

**YAPAY İNTEGRİN TEMELLİ
NANOBİYOKONJUGATİF
PLATFORM GELİŞTİRİLMESİ**

Alper UĞUR
Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Nanoteknoloji Bilim Dalı
Ocak-2009

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Alper Uğur'un "Yapay İntegrin Temelli Nanobiyokonjugatif Platform Geliştirilmesi" başlıklı **İleri Teknolojiler** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 25.12.2008 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. RIDVAN SAY
Üye	: Prof. Dr. AYDIN DOĞAN
Üye	: Doç. Dr. LÜTFİ GENÇ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YAPAY İNTEGRİN TEMELLİ NANOBIYOKONJUGATIF PLATFORM GELİŞTİRİLMESİ

Alper UĞUR

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Rıdvan SAY
2009, 47 sayfa

Bu çalışma, hücre matrisine dıştan bağlanan transmembran hücre yüzey proteini olan integrin moleküllerini tanıyan ve reseptör-ligand etkileşiminde önemli bir rol oynayan arginin-glisin-aspartik asit (RGD) peptid dizilişini yansıtan biyouyumlu, kararlı yapay aspartik asit temelli ligand tanıyan nanokonjugatların oluşturulması ve bu yapının integrin reseptörünü tanıyan nanoyapılar olup olmadığını görüntülenmesine ve incelenmesine yöneliktir.

Çalışmanın birinci aşamasında, süperparamanyetik demiroksit nanopartikülleri trimetoksisillil propil metakrilat (TMSPM) ile reaksiyona sokularak silanlanmıştır. Daha sonra bu partiküllerin bir kısmı MAASP (Metakroil amidoaspartik asit) monomeri, EDMA (Etilen diamin metakrilat) çapraz bağlayıcısı yardımıyla dekore edilerek, polimerizasyon uğratılmış multivalent kabuğa sahip süperparamanyetik nanoyapılar elde edilmiştir. Partiküllerin diğer kısmı ise MAASP monomeri ilave edilmiş böylece MAASP monomeri konjuge edilmiş silanlanmış monovalent demiroksit nanopartikülleri elde edilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında; MAASP monomeri ile etkileştirilen (konjuge edilen) silanlanmış süperparamanyetik demiroksit nanopartiküller ile MAASP monomeri kabuk şeklinde dekore edilen polimerik silanlanmış süperparamanyetik demiroksit nanoyapılar Mg^{2+} içermeyen ve içeren 5RP7 kanserli hücrelerin kültür ortamına aktarılmış ve 24 saat kültürasyon yapılmıştır.

Çalışmanın son aşamasında ise hazırlanan nano konjugatları 5RP7 kanser hücreleri (*H-Ras* transform hücre hattı) ile etkileşiminde iki değerli-katyon bağımlı mı yoksa bağımsız mı olduklarının incelenmesi için hücreler hem Mg^{2+} içermeyen kültür ortamında (Kontrol grubu) hem de $40\mu l$ Mg^{2+} içeren kültür ortamlarında (Deney grubu) ayrı ayrı kültive edilmişlerdir. Sonuçların TEM'deki görüntüleri incelenmiş ve analizleri yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Yapay integrin ligandı, Yapay nanobiyokonjugatif platform
RGD

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION OF NANOBIOCONJUGATIVE PLATFORM BASED ON ARTIFICIAL INTEGRIN

Alper UĞUR

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Advanced Technologies Program Nanotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Ridvan SAY
2008, 47 pages

In this study, development and produce of nanobioconjugates that are recognize a based on aspartic acid ligand as stable and biocompatible which reflect arginine-glycine-aspartic acid (RGD) peptide sequences and play important role to interaction between receptor and ligand like the integrin molecules that are transmembrane cell surface protein to mediate the adhesion of cell to extracellular matrix (ECM) also whether that nanostructures recognize or not to integrin receptor has been investigated and displayed.

In the first stage study, superparamagnetic iron nanoparticules were silanized by react with 3-Trimethoxysilyl Propyl Methacrylate (TMSPM). Then some of them was polymerized by the Methacryloyl Amidoaspartic Acid (MAASP) was decorated via the crosslinker Ethylene Glycol Dimethacrylate (EDMA) and then Decoration of Silanized Iron Oxide Nanoparticles with multivalent shell was obtained. The other of them was not polymerized and only added MAASP monomer and obtained MAASP Conjugated Silanized Iron Oxide Nanoparticles.

In the second stage, both groups Conjugated Silanized Iron Oxide nanoparticles by MAASP monomers and Decorated Silanized Iron Oxide nanostructure with shell were added with Mg^{2+} or without in 5RP7 cancer cells culture at 24h.

In the final step for researching of interaction between both nano scale particules and 5RP7 cancer cells (H-Ras transform cell line) that whether depend a bivalent cation Mg^{2+} (40 μ l) in experimental groups or not in control groups, results were displayed using by transmission electron microscopy (TEM) and analized.

Keywords: Cell to cell adhesives, Mimicking of integrin ligand, RGD, Nanobio-conjugate

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince ilgisi ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan, farklı bir disiplinden gelmeme rağmen bana büyük bir hoşgörü ve anlayışla yaklaşan, ayrıca Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BİBAM) olanaklarından yararlanmamı sağlayan Danışman Hocam Merkez Müdürü Sayın Prof.Dr. Rıdvan SAY'a,

Çalışmalarım süresince desteği ve yardımlarını eksik etmeyen Sayın Doç. Dr. Arzu ERSÖZ'e,

Fen Fakültesi Kimya Bölümü olanaklarından yararlanmamı sağlayan Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof.Dr. Hayrettin TÜRK'e,

Deneysel çalışmalarım esnasında her türlü konuda yardımcı olan, bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Sayın Yrd.Doç. Sibel EMİR DİLTEMİZ 'e, kullandığım monomerin sentezinin yapılmasında katkıda bulunan Sayın Yrd.Doç. Deniz HÜR'e

Çalışmam boyunca yardım ve destekleriyle katkıda bulunan arkadaşlarım Suzan YAZAR, Nagihan SALTAN, Sibel BÜYÜKTİRYAKİ, Rüstem KEÇİLİ ve Güner SAKA'ya,

Deneysel çalışmalarımda kullandığım TEM görüntülerinin alınmasında Sayın Arzu FERAHOD İŞCAN'a,

Tez çalışmam süresince destekleriyle hep yanımda olan Sentetik Reseptörler Araştırma Grubu (SYNREG) Üyelerinin tümüne,

Ve maddi-manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan Ailem'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Alper UĞUR

Ocak-2009

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyoadezyon Mekanizması.....	2
1.1.1. Sıkı Doku Adezyonu	3
1.1.2. Hafif Doku Adezyonu	3
1.2. Hücre - Hücre Bağlantıları (Hücreler Arasındaki Bağlantı ve Yapışma Birimlerinin Yapı ve İşlevleri).....	4
1.2.1. Hücre Adezyon Molekülleri	5
1.2.2. Transmembran Yapısında Hücre Adezyon Molekülleri	6
1.2.3. Hücre Matriks Adezyon Reseptörleri Olarak İntegrinler	8
1.2.4. İntegrin Ailesi ve Önemi	9
1.2.5. İntegrinin Yapısı ve Fonksiyonları	10
1.2.6. İntegrin α ve β Alt Üniteleri Yapı Özellikleri.....	10
1.2.6.1. $\beta 1$ İntegrinler	12
1.2.6.2. $\beta 2$ İntegrinler	12
1.2.6.3. $\beta 3$ integrinler	13
1.2.7. İntegrinin Yapı Özellikleri.....	13
1.2.8. İntegrinin İşlevleri	16
1.2.9. İntegrinin Ligandları	19
1.2.9.1. Kollajen (Coll).....	19
1.2.9.2. Fibronektin (Fn).....	20
1.2.9.3. Laminin (Lm)	20

1.2.9.4. Won Willebrand faktör (vWF)	21
1.3. Nanobiyokonjugasyon Uygulamaları	22
1.3.1. Süperparamanyetik Nanoyapılar (SPN)	22
1.3.2. SPN Uygulamaları	23
1.4. TEM Görüntülemesi ve Ugulamaları.....	23
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
2.1. Materyal	24
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	24
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	24
2.2. Yöntem.....	25
2.2.1. Metakroil Amido Aspartik Asit (MAASP) Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu	25
2.2.2. Nanobiyokonjugatların Sentezi	28
2.2.2.1. Süper Paramanyetik Demir Nanopartiküllerinin Trimetok sisil Propil Metakrilat ile (TMSPM) Modifiye Edilmesi.28	
2.2.2.2. Silanlanmış Süperparamanyetik Demir Nanopartikülleri nin Metakroil Amido Aspartik Asit (MAASP) Mono- meri ile Konjugasyonu	28
2.2.2.3. Silanlanmış Demiroksit Nanopartiküllerine (MAASP) monomerinin Kabuk Oluşturacak Şekilde Dekorasyo- nu	29
2.2.3. Karakterizasyon Çalışmaları	29
2.2.3.1. Geçirgen Elektron Mikroskobu(TEM) ile EDMA Çapraz Bağlayıcısı Varlığında MAASP Dekore Edilmiş ile MAASP Konjuge Edilmiş Silanlanmış Demiroksit Nanopartiküllerinin Görüntülenmesi	29
2.2.3.2. FT-IR Karakterizasyon Çalışmaları	30
2.2.4. Hücre Hatları ve Hücre Kültürü	30
2.2.5. TEM ile Hücrelerin Analizi	31

3. BULGULAR	32
3.1. TEM ile EDMA Çapraz Bağlayıcısı Varlığında MAASP Dekore Edilmiş Silanlanmış Demiroksit Nanopartiküller ile MAASP Konjuge Edilmiş Silanlanmış Demiroksit Nanopartiküllerinin Karakterizasyonları	32
3.1.1. Yüzey Morfolojisi	32
3.1.2. FT-IR Karakterizasyonları	33
3.1.3. Nanobiyokonjugatların Hücre Kùltürleri ile Etkileşiminin İncelenmesi	34
3.1.3.1. TEM Görüntülerinin Analizi	34
3.1.3.2. Kontrol Gruplarının TEM ile Görüntülenmesi	34
3.1.3.3. Deney Gruplarının TEM ile Görüntülenmesi	38
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Biyoadezyon iki polimer sistem arasında arayerde polimer zincirler difüzyonla birbirlerinin arasına girmesi	2
1.2. Hücre - Hücre Bağlantıları	4
1.3. Hücre hücre bağlantılarında etkili olan faktörler	4
1.4. Hücre içi-dışı yüzeylerin gösterimi	5
1.5. Hücre adezyon molekülleri	5
1.6. Ig süper ailesi üyeleri adezyonu şematik gösterilişi	6
1.7. Transmembran yapısında hücre adezyon molekülleri şematik gösterilişi	7
1.8. Hücre adezyon molekülleri bağlantılarının şematik gösterimi	8
1.9. İntegrin tarafından tanınan fibronektin RGD ve yardımcı bölgelerin modeli	9
1.10. İntegrin α ve β alt ünitesi boyutları	11
1.11. İntegrin α ve β alt ünitesi aktif ve inaktif durumdaki şekil değişikliği	11
1.12. İntegrin domeini yapısının şematik gösterilişi	13
1.13. I-domein içeren integrinin yapısı şematik gösterilişi	14
1.14. İntegrin α ve β alt üniteleri afinite modülasyonu	15
a) Afinite modülasyonu	15
b) Afinite modülasyonuna bağımlı/bağımsız birleşmenin artması	15
1.15. RGD bağ yapımı	16
1.16. Hücre zarı ve hücre dışı yatağın bileşenleri arasındaki etkileşimler	16
1.17. Protein kinazların etki mekanizması	18
1.18. İntegrin ligandlarının tümör hücresine bağlanması	19
2.1. TEM cihazı fotoğrafı	25
2.2. Metakroil amido aspartik asit (MAASP) monomerinin sentez reaksiyonu	25
2.3. MAASP monomerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO)	27
2.4. MAASP monomerinin D_2O içinde $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	27
2.5. MAASP D_2O içinde $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu	28
3.1. EDMA çapraz bağlayıcısı varlığında MAASP dekore edilmiş silanlanmış demiroksit nanopartiküllerin TEM görüntüsü	32

3.2. FT-IR Spektrumu	33
a) Fe nanopartiküllerin FT-IR spektrumu	33
b) TMSPM ile modifiye edilmiş Fe nanopartiküllerin FT-IR spektrumu	33
c) Fe nanopartiküllerin TMSPM ile modifiye edilmiş nanopartiküllerin FT-IR spektrumu	33
3.3. MAASP monomerleri konjuge edilmiş demiroksit nanopartiküllerinin Mg ²⁺ iyonu içermeyen kültürde 5RP7 hücreleri ile etkileşiminin TEM Görüntüsü	35
a) Hücrenin sağlam görüntüsü	35
b) Hücrenin sağlam görüntüsü	35
c) Hücrenin sağlam görüntüsü	35
3.4. EDMA aracılığıyla MAASP monomerleri dekore edilmiş poli(MAASP-co-EDMA) silanlanmış demiroksit nanopartiküllerinin Mg ²⁺ iyonu içermeyen kültürde 5RP7 hücreleri ile etkileşiminin TEM Görüntüsü	36
a) Nanopartiküllerin hücre içine girmiş görüntüsü	37
b) Nanopartiküllerin hücre içine girmiş görüntüsü.....	37
3.5. MAASP monomerleri konjuge edilmiş demiroksit nanopartiküller ve 5RP7 hücreleri ile 40 µl Mg ²⁺ iyonu içeren kültürde etkileşime sonucu TEM görüntüleri	38
3.6. EDMA aracılığıyla MAASP monomerleri dekore edilmiş poli(MAASP-co-EDMA) silanlanmış demiroksit nanopartiküller ve 5RP7 hücreleri ile 40 µl Mg ²⁺ iyonu içeren kültürde etkileşime sonucu TEM görüntüleri	36
a) Agrege olmuş nanoyapı görüntüsü	41
b) Agrege olmuş nanoyapı görüntüsü	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Adezyon molekülü, ligandı ve etkileşim şekli	6
1.2. İntegrin α ve β altünite kombinasyonları ve ligandları	21

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Ab	: Antibadi
BSA	: Bovin serum albumin
CAMs	: Hücre adezyon molekülleri (Cell Adhesion Molecules)
CR3-4	: Kompleman reseptörü (Complement Receptor)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ECM	: Ekstrasellüler matriks
EDMA	: Etilen diamin metakrilat
EGF	: Epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor)
FAK	: Fokal adezyon kinazi
FT-IR	: Fourier transform infrared spektroskopisi
I-CAM	: İntersellüler hücre adezyon molekülü (Intercellular CAM)
I-domain	: (Inserted domain)
IgCAMs	: Hücre adezyon molekülleri ile ilgili immüneglobin süperailisi
LFA-1	: Lökosit fonksiyonu ile ilişkili antijen (Leukocyte function associated antigen-1)
MAASP	: Metakroil amidoaspartik asit
Mac-1	: Membran atak kompleksi (Membrane Attack Complex)
MIDAS	: Metal iyon bağımlı adezyon bölgesi
N-CAM	: Nöral hücre adezyon molekülü (Neural-cell adhesion molecules)
PSA	: Basınç hissedebilir adezivler (Press sensitive adhesives)
RGD	: Arg-Gly-Asp (Arginin-glisin-aspartik asit)
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-PoliAkrilamit Jel Elektroforez
TEM	: Geçirgen Elektron Mikroskobu
TMSPM	: Trimetoksisillil propil metakrilat
V-CAM	: Vasküler hücre adezyon molekülü (Vascular CAM)
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)
VLA	: Geç aktivasyon antijenleri (Very Late Activation Antigens)
5RP7	: H- <i>Ras</i> transform hücre hattı

1. GİRİŞ

Terim olarak adeziv, adezyondan sorumlu biyomalzemeler ve sistemler olarak tanımlanır. Adezivler herhangi iki maddenin birbirine tutundurma kabiliyetlerinde işlem görürler. Biyoadezyon yaygın bir biçimde biyolojik yüzey ya da biyolojik yüzey ile sentetik yüzey arasında bağ oluşumu konularını içermektedir. Yaygın biyoadeziv uygulamaları; Diş yenileme ayarlayıcıları, deri adezivleri ve bakteriyel kolonizasyonlardır. Sıkı doku adezivleri ticari olarak yüksek başarı ile biyoadeziv sistemlerde kullanılmaktadır. Mukoadeziv malzemeler ise başlıca ilaç sektöründe ilaç dağıtım yaklaşımıyla son 20 yıldır araştırmalara odak konusu olmuştur. İlaç dağıtım mukoadeziv sistemlerinde tıropatik ajan ilacın gideceği yerde lölalize olmaktadır. Peptidlerde, proteinlerde aktif bileşiklerde hedeflendirme absorpsiyonla mümkündür. Biyofilm oluşumu, biyomalzemelere direnç ve efektif doku mühendisliği konularında hücresel adezyon mekanizmasının daha iyi anlaşılması sonucu biyoyapay malzemelere olan ilgiyi artmıştır. Sentetik malzemelerle, moleküler yapılar tarafından tanınan daha iyi hücre eklenmesine çaba sarfeden özel hücre bileşikleri geliştirilmiştir.

