

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEME KANSERİ HÜCRELERİNİ SAPTAYAN HER2
ANTİKORUYLA İŞLEVSELLEŞTİRİLMİŞ KUVARS KRİSTAL
MİKRODENGELİ TEMELLİ BİYOSENSÖRÜN GELİŞTİRİLMESİ**

Merve YILMAZ

**Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2019

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEME KANSERİ HÜCRELERİNİ SAPTAYAN HER2
ANTİKORUYLA İŞLEVSELLEŞTİRİLMİŞ KUVARS KRİSTAL
MİKRODENGİ TEMELLİ BİYOSENSÖRÜN GELİŞTİRİLMESİ**

Merve YILMAZ

**Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. A. Kevser ÖZDEN**

ANKARA

2019

ONAY SAYFASI

**MEME KANSERİ HÜCRELERİNİ SAPTAYAN HER2 ANTİKORUYLA
İŞLEVSELLEŞTİRİLMİŞ KUVARS KRİSTAL MİKRODENGELİ TEMELLİ BİYOSENSÖRÜN
GELİŞTİRİLMESİ**

Öğrenci: Merve YILMAZ

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN

Bu tez çalışması 02.08.2019 tarihinde jürimiz tarafından “Biyokimya Programı”nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Z. Günnur DİKMEN
(Hacettepe Üniversitesi)

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Gülberk UÇAR
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Doç. Dr. Dilara ZEYBEK
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Serenay ELGÜN
(Ankara Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

07 Ağustos 2019

Prof. Dr. Diclehan Orhan
Enstitü Müdürü

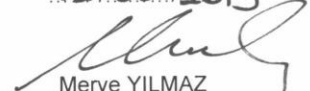
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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 kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

02/08/2019

 Merve YILMAZ

i

ⁱ“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
 Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof.Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.



(İmza)

Araş.Gör. Merve YILMAZ

TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm yüksek lisans eğitimim boyunca tüm öğretim üyelerinin bana vermiş oldukları değerli bilgiler ve her konudaki katkıları için,

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgileriyle bana yol gösteren, fikirlerimi destekleyerek beni cesaretlendiren, bir arkadaş gibi yanımda olup heyecanıma ortak olan, tez çalışmamı planlanmamda ve sürdürmemde her daim desteğini esirgemeyen çok sevgili danışman hocam Prof. Dr. A. Kevser ÖZDEN'e,

Deneyisel çalışmalarım sırasında laboratuvar imkânlarından ve çok değerli bilgilerinden faydalandığım sevgili Prof. Dr. Adil DENİZLİ, Monireh BAKHSHPOUR ve Ilgım GÖKTÜRK'e

Her zaman ve her şartta her daim yanımda olan, beni her konuda destekleyen ve güçlü kalmamı sağlayan, yalnızca hayatı öğretmekle kalmayıp tüm etik ilkeleriyle bilim insanı olmam yönünde yolumu aydınlatan sevgili annem Doç. Dr. Meryem YILMAZ'a

Sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Yılmaz M., Meme Kanseri Hücrelerini Saptayan HER2 Antikoruyla İşlevselleştirilmiş Kuvars Kristal Mikrodenge Temelli Biyosensörlerin Geliştirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2019. Bu çalışmada, HER2 ekspresyonu artmış meme kanseri hücrelerinin erken tespit edilebilmesine imkan tanıyabilecek kullanımı kolay, güvenilir, etkili, hızlı, duyarlı, özgül ve doğrudan gerçek zamanlı izlemeye olanak sağlayan antijen-antikor temeline dayalı QCM sensör sistemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, QCM çipi polimerik nanopartiküllerle kaplanmıştır. Nanopartikülleri hazırlamak için monomer fazı hidrosietilmetakrilat (HEMA) ve etilen glikol dimetakrilat (EDMA) kullanıldı. Nanopartiküller Zeta Sizer ve FTIR ile incelendi. Nanopartiküllerin homojen şekilde oluştuğu ve boyutlarının 73,22 nm olduğu belirlendi. Elde edilen poli-hidroksietilmetakrilat (PHEMA) nanopartiküller tozsuz ortamda UV ışık altında 20 dk inkübe edilerek çip yüzeyine bağlandı. Nanopartiküllerin bağlı olduğu çip yüzeyinin özellikleri temas açısı, elipsometri, SEM ve AFM ile belirlendi. Nanopartikül kaplanmış altın çip yüzeyi, karbodiimid aracılığıyla bağlanan HER2 antikoru ile işlevselleştirildi. SKBR3, MDA-MB 231 ve fibroblast hücre örnekleri, çip üzerinden 10-500 hücre/ml ve 0.5 ml/dk hızda geçirilerek eş zamanlı hücre analizi gerçekleştirildi. QCM sensör yüzeyi için hücre/cm² birim alanda meydana gelen kütle artışları (Δm) karşılaştırıldı. HER2 bağlı QCM çipin tespit limiti (LOD) 10 hücre/ml olarak bulundu. Hücre seçiciliğinin belirlenmesi için yapılan çalışmada sensörün SKBR3 hücrelerine, HER2 içermeyen MDA-MB 231 hücrelerine göre 6.32 kat, fibroblast hücrelerine göre ise 8.40 kat daha fazla seçiciliğe sahip olduğu saptandı. HER2 bağlı çipin tekrar kullanılabilirliği 250 hücre/ml olarak bulundu. Hazırlanan çipin 5 döngü boyunca bağlanma kapasitelerinde bir değişiklik olmadı. Yapılan tez çalışması sonucunda geliştirilen QCM sistemi, SKBR3 meme kanseri hücrelerinde ekspresyonu artmış HER2 hedefli olsa da daha sonraki çalışmalarda diğer HER2 ekspresyonu artmış kanser tiplerinde de kullanılabilir bir QCM sensör sistemi geliştirilmesine katkı sağlayabilecek niteliktedir.

Anahtar kelimeler: meme kanseri, HER2, Notch4, transferrin, QCM biyosensör

ABSTRACT

Yilmaz M., Development of the Quartz Crystal Microbalance Based Biosensor Functionalized with HER2 Antibody That Detects Breast Cancer Cells, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Biochemistry Department of Master Thesis, Ankara, 2019. Here in this thesis project, we aimed to develop a reliable, effective, rapid, sensitive and specific QCM-based system to identify a small number of HER2 overexpressed breast cancer cells via receptor-specific ligands and/or antibodies. For this purpose, the QCM chip was coated with polymeric nanoparticles. The monomer phase was prepared using hydroxyethylmethacrylate (HEMA) and ethylene glycol dimethacrylate (EDMA). Nanoparticles were analyzed by Zeta Sizer and FTIR measurements. The nanoparticles were formed homogeneously and their size was 73.22 nm. The obtained poly hydroxyethylmethacrylate (PHEMA) nanoparticles was dropped the chip surface and for nanoparticle attachment, the chip surface was incubated for 20 minutes under UV light in a dust free environment. The properties of the nanoparticles that bound to the chip surface were determined by ellipsometer, contact angle, AFM and SEM measurements. The nanoparticle coated gold chip surface was functionalized with HER2 antibody via carbodiimide. Simultaneous cell analysis was performed for SKBR3, MDA-MB 231 and fibroblast cells with solutions containing 10-500 cells/ml, the cells passed over the chip surface at a rate of 0.5 ml/min. The mass increases (Δm) per cell/cm² unit area were compared for the QCM sensor surface. The detection limit (LOD) of the HER2 bound QCM chip was found to be 10 cells/ml. In the study to determine cell selectivity, the HER2 bound chip was found to have 6.32 fold more selective to the SKBR3 cells than the MDA-MBB 231 cells and 8.40 fold higher than fibroblast cells. The reusability of the HER2 bound chip was found to be 250 cells/ml. There was no change in the binding capacity of chip for 5 cycles. Based on the results obtained of this thesis study, it was concluded that, although the QCM system developed to detect increased HER2 expression in SKBR3 breast cancer cells, it may contribute to the development of a new QCM sensor systems that can be used for diagnosis of other types of cancers with increased HER2 expression.

Key words: breast cancer, HER2, Notch4, transferrin, QCM biosensors

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
GRAFİKLER	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kuramsal Yaklaşımlar ve Kapsam	1
1.2. Amaç ve Varsayım	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.2. Kanser Tanısının Önemi	4
2.2. Kanser Biyobelirteçleri	5
2.2.1. Kanser Tanısında Sıklıkla Kullanılan Biyobelirteçler	6
2.2.2. Östrojen Reseptörü (ER) ve Progesteron Reseptörü (PR)	6
2.2.3. HER2/neu Reseptörü	7
2.3. Tanı ve Tedavide Hedeflenebilecek Diğer Bazı Meme Kanseri Biyobelirteçleri	9
2.3.1. Notch	9
2.3.2. Ki67	9
2.3.3. Siklin D1	10
2.3.4. Siklin E	10
2.3.5. Transferrin	11
2.4. Biyosensörler	12
2.4.1. Kuvars Kristal Mikroterazi Sensörleri (QCM)	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18

3.1. Materyaller	18
3.2. Method	18
3.2.1. Poli (HEMA) Nanopartiküllerin hazırlanması	18
3.2.2. Nanopartiküllerin karakterizasyonu	19
3.2.3. Nanopartiküllerin ve antikörlerin QCM çip yüzeyine bağlanması	20
3.3. Nanopartikül kaplı çip yüzeyinin karakterizasyonu	20
3.3.1. Elipsometre	20
3.3.2. Yüzeyde hidrofobisite ölçümü	20
3.3.3. FTIR ve AFM ölçümleri	21
3.4. Nanopartikül Kaplı Çip Yüzeyine Antikörlerin Bağlanması	21
3.4.1. Antikör ve Transferrin Çözeltilerinin Hazırlanması	21
3.5. Hücre Kültürü	22
3.5.1. QCM Çip Yüzeyinden Hücrelerin Geçirilmesi	23
4. BULGULAR	26
4.1. Nanopartikül Karakterizasyonu	26
4.1.1. Zeta Boyut Analizi	26
4.1.2. FTIR Analizi	28
4.2. Nanopartikül Kaplı Çip Yüzeyinin Tanımlanması	29
4.2.1. AFM Ölçümleri	32
4.2.2. FTIR Ölçümleri	35
4.3. Eş Zamanlı Hücre Saptanması	37
4.4. Seçicilik Çalışmaları	47
4.5. Tekrar Kullanılabilirlik	50
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
7. KAYNAKLAR	63
8. EKLER	
EK 1. Turnitin Dijital Makbuz	
EK 2. Orjinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

τ	: Kuvars rezonatörünün bozulma sabiti
f_0	: Kuvars kristalinin temel rezonans frekansı
Δf	: Frekans değişimi
μf	: Kuvars kristallerinin rezonans frekansı
μl	: Mikrolitre
Δm	: Kuvars kristal mikroterazi sensör yüzeyinde alan başına kütle
μq	: Kuvars kayma modülü
ρq	: Kuvars yoğunluğu
3B	: 3 boyutlu görüntü
AFM	: Atomik kuvvet mikroskobu
ASCP	: Amerikan Klinik Patoloji Derneği
ATCC	: Amerikan tipi kültür koleksiyonu
BT474	: İnsan meme kanseri hücre hattı
BT549	: İnsan meme kanseri hücre hattı
CDK	: Siklin bağımlı kinazlar
CDK4	: Siklin bağımlı kinaz 4
CDK6	: Siklin bağımlı kinaz 6
C_f	: Kuvars kristalin duyarlılık faktörü
DMEM	: Sentetik hücre kültürü ortamı
EDGMA	: Etilen glikol dimetakrilat
EGFR	: İnsan epidermal büyüme faktörü
ELISA	: Enzim bağımlı immunosorbent
eq	: Denge
ER	: Östrojen reseptör
ex	: Deneysel
FBS	: Fetal sığır serumu
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
g	: Bağlı merkezkaç kuvveti
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
H_2SO_4	: Sülfirik asit

HER1	: İnsan epidermal büyüme faktörü 1
HER2/neu	: İnsan epidermal büyüme faktörü 2
HER3	: İnsan epidermal büyüme faktörü 3
HER4	: İnsan epidermal büyüme faktörü 4
Hs578T	: İnsan meme kanseri hücre hattı
IHC	: İmmünohistokimyasal yöntem
k	: Seçicilik katsayısı
k'	: Göreceli seçicilik katsayısı
KA	: İleri denge sabiti
ka	: İleri kinetik hız sabiti
KD	: Geri denge sabiti
kd	: Geri kinetik hız sabiti
Ki67	: Nükleer protein
KPS	: Potasyum persülfat
LOD	: Saptama sınır denklemi (tespit limiti)
LOQ	: Tespit miktar sınırı
MAPK	: Mitojenle aktive edilen protein kinaz
McCoy's 5a	: Sentetik hücre kültürü ortamı
MCF7	: İnsan meme kanseri hücre hattı
MDA-MB 231	: İnsan meme kanseri hücre hattı
MDA-MB 453	: İnsan meme kanseri hücre hattı
MDA-MB 468	: İnsan meme kanseri hücre hattı
mS	: Siemens/cm
MUC1	: Müsin 1
NaCl	: Sodyum klorür
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
nm	: Nanometre
Notch	: Çentik reseptörü
Notch1	: Çentik reseptörü 1
Notch4	: Çentik reseptörü 4
PBS	: Fosfat tamponu
Pdl	: Poundal

PHEMA	: Hidroksietil metakrilat
PI3K-AKT	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PR	: Progesteron Reseptör
PVA	: Poli vinil alkol
QCM	: Kuvars kristal mikroterazi sensör
R²	: Regresyon katsayısı
RPM	: 1 dakika içerisinde gerçekleştirilen dönüş/devir sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SEM	: Taramalı elektron mikroskopisi
Siklin D1	: Siklin protein
Siklin E	: Siklin protein
SKBR3	: İnsan meme kanseri hücre hattı
SUM1315	: İnsan meme kanseri hücre hattı
SUM185	: İnsan meme kanseri hücre hattı
SUM190	: İnsan meme kanseri hücre hattı
T47D	: İnsan meme kanseri hücre hattı
TfR1	: Transferrin reseptörü
TK	: Tirozin kinaz
UV	: Ultraviyole
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü
w	: Bant genişliği
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
ZR-75	: İnsan meme kanseri hücre hattı

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. WHO' e göre cinsiyet ve yaşa göre 185 ülkede 36 kanser türünün görülme sıklığı, mortalite ve prevalansına dair mevcut ulusal tahmini vaka sayıları.	3
2.2. Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması.	12
2.3. İşaretili ve işaret gerektirmeyen analiz şeması.	14
2.4. QCM çip yüzeyinin şematik görüntüsü.	15
2.5. QCM çip yüzeyinin antikorla modifikasyonu ve sinyal alımı sırasında frekans değişimi.	16
3.1. Temas açısı ölçüm presibi.	21
3.2. L929 fibroblast hücreleri.	23
3.3. SKBR3 hücreleri.	23
3.4. MDA-MB 231 hücreleri.	23
3.5. <i>MAXTEK RQCM INFICON</i> cihazının ölçümler sırasındaki görüntüsü.	25
4.1. PHEMA partiküllerinin zeta boyut analizi (hacim ve standart sapma değerleri).	27
4.2. PHEMA partiküllerinin zeta boyut analizi (yoğunluk ve standart sapma değerleri).	27
4.3. PHEMA nanopartiküllerinin FTIR analiz spektrumu.	28
4.4. PHEMA yapısı ve yapıda bulunan bağların gösterimi.	28
4.4. PHEMA yapısı ve yapıda bulunan bağların gösterimi.	30
4.6. Boş QCM yüzeyine damlatılan suyun temas açısı ölçümü.	30
4.7. Nanopartikülle kaplanmış QCM çip yüzeyinin 3D görüntüsü.	31
4.8. Nanopartikül çözeltisi ile işlevselleştirilmiş QCM yüzeyine damlatılan suyun temas açısı ölçümü.	31
4.9. SEM analizinde PHEMA nanopartiküllerinin QCM çip yüzeyinde 1µm alandaki genel görünümü.	32
4.10. 5µm boyutta çekilmiş boş QCM çip yüzeyinin 3D AFM görüntüsü.	33
4.11. 5µm boyutta çekilmiş PHEMA kaplı QCM çip yüzeyinin 3B AFM görüntüsü.	33
4.12. 500nm boyutta PHEMA kaplı QCM çip yüzeyinde nanopartiküllerin görünümü.	34
4.13. 5µm boyutta çekilmiş PHEMA ve HER2 antikorlu kaplı QCM çip yüzeyinin 3B AFM görüntüsü.	34
4.14. 500nm boyutta PHEMA kaplı QCM çip yüzeyinde nanopartiküller ve HER2 antikor molekülleri.	35

4.15.	Boş QCM çip yüzeyinin FTIR analizi.	36
4.16.	PHEMA kaplı QCM çip yüzeyinin FTIR analizi.	36
4.17.	Boş QCM çip yüzeyi (mavi), PHEMA nanopartikülleri (kırmızı) ve PHEMA kaplı QCM çip yüzeyinin (sarı) FTIR analizlerinin karşılaştırılmış görüntüsü.	37
4.18.	PHEMA nanopartiküllerinin ve HER2 bağlı PHEMA partiküllerinin Δm değerleri (1: SKBR3, 2: MDA-MB 231, 3: Fibroblast hücreleri).	48
4.19.	PHEMA nanopartiküllerinin ve HER2, Notch4 ve transferrin bağlı PHEMA partiküllerinin Δm değerleri (1: SKBR3, 2: MDA-MB 231, 3: Fibroblast hücreleri).	49
4.20.	HER2 bağlı QCM çip için tekrar kullanılabilirlik değerleri için yapılan rejenerasyon döngüleri.	50



TABLULAR

Tablo	Sayfa
2.1. Meme kanseri moleküler alt tipleri.	6
4.1. Elipsometre ve temas açısı ölçüm sonuçları.	32
4.2. HER2 bağlı QCM çip için izoterm değerleri.	46
4.3. HER2, Notch4 ve transferin bağlı QCM çip için izoterm değerleri.	46
4.4. HER2 bağlı ve bağlı olmayan QCM çip için Δm , k ve k' değerleri.	48
4.5. HER2, Notch4 ve transferrin bağlı ve bağlı olmayan QCM çip için Δm , k ve k' değerleri.	49
5.1. Meme kanseri hücrelerini tanıtmaya yönelik yapılmış yöntemler ve LOD değerleri.	57

GRAFİKLER

Grafik	Sayfa
4.1. HER2 bağı QCM sensör yüzeyindeki (hücre/cm ²) birim alanda meydana gelen SKBR3 hücrelerinin bağlanmasıyla meydana gelen kütle artışı.	38
4.2. HER2 bağı QCM sensör yüzeyindeki (hücre/cm ²) birim alanda meydana gelen SKBR3 hücrelerinin bağlanmasıyla meydana gelen frekans değişimi.	39
4.3. HER2, Notch4 ve transferrin bağı QCM sensör yüzeyindeki (hücre/cm ²) birim alanda meydana gelen SKBR3 hücrelerinin bağlanmasıyla meydana gelen kütle artışı.	39
4.4. HER2, Notch4 ve transferrin bağı QCM sensör yüzeyindeki (hücre/cm ²) birim alanda meydana gelen SKBR3 hücrelerinin bağlanmasıyla meydana gelen frekans değişimi.	40
4.5. HER2 bağı QCM çip yüzeyindeki SKBR3 bağlanmasına karşı meydana gelen kütle artışının hücre sayısına karşı Scathard grafiği.	41
4.6. HER2 bağı QCM çipte bağlanma için Langmuir denge izoterm modeli eğrisi.	42
4.7. HER2 bağı QCM çipte bağlanma için Freundlich denge izoterm modeli eğrisi.	42
4.8. HER2 bağı QCM çipte bağlanma için Langmuir-Freundlich denge izoterm modeli eğrisi.	43
4.9. HER2,Notch4 ve transferrin bağı QCM çip yüzeyindeki SKBR3 bağlanmasına karşı meydana gelen kütle artışının hücre sayısına karşı Scathard grafiği.	44
4.10. HER2, Notch4 ve transferrin bağı QCM çipte bağlanma için Langmuir denge izoterm modeli eğrisi.	44
4.11. HER2, Notch4 ve transferrin bağı QCM çipte bağlanma için Freundlich denge izoterm modeli eğrisi.	45
4.12. HER2 bağı QCM çipte bağlanma için Langmuir-Freundlich denge izoterm modeli eğrisi.	45

1. GİRİŞ

1.1. Kuramsal Yaklaşımlar ve Kapsam

Kanser epigenetik ve genetik kusurların birikmesi sonucunda zaman içinde normal homeostatik kontrol ve dengelerin bozularak hücrelerin anormal ve kontrolsüz büyümesine eşlik eden süreç olarak tanımlanmaktadır. Kanser, sahip olduğu epigenomik ve genomik karakteriyle oldukça heterojen yapıya sahip bir hastalık olup dünya genelindeki ölümlerin önemli bir yüzdesini oluşturmaktadır. Kanser diğer hastalıklardan farklı olarak hastalık sürecinde yüksek heterojenite ile metastatik özellikleri, kanser hücrelerinin apoptoz ya da vücuttaki diğer savunma mekanizmalarına karşı direnç kazanmasına neden olmakta ve kanserin tedavi edilebilirliğini sınırlandırmaktadır. Etkili tedavilerin geliştirilebilmesi için özellikle kanserin erken evre sürecindeki moleküler değişimlerin tanımlanması ve bu değişimlere özgü hedefli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gereklidir.

