. Cancer Lett, 253(2): p. 236-48, 2007.



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Ezgi BEKTAŞ

Doğum Yeri: Ankara /Altındağ

Doğum Tarihi: 22/07/1990

Medeni Hali: Bekar

E-posta: ezzgibektas@gmail.com

Adresi: Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü,
Biyomühendislik ABD, 06800, Beytepe Çankaya/ Ankara/ TÜRKİYE

Eğitim

Lise: 2004-2008 Yahya Kemal Beyatlı Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi

Lisans: 2009-2013 Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: 2013-2017 Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik
Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi: İngilizce/ İyi Düzeyde

İş Deneyimi : -

Deneyim Alanları: Hücre kültürü çalışmaları, antisens tedavi,
biyokimyasal testler

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi: Tez Hacettepe Üniversitesi
BAP Hızlı Destek projesi olarak desteklenmiştir. / 20.000 TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar : -

**Tezden Üretilmiş Tebliğ ve veya Poster Sunumu ile Katıldığı
toplantılar :** -



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS/ DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih : 31 /10/2017

Tez Başlığı : Meme Kanseri Hücrelerine mTOR Antisens Oligonükleotidlerini Hedefleyecek Transferrin Kaplanmış Altın Nanopartiküllerin Tasarımı Sentezi ve Uygulanması

Yukarıda başlığı /konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası b) Giriş c) Ana Bölümler d) Sonuçlar e) Kaynakça kısımlarından oluşan toplam 72 sayfalık kısmına ilişkin,

12/10/2017 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreler uygulanarak alınmış olan orjinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5'tir.

Uygulanan filtrelemeler

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini ; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Adı Soyadı : Ezgi BEKTAS

Öğrenci No: N13126767

Anabilim Dalı: Biyomühendislik Anabilim Dalı

Programı : Biyomühendislik

Statüsü : Yüksek Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR

Prof. Dr. Ayşe Keşer Özden

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

Keşer