Bu çalışma, hücre matriksine dıştan bağlanan transmembran hücre yüzey proteini olan integrin moleküllerini tanıyan ve reseptör-ligand etkileşiminde önemli bir rol oynayan arginin-glisin-aspartik asit (RGD) peptid dizilişini yansıtan biyoyumlu, kararlı yapay aspartik asit temelli ligand tanıyan nanokonjugatların oluşturulması ve bu yapının integrin reseptörünü tanıyan nanoyapılar olup olmadığını görüntülenmesine ve incelenmesine yöneliktir.

Hazırlanan nano konjugatları 5RP7 kanser hücreleri (H-Ras transform hücre hattı) ile etkileşiminde iki değerli-katyon bağımlı mı yoksa bağımsız mı olduklarının incelenmesi için hücreler hem Mg^{+2} içermeyen kültür ortamında (Kontrol grubu) hem de $40\mu l$ Mg^{+2} içeren kültür ortamlarında (Deney grubu) ayrı ayrı kùltive edilmişlerdir. Sonuçların TEM'deki görüntüleri incelenmiş ve analizleri yapılmıştır.

Bu çalışmadan elde edilecek yaklaşımlar ile kanser hücrelerinde yoğun miktarda bulunan yaygın bir kullanıma ve geliştirme alanına sahip olan integrin adezyon molekülünün tezde hazırlan yapay ligandlar ile yayılmasının

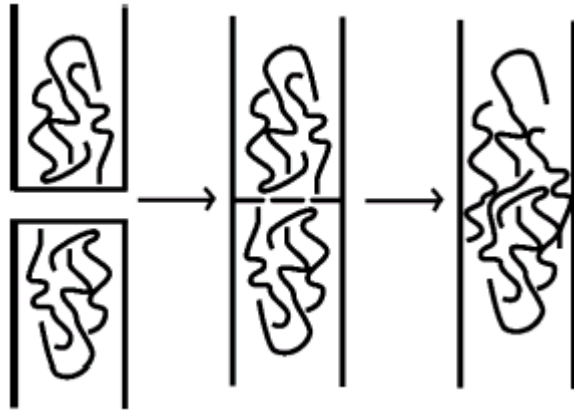
engellenmesi ve bloke edilerek ölümünün sağlanarak kanser hücrelerinin yayılmasının engellenmesinde fiziksel proseslerde hastalığın tedavisinde, hastalık keşfinde, büyük bir ilerleme sağlanabilecektir.

1.1. Biyoadezyon Mekanizması

Biyoadezyon mekanizması elektronik teorisi, adsorpsiyon teorisi kapsamında sıklıkla kimyasal ve fiziksel mekanizmalarla sınıflandırılmaktadır.

Elektronik teori polimer ve glikoprotein (Şeker ve aminoasitlerden oluşmuş organik moleküller için kullanılan genel tanım) ağ gibi iki farklı elektronik yapı arasındaki adezyondur. İki sistemin kontak yüzeyinde elektron transferi olur, elektriksel katmanlar arasında arayerde elektriksel birikme meydana gelir.

Adsorpsiyon teorisinde van der Waals, hidrojen bağı gibi güçlerin adeziv bağlarını kuvvetlendirdiği vurgulanır. Wetting teorisinde ise yüzey enerjisinin analizi ve belirlenmesi hedeflenerek adeziv ve biyolojik yüzey kontağı arasındaki iletişim, yayılma kapasitesi incelenir. İki polimer sistem arasında arayerde polimer zincirlerin difüzyonla birbirlerinin arasına girmesi aşağıda gösterilmektedir.



Şekil 1.1. Biyoadezyon, iki polimer sistem arasında arayerde polimer zincirler difüzyonla birbirlerinin arasına girmesi

Teoriler incelendiğinde genelde bir teori tüm sistemi, adezyonu tanımlamaya yetmez, en az iki teorinin gerçekleşmesi biyoadezyon verimliliği ve gelişmesi için düşünülmelidir [1].

1.1.1. Sıkı doku adezyonu

En yoğun ilgiyi iskelette mekanik vidalama ve çivi uygulamalarına alternatif oluşturması nedeniyle çekmektedir. Başarılı kullanım alanları diş adeziv ve bantları, kemik dolguları alanlarıdır. Uygulamalarda polikarboksilat ve iyonomer malzemeler; Emaye, diş, kemik dolguları yapımında kullanılarak partiküler biyoadezyon prosesinde büyük bir avantaj yakalamışlardır. Zn ve Al içeren çinko fosfat dolgu malzemeleri yüksek sıkışma dayanımları itibariyle diş yenileme işleminde 20.yüzyılın ortalarından itibaren kullanılmaktadır. (Caulk Tenacin, Mizzy, Inc. Fleck's Cement) Hidroksiapatite dolgular iskelet sistemlerinde biyoyumlu malzemeler olarak yenileme işlemlerinde kullanılmaktadır. (Norian SRS) Bu malzemeler dahlliteden daha sıkı yapıdadır ve mineral fazda yeni kemik geliştirilmesinde, inorganik benzer özellikteki malzemeler yerine kullanılmaktadır [1].

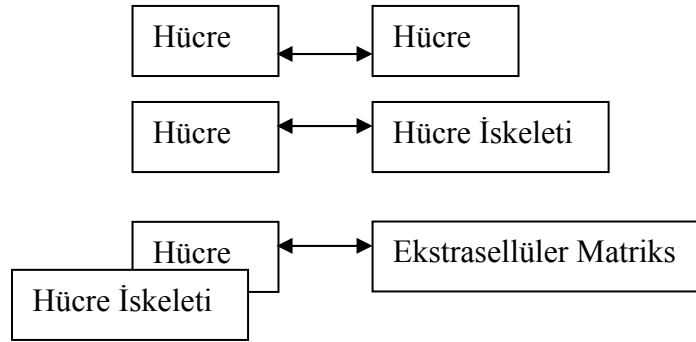
1.1.2. Hafif doku adezyonu

Deri adezivleri, doku bantları geleneksel uygulama alanlarıdır. Basınç hissedebilir (PSA) adezivler medikal cihazların yapımında kullanılmaktadır. Bu bandaj poliisobutilenler, akrilatlar ve silikon polimerlerden yüksek bir tabaka oluştururlar. Bandaj sistemlerinin bir diğer avantajı ise suya, bakteriye karşı koymaları, yüksek adeziv kapasiteleri ve bükülebilir olmalarıdır. Yarı geçirgen bir membran oluşturma özellikleri ile iki biyolojik akışkanın absorbe edilmesinde kullanılmaktadır. Fibrin bantları sistemi fibrinojen ve trombin içerir ve tedavi bölgesinde birleştiklerinde trombus formasyonu olur ve hemostas işleminde kullanılırlar. Albumin yapışkanları (Cerrahi adezivler örnek 'Cryolife Bioglue') cerrahide kanama kontrolünün yapılmasında kullanılmaktadır.

Bovine serum albumin (BSA) ve glutaraldehit birlikte çapraz bağ oluşturarak adeziv sistemlerde kullanılır ayrıca poliakrilik asit (PAA) temelli hidrofilik polimerler mükemmel biyoadeziv adaylarıdır.

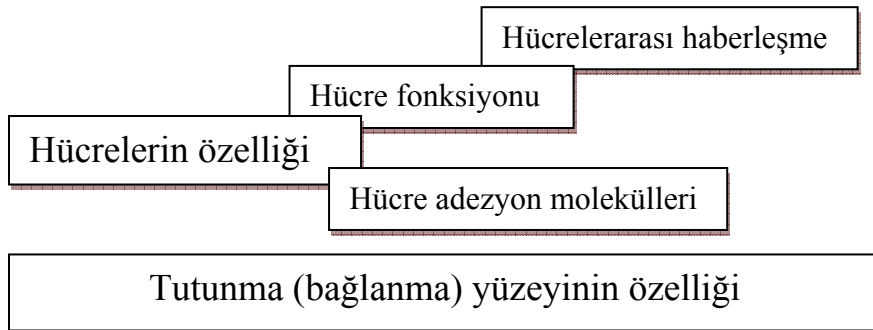
1.2. Hücre-Hücre Bağlantıları (Hücreler Arasındaki Bağlantı ve Yapışma Birimlerinin Yapı ve İşlevleri)

Hücre adezyonu dört adımlı bir proses olarak tanımlanmaktadır. Hücre tutunması, hücre yayılması, aktin cytoskeleton organizasyonu ve fokal adezyon formasyonu. Yapışma'nın önemi ise; Embriyolojik göç, farklılaşma, birlikte davranma ve hareket etme olarak vurgulanmaktadır.



Şekil 1.2. Hücre hücre bağlantıları

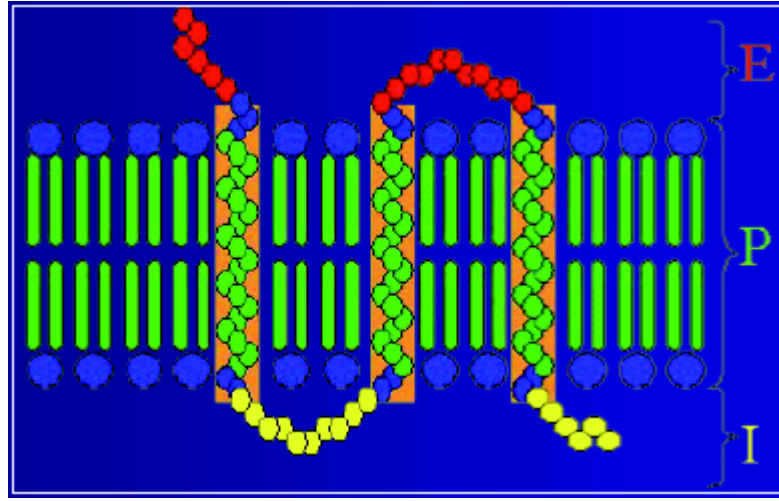
Hücrelerarası haberleşme hücre fonksiyonu, adezyonu sağlayan hücre adezyon moleküllerinin özellikleri ve tutunmanın olduğu yüzeyin özellikleri, karşılıklı etkileşim, birbirini tanıma, hücre bağlantılarında etkili olan faktörlerin başlıcalarıdır.



Şekil 1.3. Hücre hücre bağlantılarında etkili olan faktörler

1.2.1. Hücre adezyon molekülleri

Hücreleri diğer hücelere ya da ekstrasellüler matrikse bağlayan (ECM), yapışmasını sağlayan protein yapısında moleküllerdir. Aşağıdaki şekilde E,P yüzeyleri ve P membranı şematik olarak gösterilmiştir. Tez inceleme konusu E: Ekstrasellüler yüzey alanındaki etkileşimlerde yoğunlaştırılmıştır.



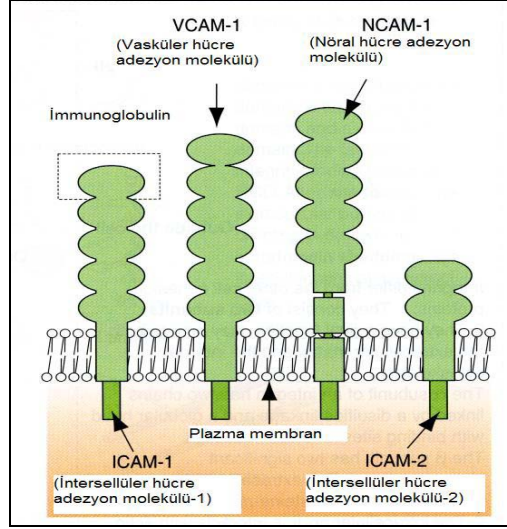
Şekil 1.4. Hücre içi-dışı yüzeylerin gösterimi E: Ekstrasellüler yüzey, P: Plazma membranı, I: Intrasellüler yüzey

Aşağıdaki şekilde hücrenin bağlanma yüzeyine tutunmasında rol alan adezyon molekülleri sınıflandırılmıştır.



Şekil 1.5. Hücre adezyon molekülleri

Bu adezyon moleküllerinden Ca^{2+} bağımlı olanlar kaderinler ve selektinler Ca^{2+} bağımlı iken, integrin ve Ig süper ailesi üyeleri N-CAM, I-CAM-1 ve I-CAM-2, V-CAM Ca^{2+} den bağımsızdır [2].



Şekil 1.6. Ig süper ailesi üyeleri adezyonu şematik gösterilişi

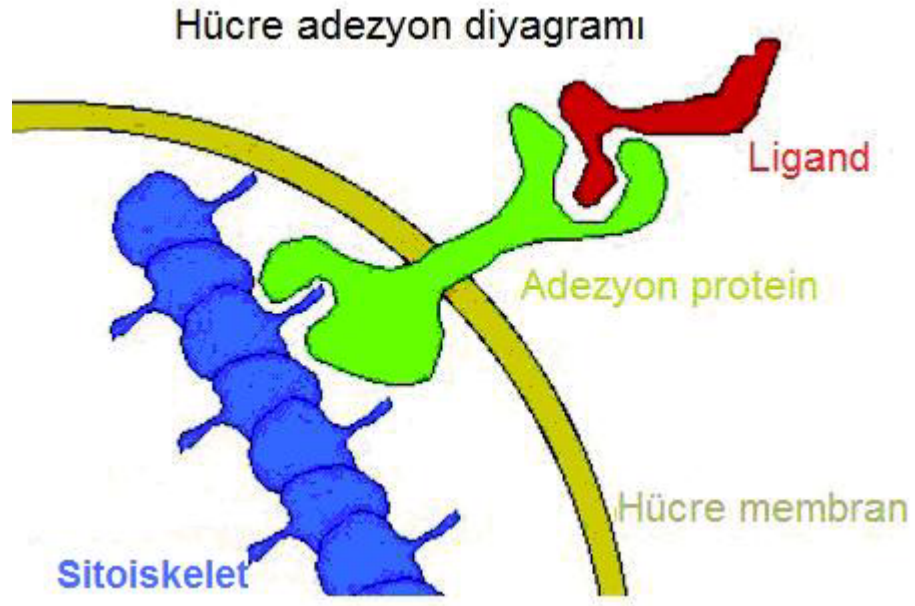
1.2.2. Transmembran yapısında hücre adezyon molekülleri

Transmembran proteinlerin bağlantı şekilleri, homofilik etkileşimle veya heterofilik etkileşimle sağlanır. Aynı tip adezyon molekülü ile bağlantı sağlanırsa, homofilik etkileşim farklı tip adezyon molekülü ile bağlantı sağlanırsa, heterofilik etkileşim olarak sözkonusu olur. Çizelge 1.1’de adezyon molekülü, ligandı ve etkileşim şekli gösterilmiştir.

Transmembran proteinlerin fonksiyonlar, hücre-hücre bağlantısı embriyonel gelişim ve morfogenez, hücre hareketi lökosit göçü ve immun cevap, hücrelerarası haberleşme sinaptik bağlantı kurulması şeklindedir.