Meme kanseri günümüzde hastalık yönetimi açısından zorlu, maliyetli ve kadınlarda ölüm oranının en yüksek olduğu ikinci kanser türüdür. Meme kanseri de dâhil olmak üzere birçok kanser türünün tedavi açısından en önemli mevcut sorunu erken neoplastik değişikliklerin tespit edilememesidir. Bu nedenle bu moleküler değişimleri kolayca saptayabilmek ve hastalığın gelişimini izlemek için kullanılacak invaziv olmayan, hassas ve spesifik biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Son yıllarda meme kanserinin moleküler düzeydeki gelişimini anlamak için birçok çalışma yapılmış ve kanserin tanısında hem hücre içi hem de membran proteinleri olmak üzere çok çeşitli biyobelirteçler kullanılmaya başlanmıştır. Tanıda kullanılan biyobelirteçlerden Transferrin, Notch4 ve HER2 (HER2/neu) reseptörlerinin meme kanseri hücrelerinin metastatik potansiyeline paralel olarak ekspresyonlarının arttığı bilinmektedir. Özellikle meme kanseri için zayıf prognozun göstergesi olan HER2 klinik tanıda sıklıkla kullanılmaktadır.

Biyosensörler, belirli bir molekülü hassas, hızlı ve özgül olarak saptayarak çeşitli sinyallere dönüştüren cihazlardır. Biyosensör tarafından saptanan bu moleküller çeşitli protein (antijen, antikor ve enzim), nükleik asit veya diğer biyolojik ya da metabolit yapılar (glukoz gibi) olabilmektedir. Tipik bir biyosensör üç bileşenden oluşmaktadır; hedef analiti bulunan ortamdan sinyal olarak tespitini

sağlayan bir tanıma elemanı, analit tespiti ile alınan biyolojik sinyali elektriksel sinyale çeviren bir sinyal dönüştürücüsü ve sonuçların iletilmesi ve görüntülenmesini sağlayan bir sinyal işlemcisi. Biyosensörler, dönüştürücülerin analiz çeşitlerine göre dört kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar; elektrokimyasal sensörler (amperometrik ve potansiyometrik), optik sensörler (kolorimetrik, floresan, lüminesans ve inferometrik), kütle temelli sensörler (piezoelektrik ve akustik dalga) ve kalorimetrik sensörlerdir (sıcaklık değişimi). Kuvarz kristal mikroterazi (QCM) kütledeki değişimleri, yani bağlanmayı elektriksel bir sinyale çevirerek analit saptayan piezoelektrik bir cihazdır. Birçok alanlarda farklı amaçlar için sensörlerin karakterizasyonu ve geliştirilmesi gereklidir. Nanomalzemeler sahip oldukları yüksek yüzey/hacim oranları, sınırlı elektron sayıları ve makro boyuttaki malzemelere kıyasla gelişmiş biyoyumluluğa sahip olmalarıyla tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Nanopartiküller sahip oldukları bu özgün fiziksel ve kimyasal yapılarıyla şimdiye kadar biyosensörlerin yüzeylerinin modifikasyonunda kullanılmışlardır.

1.2. Amaç ve Varsayım

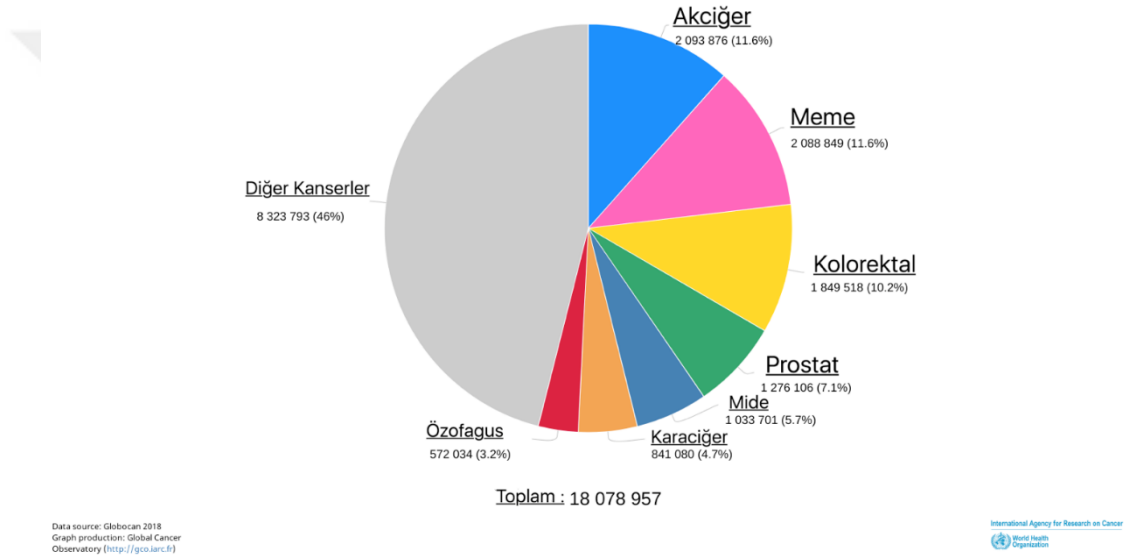
Bu tez çalışmasında, HER2 ekspresyonu artmış meme kanseri hücrelerinin erken tespit edilebilmesine imkân tanıyabilecek kullanımı kolay, güvenilir, etkili, hızlı, duyarlı, özgül ve doğrudan gerçek zamanlı izlemeye olanak sağlayan antijen-antikor temeline dayalı QCM sensör sistemi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser günümüz toplumunda tedavi gereksinimleri ve süresi ile büyük bir sosyal yük olup sanayileşmiş ülkelerde önde gelen ölüm nedenlerinden biridir [1]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' nun 2018'deki raporuna göre yaklaşık 2.1 milyon akciğer ve meme kanseri tanısı konulmuş olup bu tanı toplam kanser insidansının % 11.6' sını oluşturmaktadır [1, 2].

2018 yılında dünyadaki tüm kanserlerde, her iki cinsiyette, her yaşta tahmin edilen yeni vaka sayıları



Şekil 2.1. WHO' e göre cinsiyet ve yaşa göre 185 ülkede 36 kanser türünün görülme sıklığı, mortalite ve prevalansına dair mevcut ulusal tahmini vaka sayıları.

Kanser diğer hastalıklardan farklı olarak histolojik ve moleküler açıdan yüksek derecede heterojenite göstermesi ile kanser hücrelerinin farklı düzeyde metastatik özelliklere sahip olması gibi nedenler hastalığın tedavi edilebilirliğini sınırlandırmaktadır [3]. Dolayısıyla, kanserin morbidite ve mortalitesi önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Metastaz, kanser hücrelerinin buldukları primer tümör dokusundan çevre dokulara ve uzak organlara yayılma sürecini tanımlamaktadır. Bir kanser hücrelerinin metastatik süreci, kanser hücrelerinin primer tümörden ayrılması, dolaşım ve lenfatik sistemlere intravazasyonu, bağışıklık sistemi elemanlarından kaçması, uzak kapiller dokulara ekstravazasyonu gibi karmaşık

olayları içerir [4]. Metastaz, hücrel ve biyokimyasal anlamda karmaşık bir olaydır ve metastazın meydana gelmesinde rol alan, malign transformasyona yol açan moleküler değişimler arasında bazı membran reseptörlerinin ekspresyonlarının artması da yer alır [5]. Dünya genelinde kanser nedeni ile gerçekleşen ölümlerde akciğer kanseri ilk sırada yer alırken meme kanseri en sık gözlenen ikinci kanser türü olup kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir [6]. Bu durum meme kanserinin moleküler olarak tanımlanmış alt gruplarının yanı sıra meme kanseri tiplerinin klasik histolojik ve immünohistokimyasal tanımlarını içeren çeşitli alt tiplere sınıflandırılmasını gerektirmiştir.

2.1.2. Kanser Tanısının Önemi

Meme kanserindeki mortalitenin en önemli nedenlerinden biri tanıdaki gecikmedir. Erken evre kanser tespiti, kanser hücrelerinin metastaz aşamasından önce tespitini içerir ve tedaviye başlanmasıyla uzun vadede meme kanseri ölüm oranlarını önemli ölçüde azaltabilir [7]. Bu nedenle iyi bir prognoz için en önemli konu, erken evrede kanser hücrelerinin tanımlanmasıdır [8]. Günümüzde meme kanserinin tespitine yönelik olarak, mamografi, manyetik rezonans görüntülemesi, ultrason, bilgisayarlı tomografi, pozitron emisyon tomografisi ve biyopsi gibi bir çok tanı yaklaşımı uygulanmaktadır [9]. Ancak bu tanı yöntemleri pahalı, zaman alıcı, invaziv, kimi zaman yanlış pozitif sonuçlar vermekte ve yeterince hassas olamaya bilmektedir [10]. Bu nedenle hassas, özgül, seçici ve hızlı tanı yöntemlerine duyulan gereksinim gün geçtikçe artmaktadır. Dolayısıyla, son yıllarda araştırmacılar kansere özgü yeni biyobelirteçler tanımlamak ve bu biyobelirteçleri invaziv olmayan ucuz teknolojik yöntemlerle birleştirerek meme kanserini saptamaya yönelik yöntem geliştirme çabasındadırlar [11].

Radyoimmünoassay, immünohistokimya, enzim bağlı immünosorbent (ELISA) ve floroimmünoassay gibi biyobelirteç temelli yöntemler bulunmakta olup bunlar meme kanseri için tanıda önemli gelişmeler sağlamışlardır [11]. Ancak biyobelirteç temelli teknikler hassas ve seçici olsa da pahalı, zaman alıcı, eğitimli personele gereksinim duyulan ve karmaşık bir dizi işaretleme süreci gibi bazı sınırlamalara sahiptir [12]. Bu nedenle, tüm bu sınırlamaları aşabilmek için, meme

kanserini erken evrede hızlı teşhis etmeye olanak sağlayan, yüksek hassasiyet ve işaretleme gerektirmeyen bir yöntem acil bir gereksinim vardır [13, 14].

2.2. Kanser Biyobelirteçleri

Kanser biyobelirteçleri, kanserin erken tanısı, doğru evreleme, kanserin kemoterapiye verdiği yanıtı belirleme ve hastalığın ilerlemesini izlemeye imkan veren en önemli araçlardan biridir [15-18]. Kanser biyobelirteç analizi yalnızca klinik bulgular hakkında ek bilgi vermekle kalmaz, aynı zamanda da hastaların tedavilerden yararlanmasını da sağlar [19]. Meme kanserinin yönetimindeki zorluklar arasında erken neoplastik değişiklikleri saptamak yer almaktadır. Bu değişikliklerin erken tespit edilmesi özellikle invaziv meme kanseri olan hastaların tedavi ve sağ kalımı için oldukça önem arz etmektedir. Dolayısıyla hastalığın erken tanısında kullanılacak hassas ve spesifik biyobelirteçler önemli bir rol oynamaktadır [20]. Belirteçler çeşitlilikleri ve kan, serum, idrar veya beyin omurilik sıvılarında tespit edilebilirlikleri açısından değerlendirilmektedir. Genellikle kanser hücrelerinin gelişmesinin bir sonucu olarak aşırı eksprese edilen proteinler kanser teşhisinde biyobelirteçler olarak kullanılmıştır. Kanser hücresinde bulunan belirteçler hücre içinde olduklarında, analizden önce biyobelirteçlerin hücre içi kısımdan alınması için hücrelerin parçalanması, toplanması ve gerekirse derişimlerinin arttırılması gerekmektedir [21].

Meme kanseri meme epitel hücrelerinde anormal veya düzensiz reseptör ifadesi gibi bazı moleküler değişimlerin sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle bu tür özgül moleküller aracılığıyla meme kanseri hücreleri bu molekülleri hedefleyen özgül antikorlar kullanılarak hızlı ve etkili şekilde saptanabilir [22]. Meme kanserinin tanısında kullanılan biyobelirteçler genellikle kanserli hücreler tarafından üretilen veya kanserin gelişmesiyle cevap olarak üretilen molekülleri içermektedir [23, 24]. Bu belirteçler DNA, protein, protein-metabolit konjugatları, küçük moleküllü metabolitler, nükleotitler veya lipitler olabilmektedir. [13, 25]. Amerikan Kanser Birliği' ne göre [26], meme kanserinde hedefe yönelik tedaviyi kolaylaştırmak için spesifik biyobelirteçlerin ekspresyonlarının varlığı ya da yokluğu fark etmeksizin standart histokimyasal belirteçler kullanılarak prognostik farklılıkları olan üç ana moleküler alt tipe ayrılmaktadır: östrojen reseptörleri (ER), progesteron

reseptörleri (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2). Özellikle metastatik tipteki meme kanseri için belirlenen biyobelirteçlerle uygun tedavi seçeneklerinin belirlenmesi hastanın hayatta kalımı için oldukça önemlidir [27]. Moleküler alt tiplerin özeti **Tablo 2.1**'de gösterilmiştir [28, 29].

Tablo 2.1. Meme kanseri moleküler alt tipleri.

Yapısal alt grup	IHC durumu	Derecesi	Diyanoz	Özellikleri	Hücre tipi
Luminal A	(ER+/PR+) HER2-	1/2	iyi	Endokrin yanıt, sıklıkla kemoterapi yanıtı	MCF7,T47D,SUM185
Luminal B	(ER+/PR+) HER2- (ER+/PR+) HER2+	2/3	orta	Genellikle endokrin yanıt, kemoterapiye değişken yanıt, HER2+ trastusumab duyarlı	BT474, ZR-75
HER2 (artmış ekspresyonu)	(ER-/PR-) HER2+	2/3	zayıf	EGFR+ ve/veya sitokeratin+, endokrin yanıt yok, sıklıkla kemoterapi yanıtı	MDA-MB 468, SUM190
Bazal	(ER-/PR-) HER2-	3	zayıf	E-kaderin düşük, orta düzeyde kemoterapi yanıtı	BT549,MDA-MB 231 Hs578T, SUM1315
Normal tip	(ER+/PR+) HER2-	1/2/3	orta	Trastusumab yanıtı, kemoterapi yanıtı	SKBR3, MDA-MB 453

2.2.1. Kanser Tanısında Sıklıkla Kullanılan Biyobelirteçler

2.2.2. Östrojen Reseptörü (ER) ve Progesteron Reseptörü (PR)

Östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) meme kanserinin tanısında oldukça önemli iki belirleyici immünohistokimyasal belirteçtir [30]. Bu iki reseptörden birine veya ikisine sahip meme kanseri hücrelerinin gelişimi östrojen veya progesterona bağlıdır ve hormon reseptör durumuna göre 4 ayrı alt gruba sahiptir: ER+/PR+, ER+/PR-, ER-/PR+, ER-/PR-. Bu alt grupların sahip oldukları reseptör durumlarına göre biyobelirteç olarak kullanılma ile hedeflenme durumları ve her alt grubun sahip olduğu risk faktörleri değişiklik gösterir [31, 32]. ER reseptör ekspresyonuna sahip kanser hücreleri hormon tedavisine yanıt verdikleri için ER ekspresyonu olumlu bir prognostik faktör olarak bilinmektedir. PR' nin gen ekspresyonu östrojene bağlıdır ve sonuç olarak PR ekspresyonunun güçlü bir ER yanıtını gösterdiği düşünülmektedir [32]. ER' nin tanı ve tedaviye karar verilmesindeki rolü temel olmakla beraber PR' nin rolü ER' ye göre daha az tanımlanmış durumdadır.

2.2.3. HER2/neu Reseptörü

Hormon reseptörlerinin yanı sıra HER2 (HER2/neu) meme kanserinde en önemli prognostik ve prediktif belirteç konumundadır. HER2 tüm meme hücrelerinde çeşitli seviyelerde bulunan bir proteindir. HER2 reseptörü insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ailesinin bir üyesidir ve meme kanseri de dâhil olmak üzere birçok kanserde sıklıkla ekspresyonu artarak poliferasyon ve metastaza neden olan HER1(veya EGFR), HER3 ve HER4 ile birlikte rol alır [33]. Normal fizyolojik koşullarda HER2 epitel hücrelerinin yüzeyinde düşük miktarlarda eksprese edilir ve meme, yumurtalık, akciğer, karaciğer, böbrek ve merkezi sinir sistemi dâhil olmak üzere birçok dokunun normal gelişimi için gerekli hücre sel sinyali düzenlemektedirler. Bunun aksine immünohistokimyasal analizlerin sonucunda meme kanseri hücrelerinde HER2 miktarının hücre başına iki milyon reseptöre ulaşabilen son derece yüksek miktarlarda olduğunu saptanmıştır [34]. Bu durum kanser hücrelerinin anormal poliferasyonu için gereken çoklu sinyal akış yollarını tetiklediği için oldukça önemlidir (Browne et al., 2009). HER2 onkogeni hücre içi tirozin kinaz [17] aktivitesine sahip transmembran glikoprotein reseptörünü kodlamaktadır. HER reseptörünün sahip olduğu bu alt tipler farklı hücre dışı ligand bağlama alanlarına ve dolayısıyla farklı sinyal oluşumuna neden olurlar. Ancak tirozin kinaz [17] bölgeleri benzerdir ve eldeki bilgilere göre tüm meme kanserlerinin yaklaşık %20-30' u HER2 pozitifdir [35]. EGFR ile ilişkili moleküller HER2 reseptörüne bağlandıklarında hücre bölünmesinden ölüme, hareket yeteneğinden adezyona kadar değişen ve kanseri ileri evrelere taşıyan yanıtlarla sonuçlanan karmaşık bir sinyal ağını tetiklemektedir. HER2 ekspresyonu aynı zamanda tümör derecesi, pozitif lenf nodu metastazı ve mitotik sayıyla da ilişkilendirilmiştir [36]. HER2' den spesifik olarak etkilenen sinyal yolları arasında fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)–AKT ve mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolları bulunmaktadır. MAPK kaskadı bilindiği üzere hücre büyümesinin gerekli bileşenleri olan MAP kinaz kinaz ve MAPK olmak üzere iki ana faktör tarafından düzenlenmektedir [37]. Ayrıca, HER2' nin tümör hücrelerinde aşırı ekspresyonu aynı zamanda tümörün sağ kalımı ve metastazı için de gerekli olan anjiyogenez ile ilişkilidir [35]. HER2 aşırı ekspresyonu sonucunda meme tümör hücrelerinde ve karsinomlarda Ras/MAPK sinyal yolunun aktivasyonuna neden

olmaktadır. Bu biyolojik mekanizmaların değişimine dayanarak HER2 pozitif tümörlerin daha az farklılaştığı, çoğalma oranının arttığı ve sık metastaz yaparak geniş bir yayılım ağına sahip oldukları söylenebilir [38]. Sonuç olarak, HER2' i aşırı ekspresyonu, yüksek mortalite, prevelans sıklığı ve metastaz oranının yüksekliği ile zayıf prognoz karakterine sahip meme kanseri alt tipidir [39]. Bununla birlikte meme kanserine ilişkin günümüz başarılarına ve etkili tedavi yöntemlerine rağmen, meme kanserinin teşhisi ilk aşamada belirgin semptomlar olmadığı için zordur. Hastaların çoğu kanserin geç evresinde teşhis edilir ve bunun temel nedeni etkili erken evre teşhis sistemlerinin eksikliğidir. Amerikan Klinik Patoloji Derneği (ASCP) HER2 teşhisi için immünohistokimyasal yöntem (IHC) ve floresan in situ hibridizasyon [8] yöntemlerini önermiştir. Ancak bu testler oldukça zaman alıcıdır ve nitelikli personele gereksinim duyulmaktadır. Bunların dışında bu testlerin yanlış pozitif riski %20-%50 arasında değişkenlik göstermektedir [40]. Biyosensör teknolojisinin kullanım gerekliliği hem bu zorlukların aşılması için hem de HER2 pozitif meme kanserinin sahip olduğu agresif ilerleme süreci nedeni ile gereklilik arz etmektedir.

HER2 pozitif meme kanseri hücrelerinin gelişimi her ne kadar agresif olsa da erken evrede tespit edildiklerinde monoklonal antikolarla (*Trastuzumab*, *Herceptin* vb) tedavileri mümkün olabilmektedir. Örneğin *Trastuzumab*, HER2 reseptörünü hedef almak için geliştirilmiş monoklonal antikor yapıda bir ilaçtır ve HER2 reseptörünün hücre dışı alanına yüksek afinite ile bağlanarak kanser hücrelerinin hücre sel sinyal ağını bozar. Böylelikle HER2 aşırı eksprese eden tümör hücrelerinin çoğalmasını engeller [41, 42]. *Trastuzumab* ve HER2 yanıtı ile ilişkili yapılan bir çalışmada HER2 hücre içi sinyalizasyon yolağı ile *Trastuzumab*'a karşı biyolojik yanıt arasında Pearson korelasyon testi ile anlamlı yanıt alınmıştır [37]. Bu nedenle HER2 pozitif hücrelerin erken evrede invaziv olmayan yollarla hızlı ve hassas tespiti ile birleştirilecek olan antikor tedavisi hastaların sağ kalımını arttırma olasılığı taşımaktadır.

2.3. Tanı ve Tedavide Hedeflenebilecek Diğer Bazı Meme Kanseri Biyobelirteçleri

2.3.1. Notch

Notch sinyal reseptör ailesinin sahip olduğu dört membran proteininin yer aldığı sinyal yolu evrimsel olarak korunmuş, hücre tipi farklılaşması, organ gelişimi ve vasküler gelişim ile fizyolojide oldukça önemli rollere sahip hücrelerarası bir sinyalleşme yoludur [43]. Diğer çalışmalardan elde edilen kanıtlara göre Notch sinyalinin anjiogenez sırasındaki arteriyel ve venöz farklılaşmasındaki rolü ile vasküler morfogenez sağladığı ve bu nedenle damar olgunlaşmasında kritik roller üstlendiği gösterilmiştir [44-47]. Notch sinyali ile vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)'nin ortak rolü sonucunda gerçekleşen anjiogenez ve damar olgunlaşmasıyla tümör vaskülarizasyon mekanizması daha iyi anlaşılmıştır [48]. Notch sinyal yolunun bir üyesi olan Notch4, normal meme gelişimi, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz da dahil olmak üzere çeşitli gelişim yollarındaki rolünün yanı sıra meme kanserinin oluşması ve ilerlemesinde de oldukça önemli bir role sahiptir [43, 49]. Notch4'ün anormal veya mutant ekspresyonunun neden olduğu kanser ilişkili değişimler arasında özellikle meme kök hücrelerinin farklılaşması ve yenilenmesindeki engelleyici rolü yer almaktadır [50, 51]. Ayrıca yapılan çalışmalarda Notch sinyal yolağı meme kanseri hücrelerinin radyasyon direnciyle de ilişkilendirilmiştir [52]. Kanser gelişiminde dört Notch reseptörü de farklı roller üstlenmektedir ancak tümörögenezden sorumlu olan Notch ailesinin üyeleri Notch1 ve Notch4'dür [43] ve hücre yüzeylerinde ekspresyonlarının artması bu nedenle bir belirteç olarak kullanılabilir. Östradiol ve Notch sinyalinin çapraz etkileşimi de meme kanseri anjiyogenezinde oldukça önemli bir role sahiptir [53].

2.3.2. Ki67

Ki67, tüm poliferatif hücrelerde bulunan, G0 fazı hariç mitotik hücre döngüsünün tüm aktif fazlarında (S, G1, G2 ve M) görev yapan ve bu döngüler sırasında ekspresyonu artan, nükleer bir proteindir [54]. Hücre bölünmesindeki tam işlevi henüz anlaşılmasa da, Ki67 hücre döngüsünde aktif görev aldığı için çoğalma belirteci olarak görülmekte ve meme kanserindeki diğer belirteçlerle birlikte

kullanılarak prognostik ve prediktif değerler sağlamaktadır [22, 55-57]. Mitotik hücre döngüsünde aktif görev aldığı için yüksek Ki67 ekspresyonu, daha hızlı tümör gelişimi dolayısıyla tümör hücresi agresifliği ile ilişkilidir [58]. Aynı zamanda hücre döngüsüyle ilişkisinden dolayı kemoterapiye yanıtı tahmin etmek için kullanılan potansiyel bir belirteçtir [59] ve yapılan bir çok çalışmada Ki67 seviyeleri iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir [60-63].

2.3.3. Siklin D1

Siklin D1, hücre döngüsünün G1 evresinde aktif hale gelip siklin bağımlı kinazların (CDK' ler) aktivitesini düzenleyerek G1/S evre geçişini yöneten siklin protein ailesinin bir üyesi olup hücre döngüsünün ana düzenleyici moleküllerinden biridir [64, 65]. Siklin D1, hücre döngüsünde CDK' lere (CDK4 ve CDK6) bağlanarak hücre döngüsünün ilerlemesine yardımcı olan retinoblastoma (Rb) proteininin hiperfosforilasyonunu indükleyerek etkisiz hale getirir ve hücrel çoğalmayı artırır [66, 67]. Bu nedenle CDK4/6 siklin D1 kompleksinin düzensizliği büyüme faktörünün kaybına ve hücrelerin büyüme faktörüne karşı bağımlı yanıtını azaltarak meme kanseri oluşumuna katkı sağlamaktadır [68]. Oysaki, normal insan meme epitel hücreleri, siklin D1' in aşırı ekspresyonu durumunda büyüme inhibisyonuna, farklılaşmaya ve sonucunda apoptoza neden olarak hücrel düzenlemeleri etkinleştirmektedir [69]. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada siklin D1' in aşırı ekspresyonu kötü prognozla ilişkilendirilmiş olup ER pozitif meme kanserlerinde miktarının arttığı, tümör boyutu ve derecesiyle ilişkili olduğu, ayrıca meme kanseri ölüm riskinin artmasıyla korelasyon gösterdiği bulunmuştur [64].

2.3.4. Siklin E

Siklin E, siklin D1' e benzer şekilde hücre döngüsünde S fazına geçişte rol oynayan pozitif bir regülatördür. Siklin E, siklin bağımlı kinaz 2 (CDK2) ile kompleksler oluşturarak enzimatik etkinliğini göstermektedir [70]. Siklin E seviyeleri yalnızca G1' den S fazına geçiş sırasında kısa bir süreçte pik yapmakta ve geri kalan süreçte ise seviyeleri sabit kalmaktadır [71]. Bu durum siklin E' nin G1 ile S faz geçişini düzenlemede kritik bir role sahip olduğunu göstermektedir [71]. Siklin D1 gibi siklin E ekspresyonu da hücre poliferasyonunda kritik rol aldığı için

ekspresyonundaki normal olmayan bir değişiklik onkogenezele ilişkilendirilmektedir [70, 72]. Yapılan meta analiz çalışmalarında siklin E' nin prognostik değeri incelendiğinde, siklin E ekspresyonundaki artış kötü prognoz ve düşük sağ kalım değerleri ile ilişkilendirilmiştir [73, 74]. Ayrıca siklin E'nin hücre döngüsündeki rolü nedeniyle Siklin E seviyelerinde meydana gelen artışın kemoterapiye ve endokrin tedaviye yanıtı değiştirebileceğine ilişkin hipotezler öne sürülmüştür. Bu hipotezleri temel alan çalışmalarda, değişen ekspresyon seviyelerinde meme kanseri hücrelerinin sisplatin ve paklitaksel duyarlılığının arttığı gösterilmiştir [75].

2.3.5. Transferrin

Demir elementi tüm hücrelerin büyümesi, bölünmesi, enerji metabolizması, oksijen transportu, nörotransmitter yapımı ve salımı gibi sayısız önemli hücrenel yanıtlarda görev almaktadır [76-78]. Transferrin reseptörü (TfR1) hücrenin demir alımında, dolayısıyla demir ile ilişkili hücrenel yanıtların düzenlenmesinde rol oynayan hücre zarı ile ilişkili bir glikoproteindir [79].

Kanser hücreleri membranlarındaki transferrin reseptörünün miktarını arttırarak hücre bölünmesi için gerekli demirin hücre içine alımını sağlarlar [80]. TfR1'in kanser hücrelerinde artmış ekspresyonu sonucunda kanser hücrelerinin demir ile ilişkili yolakları olan poliferasyon, migrasyon, invazyon, apoptozis ve metastaz gibi özellikleri etkilenmektedir [81-83]. Dolayısıyla TfR1 ekspresyonunun tümör hücrelerinde normal hücrelere göre çok daha yüksek seviyelerde ekspresyonu tümör evresi veya kanser ilerlemesiyle ilişkilendirilmektedir [84]. TfR1 ekspresyonunun karaciğer, meme, akciğer ve kolon kanseri hücrelerinde arttığı bilinmektedir ve yapılan birçok çalışmalarda prognoz ile ilişkili olan artmış TfR ekspresyonları bulunmuştur [84-87]. TfR1' in hücredeki rolü ve kanser hücrelerinin demire duydukları ihtiyaç doğrultusunda TfR1 ile kanser arasındaki ilişkinin gösterilmesi için yapılan çalışmalar sonucunda TfR1' in ekspresyonundaki artışın kötü prognoz ile ilişkili olduğu, kanserin tanı ve tedavisinde kullanılabilir bir biyobelirteç olabileceği bulunmuştur [83, 88].

2.4. Biyosensörler

Biyosensörler biyolojik bir analiti (protein, DNA, RNA gibi) tespit edilebilecek bir elektrik sinyaline dönüştüren sistemler olup, kanserin saptanması ve izlenmesi için kullanılması potansiyeline sahiptir [21]. Biyosensör teknolojisi, hızlı ve doğru tespiti sağlarken aynı zamanda kanser hücrelerinin güvenilir görüntülenmesi, anjiyogenez ve kanser metastazının izlenmesi ile antikanser kemoterapi ajanlarının etkinliğini belirleme yeteneğine de sahiptir [89]. Bir biyosensör tipik olarak fizikokimyasal bir dönüştürücü ile ilişkili veya entegre bir moleküler tanıma elemanı ve sonuçları ileten aynı zamanda görüntüleyen bir sinyal işlemcisi içeren biyoanalitik cihazlardır [90]. Burada dönüştürücü alınan moleküler tanıma sinyalini elektriksel sinyale dönüştüren bir cihazdır. Dönüştürücü elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik veya impedimetrik), optik (flüoresans, lüminesans, kolorimetrik ve interferometre) veya kalorimetrik (termistör) olabileceği gibi kütle değişikliklerine (piezoelektrik/akustik dalgalar) dayalı da olabilmektedir [91].



Şekil 2.2. Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması.

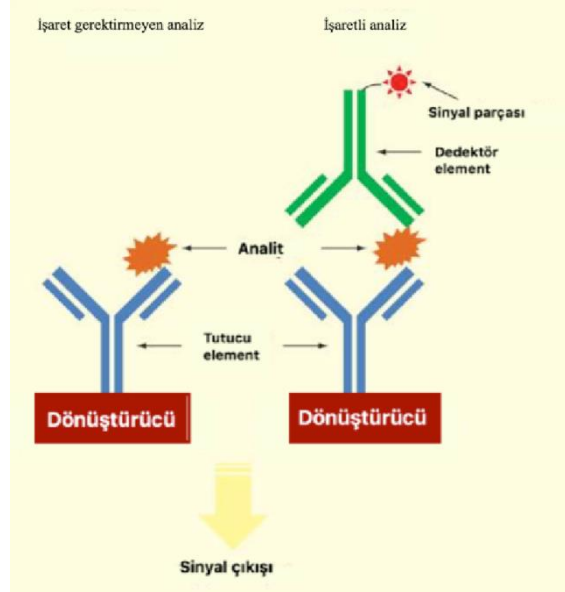
Elektrokimyasal dönüştürücüler bugüne kadar sensör teknolojisinde en yaygın kullanıma sahip iken son zamanlarda optik ve kuvars kristal mikroterazi sensörü (QCM) tipi sensörler daha popüler hale gelmiş olup, pratik uygulamalarda gittikçe kullanımını artmaktadır [92]. Bunun temel nedeni ise, çoğu elektrokimyasal sistemin test sonuçlarının izlenebilmesi için ek bir dizi enzim işaretleri kullanılmasını gerektirmesidir. Tam tersine optik sistemde sensör yüzeyinde kullanılan reseptör ile biyobelirteç arasındaki bağlanma olayı doğrudan tespit edilebilmektedir [93].

Piezoelektrik/ akustik bir sistemde ise biyobelirteç ve sensör üzerindeki reseptör arasındaki bağlanma nedeni ile kütle artışı meydana gelmekte ve hassas düzeyde değişim doğrudan izlenebilmektedir.

Biyosensörler kullanımı kolay, ucuz, hızlı ve sağlam olmanın dışında yüksek performans, yüksek gürültü sinyalleri sunmaları ve diğer yöntemlere nispeten düşük enstrümantasyon maliyetine sahip oldukları için tercih edilirler. Aynı zamanda biyosensörler, iyi çözünürlük ve tekrarlanabilir sonuçlar verdikleri için biyobelirteç analizi için gerekli sistemlerdir [94].

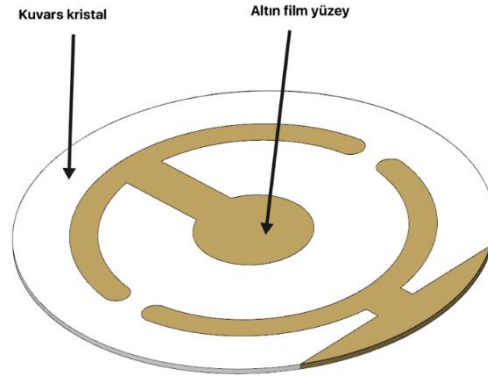
2.4.1. Kuvars Kristal Mikroterazi Sensörleri (QCM)

Kuvars kristal mikroterazi (QCM) sensörleri pizoelektrik sensörler sınıfında yer alır ve klasik bir QCM, iki elektrot atasına sıkıştırılmış AT kesimli kuvars kristalinin ince bir diliminden oluşmaktadır. Sisteme uygulanan salınımlı elektrik alan akustik dalgayı indüklemektedir [95]. Tespit stratejileri işaretli ve işaret gerektirmeyen analiz olarak ikiye ayrılmıştır. Sensör sistemlerinde işaret gerektirmeyen deneyler bir transdüser yüzeyindeki biyokimyasal reaksiyonlar yoluyla doğrudan analitin varlığını ölçerken işaretli analizler için analit, sinyal çıkışı için bir enzim, florofor, kuantum dot veya radyoizotop gibi detektör ajanda spesifik bir işaret ile yakalama aracılığıyla tespit sağlanmaktadır [96]. QCM' in kütle algılaması sinyal iletimi için herhangi bir işaret basamağı gerektirmediğinden işaret gerektirmeyen teknoloji olarak sınıflandırılırlar ve 0.1 ng' a kadar kütle değişikliklerini sinyale dönüştürebilirler [97]. Ek olarak QCM sisteminde sinyal iletim mekanizması kristal kuvarsın piezoelektrik etkisine dayandığı için kompleks ve optik olarak opak çözelti ortamlarında dahi ölçüm yapmak mümkündür. Bu gibi nedenler diğer işaret gereken sistemlere göre birçok avantaj sağlarlar [98].



Şekil 2.3. İşaretli ve işaret gerektirmeyen analiz şeması.

QCM, 1959'dan bu yana Sauerbrey' in rezonans frekansındaki değişiklik ile sensör yüzeyinde biriken kütle yoğunluğu arasındaki ilişkiyi kurduğu zamandan beri sensör uygulamaları için en çok kullanılan akustik cihaz haline gelmiştir. Bir QCM potansiyel enerji altında kuvars kristallerinin rezonans frekansındaki (μf) birim alan başına kalınlık veya kütle (Δm) eklenirken veya çıkarılırken oluşan değişimleri tespit edebilen nanograma duyarlı cihazlardır [99]. QCM yüzeyinde bir altın elektrot ile kaplanmış kuvars kristali içerir ve sensör yüzeyindeki kütle değişimlerine karşı oldukça hassastır [100]. Piezoelektrik immüno-sensörler oldukça spesifik antijen-antikor, reseptör-ligand etkileşimi ile kombinasyonuna dayandığı için kanser belirteçlerini tespit etmek adına tasarlanmış ve günümüzde kullanımları sağlamış oldukları duyarlı, spesifik, hızlı ve doğrudan analiz yeteneklerinden dolayı kullanımları artmıştır [89].



Şekil 2.4. QCM çip yüzeyinin şematik görüntüsü.