Çizelge 1.1. Adezyon molekülü, ligandı ve etkileşim şekli

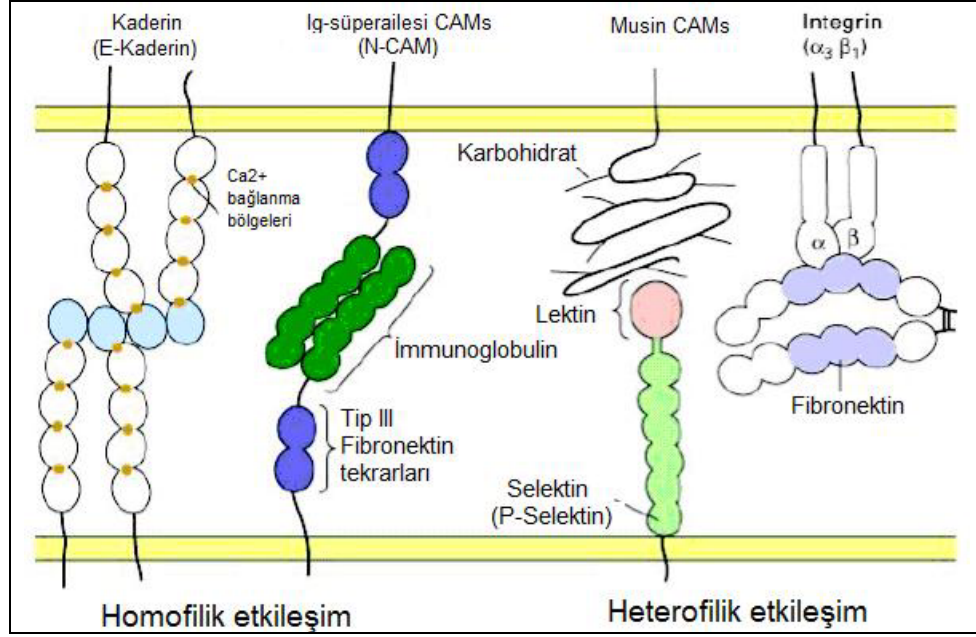
Adezyon Molekülü	Ligandı	Etkileşim Şekli
Selektinler	Karbonhidratlar	Heterofilik
İntegrinler	Ekstrasellüler matriks	Heterofilik
	Ig süper ailesi	Heterofilik
Ig süper ailesi	İntegrinler	Heterofilik
	Ig süper ailesi	Homofilik
Kaderinler	Kaderinler	Homofilik



Şekil 1.7. Transmembran yapısında hücre adezyon molekülleri şematik gösterilişi

Ligand adezyon proteinine farklı amaçlarla bağlanan örneğin biyomoleküllerin saflaştırılmasında veya ayrılması istenen biyomoleküle özel olarak kullanılan, seçimli afinite gösteren ve onu spesifik olarak tanıyıp bağlayan maddelerdir. Kullanılacak ligandın seçiminde dikkat edilmesi gereken en önemli unsur ligandın proteine karşı spesifikliğinin fazla olması ve bağlanmanın geri dönüşümlü olmasıdır. Kromatografi sırasında uygulanacak kimyasal işlemlere karşı ligandın kararlı olması da gerekir [3].

Birçok biyomolekülün ligand olarak kullanılması düşünülse de çok pahalı olmaları ve kararlılıklarının düşük olması sebebi ile tercih edilmezler. Pseudo-spesifik (biyomimetik) ligandların geliştirilmesi ile bu tip dezavantajlar büyük ölçüde giderilmiştir. Tez çalışmasında SRP7 kanser hücreleri (*H-Ras* transform hücre hattı) ile yapay integrin temelli nanobiyokonjugatif ligandların birbirleri arasındaki etkileşim incelenmiştir.



Şekil 1.8. Hücre adezyon molekülleri bağlantılarının şematik gösterimi

1.2.3. Hücre matriks adezyon reseptörleri olarak integrinler

İntegrinler hücre yüzeyinde spesifik reseptörler olarak keşfedilmiştir. ECM ve glikoprotein fibronektin konusundaki çalışmalarla; 1980'lerde fibronektinin ECM proteinlere serumlarda doku kültür tabakalarında, adezyonu teşvik edici bir rol oynadığının kabul edilmesini sağlamıştır [4].

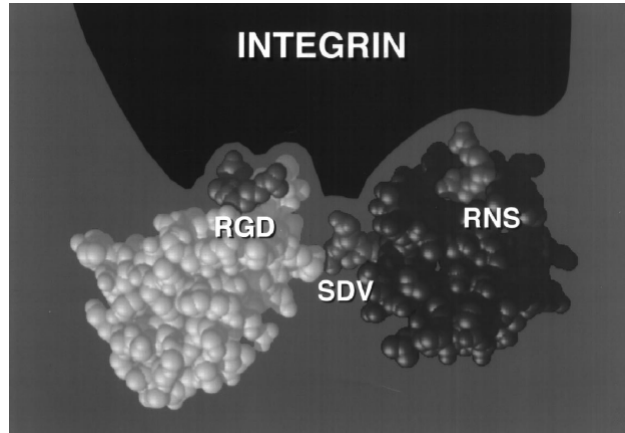
Yapılan çalışmalarda fibronektinin yüzey boşluklarında değişim gösteren hücrelerde görüldüğü ve yüzeyde değişimi olmayan zayıf bağlanma olmasına rağmen adezyon yayılmasını arttırıcı bir ilişki kurduğu saptanmıştır. Fibronektinin saflaştırılarak tekrar değişim hücrelerine eklenmesinde substrata daha adeziv olduğu görülmüştür. Hücre-adeziv davranışının regülasyonunda fibronektinin hücre yüzeyine bağlanması kritik bir basamak oluşturmaktadır. Aktin mikrofilamentleri fibronektin fibrilleri ile yüzeyde yoğun miktarda lokalize olarak hipotesis oluşturmaya da gerekli desteği verir.

1.2.4. İntegrin ailesi ve önemi

İntegrinler hücre adezyon molekülleri içinde belli başlı reseptörler ve diğer ailelerden seçilmiş üyelerle kıyaslandığında ECM proteinler için çok önemli ve yaygın bir reseptörlerdir. Hücre matriksine dıştan bağlanan transmembran hücre yüzey proteinleridir. İntegrin adı, bu moleküllerin hücre-dışı matriks ve hücre iskeleti ile ilgili aktivitelere aracılık etmesinden (İntegre etmesi) kaynaklanır [4]. İntegrinler transmembran glikoproteinlerin ECM ve diğerlerine bağlanmasında arabuluculuk yaparak ECM ile cytoskeleton arasında birbirlerini bağlayıcı kritik bir fonksiyona sahiptir. Bu bütünleşme hücre mekanizmasında adezyonda hücre göçünde bir temel oluşturur ve değişken sinyaller alınmasına olanak sağlar. İntegrin adezyon molekülü olarak fiziksel proseslerde hastalık tedavisinde, keşfinde geniş ve yaygın bir kullanıma ve geliştirme alanına sahiptir [5].

İntegrin üzerine çalışmalar hücre-ECM alanında 1980 ortalarından itibaren olmaktadır. Bu çalışmalar platelet aktivasyon, kümelenme, birikme, lökosit aktivasyonu ve hücre-hücre bütünleşmesi şeklinde devam etmiştir.

Glikoprotein kompleks IIb/IIIa hücre yüzeyinde bulunmuştur buda SDS-PAGE tarafından heterodimer iki transmembran proteinlerin glikoprotein IIb ve IIIa'nın (gpIIb, gpIIIa) ECM reseptörlerine benzer davrandığı göstermektedir. IIb/IIIa kompleks aynı zamanda fibrinojen, fibronektin, vitronektin, thrombospondin ve vWF gibi plazma proteinlere bağlanmayı ve platelet adezyonunu sağlar. Protein temelli RGD dizilişlerinin integrin ile adezyon sürecindeki etkilerini göstermektedir [5].



Şekil 1.9. İntegrin tarafından tanınan fibronektin RGD ve yardımcı bölgelerin modeli [6].

1.2.5. İntegrinin yapısı ve fonksiyonları

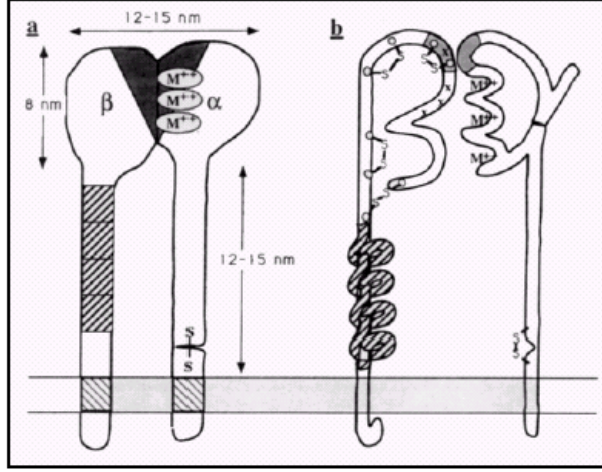
İntegrinler heterofilik transmembran glikoproteinleridir. Bazal membranın ekstrasellüler matriks proteinlerine ve immunoglobulin süper ailesine ait hücre adezyon moleküllerine bağlanır.

- İntegrinler, insan vücudunda bulunan hemen tüm hücrelerde eksprese olurlar.
- Transmembran matriks reseptörleridir.
- Hücre içindeki aktin iskeletini hücrelerarası matrikse bağlarlar.
- Hücre dışındaki ligandları fibronektin ve laminin'dir.
- Embriyogenez'de hücrelerin hedeflerine ulaşmasında önemlidir.
- İntegrinler bir α bir β iki altbiriminden (heterodimer) oluşurlar. α ve β alt ünitelerinin farkı (8 çeşit β , 18 çeşit α) sonucunda 24 tane α/β dimeri keşfedilmiştir [7].

1.2.6. İntegrin α ve β Alt Üniteleri Yapı Özellikleri

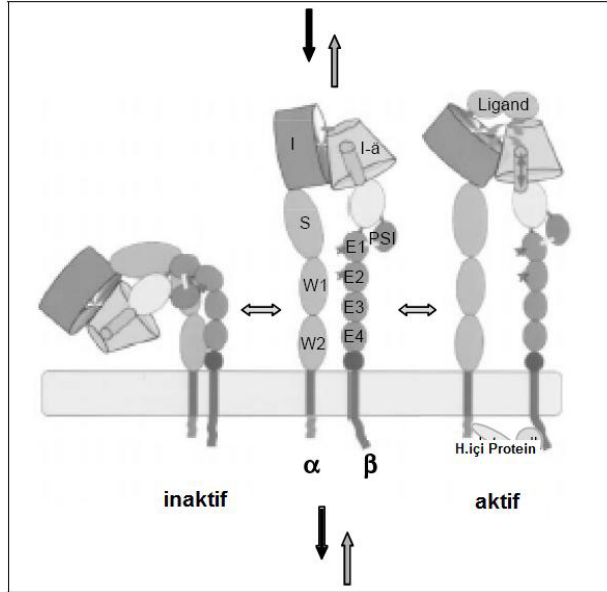
Her α altünitesi yaklaşık 1.000-1.150 aminoasit (140-210 kDa) içerir. İntegrin fonksiyonları için gerekli 3-4 divalent katyon bölgesi mevcuttur. Bazıları ilave 200 amino asit daha içerir ve I-domain olarak isimlendirilir.

β altüniteleri 740-780 amino asit (90-130 kDa) içerir ve kuyruğu yalnızca 40-50 amino asitten oluşur ancak yalnız β_4 altünitesi stoplazmik kuyruğu 1.000'in üzerinde aminoasit ile oldukça uzundur [8].



Şekil 1.10. İntegrin α ve β alt ünitesi boyutları

İntegrinlerin α ve β zincirleri helisel bir yapı oluşturur. İnaktif dönemde iken dirsek bölgesinden kıvrım yaparlar. Gliko-protein eş reseptörler (GPCR) ile hücre içinden dışına doğru sinyaller ile uyarılan integrinler dirsek bölgesinden açılarak aktif hale gelir.



Şekil 1.11. İntegrin α ve β alt ünitesi aktif ve inaktif durumdaki şekil değişikliği

İntegrinler farklı yollardan aktive edilebilirler. TCR kompleksi veya protein kinazı C (PKC) aktive eden forbol esterler aracılığıyla içeriden dışarıya doğru sinyal iletimi sağlanabilir [4]. Aktifleşen integrinlerin β zincirleri, endotel

eksprese olan ligandlara (ICAM-1,2) bağlanır. Bu bağlanma sonucu hücre dışından, hücre içine doğru sinyal iletimi olur.

İntegrinlerin birçoğunun ifade edilmesini ortadan kaldırmak üzere (her defasında bir genin ifade edilmesini) genetik mühendislik yöntemleri uygulanmış fareler ve bu geni devre dışı bırakılmış (knockout) farelerin fenotipleri embriyo ölümünden ($\alpha 5$ geni buna örnektir) hemen hemen hiçbir gözlenebilir kusur bulunmamasına ($\alpha 1$ geni buna örnektir) kadar değişmektedir. Hücre iskeletini ECM'ye kancalama ve böyle hücrenin içine oturabileceği kararlı bir ortam sağlama görevine ek olarak integrinler çok büyük çeşitlilik gösteren hücre işaretleme seçeneklerine de katılmaktadır [9].

Hücre yüzey membran proteinlerinden olan tetraspaninler, özellikle $\beta 1$ integrinler ile kompleks yapılar oluşturarak hücre içi sinyal iletiminde rol oynar ve özellikle lökozit adezyon ve migrasyonuna, göçüne katkıda bulunurlar [10].

1.2.6.1. $\beta 1$ integrinler

Geç aktivasyon antijenleri olarak bilinirler. Geç aktive olan antigenler (VLA) hücrelerin ECM'ye bağlanmasında iş görürler. Lökositlerde bulunur ve lökositlerin endotel hücresi membranına tutunmasını sağlarlar. VLA 1-6 : Hareketsiz T moleküllerinde bulunur. Hücre matriks adezyonu ve T hücrelerinin dokulara tutulmasında iş görürler. VLA 4: Ligandı endotel hücresi üzerinde VCAM-1 ile bağlantı kurar. Lenfositlerin enflamasyon bölgesine hareketini düzenler. ve sitokinler tarafından aktive olur, ömrü 24 saattir, lenfosit, monosit ve eozinofil adezyonunu kontrol eder ayrıca bazı melanoma hücreleri VCAM-1'i kullanarak endotel hücrelerine tutunur.

1.2.6.2. $\beta 2$ integrinler

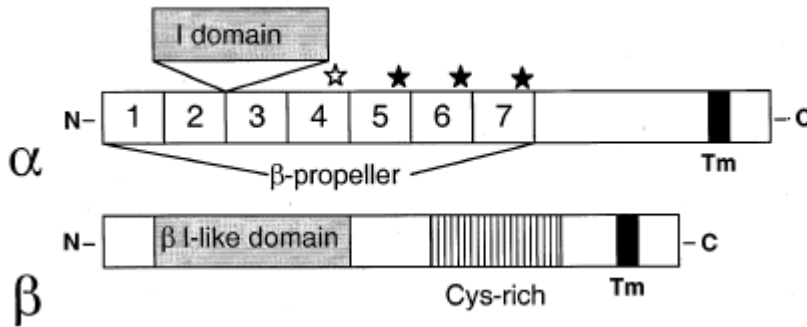
Lökosit fonksiyonu ile ilişkili antijen (LFA-1), CR3, CR4 (P150,95) lökositlerinin endotele ve diğer immün hücrelere bağlanmasında iş görürler. En çok bulunan tipleri *LFA-1* (Lökosit transmigrasyonunda rol oynar), (CD 11a, CD 18) timositlerin %90'ında olgun T ve B hücrelerinde monositlerde sentezlenir ve

lenfositlerin endotel membranına tutunmasını sağlarlar ve *Mac-1* (Granulosit yüzeyinde bulunur)'dir. Kemoatraktif maddeler ile aktive olur ve özellikle nötrofil yüzeyinde bulunur.

1.2.6.3. $\beta 3$ integrinler

Sitoadesinler enflamasyon yerinde veya vasküler hasar bölgelerinde trombosit ve nötrofillerin bağlantılarının kurulmasında iş görürler. Plateletlerin yüzeyinde ifade edilir. Aktive olmamış plateletlerde; Fibrinojene, aktive olmuş plateletlerde; Fibronektin, Von Willebrand faktörü, Vitronektin, Trombospondine bağlanır [11,23].

1.2.7. İntegrinin yapı özellikleri



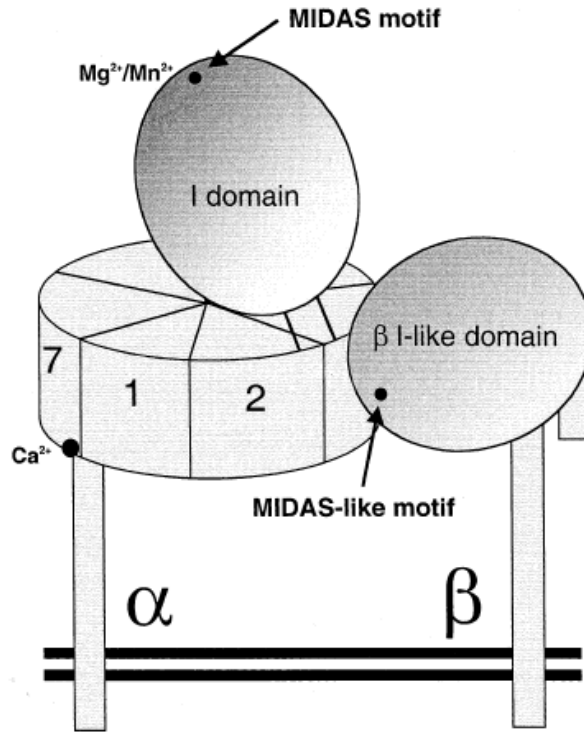
Şekil 1.12. İntegrin domeini yapısının şematik gösterilişi

α altbiriminde söz konusu integrinde şekilde de görüldüğü üzere 1-7 sayıları ile gösterilen birbirine benzer 7 altünite vardır. 2 ve 3 altünitelerinin arasında inserted domein (I-domain) içermektedir. Yıldızla gösterilen yerler varsayılan katyon Ca, Mg bağlanma bölgeleridir. 5-7 arasına I-domein içeren integrinler, 4-7 arasında ise I-domein içermeyen integrinlerde bulunmaktadır [12,13,21].