Sauerbrey'e göre QCM yüzeyinde bağlanan analitin yarattığı değişime yönelik teorik mutlak kütle hassasiyeti rezonans frekansının karesiyle orantılıdır yani frekans varyasyonu yaklaşık olarak ölçülebilir ve kütle değişimiyle ilişkilendirilebilir [101].

$$\Delta f = -C_f \cdot \Delta m \quad (2.1.)$$

Formül 2.1'de Δf , frekanstaki değişim (Hz) iken C_f , kullanılan kuvars kristalin duyarlılık faktörüdür ve Δm , birim alandaki değişen kütledir [102]. Duyarlılık faktörü ise Formül 2.2 kullanılarak hesaplanır:

$$C_f = \frac{2 \cdot n \cdot f_0^2}{(\mu_q \rho_q)^{1/2}} \quad (2.2.)$$

Formül 2.2'de μ_q , kuvars kayma modülü ($2.947 \times 10^{11} \text{ g/cm}^2$), ρ_q , kuvars yoğunluğu (2.648 g/cm^3), n , kristalin sürüldüğü harmonik sayı, f_0 ise kuvars kristalinin temel rezonans frekansıdır [103]. Dağılma faktörü rezonansın kalite faktörünün tersi olarak hesaplanabilir:

$$D = \frac{1}{Q} = \frac{w}{f_0} \quad (2.3.)$$

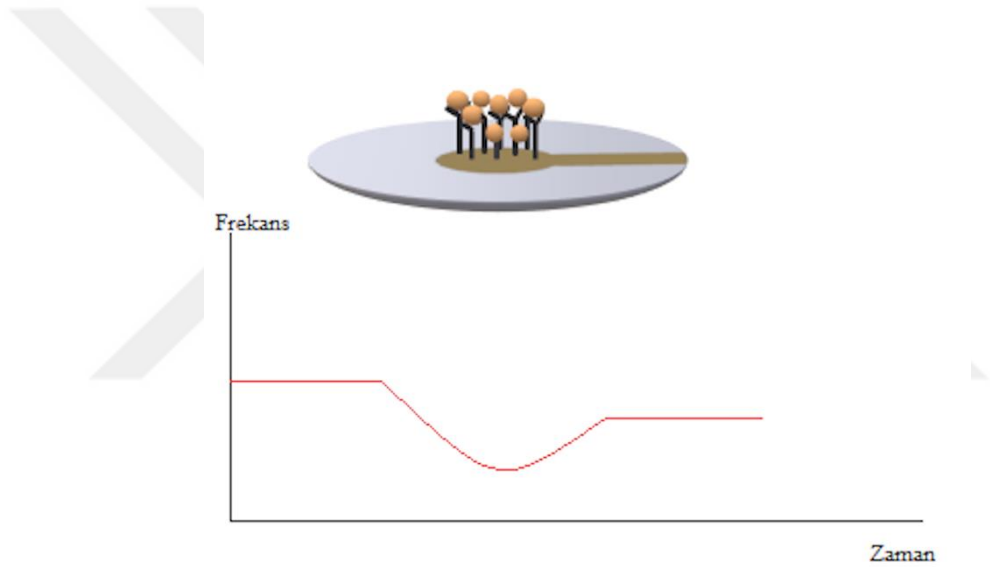
Formül 2.3' de w bant genişliğidir ve formül sistemdeki sönümü ölçmektedir. Ayrıca ek olarak Formül 2.4 ile de hesaplanabilmektedir:

$$D = \frac{1}{\pi \Delta f \tau} \quad (2.4.)$$

Formül 2.4' de Δf , frekanstaki değişim (Hz), τ , kuvars rezonatörünün bozulma sabitidir. Salınım başına kaybedilen enerji ile sistemde depolanan toplam

enerji başına bir sabit ürün arasındaki oran (harcanan enerji ve korunan enerji arasındaki oran) olarak görülebilir [103]. Buradan Sauerbrey denklemini takiben sistemdeki frekans düşüşü bağlanan kütle derişimi ile doğru orantılıdır denilebilir.

QCM sensörleri istenen amaca yönelik olarak bir çok türde olabilir: DNA sensörleri, enzim sensörleri, antikor ile işlevselleştirilmiş ve kaplanmış sensör yüzeyleri olan immünosensörler, hücre, doku veya mikroorganizma bazlı sensörler veya aptasensörler [104]. İmmünosensörler söz konusu olduğunda QCM çip yüzeyinin altın yüzeyinden kaynaklanan hidrofobisite ve bağlanmanın engelinin aşılması adına antikorlar çapraz bağlama bileşikleri kullanılarak veya polimerik karışımlarla çip yüzeyine tutturulabilir [105].



Şekil 2.5. QCM çip yüzeyinin antikorla modifikasyonu ve sinyal alımı sırasında frekans değişimi.

Kanserin erken tanısı, hastalığın tedavisi için oldukça önemli bir basamağı oluşturduğundan günümüzde erken tanıya yönelik yeni biyobelirteçlerin tanımlanması ve klinik tanıda kullanıma geçirilmesi önceliklidir [106]. Bunun için kanser biyobelirteçlerini tanımak ve bunları biyosensör tasarımında reseptör molekül olarak kullanılması önem taşımaktadır. Sensörün algılayıcı (reseptör) bölümünü oluşturan moleküllerin özgüllüğü biyosensörün tanı amaçlı kullanımında temel gereksinimdir [107]. Biyobelirteç tespiti için çeşitli moleküler tanıma elemanları kullanılmıştır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılan yüksek düzeyde hassasiyet ve

özgüllük sağlayan antikör molekülleridir [21]. Antikörün sisteme sağladığı kritik yarar ise antikör-antijen etkileşimlerinin yüksek afinite ve seçiciliğe sahip olması ve hedef molekülün önce saflaştırılmasının gerekmemesidir.

Kanserden kaynaklanan ölümlerin oranının günümüzde bu kadar yüksek olmasının nedeni birçok kanserin geç evrede tespit edilmesi ve beraberinde gelen metastaz ile ilerlemenin kontrol edilemeyecek düzeye ulaşmasıdır. Oysa kanser klinik olarak ne kadar erken tespit edilebilirse kanser bölgesine müdahale şansı ve dolayısıyla sağ kalım süreci o kadar artacaktır. Bu nedenle kullanımı kolay, güvenilir, etkili, hızlı, duyarlı, özgül ve doğrudan gerçek zamanlı izlemeye olanak sağlayan tanı yöntemleri geliştirilmesi gereklidir.

Bu tezde amaçlanan, literatürde yer alan daha önceki QCM-Notch ve QCM-transferrin sistemlerine [108, 109] ek olarak, tanıda rutin olarak kullanılan HER2 antikoru [110, 111] da sisteme eklenerek QCM sensör sisteminin geliştirilmesidir. QCM çip yüzeyinin hidrofobik yapıda olması nedeniyle direkt analiz için uygun değildir. Nanopartiküllerin kullanılmasıyla hidrofobik yüzey direncinin azaltıldığı ve böylelikle ligant-analit bağlanma kapasitesinin ve elektromekanik hassasiyetin arttığı bilinmektedir [112]. Bu nedenle QCM ile yapılan çeşitli çalışmalarda çip yüzeyi modifiye edilerek analize uygun hale getirilmiştir [109, 113, 114]. Bu çalışmada da altın yüzeyde antikör-ligant etkileşimi için yüzey alanını arttırmak ve antikörün çip yüzeyine bağlanmasını sağlamak için, hidrofilik özellikteki poli (HEMA) nanopartiküller hazırlanacak ve çip yüzeyine tutundurulacaktır. Çip yüzeyi HER2 antikoru ile işlevselleştirilerek meme kanseri hücrelerini tanıyan bir QCM temelli sensör oluşturulacaktır. Böylelikle, tez çalışmasının sonucunda kötü prognozla ilişkili ve meme kanserinin önemli bir paydasını oluşturan HER2 pozitif meme kanseri hücrelerini seçici, hassas ve hızlı tanımaya yönelik yeni bir sensör sistem geliştirilmesi sağlanacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

Nanopartikül yapımı için gerekli monomerler olan hidrosietil metakrilat (HEMA, %97) ve etilen glikol dimetakrilat (EDGMA, %98) ile farede üretilmiş monoklonal anti-ERBB2 (HER2/neu) antikoru, transferrin, sodyum dodesil sülfat (SDS, \geq %99), potasyum persülfat (KPS, \geq %98), sodyum bikarbonat (%99.5-100.5), poli vinil alkol (PVA, cold, hidrolize %99+) karbodiimit (%99) ve sodyum bikarbonat (NaHCO₃, %99) *Sigma chem. Co., St. Louis, USA* firmasından temin edilmiştir. Hücre kültüründe kullanılan DMEM (D6429/ 500ml), McCoy's 5a (M9309/500ml), penisilin-streptomisin (A5955/ 100ml), L-glutamin (G7513/ 100ml), fetal sığır serumu (FBS- F2442/ 100ml) *Sigma chem. Co., St. Louis, USA* firmasından temin edilmiştir. Tavşanda üretilmiş anti-NOTCH4 antikoru ise *Novus Biologicals CO, USA* firmasından temin edilmiştir. Altın yüzey QCM çipleri *Maxtek Inc. New York, USA* firmasından temin edilmiştir. Deneylede kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup yine tüm deneylede kullanılan su Barnstead (Dubuque, IA, USA) ROpure LP® ters ozmos ünitesi kullanılarak saflaştırılmıştır (R= 18.2 MΩ).

3.2. Method

3.2.1. Poli (HEMA) Nanopartiküllerin hazırlanması

Poli (HEMA) nanopartiküllerinin hazırlanması ve polimerizasyonu için 2 sıvı fazdan oluşan bir yöntem gerektirmektedir. Bunun için birinci sıvı fazda stabilizatör olarak 93.7 mg PVA (Mw: 100.000) sürekli faz oluşturmak üzere 50 ml deiyonize suda çözülmüştür. Daha sonra hazırlanan PVA çözeltisine 14.4 mg SDS ve 11.7 mg sodyum bikarbonat ilave edilmiştir. İkinci sıvı fazda ise 50 mg PVA 100 ml deiyonize suda çözüldükten sonra üzerine 50 mg SDS, 0.45 ml HEMA ve 1.05 ml EDGMA eklenmiştir. Daha sonra hazırlanan ikinci sıvı çözelti birinci sıvı fazın üzerine yavaşça eklenmiştir. Miniemülsiyon eldesi için hazırlanan sıvı çözelti 50.000 rpm'de 30 dk homojenize edilmiştir (*T10, Ika Labotechnick, Almanya*). Elde edilen karışıma polimerizasyon başlatıcı olarak 0.44 mg/ml potasyum persülfat (KPS)

eklenmiş ve çözünmüş oksijeni çözeltiden uzaklaştırmak amacıyla ortamdaki 2 dakika boyunca azot gazı geçirilmiştir. Karışım cam polimerizasyon reaktörüne (*Radleys Carousel 6, Essex, UK*) aktararak 40°C'de 600 rpm' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sentez sonrasında nanopartikül çözeltisi içerisinde polimerleşmemiş monomerler, başlatıcılar ve yüzey aktif bileşenlerin uzaklaştırılması için *Beckman Coulter Optima L-100K Ultrasantrifüj*'ün Type 40 rotoru kullanılarak 81.085 g (35.000 rpm)' de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından süpernetant kısmı atılarak pellet üzerine %70 etil alkol çözeltisi eklenerek (kullanılan santrifüj tüpünün özelliğine göre maksimum miktarda alkol eklemesi yapıldı) partiküllerin tekrar dağılması için su banyolu *ALEX Machine Ultrasonic Cleaner* cihazında 15 dk sonikasyona bırakıldı. Partiküller alkol içerisinde tamamen dağıldıktan sonra (tamamen dağılma sonrası çözelti opaklaşır) tekrar 81.085 g' de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernetantın alınarak kalan pelletin %70' lik alkolle yıkanması için sonikasyonla dağıtılma işlemi 4 kez tekrarlandı. 5. alkol yıkamasının ardından santrifüj sonrası oluşan alkol süpernetantı atılarak pellet üzerine distile su eklendi ve 15 dk sonikasyon yapılarak nanopartiküller bu sefer su içerisinde dağıtıldı. Alkolle yıkamada olduğu gibi aynı basamaklar distile su ile yıkamada da 5 kez tekrarlandı. Son elde edilen nanopartikül pelletleri yine distile su içerisinde (miktar gerektirmeksizin) çözülerek boyut ölçümlerinde ve daha sonra QCM çip işlevselleştirilmesinde kullanıldı.

Daha önceki çalışmalarda nanopartikül boyutunun küçülmesiyle QCM çip duyarlılığının arttığı belirtilmiştir [115]. Bu nedenle küçük boyutlu nanopartiküller elde edilene kadar sentez işlemi ve ölçümler tekrarlanmıştır.

3.2.2. Nanopartiküllerin karakterizasyonu

Nanopartiküllerin QCM yüzeyine tutturulmasından önce boyut analizi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen poli (HEMA) nanopartiküllerin boyut analizi (ortalama büyüklüğü, boyut dağılımı ve çoklu dağılımı) Nano Zetasizer (*NanoS, Malvern Instruments, Londra, UK*) ile belirlenmiştir. Bunun için 1ml nanopartikül çözeltisi nanoboyut analizörüne yerleştirilmiş ve 90°C' lik ışık saçılmasıyla oda sıcaklığında tayin edilmiştir. Ölçümler 3 kez tekrarlanmış ve sonuçlar zeta boyut analizörünün yazılımı ile incelenip standart sapma değerleri ile birlikte

kaydedilmiştir. Boyut analizinin ardından nanopartiküllerin moleküler boyutta analizi FTIR analizi ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Nanopartiküllerin ve antikorların QCM çip yüzeyine bağlanması

Nanopartiküllerin çip yüzeyine tutturulmasından önce altın yüzey sırasıyla etanol (%70), deiyonize su ve sülfirik asit (H_2SO_4) ile hidrojen peroksit (H_2O_2)' nin 3:1 (v/v) oranında karıştırılmasıyla elde edilmiş asidik pirana çözeltisiyle 10 dakika boyunca çipin yüzeyine damlatılarak çip yıkandı. Yıkamanın ardından çip yüzeyi vakumlu fırında kurutuldu ($37^\circ C$, 200 mmHg). Ardından hazırlanmış nanopartikül çözeltisinden 15 μl alınarak QCM çip yüzeyine damlatıldı. Çözelti çip yüzeyinde düzgün, ince bir yüzey oluşturmak amacıyla 10 saniyede *Spin coator* kullanılarak yüzeye yayıldı. İnce bir yüzey oluşturulduktan sonra nanopartiküllerin altın yüzeye fiksasyonu sağlamak için QCM çip $37^\circ C$ ' de UV ışık altında 30 dakika inkübe edildi.

3.3. Nanopartikül kaplı çip yüzeyinin karakterizasyonu

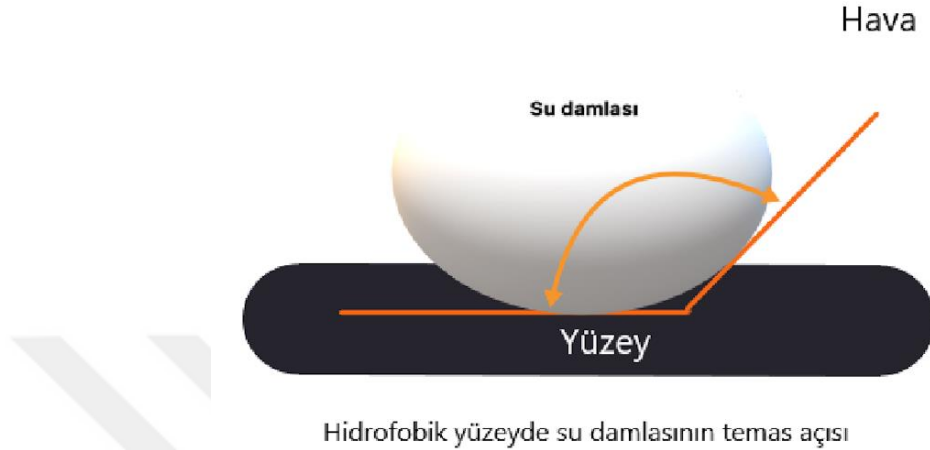
3.3.1. Elipsometre

Nanopartikül kaplı QCM çip yüzeyi elipsometri, temas açısı ölçümleri ve atomik kuvvet mikroskopisi ile analiz edildi. Hazırlanan sensörlerin yüzeyindeki kalınlık ölçümleri *Nanofilm EP3-Nulling* Elipsometre cihazı ile karakterize edilmiştir. Kalınlık ölçümleri 532 nm dalga boyunda 62° lik geliş açısında gerçekleştirilmiştir. Ölçümler önce yüzeyi kaplanmamış QCM için daha sonra polimerle kaplanan QCM yüzeyi için gerçekleştirilmiştir. Yüzey kalınlığı hesaplama programında polimer katmanının verileri kaydedilmiştir.

3.3.2. Yüzeyde hidrofobisite ölçümü

QCM çipin yüzey temas açısı *KRUSS DSA100 (Hamburg, Almanya)* cihazı kullanılarak tespit edildi. Nanopartikülle kaplanmamış QCM sensörlerin yüzeyine 1 damla su damlatılarak yapışık damla yöntemi ile temas açısı belirlenmiştir. Çip yüzeyinin farklı bölgelerine su damlatılarak 5 ayrı fotoğraf çekilmiş ve her biri için ayrı temas açısı belirlenmiştir. Damlacığın katı yüzey ile temas ettiği sağ ve sol temas noktalarının ortalaması alınarak ortalama temas açısı değerleri elde edilmiştir.

Daha sonra nanopartikül çözeltisi çip yüzeyine damlatılarak aynı işlemler tekrarlanmış ve ortalama temas açısı değerleri elde edilmiştir.



Şekil 3.1. Temas açısı ölçüm presibi.

Elipsometre ve temas açısı ölçümlerinden sonra nanopartiküllerin çip yüzeyindeki dağılımlarının incelenmesi için SEM analizi yapıldı.

3.3.3. FTIR ve AFM ölçümleri

Nanopartikül kaplı çip yüzeyinin yapısı FTIR ile incelenirken, yüzey morfolojisinin incelenmesi için ve AFM analizleri yapıldı. Her iki analiz yöntemi de *Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkezi Laboratuvar ARGE Eğitim ve Ölçme Merkezi*'nde yapıldı. FTIR analizi için *Bruker IFS 66/S, FRA 106/S, HYPERION 1000, RAMANSKOPE II* cihazı, AFM için ise *Veeco MultiMode V* cihazı kullanılmıştır.

3.4. Nanopartikül Kaplı Çip Yüzeyine Antikorların Bağlanması

3.4.1. Antikor ve Transferrin Çözeltilerinin Hazırlanması

Son konsantrasyon 0.01 µg olacak şekilde monoklonal anti-HER2 (HER2/neu) (0.1 mg) antikorunu ile tavşanda üretilmiş anti-Notch4 antikorunu (0.1 mg)

pH 7.4 1X PBS kullanılarak 10.000 kat seyreltilip -20°C' de saklandı. Yine son konsantrasyon 0.01 µg olacak şekilde transferrin (100 mg), pH 7.4 1X PBS kullanılarak önce 1000 daha sonra 10.000 kat seyreltildi ve çözelti -20°C' de saklandı.

Elde edilecek antikor bağlı QCM çipin seçiciliğinin belirlenmesi için yüzeye farklı kombinasyonlarda antikor çözeltileri eklenmiştir. İlk ölçümlerde yalnız HER2 bağlı QCM çip kullanılırken daha sonraki ölçümlerde transferrin, Notch-4 ve HER2'nun birlikte bağlandığı QCM çip kullanılmıştır. Bu amaçla inkübasyonun ardından antikorların uygun oryantasyonda bağlanmasını sağlamak için her bir yüzey hazırlanması sırasında karbodiimid ve antikor çözeltileri karıştırılarak nanopartikül kaplı çip yüzeyine damlatıldı. Bunun için 5 mg karbodiimid tartılarak üzerine 200 µl distile su eklendi. Karbodiimid tamamen çözüldükten sonra 150 µl karbodiimid üzerine PBS (1X) ile 10.000 kat seyreltilmiş stok antikor çözeltisinden veya çözeltilerinden 50 µl eklendi. Oluşan karışımdan 15 µl alınarak çip yüzeyine damlatıldı ve bağlanmanın tüm yüzeyde olmasını sağlamak için çip yüzeyindeki çözeltinin adhezyon kuvvetinden yararlanılarak çözelti çip yüzeyine yayıldı. Ardından +4°C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 0.1 M NaCl (desorpsiyon için) ve 1X pH 7.4 PBS (NaCl' nin uzaklaştırılması için) tamponuyla çip yüzeyi yıkandı.

3.5. Hücre Kültürü

İnsan meme kanseri hücre hatları olan MDA-MB 231 (ATCC-HTB-26) ve L929 fare fibroblast (ATCC-CLL-1) hücreleri, ATCC' nin uygun ortam koşulları gereğince %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM besi yerinde, %5 karbondioksit ve 37°C atmosferik koşullar altında kültüre alındı. SKBR3 (ATCC-HTB-30) hücreleri ise yine ATCC'nin uygun ortam koşulları gereğince %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren McCoy's 5a besi yerinde, %5 karbondioksit ve 37°C atmosferik koşullar altında çoğaltıldı Hücreler deneyde kullanılmadan önce kültürde buldukları kaplardan kaldırıldı. Bu aşamada tripsin aktivitesinin engellenmemesi için kültür ortamında kalan DMEM, pH 7.4 PBS ile 2 kez yıkama yapılarak uzaklaştırıldı. Ardından kültür kabına 1X tripsin eklenerek 2-5 dk 37°C' de inkübe

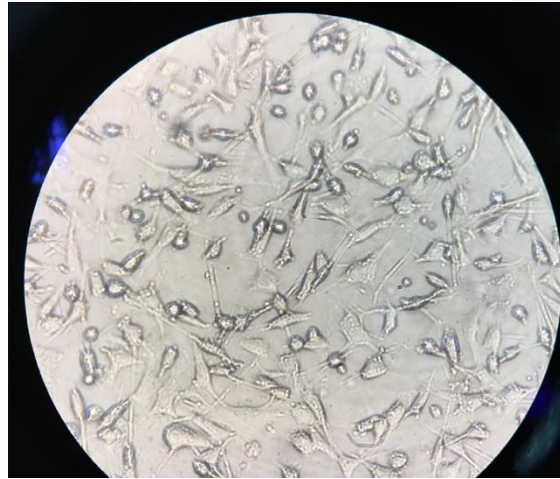
edilen hücreler yüzeyden kaldırıldı ve tripsini inaktive etmek için besi yeri ile hızlı sulandırıldı ve 1200 rpm (1300 g)' de 3 dakika santrifüj edildi (Nüve NF 800/800R, $r=16.2$). Hücre pelleti hücre miktarına uygun olarak pH 7.4 PBS (1X) ile sulandırıldıktan sonra tripan mavisi ile hemositometre kullanılarak sayıldı. Sayılan hücreler deneyde gerekli hücre sayılarına PBS (1X) kullanılarak seyreltildi.



Şekil 3.2. L929 fibroblast hücreleri.



Şekil 3.3. SKBR3 hücreleri.



Şekil 3.4. MDA-MB 231 hücreleri.

3.5.1. QCM Çip Yüzeyinden Hücrelerin Geçirilmesi

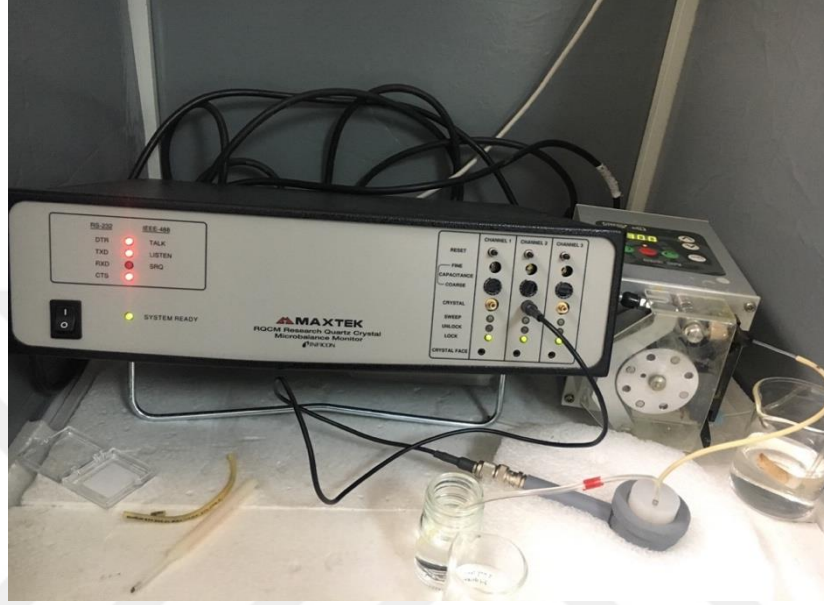
QCM çip ile ilgili tüm analizler *MAXTEK RQCM INFICON* (research Quartz Crystal Microbalance Monitor) kullanılarak yapılmıştır. QCM çip üzerinden eş

zamanlı olarak hücrelerin geçirilmesinden önce QCM çip yüzeyindeki bağlanma kinetiği belirlenmiştir. Bunun için antikor bağlı çip yüzeyinden ilk önce dakikada 0.5 ml olacak şekilde *WATSON MARLOW Sci 400* peristaltik pompa aracılığıyla 0.1 M NaCl geçirilerek ortamda bağlanmadan kalan antikorların desorpsiyonu gerçekleştirildi. Daha sonra ortamdaki fazla NaCl' yi uzaklaştırmak için yine aynı hızda 1X pH 7.4 PBS yüzeyden geçirildi ve böylelikle çip yüzeyi ölçümler için dengelendi. Bu işlem yalnız HER2 bağlı çip ile HER2, Notch4 ve transferrinin birlikte bağlandığı çip için tekrarlanmış olup daha sonra eş zamanlı hücre geçirilmesi gerçekleştirilmiştir.

Hücre seçiciliğinin belirlenmesi için çip yüzeyine yalnızca HER2/neu antikoruna bağlanmış QCM çip kullanıldı. Başlangıç hücre sayısı 10 hücre/ml olacak şekilde pH 7.4 PBS (1X) ile seyreltilmiş, artmış HER2/neu ekspresyonuna sahip pozitif kontrol SKBR3 hücreleri çip üzerinden, *WATSON MARLOW Sci 400* peristaltik pompası aracılığıyla dakikada 0.5 ml hızla QCM çip yüzeyine verilip rezonans frekansı (f_0) izlenmiştir. Yaklaşık 8 dakikada dengeye ulaşan sistemde giderek artan sayıdaki hücrelerle deney tekrarlanması için hücreler çip yüzeyinden 1M NaCl geçirilerek ayrılmıştır. Reseptöre antikorun afinitesini kontrol etmek için benzer şekilde negatif kontrol hücreleri olan ve artmış HER2 ekspresyon seviyelerine sahip olmayan L929 fibroblast hücreleri ile MDA-MB 231 hücreleri de sisteme aynı hızla verilerek 500 hücre/ml maksimum hücre sayısı olacak şekilde hücre geçirilmesine son verilmiştir. Ardından çoklu analiz için HER2 ve Notch4 ile transferrinin bağlı olduğu QCM çip yüzeyinden dakikada 0.5 ml hızla 10-500 hücre/ml aralığında pozitif kontrol SKBR3 hücre çözeltisi ve daha sonra SKBR3 hücrelerinin çip yüzeyinden ayrılmasıyla negatif kontrol olarak L929 fibroblast hücreleri ile MDA-MB 231 hücre çözeltisi sistemden geçirilerek *RQCM (Maxtek)* yazılım sistemiyle veriler değerlendirilmiştir. Elde edilen frekansın kütleye dönüştürülmesi için kuvars kristalin geometrik ve fiziksel özellikleri göz önüne alınarak Sauerbrey denklemi [101] kullanılmıştır. Denklem, kuvars kristalin rezonans frekansındaki değişiklikler ile yüzeyine eklenen ince sert bir filmin kütlesi arasındaki doğrusal ilişkiyi göstermektedir.

$$\Delta f = - \frac{2f_0^2}{\rho_q v_q} \frac{\Delta m}{A} \quad (3.1.)$$

Formül 3.1' de f_0 , v_q , ρ_q , Δm ve A rezonans frekansiyken kayma dalga hızı, yoğunluk, kayma modülü ise kuvars kristalinin aktif elektrotudur. QCM çipinin yeniden kullanılabilirliğini ve kararlılığını analiz etmek için çip 2 ay boyunca test edildi.



Şekil 3.5. MAXTEK RQCM INFICON cihazının ölçüm sırasındaki görüntüsü.

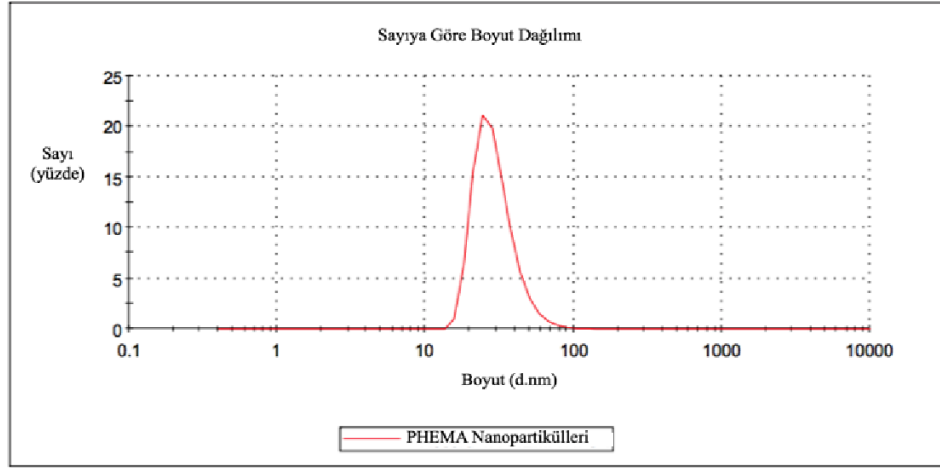
4. BULGULAR

4.1. Nanopartikül Karakterizasyonu

4.1.1. Zeta Boyut Analizi

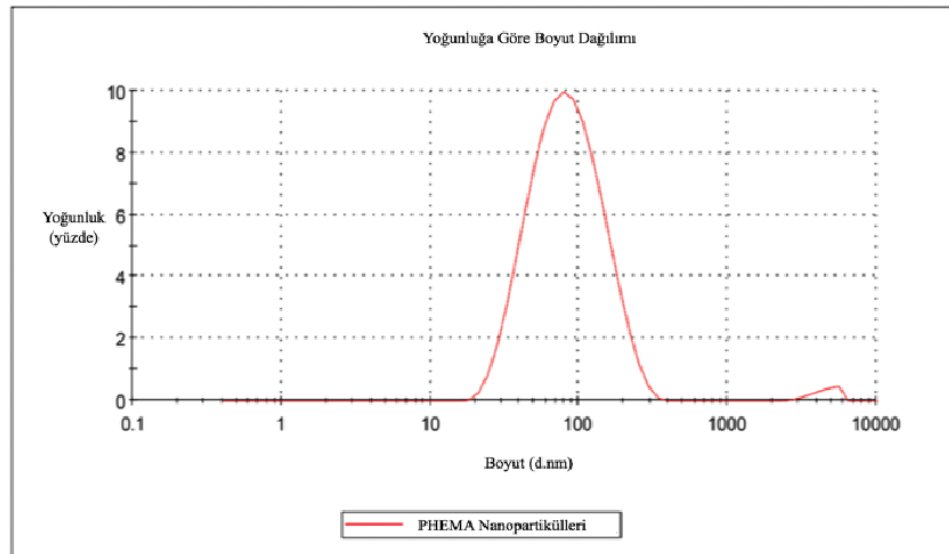
Zeta boyut analizi ile ölçülen Z potansiyeli süspansiyondaki herhangi bir parçacık tarafından oluşturulan fiziksel bir özelliktir. Bu özellik ile süspansiyon ve emülsiyon formülasyonları optimize edilebilmektedir. Parçacık yüzeyinde net yükün oluşmasıyla çevrede bulunan diğer iyonların dağılımı da etkilenir ve bu yüzeye yakın karşıt yüklü iyonların konsantrasyonunun artması ile sonuçlanır. Böylelikle her bir parçacığın etrafında elektrik yüklü bir çift katman meydana gelir ve bu katmanların sınırında oluşan potansiyele de Z potansiyel denir. Zeta boyut analizi, ışık saçılması tekniği ile ölçüm yapan nanopartiküllerin hidrodinamik boyutu (0.6nm- 6.0µm aralığında), zeta potansiyeli (maksimum iletkenlik (200mS) ve molekül ağırlığının (1×10^3 - 2×10^7 aralığında) tayinine olanak sağlayan bir sistemdir. Ölçüm için yeterli yoğunluktaki nanopartikül çözeltisi nanoboyut analizörüne yerleştirilerek ölçümleri tamamlanmıştır. 3 kere tekrarlanan ölçümlerden elde edilen nanopartiküllerin boyut dağılımına ilişkin veriler Şekil 4.1 ve Şekil 4.2' de gösterilmektedir. Elde edilen küçük boyutlu nanopartiküllerle oluşturulan geniş yüzey alanı nanopartiküllerin kuantum hapsini arttırmaktadır [116]. Bu durum da PHEMA nanopartiküllerinin yüzeye eklenen HER2/neu, Notch4 ve transferrinin emilmesini sağlayarak sensör sisteminin performansını da arttırmaktadır. PHEMA nanopartiküllerinin spesifik yüzey alanı 73.22 nm olarak bulundu.

	Boyut (d.nm):	% Sayı:	Standart Sapma (d.nm):
Z-Ortalama (d.nm): 73.22	Pik 1: 29.85	100.0	10.46
Pdl: 0.234	Pik 2: 0.000	0.0	0.000
Sinyal gürültüsü: 0.888	Pik 3: 0.000	0.0	0.000
Sonuç kalitesi: İyi			



Şekil 4.1. PHEMA partiküllerinin zeta boyut analizi (hacim ve standart sapma değerleri).

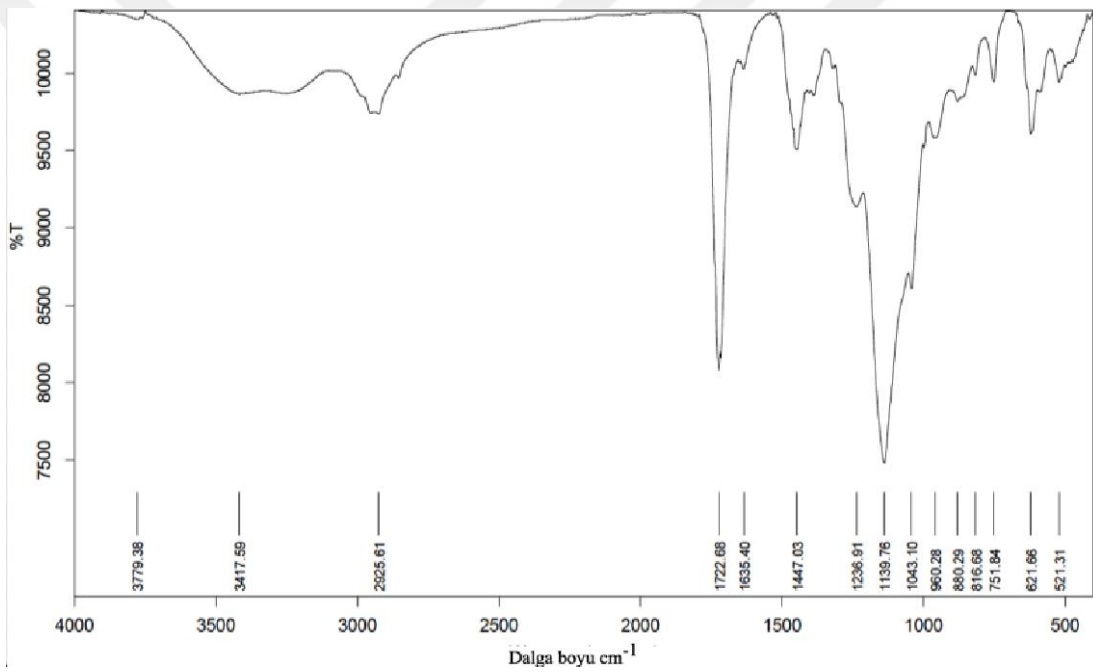
	Boyut (d.nm):	% Yoğunluk:	Standart Sapma (d.nm):
Z-Ortalama (d.nm): 73.22	Pik 1: 92.70	98.4	51.16
Pdl: 0.234	Pik 2: 4544	1.6	854.9
Sinyal gürültüsü: 0.888	Pik 3: 0.000	0.0	0.000
Sonuç kalitesi: İyi			



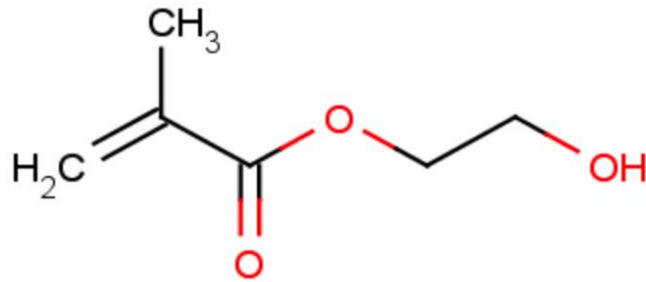
Şekil 4.2. PHEMA partiküllerinin zeta boyut analizi (yoğunluk ve standart sapma değerleri).

4.1.2. FTIR Analizi

FTIR ölçümleri yüzeyde bulunan moleküllerin sahip olduğu bağların ışığı soğurması prensibine dayanmaktadır. Moleküldeki bağların titreşimi ve dönüşleri için soğurulması gereken enerji cihazın elektromanyetik spektrumun kızılötesi bölgesinden ışık göndermesiyle sağlanmaktadır. FTIR ölçümleriyle PHEMA nanopartiküllerinin bağ yapısı ve molekülde bulunan fonksiyonel gruplar ayrıntılı olarak incelenmiştir. Analiz sonucunda PHEMA nanopartikülünün yapısında bulunan bağların 2925 cm^{-1} ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1722 cm^{-1} (C=O), 3417 cm^{-1} ($-\text{OH}$) ve 1139 cm^{-1} de (C=C) karakteristik pik değerleri elde edilmiştir.



Şekil 4.3. PHEMA nanopartiküllerinin FTIR analiz spektrumu.