İntegrin-ligand bağlanması etkileşimi integrin α altünitesinin içerdiği I-domain ve sağladığı aktivite ile ilişkilidir. Intersellüler adezyon molekülü (I-CAM) I-domain içeren α altünitesi tarafından tanınmaktadır. Tüm integrinler kovalent olmayan α ve β altünitelerine sahip heterodimer bileşiklerdir. α ve β

altüniteleri transmembran glikoproteinlerdir ve hücre yüzeyleri her altünitenin heterodimer formasyona bağımlı olduğunu açıklar. Spesifik α/β altüniteleri kombinasyonu ligand bağlanma aktivitelerini ve değişken sinyal fonksiyonlarını açıklamaktadır [5].

Affinite modülasyonu mekanizmasının içeriden-dışarıya ECM ligand bağlanması ayarlanmasında önemli bir adımdır ve her altünitenin davranışı farklı bir adeziv özellik gösterir.

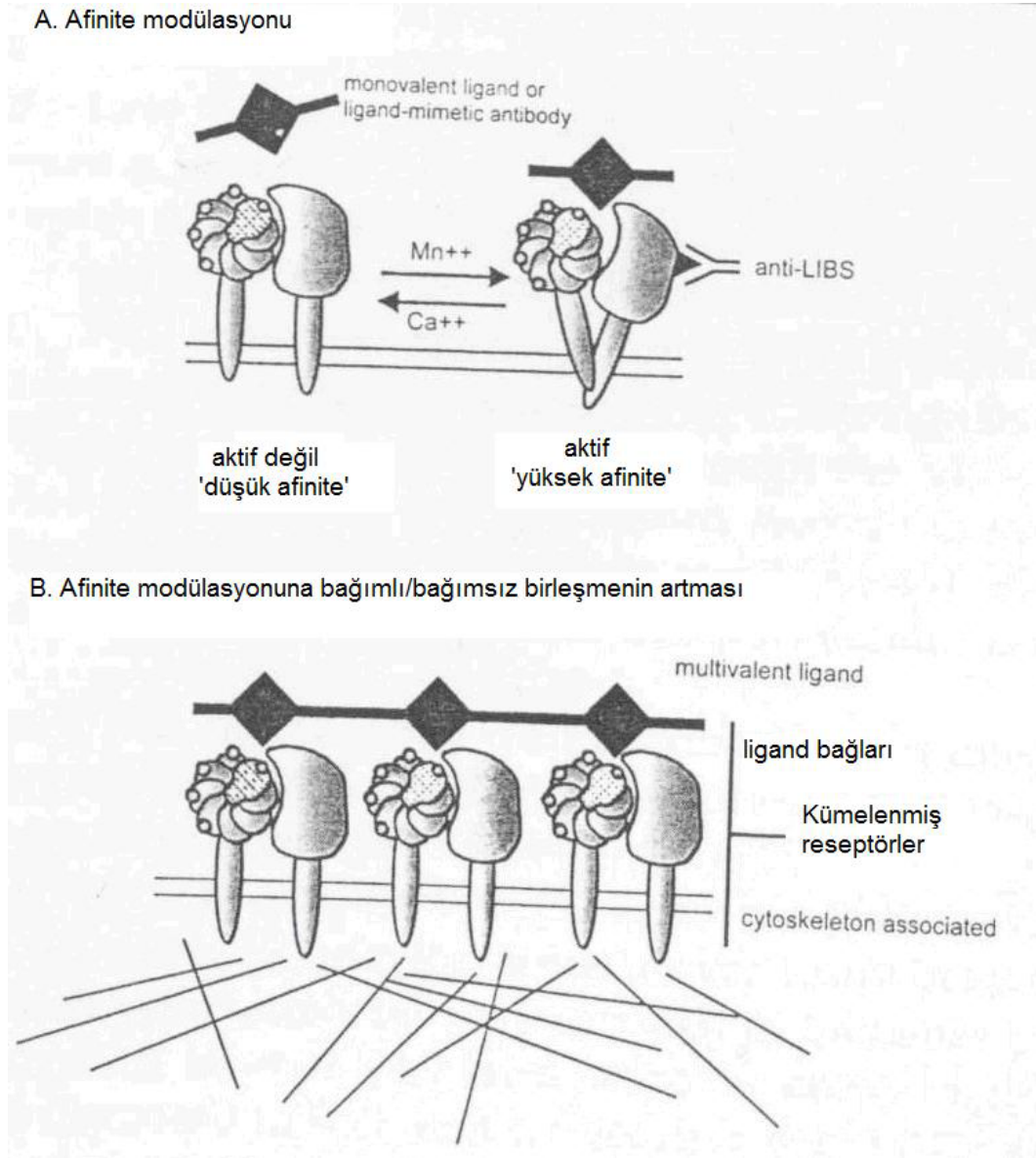


Şekil 1.13. I-domain içeren integrinin yapısı şematik gösterilişi

β I-like domeini α altünitesi β çarkı ile etkileşime girer.(2-3 arasında), α I-domaininin alt bölgesinden β I-like domeinine temas etmektedir. MIDAS katyon bağlanma bölgesi (Spesifik metal bağlanma bölgeleri) kıvrılmanın üst bölgesinde yer almaktadır. β alt ünitesi de I-like domeinine benzer katyon bağlanma bölgesi MIDAS motifi içermektedir.

Metal iyonları bütün integrin heterodimerlerin (EF hands ve MIDAS motifleri) ligand bağlanması fonksiyonunda kritik bir rol oynarlar. Örneğin Ca^{2+}

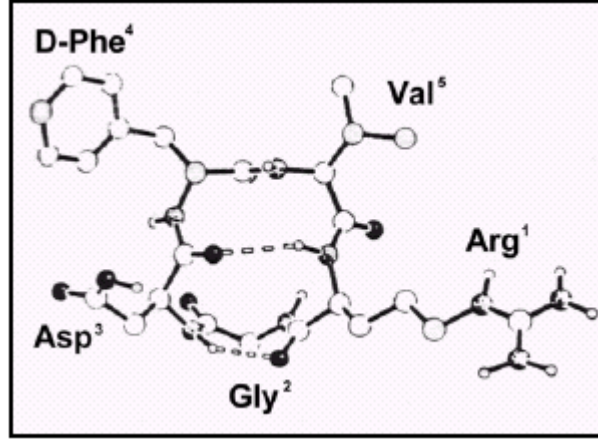
düşük affinite uyumu, Mn^{2+} yüksek bağlanma özellikleri göstermektedir (Şekil 1.14 a). Aktive edilmiş reseptörler anti-LIBS tarafından tanınır. Ligand integrin reseptör bağlanmasında bireysel reseptör aktivitesi tek başına genelde yeterli olmaktadır. Diğer taraftan multivalent ligand etkileşimi kullanılarak integrin ligand bağlanmasını afiniteden de yüksek bir ilgiyle sağlar ve hücre isteğini arttırmaktadır (Şekil 1.14 b) [5].



Şekil 1.14. İntegrin α ve β alt üniteleri afinite modülasyonu

- a) Afinite modülasyonu
- b) Afinite modülasyonuna bağımlı/bağımsız birleşmenin artması

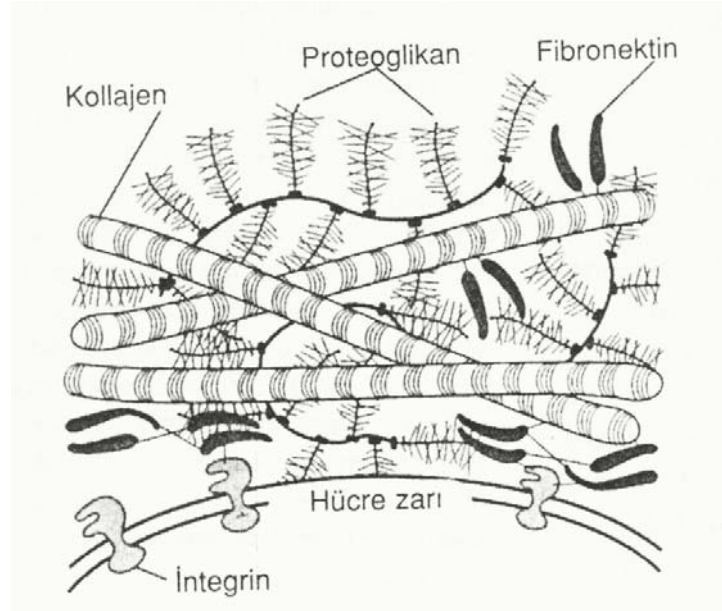
Hücre içinde integrinin kısa stoplazmik domainleri değişken cytoskeletal proteinlerle talin ve α -aktinin ile birleşirler.



Şekil 1.15. RGD bağ yapımı

Bağlanma işlevinde integrinin özellikle α 2b, β v ve α 5 altüniteleri RGD aminoasit dizilişini bağ yaparlar [8,14].

1.2.8. İntegrinin işlevleri



Şekil 1.16. Hücre zarı ve hücre dışı yatağın bileşenleri arasındaki etkileşimler

İntegrinler tersyüz etme mekanizmaları ile etkinleştirilebilmekte olup bu yolla hücre içi işaret verme olayları molekülü etkinleştirmekte veya 'dış-iç' mekanizmalarla molekülün hücre dışı bölümünde bir bağlanma olayının gerçekleşmesi hücre içi işaret verme olaylarını başlatmaktadır. Hücreleri ECM bileşenlerine bağlayan integrinlerde, özgül integrinlerin etkin hale getirilmesi afettede hücrenin ECM içinde göç etmesi ile sonuçlanabilmektedir. Bu mekanizma büyüme, hücre farklılaşması ve kötücül hücrelerin komşu dokulara metastaz (Tümör hücrelerinin başlangıçtaki konumlarını terk edip vücudun bir diğer yerine gitme) yapması olayında görev alır.

Akyuvarlarda bulunanlara benzer bazı integrinler, akyuvarların dolaşımında serbest hareket etme zorunda olmalarından ötürü normalde etkin değildir. Öte yandan, bir enfeksiyon görülecek olursa, enfeksiyon alanındaki hücreler sitokinler salmakta, sitokinler akyuvarlar üzerindeki integrinleri etkinleştirerek bunların enfeksiyon noktasındaki vasküler endotel hücrelere bağlanmasına (akyuvar yapışmasına) izin vermektedir. Akyuvar yapışma eksikliği (LAD) genetik bir bozukluk olup $\beta 2$ integrinde mutasyonlar olması sonucunda görülmekte ve sonuç olarak akyuvarlar enfeksiyon noktalarında göreve başlatılamamaktadır. Aksine, sitokinlere verilen normal akyuvar yanıtını bozarak yangısal ve otoimmün hastalıkları tedavi etmek için günümüzde $\beta 2$ veya $\alpha 4$ integrinleri (lenfositler üzerindeki) bloke edecek ilaçlar geliştirilmektedir [9].

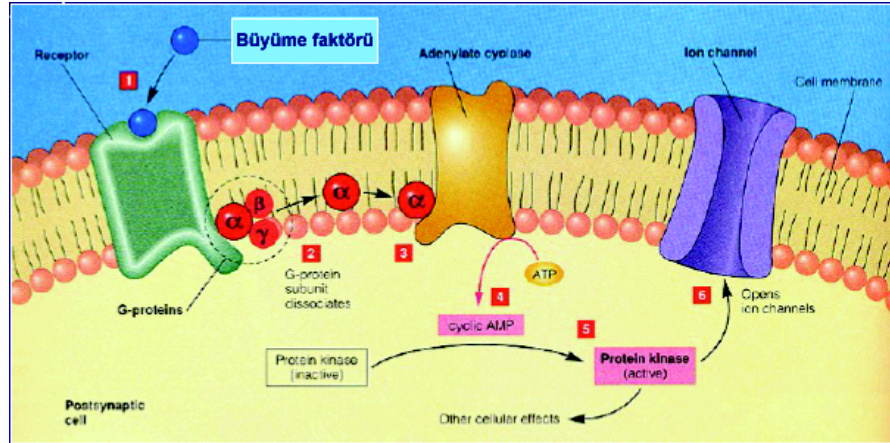
1.Hücrelerin ekstrasellüler matrikse tutunmasını sağlar.

Bağlantı bölgelerinde iki değerli Ca^{+2} ve Mg^{+2} katyonlara gereksinim vardır. Arginin-glisin-asparagin (RGD) aminoasit dizilerine sahip moleküllere bağlanma özelliği gösterir. Bu diziler hücre-dışı matriks glikoproteinlerinde, bazı hücrelerin yüzeyinde ve bazı kompleman proteinlerinde bulunur [4,25].

ECM ve hücre iskeleti arasındaki bağlantı'da; Hücre bütünlüğünü sağlayarak hücreyi dış etkilerden korur. Morfogenesisde rol oynar. Embriyogenesis'de doku ve organ oluşmasını sağlar. (Ontogeni)

2. ECM'den hücreye bilgi akışını sağlar.

Büyük (120-170 kD) α ve küçük (90-100 kD) β alt üniteleri vardır. **Sinyal iletimi;** Hücre dışı sinyaller aracılığı ile sinyal iletiminde rol oynarlar ve haberleşmeyi sağlarlar. İntegrinler, bazı büyüme faktörlerinin VEGF, EGF reseptörüdür. Bu moleküller hücre içi etkilerini protein kinazlar aracılığıyla gerçekleştirir.



Şekil 1.17. Protein kinazların etki mekanizması

Aktif hale geçen bir hücre sitoplazmasından sinyal iletildiğinde, integrinlerin hücre-dışında kalan kısmı şekil değişimi göstererek kendi ligandına olan afinitesini artırır. Bu işleme içeriden-dışa (inside-out) sinyal iletimi denir. Bu işlem adezyon molekülleri arasında bir tek integrinlerde görülür.

İntegrinlerin ligandına bağlanması ile bu kez dışardan-içeriye (outside-in) sinyal mekanizması çalışır; bu da hücre içerisinde apoptozisten proliferasyona kadar birçok işlevde etkili olur [2,22].

tanımlanmış olup, tip I, tip II şeklinde isimlendirilir bu değişiklik moleküler yapıdan kaynaklanmaktadır [15].

1.2.9.2. Fibronektin (Fn)

Hücre dışı matriks bileşenidir. Biyolojide sinyal iletimi bir hücrenin bir cins sinyal veya uyarıyı başka birine dönüştürme sürecidir. Çoğu zaman bu, hücre içinde enzimlerin yürüttüğü biyokimyasal reaksiyonlarla gerçekleşir, bunlar birbirine ikincil habercilerle bağlanıp bir "ikincil haberci yolu" oluştururlar. Bu süreçler genelde hızlı olur, iyon akıları durumunda milisaniyeler mertebesinde, protein ve lipid aracılıklı kinaz çağlayanı (kaskad) durumunda dakikalar mertebesinde sürer.

Çoğu sinyal iletimi işleminde sinyal ilk uyarandan ileri doğru yayıldıkça bu olaylara katılan protein ve diğer moleküllerin sayısı da artar ve böylece küçük bir sinyal büyük bir tepki doğurabilir; buna "sinyal çağlayanı" denir.

ECM proteini olan fibronektin; kollajen, fibrin ve heparan sülfat gibi ECM moleküllerine ve hücrelere bağlanan birçok fonksiyonel bölge içerir. Fibronektin ile hücreler arasındaki etkileşim, genelde bu molekül üzerindeki belli anahtar dizileri tanıyıp bağlanan özelleşmiş reseptörler aracılığı ile gerçekleşir.

Bu protein üzerinde en iyi bilinen fonksiyonel bölgeler RGD (arjinin-glisin-aspartat), LDV (lösin-aspartat-valin) ve REDV (arjinin-glutamataspartat-valin) segmentleridir. Hücre bağlayıcı RGD segmentindeki bir mutasyonla, bu alana bağlanan hücrelerin adhezyon yeteneğinin yok olduğu ve hücre göçünün inhibe edildiği gözlenmiştir [16,23].