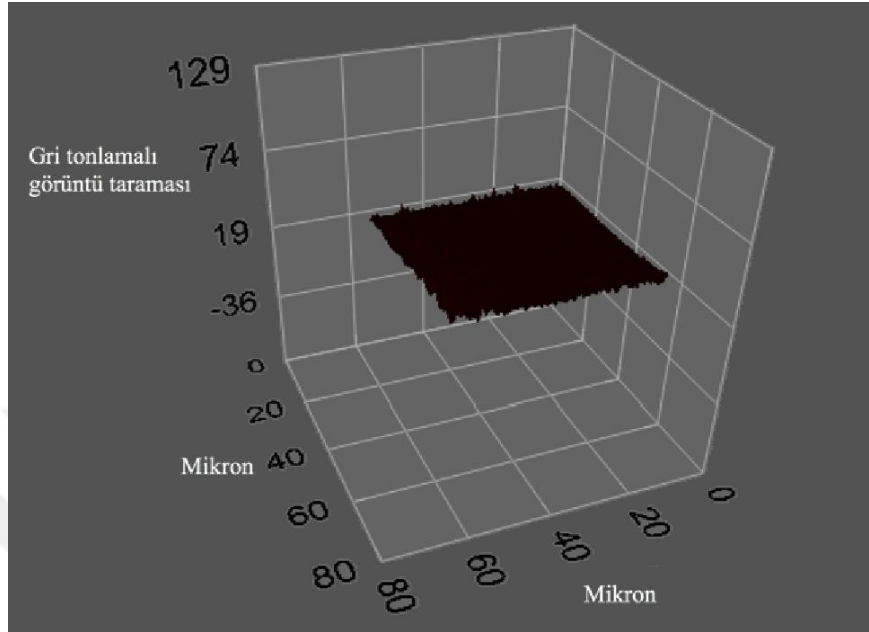
Şekil 4.4. PHEMA yapısı ve yapıda bulunan bağların gösterimi.

4.2. Nanopartikül Kaplı Çip Yüzeyinin Tanımlanması

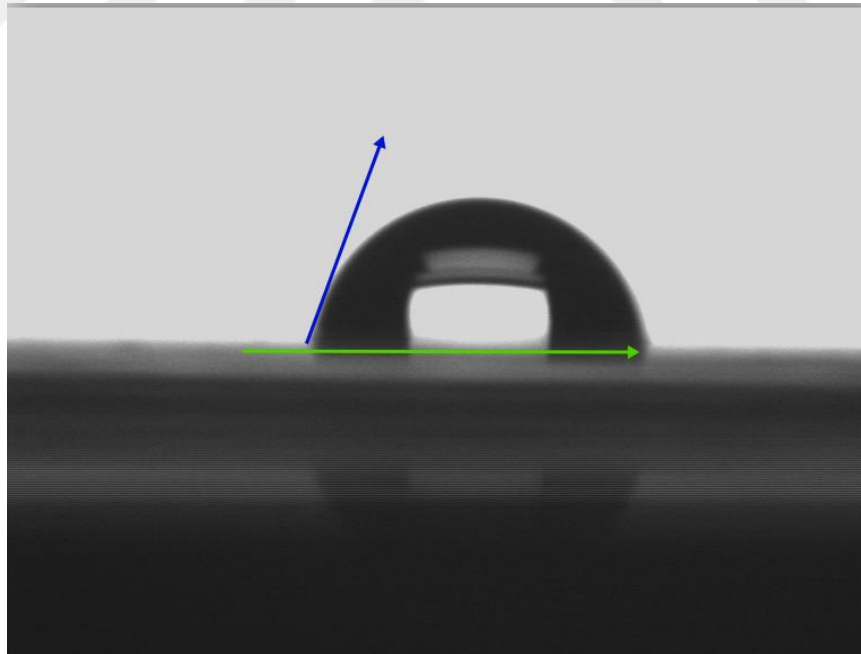
Nanopartikül kaplı QCM çipin yüzey tabakasının kalınlığı elipsometre cihazı kullanılarak analiz edildi. Kalınlık ölçümleri 532 nm dalga boyunda 62° lik geliş açısında gerçekleştirilmiştir. Ölçümler önce yüzeyi kaplanmamış QCM için daha sonra polimerle kaplanan QCM yüzeyi için gerçekleştirilmiştir. Yüzey kalınlığı hesaplama programında BK7+ 20 nm altın + 87nm polimer katmanı verisi elde edilmiştir. Yüzey kalınlığı sonuçları *Zeta-sizer* ölçümleri ile karşılaştırılarak sonuçların uyumluluğu gösterildi. Nanopartiküllerin boyut ölçümlerinden elde edilen sonuç 73.22 nm olduğundan 20 nm' lik boş çip üzerinde 87 nm' lik polimer katmanı verisinin elde edilmesiyle QCM çip yüzeyinin nanopartiküllerle homojen olarak kaplandığı anlaşıldı.

PHEMA ile kaplanan QCM çip yüzeyinin hidrofobiklik derecesinin belirlenmesi için temas açısı ölçümleri yapıldı. Çipin hidrofobiklik derecesinin nanopartikül çözeltisi eklendikten sonra azalması, dolayısıyla antikor bağlanması için uygun yapının oluştuğunun anlaşılması gerekmektedir. Temas açısı ölçümleri için boş QCM ile nanopartikülle kaplanmış QCM yüzeyine 1 damla su damlatılarak yapışık damla yöntemi aracılığıyla temas açısı belirlenmiştir. Yapışık damla yönteminde çip yüzeyinin farklı bölgelerine su damlatılarak 5 ayrı fotoğraf çekilmiş ve her bir damla için ayrı temas açısı değerleri belirlenmiştir. Damlacığın katı yüzey ile temas ettiği sağ ve sol temas noktalarının ortalaması alınarak ortalama temas açısı değerleri elde edilmiştir. Ölçümler sonucunda boş QCM yüzeyinin temas açısı 85 ± 1.72 iken nanopartikül kaplı çip yüzeyi için bu değer 66.82 ± 5.71 olarak bulunmuştur. PHEMA nanopartikülleri incelemek için taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanıldı ve nanometre boyutunda uzamsal çözünürlüklerine bakıldı. SEM ölçümleri *ODTÜ Merkezi Laboratuvar ARGE Eğitim ve Ölçme Merkezi Elektron Mikroskopi Laboratuvarı*'nda *QUANTA 400F Field Emission* cihazı kullanılarak yapılmıştır. SEM ile nanopartiküllerin yüzey morfolojisinin detayları ve partikül boyutunun dağılımı incelendi. Zeta boyut ölçümünde nanopartiküller PBS çözeltisi içerisindeyken incelendiğinden olduklarından daha büyük boyutlarda ölçülebilirler. Ayrıca Zeta ölçümü nanopartiküllerin dispersiyon ortamında ne kadar stabil oldukları hakkında bilgi verirken, Zeta ölçümlerinden farklı olarak SEM analizi

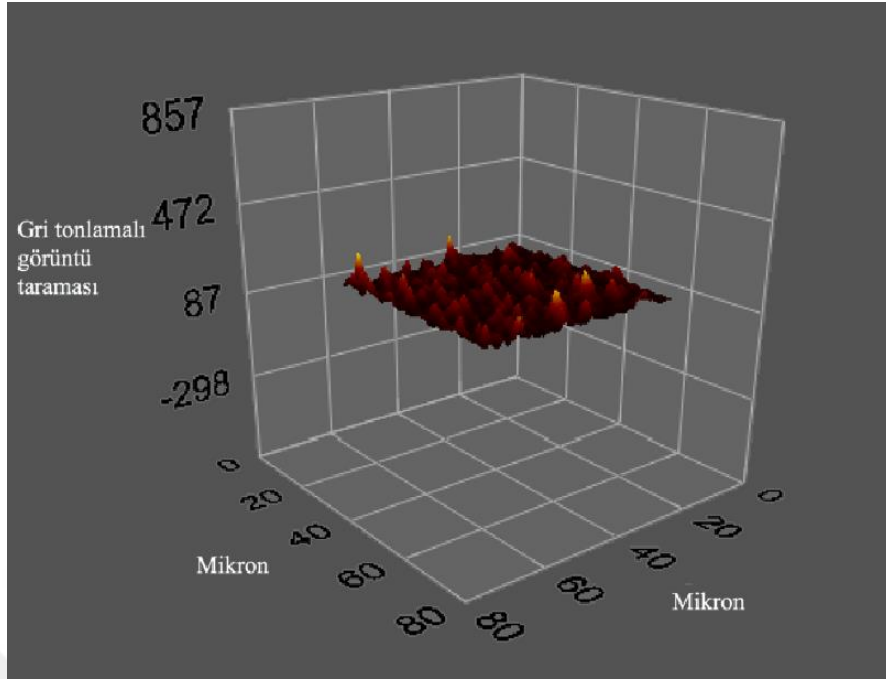
çözelti içerisinde gerçekleştirilmediğinden nanopartiküllerin sentez boyutu hakkında daha doğru bilgi verebilmektedir [117].



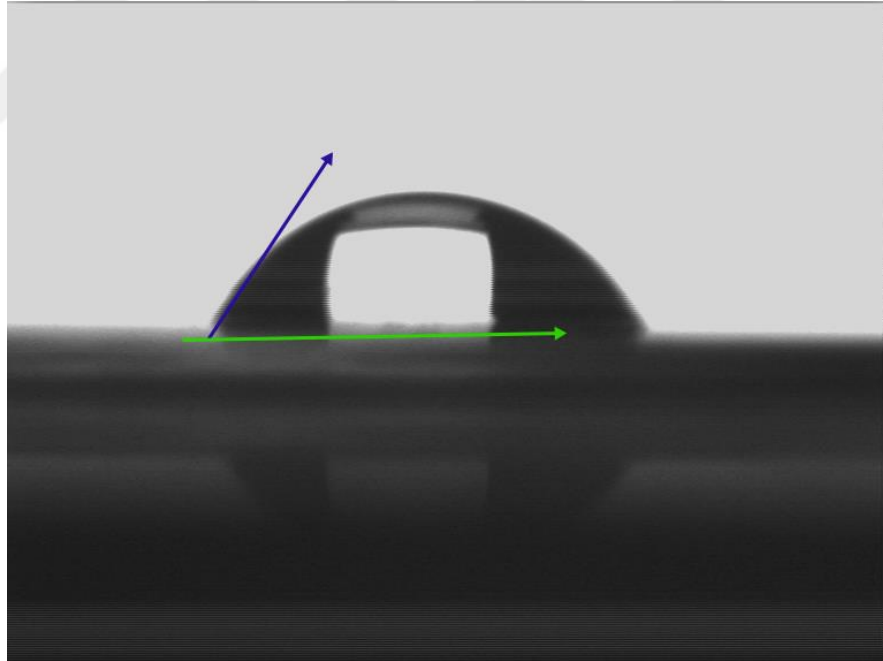
Şekil 4.4. PHEMA yapısı ve yapıda bulunan bağların gösterimi.



Şekil 4.6. Boş QCM yüzeyine damlatılan suyun temas açısı ölçümü.



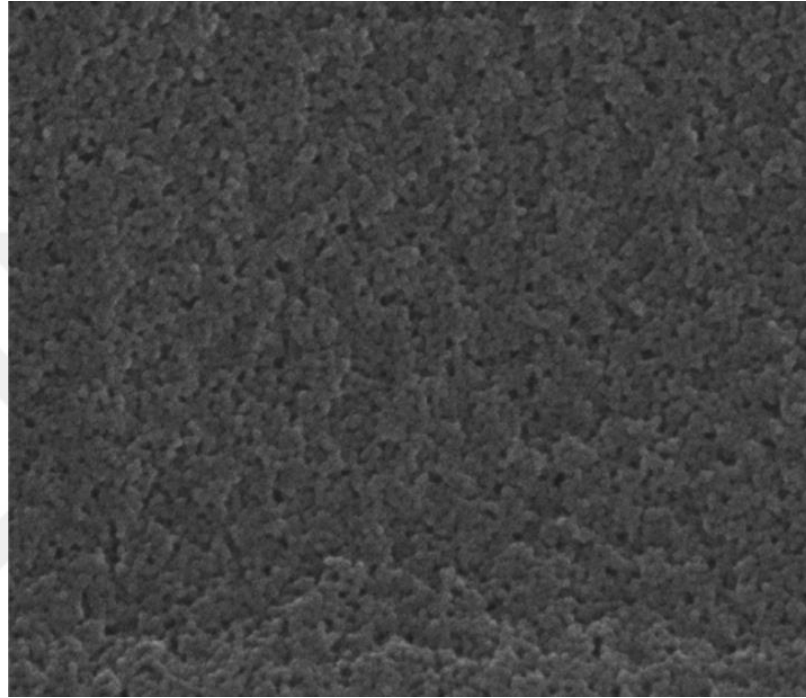
Şekil 4.7. Nanopartikülle kaplanmış QCM çip yüzeyinin 3D görüntüsü.



Şekil 4.8. Nanopartikül çözeltisi ile işlevselleştirilmiş QCM yüzeyine damlatılan suyun temas açısı ölçümü.

Tablo 4.1. Elipsometre ve temas açısı ölçüm sonuçları.

	Elipsometre (nm)	Temas Açısı (Boş QCM çip yüzeyi)
Boş QCM çip yüzeyi	20	Su damlası 85± 1.72
Nanopartikülle işlevselleştirilmiş QCM çip yüzeyi	87	Nanopartikül çözeltisi 66.82± 5.71

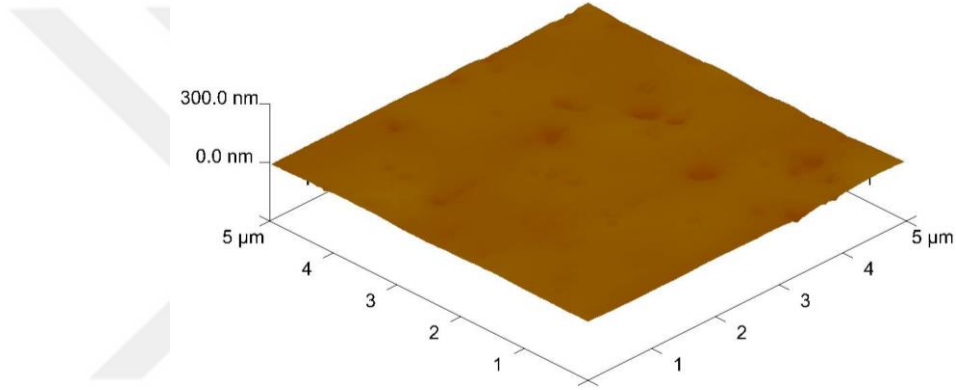
**Şekil 4.9.** SEM analizinde PHEMA nanopartiküllerinin QCM çip yüzeyinde 1µm alandaki genel görünümü.

Şekil 4.9’ da PHEMA nanopartiküllerinin QCM çip üzerindeyken SEM ile analiz sonucu gösterilmektedir. SEM analizi sonucunda nanopartiküllerin QCM çip yüzeyinde antikorların bağlanması için uygun, homojen ve tek tabakalı bir yapı oluşturdukları gösterilmiştir.

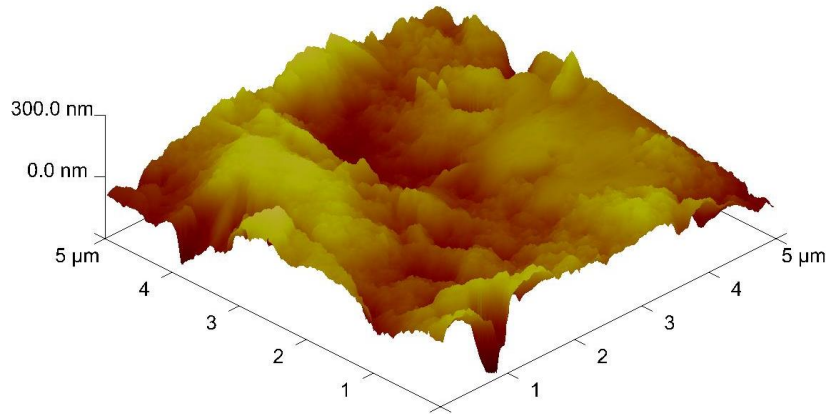
4.2.1. AFM Ölçümleri

QCM çip nanopartikül ve HER2 antikorlu ile modifiye edildikten sonra temas açısı ölçümleriyle yüzey kalınlıkları ölçülmüştür. Buna ek olarak AFM ölçümleri ile yüzeyde meydana gelen değişiklikler ayrıntılı olarak incelenmiştir. AFM ölçümlerinde cihazında atomik boyutlara kadar sivriltilmiş iğne ucu bulunmaktadır.

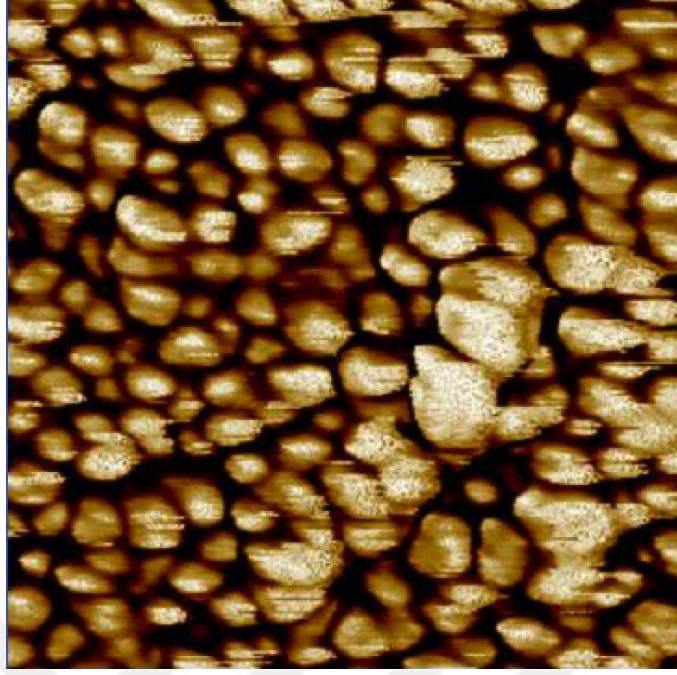
Bu iğne ucu sayesinde örnek yüzeyi yüksek çözünürlükte ve üç boyutlu yapıda incelenebilmektedir. AFM üç farklı teknik yardımıyla örnek yüzeyinin morfolojisi hakkında bilgi vermektedir. Bunlar; iğnenin yüzeye temas ettirilerek uygulandığı temas yöntemi, iğnenin yüzeye temas ettirilmeden uygulandığı temassız yöntem ve iğnenin örnek yüzeyine vurularak uygulandığı vurma yöntemidir. Boş QCM çip yüzeyi, PHEMA kaplı QCM yüzeyi ve HER2 antikoru kaplı QCM çip yüzeyinin morfolojisi vurma (tapping) modunda belirlenmiştir. Her bir çipin yüzeyinin görüntülemesinin yanı sıra faz farklılıklarına da bakılarak nanopartikül ve antikor bağlı yüzey ayrıntılı olarak görüntülenmiştir.



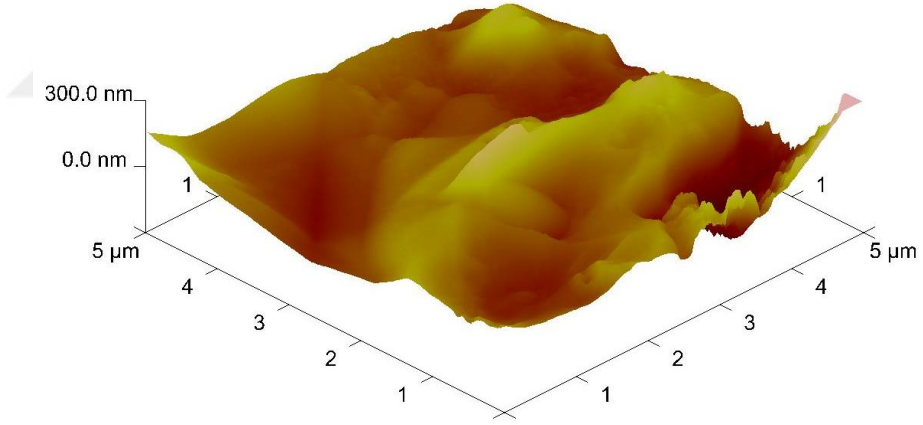
Şekil 4.10. 5μm boyutta çekilmiş boş QCM çip yüzeyinin 3D AFM görüntüsü.



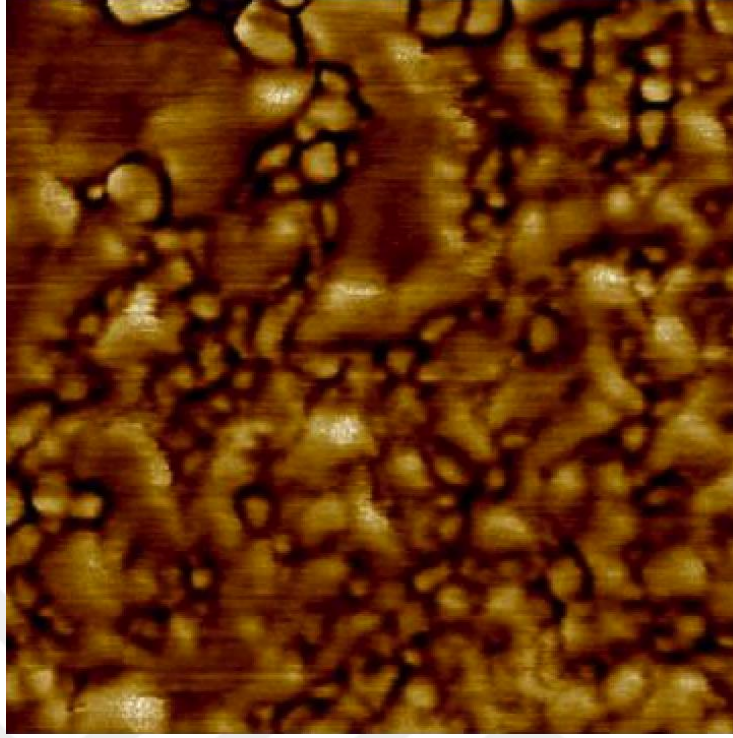
Şekil 4.11. 5μm boyutta çekilmiş PHEMA kaplı QCM çip yüzeyinin 3B AFM görüntüsü.



Şekil 4.12. 500nm boyutta PHEMA kaplı QCM çip yüzeyinde nanopartiküllerin görünümü.



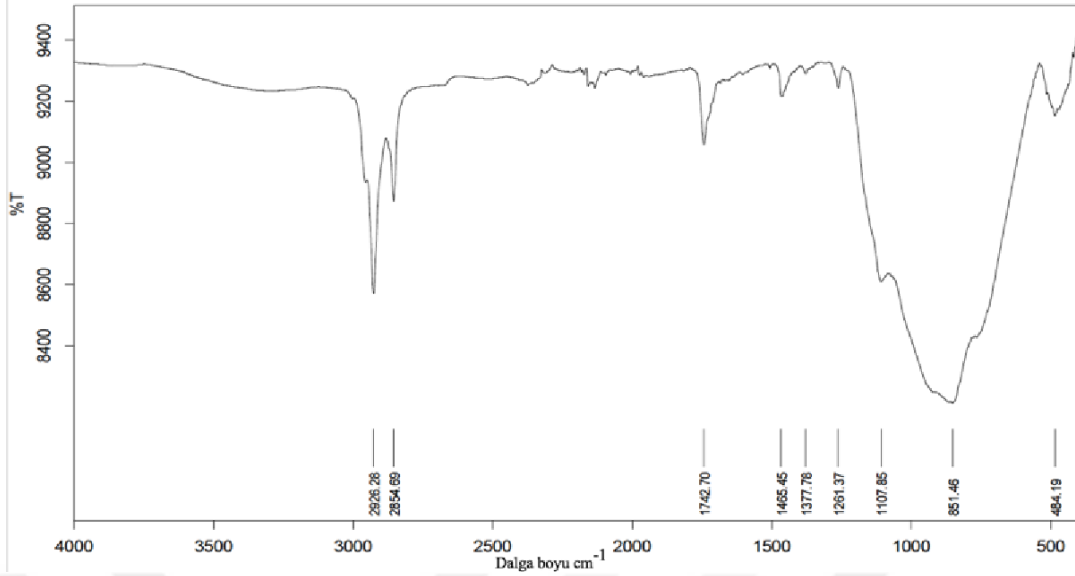
Şekil 4.13. 5µm boyutta çekilmiş PHEMA ve HER2 antikoru kaplı QCM çip yüzeyinin 3B AFM görüntüsü.



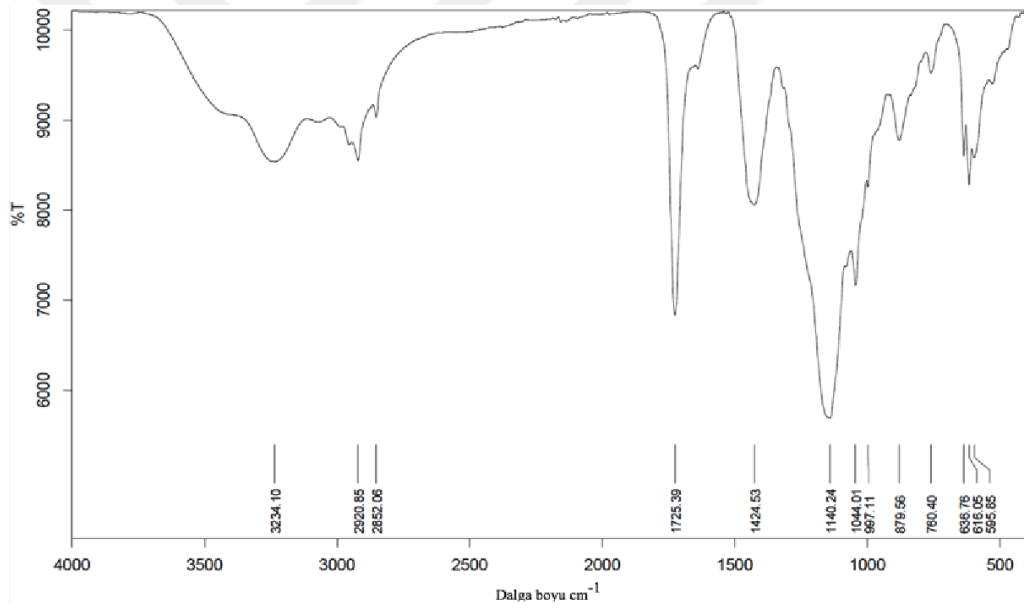
Şekil 4.14. 500nm boyutta PHEMA kaplı QCM çip yüzeyinde nanopartiküller ve HER2 antikör molekülleri.

4.2.2. FTIR Ölçümleri

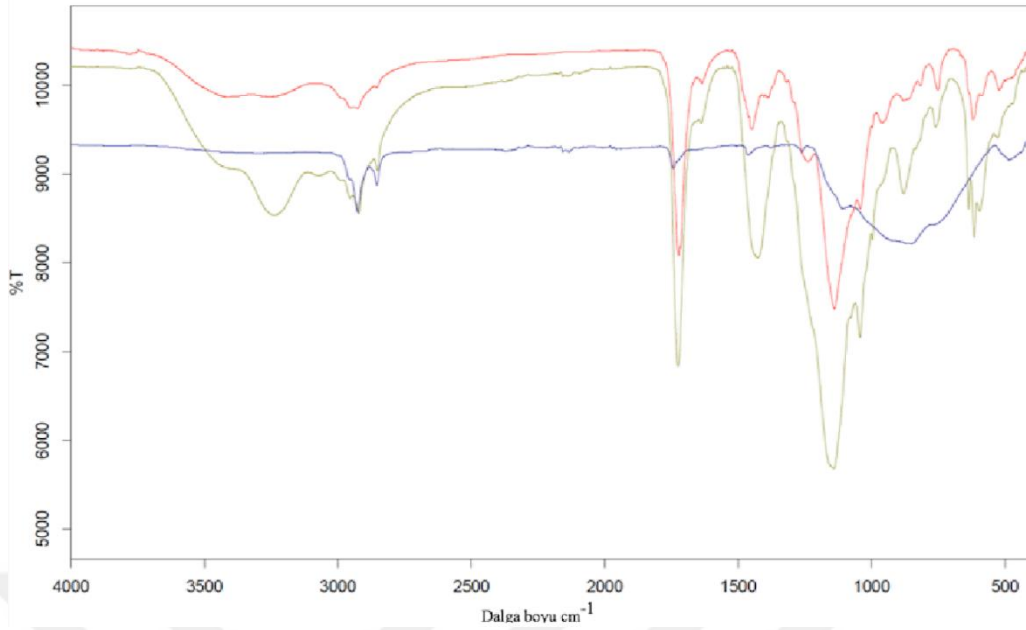
FTIR ölçümleri boş QCM çip yüzeyi ile PHEMA kaplı QCM çip yüzeyinde gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümler ile temas açısında gösterilen kalınlık artışına ek olarak moleküler düzeyde PHEMA'nın altın yüzeye bağlanmasıyla meydana gelen değişimler incelenmiştir.



Şekil 4.15. Boş QCM çip yüzeyinin FTIR analizi.



Şekil 4.16. PHEMA kaplı QCM çip yüzeyinin FTIR analizi.



Şekil 4.17. Boş QCM çip yüzeyi (mavi), PHEMA nanopartikülleri (kırmızı) ve PHEMA kaplı QCM çip yüzeyinin (sarı) FTIR analizlerinin karşılaştırılmış görüntüsü.

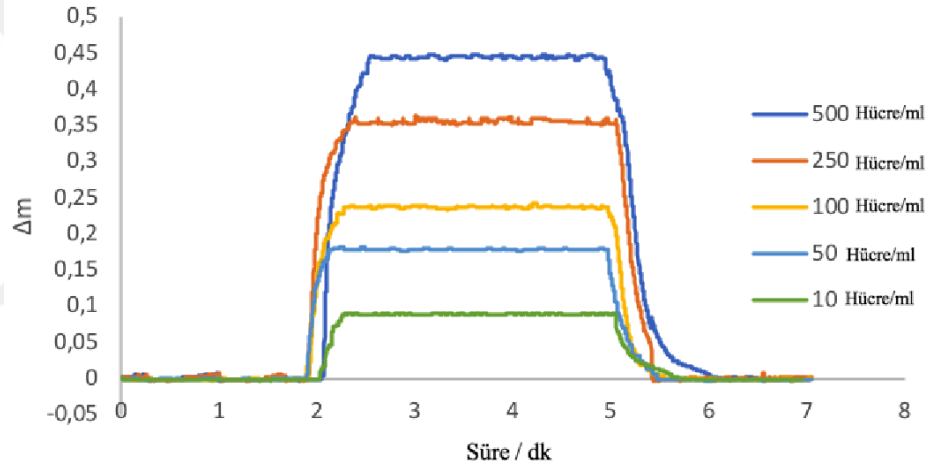
4.3. Eş Zamanlı Hücre Saptanması

Yalnız HER2 antikoruna bağlı QCM çipi ilk olarak 0.1 M pH 7.4 PBS tamponu yüzeyinden peristaltik pompa aracılığıyla geçirilerek dengelenmiştir. Bu işlem ölçümler öncesi Her2/neu, Notch4 ve transferrinin birlikte bağlandığı çip için de tekrarlanmıştır. Dengeye getirilen frekans sonrasında her iki QCM sistemine SKBR3, MDA-MB 231 ve fibroblast hücreleri için 10-500 hücre/ml içeren çözeltiler 0.5 ml/dk hızla sensör yüzeyinden geçirilip hücre yoğunluğundaki artışın QCM sensöründen elde edilen yanıtta artış sağladığı kaydedilmiştir. İki farklı sensör sistemindeki her bir hücreye yanıt ayrı ayrı incelendi. Her iki çip sistemi için artmış HER2 reseptör seviyelerine sahip SKBR3 hücre hattında çip yüzeyindeki bağlanmanın maksimum olduğu, yani sistemin tepkisinin doğrusal olduğu platoya 8 dakika sonra ulaşıldı ve veriler kaydedildi. Hücrelerin sistemden çıkarılması için 1M NaCl sisteme verildi ve tüm bağlama, çıkarma ile rejenerasyondan oluşan tüm döngü yaklaşık 15 dakikada tamamlandı. Beklenildiği gibi yalnız HER2 bağlı çip ile Her2, Notch4 ve transferrinin birlikte bağlandığı çipte MDA-MB 231 ve fibroblast hücreleri için herhangi bir bağlanma yanıtı alınamadı. Artan hücre sayısındaki

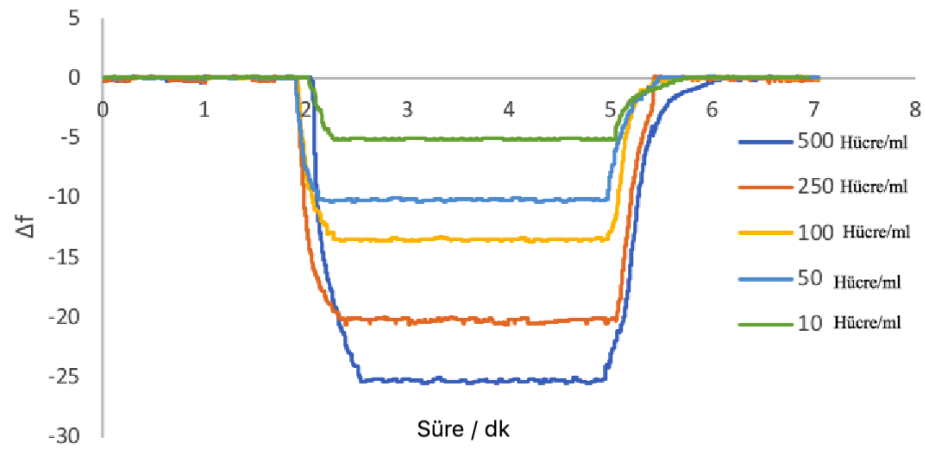
uygulamalardan elde edilen veriler tespit değerin belirlenmesi için kullanıldı. Saptama sınırı denklemi (LOD):

$$LOD = \frac{3.3 S}{m} \quad (4.1.)$$

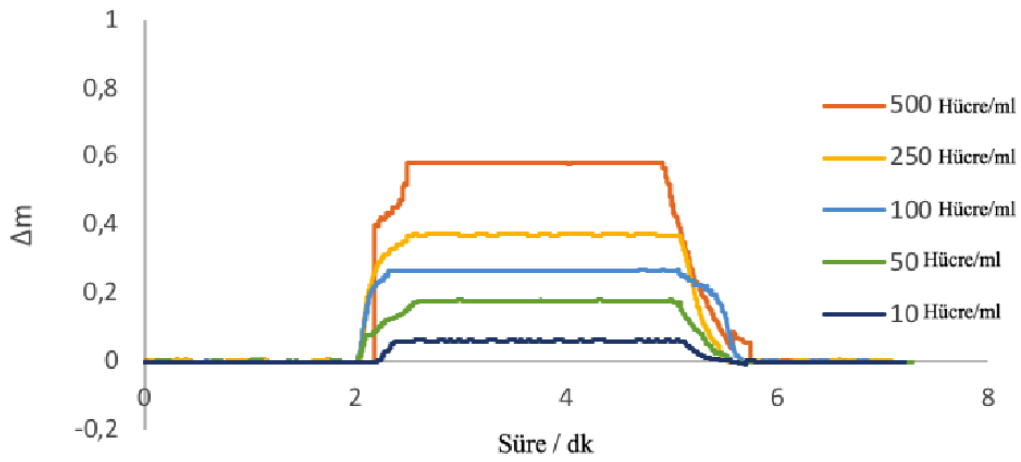
Formül 4.1' de S kesişimin standart sapmasıdır ve m regresyon çizgisinin eğimidir [118]. Sensörün tespit limiti (LOD) belirtilen çalışma koşulları altında tespit edilen ancak zorunlu olarak miktarı ölçülmeyen, analitin en düşük konsantrasyonu olarak ifade edilir. LOD'nin yanı sıra sensörün tespit miktar sınırını belirten LOQ, belirtilen çalışma koşulları altında kabul edilebilir hassasiyet ve bu kabul edilebilir hassasiyetle belirlenen analitin en düşük konsantrasyonudur [119].



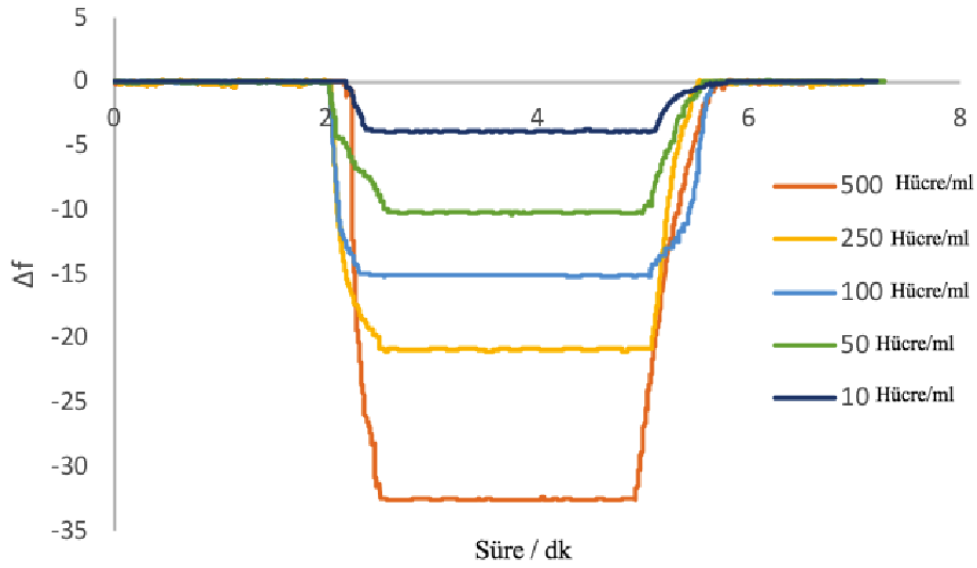
Grafik 4.1. HER2 bağlı QCM sensör yüzeyindeki (hücre/cm²) birim alanda meydana gelen SKBR3 hücrelerinin bağlanmasıyla meydana gelen kütle artışı.



Grafik 4.2. HER2 bağı QCM sensör yüzeyindeki (hücre/cm²) birim alanda meydana gelen SKBR3 hücrelerinin bağlanmasıyla meydana gelen frekans değişimi.



Grafik 4.3. HER2, Notch4 ve transferrin bağı QCM sensör yüzeyindeki (hücre/cm²) birim alanda meydana gelen SKBR3 hücrelerinin bağlanmasıyla meydana gelen kütle artışı.



Grafik 4.4. HER2, Notch4 ve transferrin bağlı QCM sensör yüzeyindeki (hücre/cm²) birim alanda meydana gelen SKBR3 hücrelerinin bağlanmasıyla meydana gelen frekans değişimi.

Deney sonucunda yalnız HER2 bağlı sensörden elde edilen LOD değeri 10 hücre/ml'dir. Yalnız HER2 bağlı sensörün tespit limiti (LOD) Grafik 4.1 ve 4.2'de gösterildiği gibi 10 hücre/ml olarak bulunmuştur. Sistem etkinliğinin geliştirilmesi için çoklu analiz yapılmasına imkân tanıyan birden fazla ligant ve antikorlarla denenen QCM sisteminin etkinliği ise Grafik 4.3 ve Grafik 4.4'de gösterildiği gibi 4 hücre/ml bulunmuştur. Ayrıca HER2 bağlı sensörün LOQ değeri 20 hücre/ml iken HER2, Notch4 ve transferrin bağlı sensörün LOQ değeri 10 hücre/ml olarak bulunmuştur.