1.2.9.3. Laminin (Lm)

Matrigel, BD Biosciences firması tarafından pazarlanan, bir çeşit fare tümör hücre serisinin salgıladığı jelatin, laminin ve başka proteinleri içeren organik karışımın ticari ve yaygın bilimsel ismidir. Bu karışım içeriği itibarıyla, dokularda hücrelerin etrafını saran ECM'e çok benzediği için, hücre serilerinin laboratuvar

koşullarında büyütülmesinde hücrelerin tutunduğu substrat (ortam) olarak kullanılmaktadır [17].

1.2.9.4. Von Willebrand faktör (vWF)

Von Willebrand isminde bir protein kaza yerini işaret ederek yardım isteyen trombositleri gördüğünde önlerini keser ve olay yerinde durmalarını sağlar. Epiligrin, Tenascin, Trombospondin'dir. Endotel hücresi membranındaki hücre adezyon molekülleri VCAM'dir.

Grup olarak integrinler çok çeşitli ECM ligandlarını tanımaktadır. Aşağıdaki tabloda RGD dizilişlerini tanıyan fibronektin ve vitronektin gösterilmiştir, ancak bu diğer ECM moleküllerini tanıyacağı anlamına gelmemektedir.

Farklı integrinler tarafından tanınan ligandların tablosu, integrin altbirim kombinasyonları ve ligandları aşağıda özetlenmiştir [20].

Çizelge 1.2. İntegrin α ve β altünite kombinasyonları ve ligandları

	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 6$	$\beta 7$	$\beta 8$
A1	Coll, Lm							
A2	Coll, Lm							
A3	Fn, Lm, Coll							
A4	Fn, VCAM-1						PP HEV	
αE							?	
A5	Fn							
A6	Lm			?				
$\alpha 7$	Lm							
$\alpha 8$?							
αv	Fn, Vn?		Vn, Fb, Opn, vWF, BSP, (Fn)		Vn, (Fn)	?		?
αIIb			Fb, Vn, Fn, vWF					
αL		I-CAM-1,2						
αM		C3bi, FX, Fb, I-CAM-1						
αX		(C3bi)						

1.3. Nanobiyokonjugasyon Uygulamaları

Protein moleküllerinin yapı ve işlev ilişkilerindeki iyileştirmelerde çok sık kullanılan yöntemlerden biri molekülün kimyasal reaktiflerle modifikasyonu ya da sentetik polimerik yapıdaki moleküllerle birleştirilmesi yani konjugasyondur. Bu Yöntemle enzimlerin kararlılıkları ve katalitik performansları arttırılmakta, çeşitli immunojen moleküllere karşı organizmada daha kuvvetli immünolojik yanıt oluşturulmakta, dolayısıyla aşı geliştirilmesi mümkün olmaktadır. Biyomedikal uygulamalarda immüne altın etiketlemenin Faulk ve Taylor tarafından 1971’de keşfinden sonra hacimsel malzemelere oranla biyolojik, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin, atomik ve moleküler yapılarının çok fonsiyonlu olması elektromanyetik, optik, katalitik etkilerde boyut ve şekil değiştirmelerinde dolayı nanoyapıların kullanımı yaygınlaşmıştır. Nanobiyokonjugasyon uygulamaları: Fonsiyonel polimer-peptit konjugatlarının, fonsiyonel biyopolimer sistemlerin oluşturulmasında, diş restorasyon malzemeleri biyokompozitler oluşturmak için polimer matriks üretimi, genetik modifikasyon, yüzey modifikasyonu, protein moleküllerininin sentetik polimerlerle modifikasyonu, enzim, nükleik asit ve oligonükleotit modifikasyonu ve konjugasyonu, organizma ve nanoyapı arasındaki etkileşimden yararlanılarak tıropatik ya da görüntüleme maksatlı teşhis, tedavi ve hücre hedefleme, uygulamalarında kullanılmaktadır [18].

1.3.1. Süperparamanyetik nanoyapılar (SPN)

Süperparamanyetik demir oksit nanoyapıları altı farklı ligand ile şelat yapma becerisine sahip olma ve ayrıca kolay görüntülenmesi özellikleri açısından tez çalışmasında ortalama çap 33 nm. olarak kullanılmış ve yüzeyi TMSPM ile modifiye edilmiştir.

Her biyomedikal uygulama için belli parçacık büyüklüğü (<100 nm), yüzey kimyası gerekmekte ve hemen her uygulama için parçacıkların kararlılığı önemli olmaktadır. Bu yüzden, parçacık boyu ve dağılımının kontrol edilmesi, uygun özelliklerde parçacık yüzeyi elde edilmesi ve parçacıkların topaklaşması sonucu parçacık boyunun büyümesinin engellenmesi bu sahada en çok çalışılan

konulardır. Son yıllarda parçacık boyunu kontrol edebilmek için uygulanan yöntemlerden birisi, manyetik çekirdekleri polimerik malzemelerle kaplayarak kararlılığının sağlanmasıdır.

1.3.2. SPN uygulamaları

Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıkları manyetik rezonans görüntüleme, manyetik ayırıştırma ya da manyetik alanda direk doku, tümör, protein, enzim, antibadi'ye bağlanma, vücuda ilaç ve gen göndermeye kadar pek çok biyomedikal sahada kullanılmaktadır. Küçük ve kararlı, toksik olmayan süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıkları belli organlara ilaç gönderme ve manyetik rezonans görüntülemede kontrast yaratma potansiyeline sahiptir [19].

1.4. TEM Görüntülenmesi ve Uygulamaları

Geçirimli Elektron Mikroskobu cismin içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibine dayanır ve optik mikroskoba kıyasla çok daha küçük ayrıntıları nano boyutta görmeye olanak tanır. Elektron mikroskobu ile hücre içi organellerin yapılarını, hücre içindeki dağılımını ve diğer organeller ile komşuluğunu, fonksiyonel ilişkilerini, çekirdeğin yapısını membran bütünlüğünü ya da membrandaki değişiklikleri görmek ve ayrıca dokuların organizasyonunu, matriks liflerini, hücre matriks ilişkilerini gözlemlemek te mümkündür. Bunların yanısıra patolojik dokularda TEM'in tanısal değeri var. Bu amaçla en sık kullanıldığı alanlar; Doğru tümör tanısı, tümörlerin tiplendirilmesi ve evrelendirilmesi, virus gibi enfeksiyon ajanlarının dokularda tanınması uygulamalarıdır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan süper paramanyetik demiroksit nanopartikülleri Sigma (St Louis, USA), trimetoksisilli propil metakrilat Sigma (St Louis, USA) metakroil klorür ve aspartik asit Sigma (St Louis, USA), 2-2 dimethoxy-2-phenylacetophenone Sigma (St Louis, USA), etilen glikol dimetakrilat (EDMA) Sigma (St Louis, USA) firmasından temin edilmiş ve kullanılmadan önce hidrokinon varlığında düşük basınçta damıtılmış ve kullanıncaya kadar 4 °C'da muhafaza edilmiştir. 5RP7 kanserli hücreler (Gabrisa ve ark.1983) sıçan emriyo fibroblast hücre hattı (H-Ras transform hücre hattı) kullanılmıştır ve kültür şartlarında muhafaza edilmiştir.

Diğer bütün kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır. Deneylede kullanılan su, yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP® ters ozmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgulu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun iletkenliği 18 megaohm/cm'dir.

2.1.2. Kullanılan cihazlar

Deneylede hazırlanan yapay ligandların etkileşimlerinin görüntülediği TEM'in teknik özellikleri aşağıda verilmiştir.



Teknik Özellikleri

FEI Company-TecnaTM G² Spirit/Biotwin

Çizgisel çözünürlük : 0.34 nm
 Cs Objektifi : 6.3 mm
 Cc Objektifi : 5.0 mm
 Yüksek voltaj aralığı : 20 – 120 kV
 Büyütme : 22 – 300.000

- Dahili CCD sensörlü kamera
- 5 lensli büyütme sistemi
- Otomatik kontrast artırma fonksiyonu
- LaB₆ filament

Yardımcı Cihazları

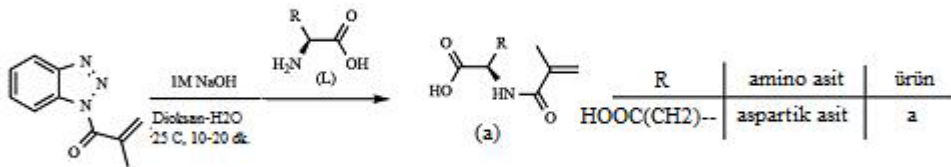
- Ultramikrotom (Leica EM UC6)
- Trim (Leica EM TRIM)
- Cam Bıçak Yapıcı (Leica Knife maker)

Şekil 2.1. TEM cihazı fotoğrafı

2.2. Yöntem

2.2.1. Metakroil Amido Aspartik Asit (MAASP) monomerinin sentezi ve karakterizasyonu

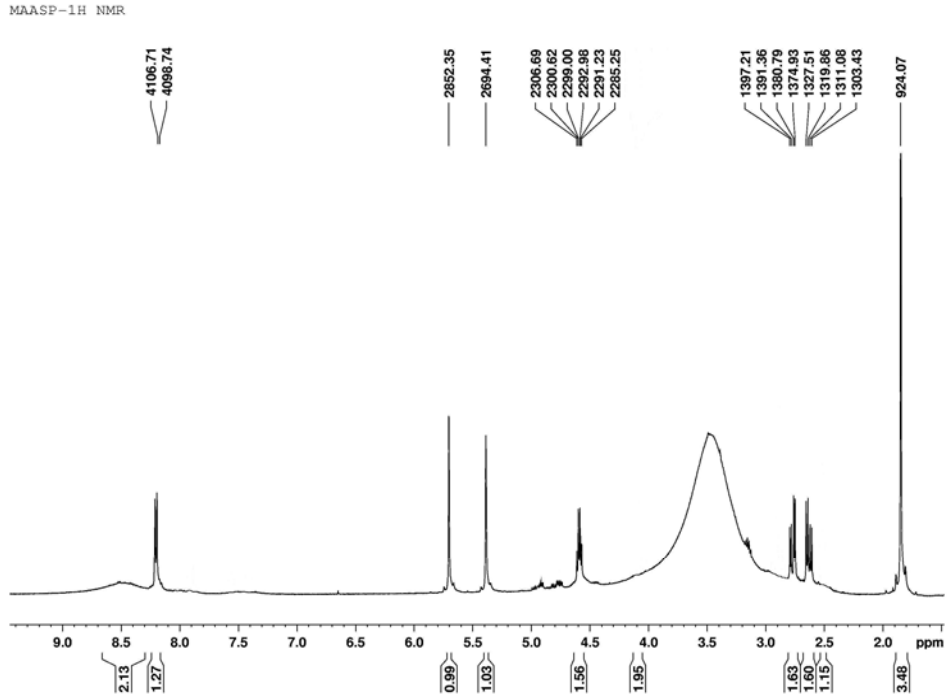
Bu çalışmada, metakroil amido aspartik asit (MAASP) aşağıdaki prosedür ile hazırlanmıştır.



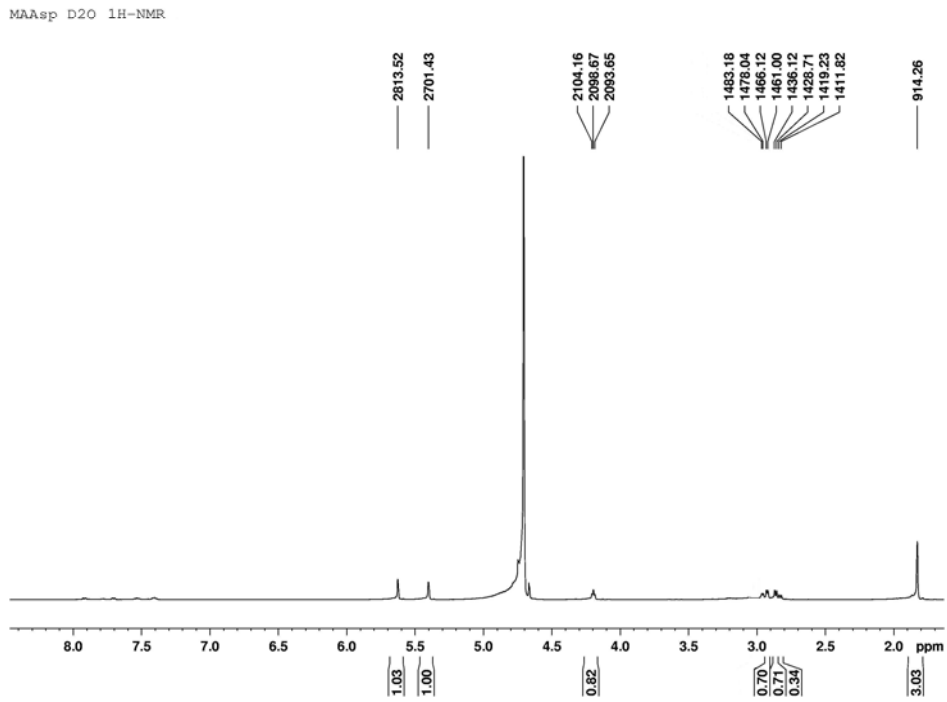
Şekil 2.2. Metakroil amido aspartik asit (MAASP) monomerinin sentez reaksiyonu

5.52 mmol, 1g aspartik asit 1M NaOH sulu çözeltisinde deney tüpü içinde dağıtılmıştır. MA-Bt (5, 52 mmol, 1.033g) çözeltisi içindeki 25 mL of 1,4-dioksan yavaşça amino asit çözeltisi içine eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 10-20 dk. içinde reaksiyonunun hareketliliğine izin vermektedir. Reaksiyon elektronik olarak TLC ile sürekli yazdırılmıştır. Reaksiyon bittiğinde vakum altında 1,4-dioksan buharlaştırılmıştır. Çökelti su ile seyreltilmiş ve içinden 1H-benzotriazole, etil asetat (3x 50 mL) ile çekilmiştir. Toplanmış su HCL %10 sulu çözeltisi kullanılarak pH= 6-7 (Metakroil grubunun asidik ortamda olası polimerleşmesini engellemek için pH 6-7 mertebelerinde tutulmalıdır) olacak şekilde nötrleştirilmiştir. Döner buharlaştırıcı ile su yapıdan uzaklaştırılarak reaksiyon ürünü MAASP monomeri elde edilmiştir [26].

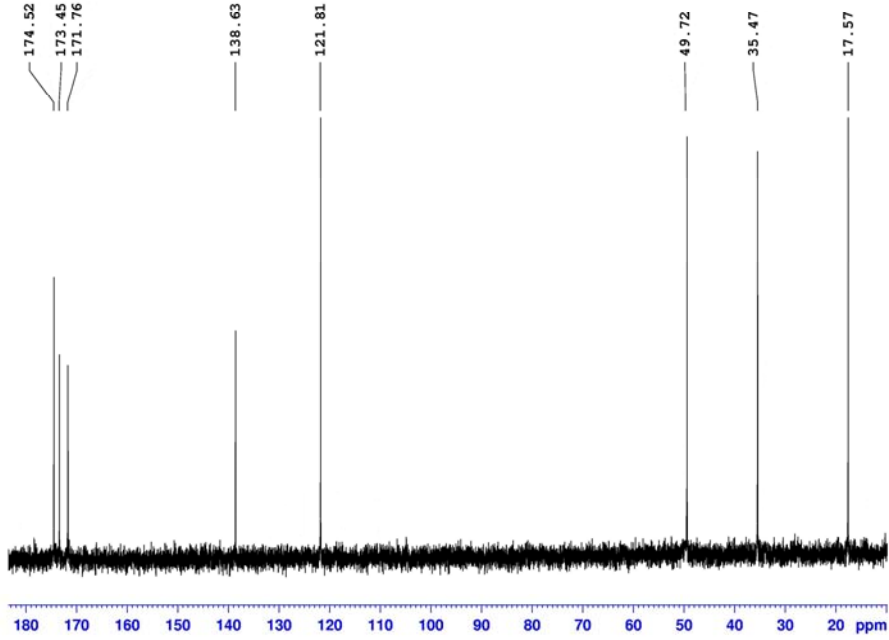
MAASP'in karakterizasyonu ile ilgili olarak ^1H NMR ve ^{13}C NMR ve yorumları aşağıda verilmektedir; ^1H (500 MHz, DMSO-d₆), δ : 8.50 (s, br, 2H, 2 – COOH, bu pik spektrum D₂O'da kaydedildiğinde gözükmemiştir), 8.21 (d, 1H, J = 7.97 Hz, amid –NH, bu pik spektrum D₂O'da kaydedildiğinde gözükmemiştir), 5.70 (s, 1H, CH₂=C(CH₃)-), 5.45 (s, 1H, CH₂=C(CH₃)-), 4.50-4.70 (m, 1H, HOCH₂-CHNH-), 2.77 (dd, 1H, J = 5.85, 16.42 Hz, COOH-CH₂-CH-NH), 2.63 (dd, 1H, J = 7.65, 16.43 Hz, COOH-CH₂-CH-NH), 1.85 (s, 3H, -CH₃) ppm. ^{13}C (125 MHz, DMSO- d₆), δ : 17.6, 35.5, 49.7, 121.8, 138.6, 171.8, 173.4, 174.5 ppm.



Şekil 2.3. MAASP monomerinin ^1H -NMR spektrumu (DMSO)



Şekil 2.4. MAASP monomerinin D_2O içinde ^1H -NMR spektrumu



Şekil 2.5. MAASP D₂O içinde ¹³C-NMR spektrumu

2.2.2. Nanobiyokonjugatların sentezi

2.2.2.1. Süper Paramanyetik Demir nanopartiküllerinin Trimetoksisilli Propil Metakrilat ile (TMSPM) modifiye edilmesi

Bu çalışmada 4,12 mM trimetoksisilli propil metakrilat 5 mL toluen içinde çözülmüş ve çözelti Demiroksit nanopartiküllerinin üzerine eklenmiştir. Karışım platform mikserde 24 saat 60 °C karıştırılmıştır. Daha sonra silanize edilmiş demiroksit nanopartikülleri manyetik separatör aracılığı ile yapıdan uzaklaştırılmıştır.

2.2.2.2. Silanlanmış Süperparamanyetik Demir nanopartiküllerinin Metakroil Amido Aspartik Asit (MAASP) monomeri ile konjugasyonu

0,5 mM MAASP monomeri 3:1 oranında su-asetonda çözülerek karışım demiroksit nanopartiküllerinin üzerine eklenmiş ve 3 saat süre metakroil uçlarından kovalent olarak modifiye edilmiştir.

2.2.2.3. Silanlanmış Demiroksit nanopartiküllerine (MAASP) monomerinin kabuk oluşturacak şekilde dekorasyonu

Silanlanmış demiroksit nanopartikülleri MAASP manomerleri ile kaplandıktan sonra multivalent etkileşimleri harekete geçmek için plimerize etmek amacıyla başlatıcı olarak 2-2 dimetoksi-2-fenil asetofenon ve çapraz bağlayıcı olarak etilen dimetakrilat (EDMA) eşliğinde işlemiştir. Çözücü olarak polar solvent asetonitril kullanılmıştır. Polimerizasyon için ilk olarak 0,6 ml asetonitril silanlanmış demiroksit nanopartiküllerin üzerine transfer edilmiş daha sonra MAASP monomerler eklenerek çözelti karıştırıldıktan sonra 0,4 ml EDMA eklenmiştir. Sonunda 5 mg başlatıcının ilavesi ile polimerizasyon başlamıştır. Polimerizasyon 2,5 saat UV lambasında tamamlanmıştır.

Polimerizasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra çözünür bileşenler ve reaksiyona girmemiş monomerler polimerin su ile yıkanmasıyla yapıdan uzaklaştırılmıştır. 5 ml dimetil sulfoksit (DMSO) ilavesi ile prosedür tamamlanmıştır.

2.2.3. Karakterizasyon çalışmaları

2.2.3.1. Geçirgen Elektron Mikroskobu (TEM) ile EDMA çapraz bağlayıcısı varlığında MAASP dekore edilmiş silanlanmış Demiroksit nanopartiküller ile MAASP konjuge edilmiş silanlanmış Demiroksit nanopartiküllerinin görüntülenmesi

Poli(MAASP-co-EDMA) kabuğa sahip süper paramanyetik nano malzemelerin kesit yapısı ve yüzey morfolojisi TEM (FEI Tecnai TM G 2 Spirit Twin/BioTWIN) kullanılarak belirlenmiştir. Dekore edilmiş silanlanmış MAASP manomerleri ve konjuge edilmiş silanlanmış demiroksit nanopartikülleri 30 dk. ultrasonik su banyosunda organik likid dimetil sulfoksit (DMSO) içinde ayrıştırılmıştır. Sonra nanopartiküller formvar kaplamalı 200-300 mesh bakır elek üzerinde biriktirilmiş ve oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Daha sonra dekore edilmiş silanlanmış MAASP manomerleri ve poli-konjuge edilmiş silanlanmış demiroksit nanopartiküllerinin TEM ile görüntüleri alınmıştır.

2.2.3.2. FT-IR karakterizasyonları çalışmaları

Dekore edilmiş silanlanmış MAASP manomerleri ve poli-konjuge edilmiş silanlanmış demiroksit nanopartiküllerinin FT-IR spektrumları, FTIR spektrometresi (Perkin Elmer Model 2000) kullanılarak elde edilmiştir. Kuru mikroküreler KBr ile karıştırılarak tablet hazırlanmış ve FTIR spektrumu çekilmiştir.

2.2.4. Hücre hatları ve hücre kültürü

H-*Ras* transform hücre hattı (5RP7) deneyde kullanılmıştır. H-*Ras* transform hücre hattı (5RP7) rutin olarak steril flasklar içerisinde 10 % (v/v) fetal bovine serum (GIBCO BRL Paisley, Scotland), L-glutamin (1mM final konsantrasyon) ve penisilin/streptomycin 100 ünite/mL içeren DMEM besiyerinde kültür edilmiştir. Hücreler ortalama 2×10^5 /ml olacak şekilde 37 °C, % 5CO₂ / % 95 hava şartlarında etüvde inkübe edilmiştir. Deney grubuna MAASP konjuge edilmiş silanlanmış nanopartiküller ve Poli(MAASP-co-EDMA) dekore edilmiş silanlanmış nanoyapılar eklenerek 37°C'de 24 saat de inkübe edilmiştir. Daha sonra 0.1 M, % 2 gluteraldehit çözeltisi içinde oda sıcaklığında 2 saat süreyle fikse edilmiştir. Kontrol grubu medyum içine Mg²⁺ iyonu olmadan aynı hücre yoğunluğu ve kültür şartlarına tabii tutulmuştur.

MAASP konjuge edilmiş silanlanmış nanopartiküller ve Poli(MAASP-co-EDMA) dekore edilmiş silanlanmış nanoyapıları hücre kültürüne eklendikten sonra hücre inkübasyon süreci sonunda hücre içerisine giren nanopartiküller TEM'de görüntülenmiştir.

2.2.5. TEM ile hücrelerin analizi

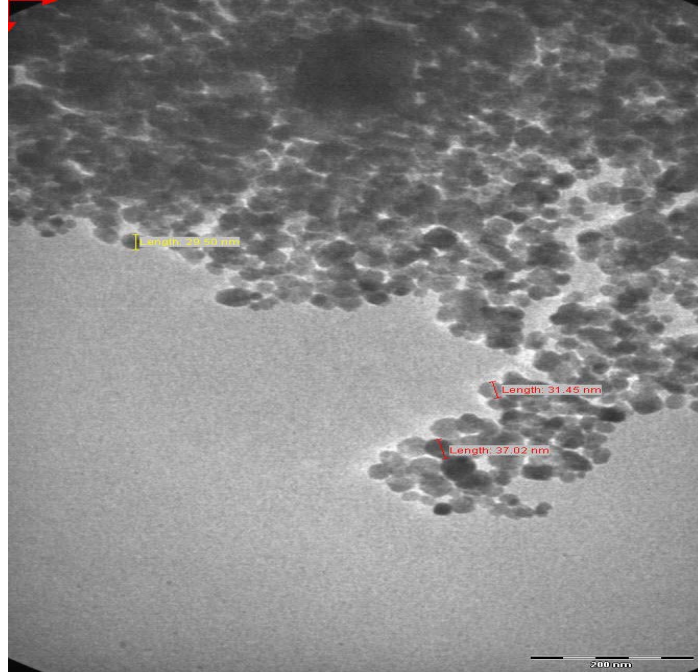
İntrasellüler yüklenmiş nanopartiküller TEM, FEI Tecnai TM G 2 Spirit Twin/BioTWIN kullanılarak belirlenmiştir. Hücreler formvar kaplamalı 200-300 mesh bakır elek üzerinde biriktirilmiş ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Hücreler %2 gluteraldehit çözeltisinde 0,1 M bekletilerek ayarlanmıştır. %2 osmiyum tetroksit içinde katılaştırılarak, benekli gözeneklilik oluştuktan sonra hücreler % 25,50,75,90 ve 100 derece etanol ile sudan arındırılmıştır. Sonra hücreler EPON 812 epoksi içine gömülmüştür. Elmas bıçak kullanılarak maksimum kalınlık 100 nm olacak şekilde ince bir katman oluşturulmuştur ve bu katman sitrat ve uranil asetat ile gözeneklendirilmiştir. Sonrasında bu hücrelerin TEM ile görüntüleri alınmıştır.

3. BULGULAR

3.1. TEM ile EDMA Çapraz Bağlayıcısı Varlığında MAASP Dekore Edilmiş Silanlanmış Demiroksit Nanopartiküller ile MAASP Konjuge Edilmiş Silanlanmış Demiroksit Nanopartiküllerinin Karakterizasyonları

3.1.1. Yüzey morfolojisi

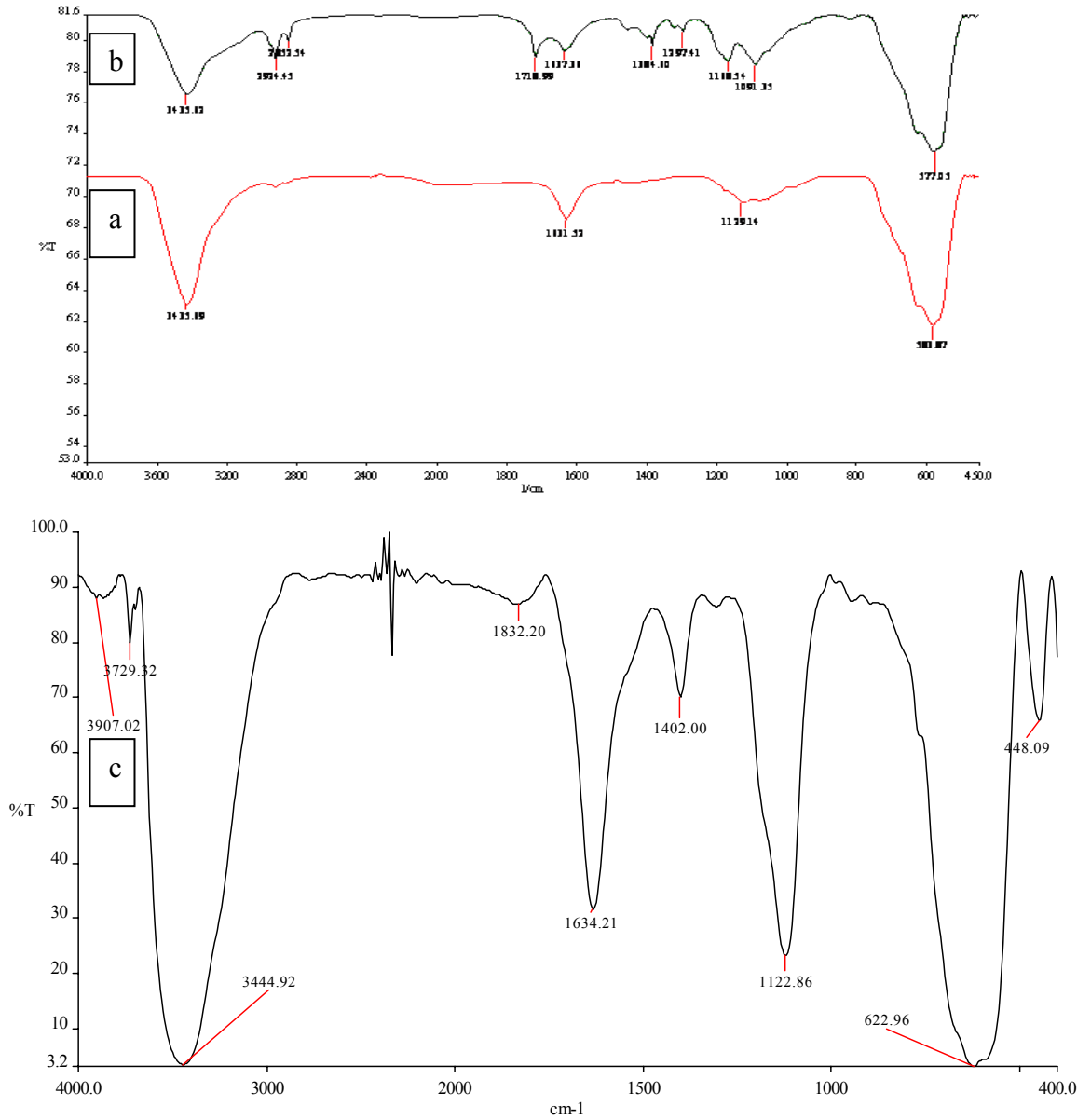
Poli(MAASP-co-EDMA) monolitinin yüzey morfolojisi geçirgen elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak incelenmiştir. Şekil 3.1’de görüldüğü gibi ortalama çapı 33 nm olan nanoyapıların yığın polimerizasyonu ile elde edilen polimerik kabuğu oldukça pürüzlü olup geniş gözeneklere (taşınım kanalları), gözeneklilik nedeniyle de oldukça büyük yüzey alanına sahiptir. Ayrıca, bu mezoporlar difüzyon direncini azaltmakta ve yüksek iç yüzey alanı sayesinde enzim moleküllerinin kütle transferini de kolaylaştırarak adsorpsiyon kapasitesinin artmasına neden olmaktadır.



Şekil 3.1. EDMA çapraz bağlayıcısı varlığında MAASP dekore edilmiş silanlanmış demiroksit nanopartiküllerin TEM görüntüsü

3.1.2. FT-IR karakterizasyonları

Şekil 3.2’de Fe nanopartiküllerin FT-IR spektrumu incelendiğinde CH anti simetrik ve simetrik gerinimi 2924 cm^{-1} ’de, O’ye bağlı CH_3 2852 cm^{-1} ’de görülmektedir. 1168 cm^{-1} ve 1091 cm^{-1} ’deki pikler ise Si-O-C gerinimine ait olup TMSPM yapısına ait karakteristik piklerdir.



Şekil 3.2. a) Fe nanopartiküllerin FT-IR spektrumu b) TMSPM ile modifiye edilmiş Fe nanopartiküllerin FT-IR spektrumu c) Fe nanopartiküllerinin TMSPM ile modifiye edilmiş ve MAASP ile etkinleştirilmiş FT-IR spektrumu

3444.92 cm^{-1} deki pik aspartik asitte bulunan OH gerinimi, 1634 cm^{-1} deki pik C=O gerinimi, 1402 cm^{-1} deki pik karboksilik asitteki COO^- simetrik gerinim, 1122 cm^{-1} C-O geriniminden kaynaklanan piklerdir.

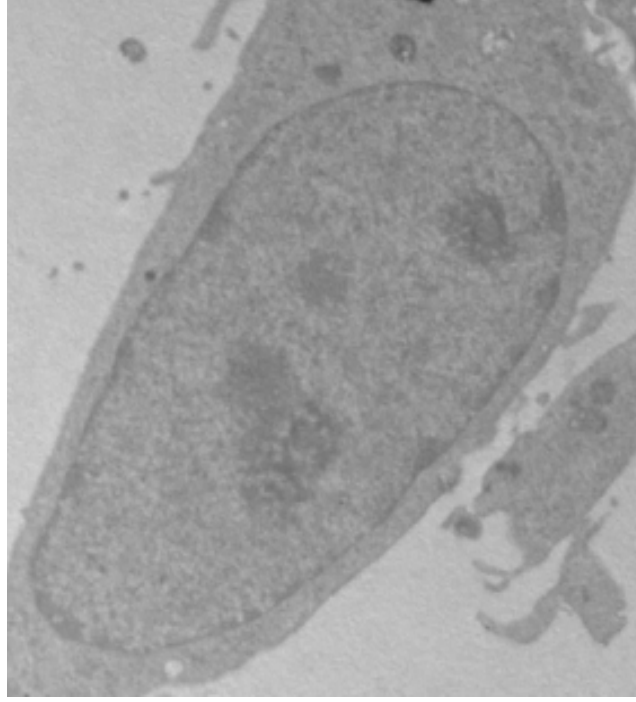
3.1.3. Nanobiyokonjugatların hücre kültürleri ile etkileşiminin incelenmesi

3.1.3.1. TEM görüntülerinin analizi

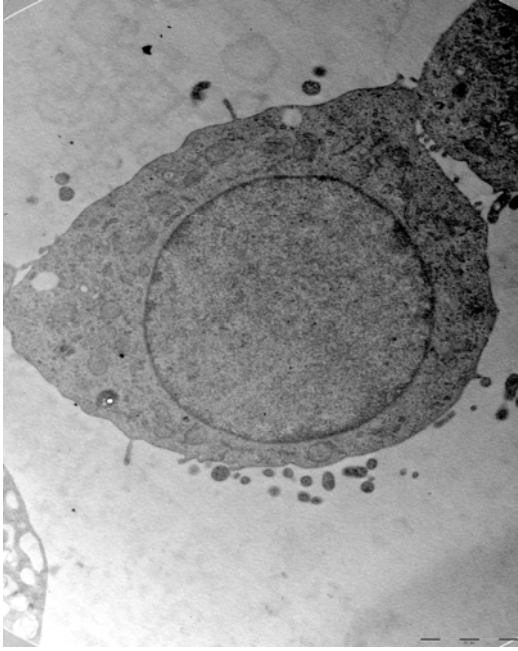
Hazırlanan nanoölçekli partiküllerin bivalent-katyon-bağımlı mı yoksa bağımsız mı olduklarının incelenmesi için hücreler hem Mg^{2+} içermeyen kültür ortamında hem de 40 μl Mg^{2+} içeren kültür ortamlarında ayrı ayrı kültive edilmişlerdir. Daha sonra hazırlanan MAASP monomeri ile etkileştirilen (konjuge edilen) silanlanmış superparamanyetik demiroksit nanopartiküller ile MAASP monomeri kabuk şeklinde dekore edilen polimerik silanlanmış superparamanyetik demiroksit nanoyapılar 5RP7 kanserli hücrelerin kültür ortamına aktarılmış ve 24 saat kültivasyon yapılarak TEM’de analizleri yapılmıştır.

3.1.3.2. Kontrol gruplarının TEM ile görüntülenmesi

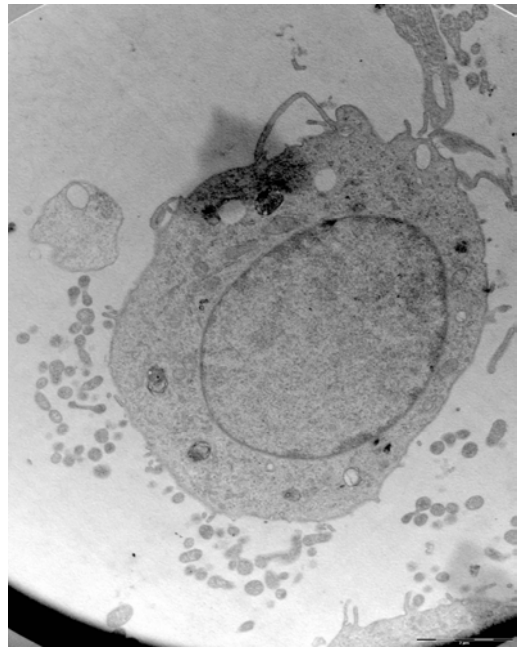
MAASP monomeri ile etkileştirilen (konjuge edilen) silanlanmış superparamanyetik demiroksit nanopartiküller ile MAASP monomeri kabuk şeklinde dekore edilen polimerik silanlanmış superparamanyetik demiroksit nanoyapılarını içeren kontrol grupları 5RP7 hücreleri ile Mg^{2+} iyonu içermeyen kültürde etkileşime sonucu TEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 3.3 ve şekil 3.3 hücre etkileşimi sonrasına aittir.



a.



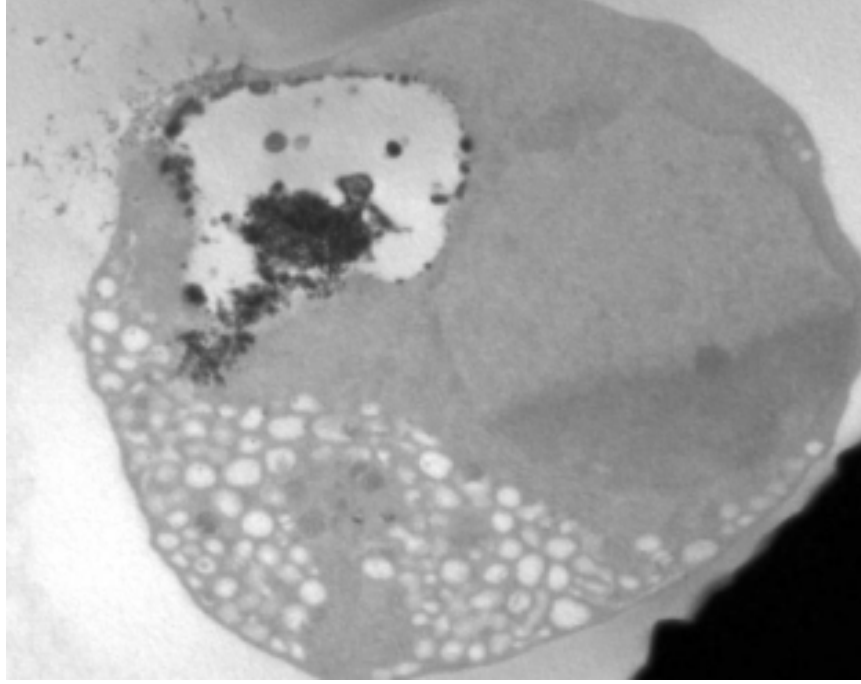
b.



c.

Şekil 3.3. MAASP monomerleri konjuge edilmiş demiroksit nanopartiküllerinin Mg^{2+} iyonu içermeyen kültürde 5RP7 hücreleri ile etkileşiminin TEM görüntüsü

a) b) c) Hücrenin sağlam görüntüsü

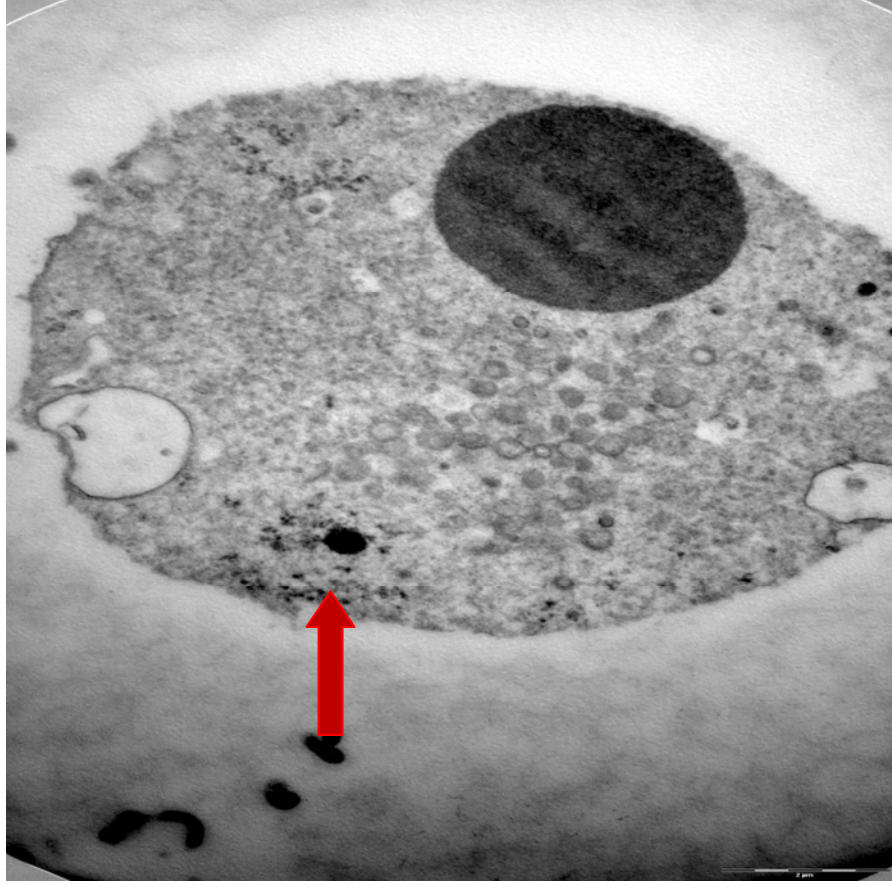


Şekil 3.4. EDMA aracılığıyla MAASP monomerleri dekore edilmiş poli(MAASP-co-EDMA) silanlanmış demiroksit nanopartiküllerinin Mg^{2+} iyonu içermeyen kültürde 5RP7 hücreleri ile etkileşiminin TEM görüntüsü

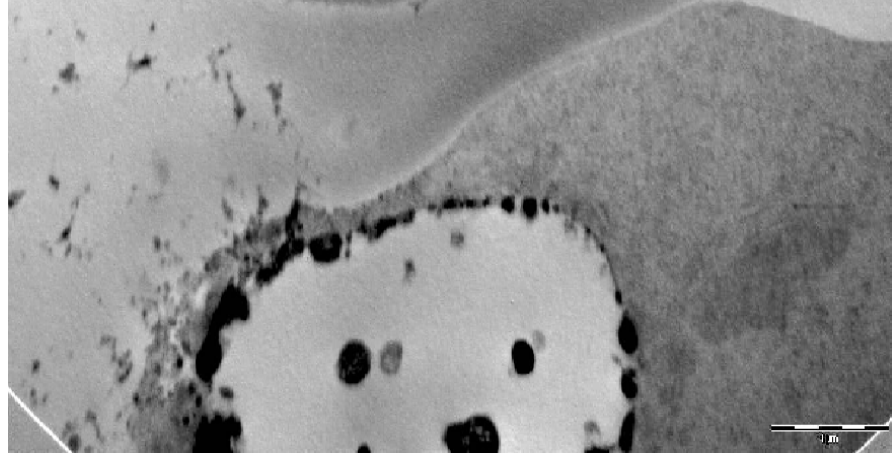
Yukarıdaki TEM görüntüsünde polimerik kabuk dekore edilmiş silanlanmış demiroksit nanopartikülleri sebebi ile ekstra uzantılı kolların (spacer arm) meydana gelmesi ile MAASP monomerindeki aspartik asit β RGD tanıma bölgesi ile etkileşmekte, bağlantı sağlamakta ve integrin bloke olduğu için hücrenin hayatta kalmasını sağlayan hayati fonksiyonları yerine getiremediğinden hücre ölmektedir.

RGD bölgesi ile etkileşim polimer yapılarda ekstra kollar, uzantılar olmasının avantajları sayesinde sağlanmaktadır.

Mg^{2+} içermemesine rağmen hücrelerin nanopartikül ile etkileşmesiyle hücre ölümü ve nekroz olaylarının görülmesi, polimerik yapıdaki nanopartikülün polivalan etkileşimler yapabilmesi sonucu Mg^{2+} bağımsızda integrin ile etkileşebildiğini [Zijenah et al. 1990] ve böylece integrinin blokasyonu ile hücrelerde apoptoz ve nekroz olaylarının gerçekleştiğini göstermektedir. Aşağıdaki görüntü Şekil 3.4a ve Şekil 3.4b veriyi destekleyici niteliktedir.



a.



b.

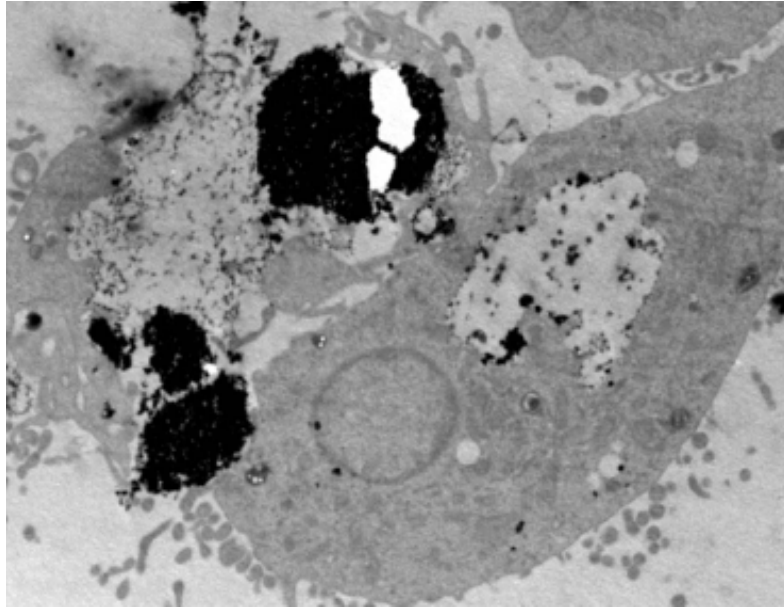
Şekil 3.4. EDMA aracılığıyla kabuk dekore edilmiş silanlanmış demiroksit nanopartiküllerinin Mg^{2+} iyonu içermeyen kültürde 5RP7 hücreleri ile etkileşiminin TEM görüntüleri

- a) Nanopartiküllerin hücre içine girmiş görüntüsü
- b) Nanopartiküllerin hücre içine girmiş görüntüsü

Şekil 3.4a’da kırmızı okla gösterilen bölgede 5RP7 hücresi EDMA aracılığıyla MAASP monomerleri dekore edilmiş poli(MAASP-co-EDMA) kabuğa sahip silanlanmış demiroksit nanopartiküllerini integrin ligandı kabul ederek bağ yaparak hücre içine girmiş, Şekil 3.4b’de hücrenin zarar görmesine neden olmuştur.

3.1.3.3. Deney gruplarının TEM ile görüntülenmesi

Deney grubunda ise Mg^{2+} iyonunun etkisini görmek için 40 μ l Mg^{2+} iyonu MAASP monomeri ile etkileştirilen (konjuge edilen) silanlanmış superparamanyetik demiroksit nanopartiküller ile MAASP monomeri kabuk şeklinde dekore edilen polimerik silanlanmış superparamanyetik demiroksit nanoyapılarını içeren gruplar ayrı ayrı 5RP7 hücrelerinin olduğu ortama ekleniyor. Mg^{2+} iyonu içeren kültürde etkileşim sonrası TEM görüntüleri Şekil 3.5 ve şekil 3.6’de gösterilmektedir.

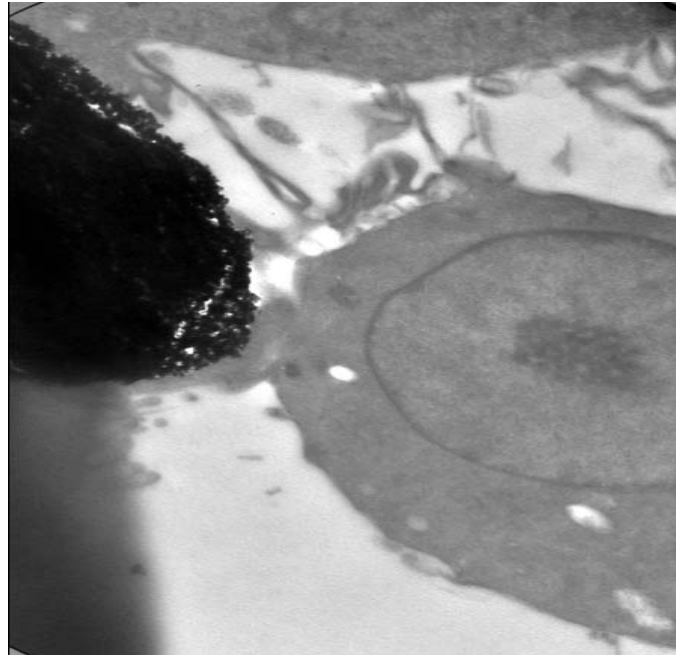


Şekil 3.5. MAASP monomerleri konjuge edilmiş demiroksit nanopartiküller ve 5RP7 hücreleri ile 40 μ l Mg^{2+} iyonu içeren kültürde etkileşime sonucu TEM görüntüleri alınmıştır. Şekildeki iki hücreden sağdaki zarar görmüş soldaki ise ölmüştür.

Yapı polimerli olmadığından integrinin β bölgesinde yüzeyde değilde daha derin yerde bulunan RGD bağlanma bölgesine bağlanamadığı varsayımı Şekil 3.3'de hücrenin sağlam görüntüsü ile desteklenmiştir.

Mg^{2+} iyonu ortamda olduğu durumda ise; İntegrinin α bölgesindeki MIDAS ile etkileşebilir ve integrine bağlanarak bloke eder böylece hücredeki integrin normal işlevini göremez ve hücre ölümü gerçekleşir. TEM görüntülerini incelediğimizde Şekil 3.5 bu varsayımı desteklemektedir. Varsayım gereğince; Mg^{2+} iyonu RGD ile etkileşemese de MIDAS ile etkileşerek hücreleri öldürebilmektedir [27].

Mg^{2+} içermeyen ortamda yapılan denemede hücre ölümü dikkate değer bir şekilde görülmezken Mg^{2+} ilavesi ile hücrelerde ölümlerin ve hasarların görülmesi, literatürde bildirilen verilere uygun olarak Mg^{2+} varlığında integrin-ligand etkileşiminin arttırmakta, ligand olarak sentezlenen nanopartikülün integrine afinite duyarak onu bloke ederek hücrelerin yaşamsal fonksiyonları için gerekli integrin molekülünü kullanamadıkları için canlılıklarında düşme olduğunu göstermiştir.



Şekil 3.6. EDMA aracılığıyla MAASP monomerleri dekore edilmiş poli(MAASP-co-EDMA) silanlanmış demiroksit nanopartiküller ve 5RP7 hücreleri ile $40 \mu l$ Mg^{2+} iyonu içeren kültürde etkileşime sonucu TEM görüntüleri alınmıştır. Şekilde nanoyapılar agregolmuş ve net bir biçimde gözükmemektedir.

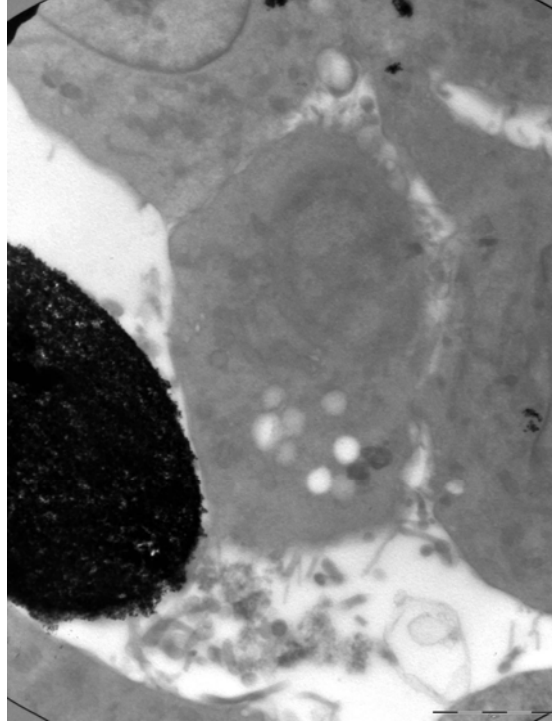
Kontrol grubunda ise Mg^{2+} iyonu içermeyende hücreler polivalent etkileşim olduğundan dolayı MAASP'daki aspartik asit RDG ile benzer etkileşim kurarak integini bloke etmektedir. Şekil 3.6 ve Şekil 3.6a-3b bunu desteklemiştir.

Mg^{2+} iyonu ilavesinde ve ölümün hem β RDG tanıma bölgesinden hemde α MIDAS bağlantısında gerçekleşmesi beklenmektedir. $40\mu l$ Mg^{+2} içeren ortamda hücre ile integrin arasındaki etkileşim azalmıştır. Hücrelerdeki canlılık değeri TEM görüntülerini incelendiğinde daha fazla görülmüştür. Hazırlanan polimerik yapıda MAASP monomeri polivalan etkileşimler gerçekleştirerek ve ortamdaki Mg^{2+} iyonu ile MAASP monomerindeki negatif yüklü aspartik asit (Asp: Asidik yan zincirli amino asit) birbirine bağlanmaktadır.

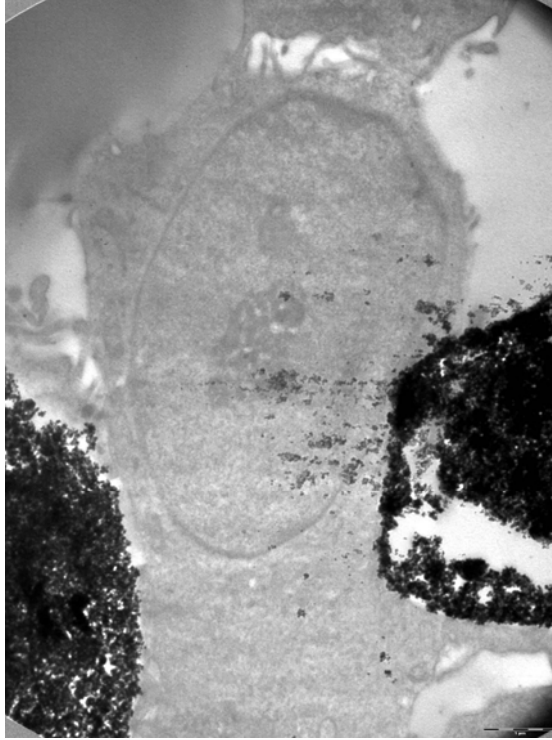
Böylece hazırladığımız yapıdaki aspartik asit ucu bloke olmaktadır. Bu sebeple hücreler ile etkileşemez integrini bloke edemez hücreler sağlam kalmaktadır.

Ortamdaki Mg^{2+} iyonları hazırlanan MAASP dekore edilmiş nanopartiküllere göre daha rahat hareket edebilir MIDAS'ta bulunan magnezyum bağlanma bölgesine gidip orada küme oluşturursa bizim hazırladığımız yapının bağlanmasını engelleyebilir. Bu kümelenme MAASP konjuge yapı TEMde incelendiğinde oldukça az görünmüştür oysa EDMA varlığında MAASP ile dekore edilen polimerik yapıdaki partiküllerde bu kümelenme mikroskopta hemen hemen incelenen tüm bölgede görünmüştür.

Mg^{2+} iyonu iki iyonik bağ yapacağı için iki MAASP dekore edilmiş yapıyı da birbirine bağlayarak demiroksit nanopartiküllerinin agrege olmasında arttırıcı bir rol üstlenir. Ayrıca EDMA sayesinde partiküller polimerize olurlar ve bu da partikül miktarını arttırdığı için daha büyük partiküller meydana gelir Mg iyonu aracılığı ile bu büyük partiküllerin birleşmesi büyük agregatların oluşmasına sebep olmaktadır. Yani hem EDMA sayesinde hemde Mg iyonunun iyonik bağ etkisi ile yanyana gelen ve etkileşen polimerik partiküller hücre ile etkileşimi engellerler. Şekil 3.6'de de bu öngörüğü destekleyen görüntüler elde edilmiştir. Şekil 3.6 a ve b ise agrege olmuş nanoyapıları net biçimde gözükmemektedir.



a.



b.

Şekil 3.6. EDMA aracılığıyla MAASP monomerleri dekore edilmiş poli(MAASP-co-EDMA) silanlanmış demiroksit nanopartiküller ve 5RP7 hücreleri ile 40 μl Mg^{2+} iyonu içeren kültürde etkileşime sonucu TEM görüntüleri alınmıştır.

a) Agrege olmuş nanoyapı görüntüsü

b) Agrege olmuş nanoyapı görüntüsü

Böylece hücrelerdeki integrin bloke olmaz hücreler sağlam kalır. Mg^{2+} iyonu iki bağ yapabilir bu sebeple birbirlerine bağlanıp küme oluşturabilir. Ortamdaki diğer Mg^{2+} iyonları da bu şekilde kümelenme gösterebilmektedir.

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, hücre matrisine dıştan bağlanan transmembran hücre yüzey proteini integrin molekülerinin birbirlerine kovalent olmayan etkileşimle bağlanan heterodimerik α ve β zincirlerini tanıyan arginin-glisin-aspartik asit (RGD) peptid dizilişine mimik, biyouyumlu, kararlı yapay polimerik kabuk taşıyan nanokonjugat (Yapay aspartik asit temelli ligand tanıyan) hazırlaması ve bu yapının reseptör vazifesi görerek interinle etkileşiminin incelenmesine ve ECM'de adezyonunun sağlanması ve deneysel olarak sonuçların görüntülenmesi, doğrulanmasına yöneliktir.

Çalışmanın birinci aşamasında, süperparamanyetik demiroksit nanopartikülleri trimetoksisillil propil metakrilat (TMSPM) ile reaksiyona sokularak silanlanmıştır. Daha sonra bu partiküllerin bir kısmı MAASP (Metakroil amidoaspartik asit) monomeri, EDMA (Etilen diamin metakrilat) çapraz bağlayıcısı yardımıyla dekore edilerek, polimerizasyon uğratılmış multivalent kabuğa sahip süperparamanyetik nanoyapılar elde edilmiştir. Partiküllerin diğer kısmı ise MAASP monomeri ilave edilmiş böylece MAASP monomeri konjuge edilmiş silanlanmış monovalent demiroksit nanopartikülleri elde edilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında; MAASP monomeri ile etkileştirilen (Konjuge edilen) silanlanmış süperparamanyetik demiroksit nanopartiküller ile MAASP monomeri kabuk şeklinde dekore edilen polimerik silanlanmış süperparamanyetik demiroksit nanoyapılar Mg^{2+} içermeyen ve içeren 5RP7 kanserli hücrelerin kültür ortamına aktarılmış ve 24 saat kültürasyonu yapılmıştır.

Çalışmanın son aşamasında ise hazırlanan nano konjugatları 5R7P kanser hücreleri (H-Ras transform hücre hattı) ile etkileşiminde iki değerli-kasyon bağımlı mı yoksa bağımsız mı olduklarının incelenmesi için hücreler hem Mg^{2+} içermeyen kültür ortamında (Kontrol grubu) hem de $40\mu l$ Mg^{2+} içeren kültür ortamlarında (Deney grubu) ayrı ayrı kültive edilmişlerdir. Sonuçların TEM'deki görüntüleri incelenmiş ve analizleri yapılmıştır. Bulgular bölümünde varsayımların görüntülerle desteklenen açıklamaları yapılmıştır. Kontrol grubunda Polimersiz nanoyapıda hücrelerde zarar gözükmezken, polimerli nanoyapıda

polivalan etkileşimle hücre hasarı gerçekleşmiştir. Deney grubunda ise Mg^{2+} ilavesiyle polimersiz nanoyapıda aspartik asit karbonil ucu iyonik olarak etkileşim sonucunda kapanmış agregasyon olarak hücre ölümü polimersiz nanoyapıdan daha az gerçekleşmiştir.

Bu çalışmadan elde edilecek yaklaşımlar ve sonuçlar ile kanser hücrelerinde yoğun miktarda bulunan ve metastaz etkisini geliştiren sistemin tezde hazırlan yapay ligandlar ile bloke edilerek engellenmesi ve kanserli hücrelerin ölümünün sağlanarak kanser hücrelerinin yayılmasının önlenmesinde dolayısıyla hastalığın tedavisinde, hastalık keşfinde, büyük bir ilerleme sağlanabilecektir. Ayrıca ilaçların geliştirilmesinde birbirine karşı hassas yapay ligand platformlar oluşturularak ilacın tesir etkinliğinin artırılması, kullanım süresi, oranını azaltmak üzere çalışmalar yapılabilecektir.

Adezyon mekanizmaları, hücre etkileşimleri, yapay reseptör ligandların sentezi günümüzde araştırmaya açık ve gelecekte de her zaman çok farklı uygulamalarda insanların kullanımına değerli katkılar sağlayacak niteliktedir. Görüntüleme kimyasal proses ve mekanizmaların nanobiyokonjugatların geliştirilmesi ve karakterizasyon çalışmaları ile biyolojik işlevlere yönelik tezde oluşan yeni yaklaşımların önemli çalışmalara öncülük oluşturacağı inancındayız.

KAYNAKLAR

- [1]. Peppas, N.A., Thomas, J.B., “Encyclopedia of Biomaterials Engineering”, Taylor & Francis, Texas A.B.D., 2006.
- [2]. Can, A., Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji ABD. Yayınları, Ankara, 2006.
- [3]. Keçili, R., “Antipirin Bazlı Monolitik Kolon Geliştirilmesi ve Penisilin Amidohidrolaz Enzimi Ayrılmasında Kullanımı” Yüksek Lisans, 2006. Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- [5]. Bette, J.Dzamba, Margaret, A.B., Douglas, W.D., “Cell Adhesion”, Oxford University Pres, İngiltere, 2001.
- [4]. Pasqualini R., Koivunen E., ve Ruoslahti E., “A Peptide Isolated from Phage Display Libraries Is a Structural and Functional Mimic of an RGD-binding Site on Integrins”, California A.B.D., 1189-1196, 1995
- [6]. Ruoslahti, E., “RGD and other recognition sequences for integrins Annu. Rev. Cell Dev. Biol., **12**, 697–715 California A.B.D.,1996.
- [7]. www.geocities.com/CapeCanaveral/9629/integrin.htm
- [8]. Kreis, T., Vale R., Guidebook to the ECM matrix and adhesion proteins Oxford University Pres, İngiltere, 1993.
- [9]. Smith, C., D.Marks, A., Lieberman, M., Lippincott, “Marks Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım”, Williams & Wilkins Press, 915-916, 2007.
- [10]. AYTEKİN, C., İKİNCİOĞULLARI A., “Lökosit Adezyonu ve Lökosit adezyon defekti sendromları”, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi. Astım Alerji İmmünoloji yayınları, **2(3)**, 157-166, 2004.
- [11]. Öztürk, M., “İmmün sistemde adezyon molekülleri”, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, power point sunuşu.
- [12]. Leitinger, B., McDowall, A., Stanley, P., Hogg N., “The regulation of integrin function by Ca⁺²”, Biochimica et Biophysica Acta, London **1498**, 91-98, 2000.
- [13]. Barclay, A.N., et.al., The Leucocyte antigen Facts”, Facts Book, 2nd. Edn., Academic Press, London, 1997.

- [14]. Kojetinsky C., Untersuchungen zur Nachstarprevention in vitro mittels des zyklischen RGD-Peptids cRGDdFV, Medizinischen Fakultat Charite der Humboldt-Universitat zu Berlin, 2002.
- [15]. www.biyoyorum.com
- [16]. <http://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-00-24-3/biy-24-3-1-9901-4.pdf>
- [17]. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Matrigel>
- [18]. Jianquan Liu, Qi Zhang, Edward E. R., ve Karen L. W., ‘‘Nanostructured Materials Designed for Cell Binding and Transduction Biomacromolecules’’ Washington University, A.B.D., **2**, 362-368, 2001.
- [19]. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Caroline, R., Vander Elst, L., ve Muller, R. N., ‘‘Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization’’ Physicochemical Characterizations, and Biological Applications Chem. Rev., Fransa, **108**, 2064–2110, 2008
- [20]. Elices, M.J., Urry, L.A. ve Hemler, M.E., J. Cell Biol. **112**, 169-181.
- [21]. Nazikođlu, A., akar, A. N., ‘‘CD44 ve organizmadaki CD44 bağımlı Oluřumlar’’ Hacettepe Tıp Dergisi Derleme, **37**, 142-148, 2006
- [22]. Acar, G. ., Doku Mühendisliği ve Hücre Kültürü Kaynaklı Yeni Tedavi Seçenekleri Cerrahpařa Tıp Dergisi Derleme, **38**, 32 – 39, 2007.
- [23]. Johansson, S., Svineng G., Wennerberg K., Armulik A., ve Lohikangas L., ‘‘Fibronectin-Integrin Interactions’’ Frontiers in Bioscience 2, d126-146, 1997.
- [24]. Baykal Y., Karaayvaz M., zet A., zet G., Koç B., Kutlu M., Kocabalkan., ‘‘Adezyon Molekülleri’’ Türkiye Klinikleri J Med. Sci. **16**, 13-21, 1996.
- [25]. Dillow, A. K., M. Lowman A., ‘‘Biomimetic Materials and Design’’ Marcel Dekker Inc., New York – Basel, 2002.
- [26]. Hür, D., Ekti, S. F., ve d Say, R., ‘‘ N-Acylbenzotriazole Mediated Synthesis of Some Methacrylamido Amino Asids’’ AcidsLetters in Organic Chemistry, **4**, 585-587, 2007.

- [27]. Tuckwell D. S., Smith L., Korda M., Askari J. A., Santoso S., Barnes M. J., Farndale R. W., ve Humphries M. J. Monoclonal antibodies identify residues 199–216 of the integrin alpha2 vWFA domain as a functionally important region within alpha2beta1, *Biochem. J.* Printed in Great Britain, **350**, 485-493, 2000.