Denge verilerinin modellenmesi Langmuir, Freundlich ve Langmuir Freundlich izoterm modeli [120] kullanılarak yapıldı.

$$\text{Langmuir} : \Delta m = \frac{\Delta m_{\max} C}{K_D + C} \quad (4.2.)$$

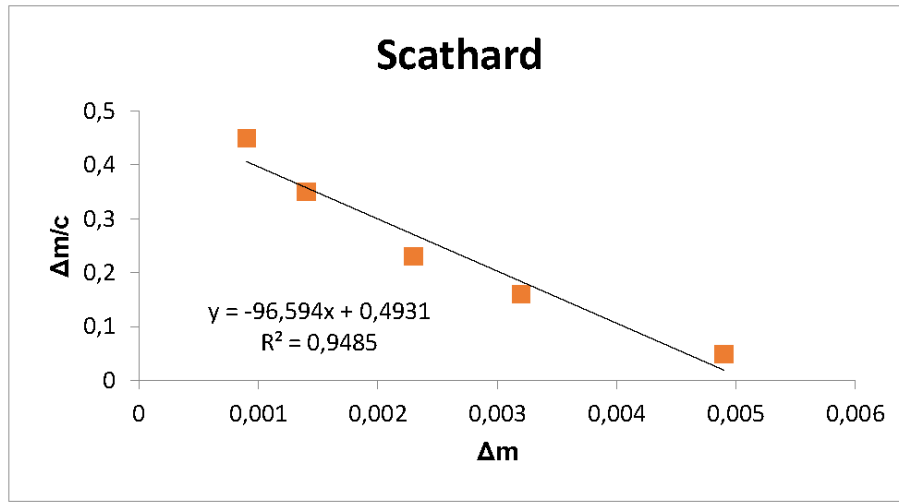
$$\text{Freundlich} : \Delta m = \Delta m_{\max} (C)^{1/n} \quad (4.3.)$$

$$\text{Langmuir - Freundlich} : \Delta m_{\max} (C)^{1/n} / K_D + (C)^{1/n} \quad (4.4.)$$

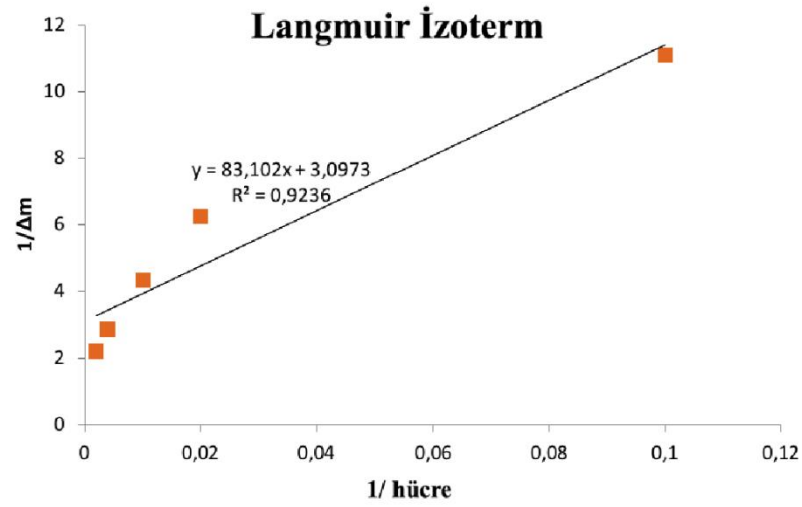
Formül 4.2, 4.3, ve 4.4' de yer alan Δm bir QCM sensör yüzeyindeki (hücre/cm²) birim alanda meydana gelen kütle artışını tanımlarken C hücre sayısını

göstermektedir (hücre/ml). $1/n$ Freundlich üssüdür, k_a (hücre/ml) ve k_d (s^{-1}) ileri ve geri kinetik hız sabitleridir. K_A (hücre/ml) ve K_D (ml/hücre) ileri ve geri denge sabitleriyken e_x , e_{max} ve e_q sırasıyla deneysel, maksimum ve dengeyi gösterir.

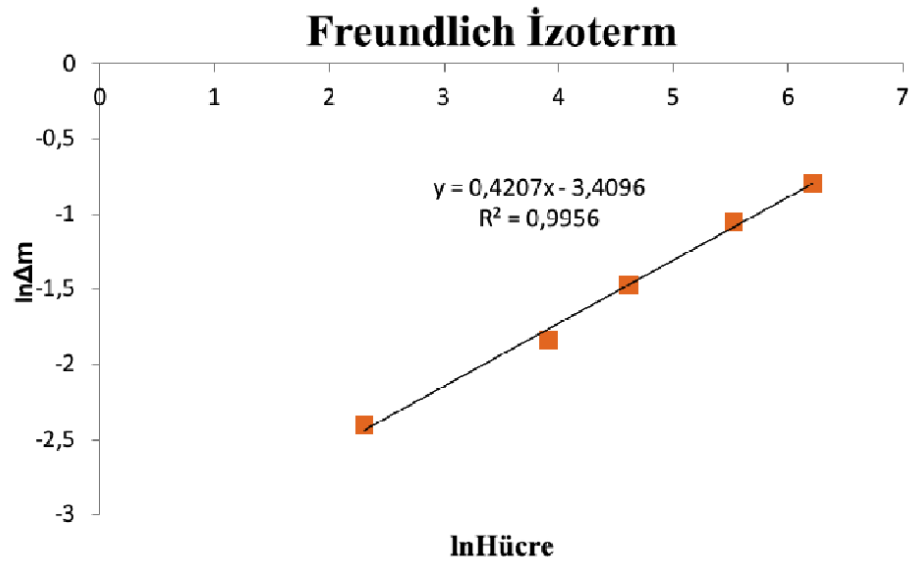
Denge kinetik analizi yapıldıktan sonra sırasıyla k_a ve k_d 'nin belirlenmesi için eğrilerin eğimlerini eğri konsantrasyonuna karşı grafiklenerek eğri eğimleri hesaplandı.



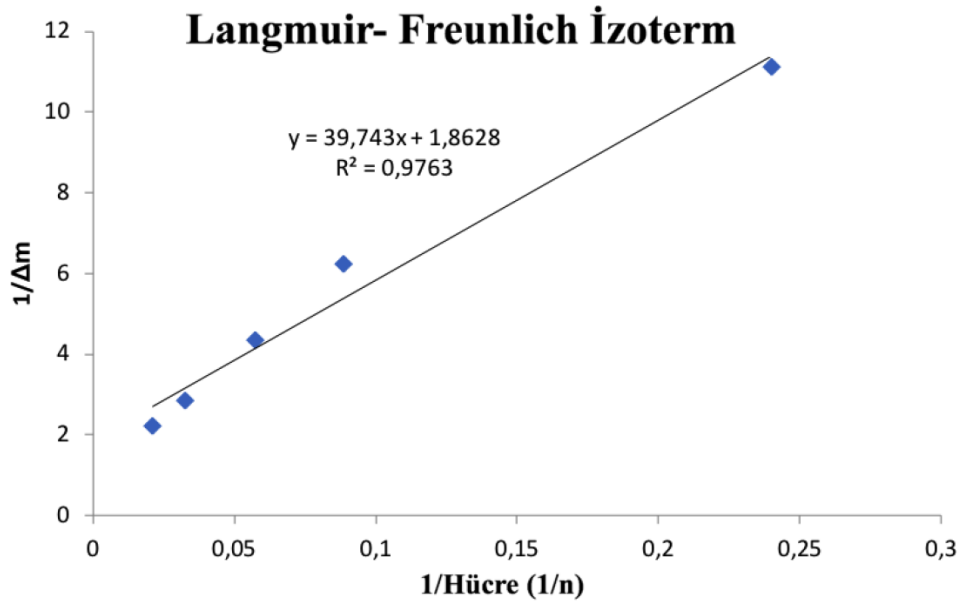
Grafik 4.5. HER2 bağlı QCM çip yüzeyindeki SKBR3 bağlanmasına karşı meydana gelen kütle artışının hücre sayısına karşı Scathard grafiği.



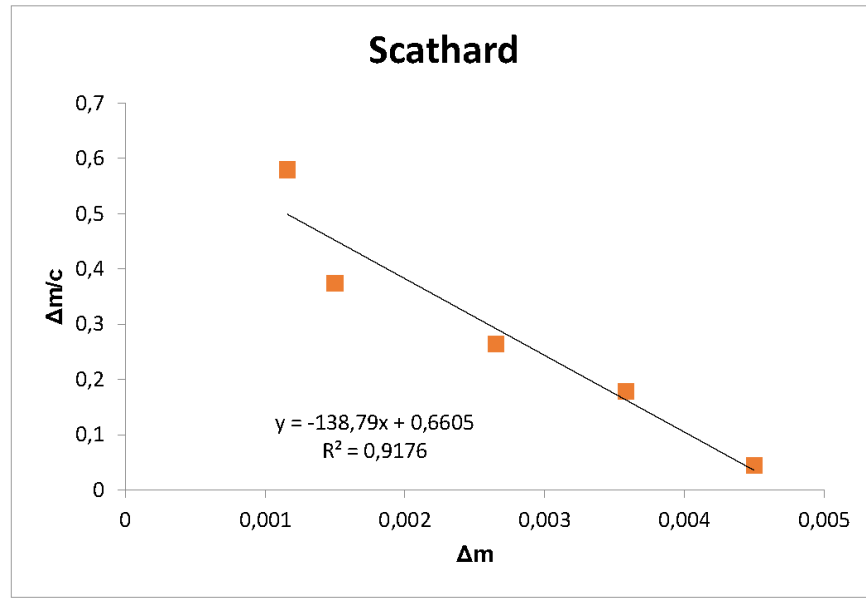
Grafik 4.6. HER2 bağılı QCM çipte bağlanma için Langmuir denge izoterm modeli eğrisi.



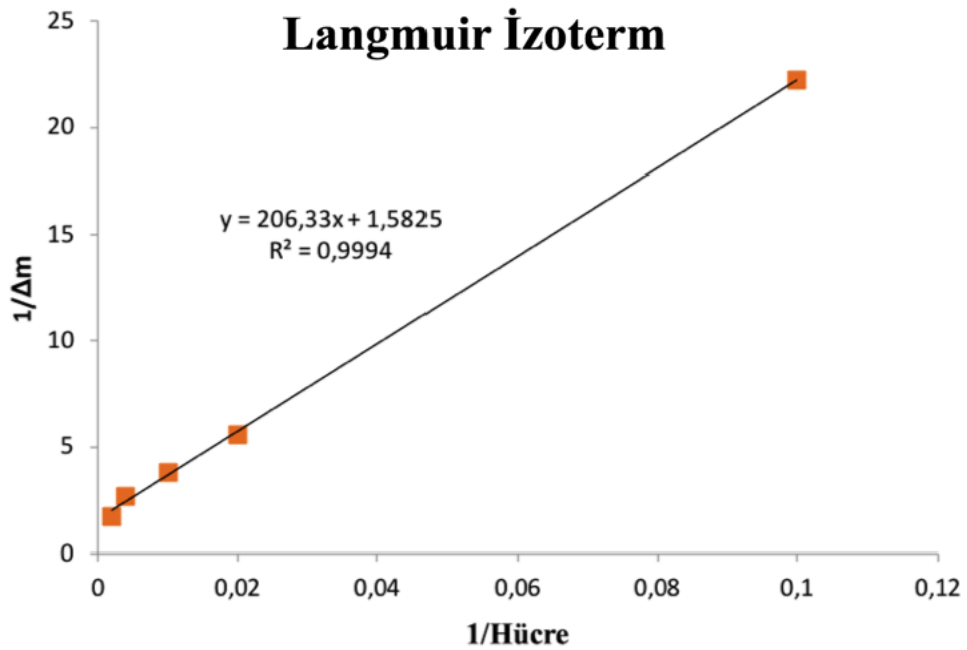
Grafik 4.7. HER2 bağılı QCM çipte bağlanma için Freundlich denge izoterm modeli eğrisi.



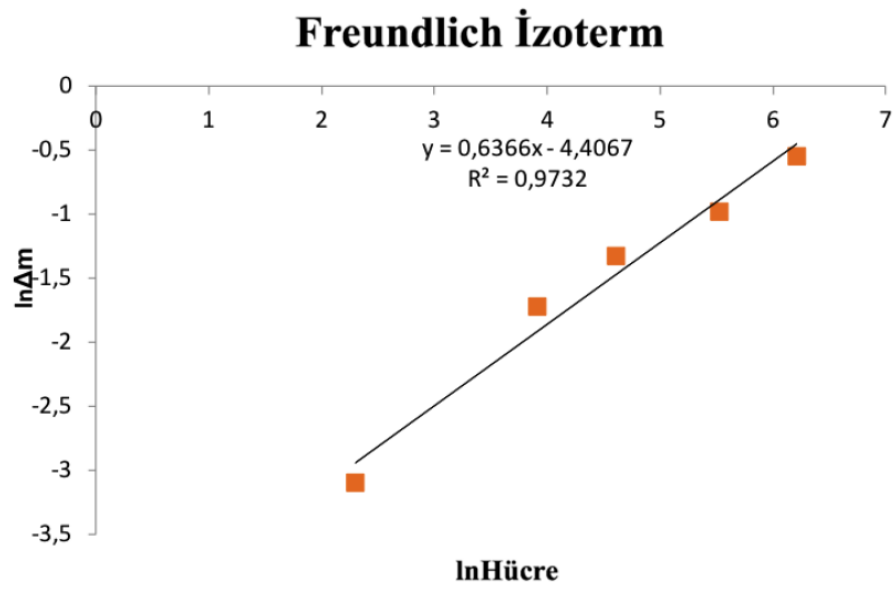
Grafik 4.8. HER2 bağılı QCM çipte bağlanma için Langmuir-Freundlich denge izoterm modeli eğrisi.



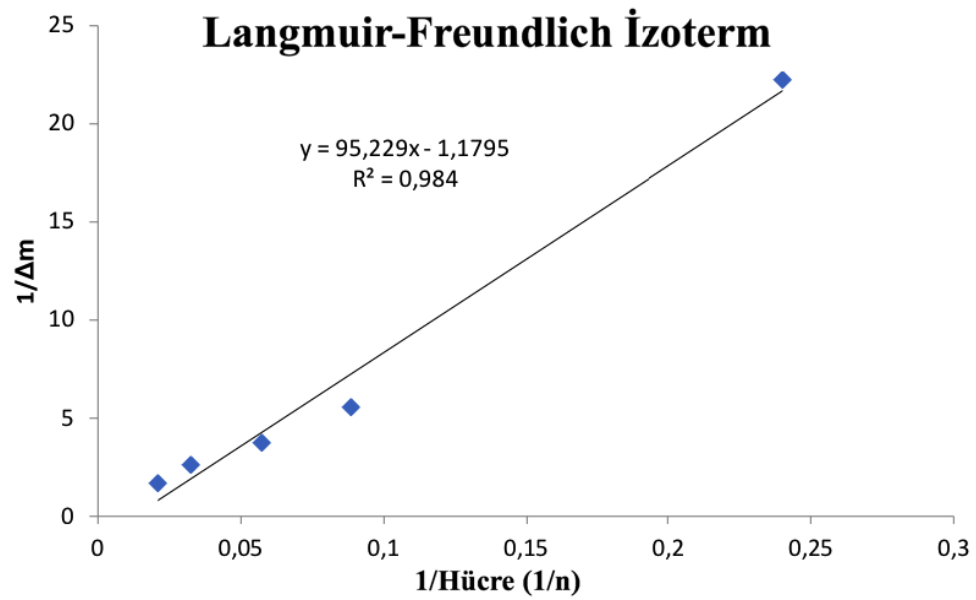
Grafik 4.9. HER2, Notch4 ve transferrin bağı QCM çip yüzeyindeki SKBR3 bağlanmasına karşı meydana gelen kütle artışının hücre sayısına karşı Scathard grafiği.



Grafik 4.10. HER2, Notch4 ve transferrin bağı QCM çipte bağlanma için Langmuir denge izoterm modeli eğrisi.



Grafik 4.11. HER2, Notch4 ve transferrin bağlı QCM çipte bağlanma için Freundlich denge izoterm modeli eğrisi.



Grafik 4.12. HER2 bağlı QCM çipte bağlanma için Langmuir-Freundlich denge izoterm modeli eğrisi.

Adsorpsiyona dayalı bu ölçümlerde tıpkı denge reaksiyonunda olduğu gibi belirli miktardaki adsorplayıcı ile çözelti temas ettirildiğinde, çözeltide adsorplanan maddenin derişimi, adsorplayıcı yüzeydekilerle dengeye gelene kadar azalmaktadır. Adsorpsiyon dengesi kurulduktan sonra ise beklendiği gibi adsorplanan maddenin derişimi çözelti içerisinde sabit kalmaktadır. Sıcaklık birçok denge tepkimesinde adsorpsiyonu miktarını etkilediğinden burada da adsorplayıcı ile adsorplanan madde miktarı sabit sıcaklıkta derişim fonksiyonu olarak ifade edilmektedir. Sabit sıcaklıkta denge halindeki çözeltide kalan çözünen derişimine karşı birim adsorplayıcının miktarı grafiklenerek izotermi olarak bilinen sonuç fonksiyonları elde edilir. Bu fonksiyonlar Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izoterm modelleri olup hücrelerin bağlanma davranışını ve hücreler ile antikor bağlı nanopartiküllerin QCM sensörü ile arasındaki olası etkileşim modelini tanımlamak için kullanıldı.

Tablo 4.2. HER2 bağı QCM çip için izoterm değerleri.

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
Δ_{\max}	0.32	Δ_{\max}	10.6	Δ_{\max}	1.86
K_A , hücre/ml	0.037	1/n	0.29	1/n	0.05
K_D , ml/hücre	26.8	R^2	0.99	K_A , hücre/ml	0.04
R^2	0.92			K_D , ml/hücre	21.37
				R^2	0.97

Tablo 4.3. HER2, Notch4 ve transferin bağı QCM çip için izoterm değerleri.

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
Δ_{\max}	0.63	Δ_{\max}	4.806	Δ_{\max}	0.84
K_A , hücre/ml	0.0076	1/n	0.22	1/n	0.05
K_D , ml/hücre	130.15	R^2	0.97	K_A , hücre/ml	0.012
R^2	0.99			K_D , ml/hücre	80.37
				R^2	0.98

Yalnız HER2 ile HER2, Notch4 ve transferrin bağı olduğu QCM çip için denge analizi, Langmuir, Freundlich ve Freundlich-Langmuir izoterm parametreleri Tablo 4.2 ve 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.2’de verilen parametrelerden elde edilen sonuçlara göre, HER2 bağı QCM çip yüzeyi için regresyon katsayısının en anlamlı olduğu değer Freundlich modelinden elde edilmiştir. Freundlich izoterm modeli, bir adsorban yüzeyindeki çözünen konsantrasyonu ile temas ettiği sıvıdaki çözünen konsantrasyonu arasındaki ampirik ilişkiyi değerlendirmektedir. Buna göre, yalnız HER2 bağı QCM çipin antikoru ve hücreleri bağlama modeli heterojen yüzeyler üzerinde adsorpsiyona dayalı ve heterojen adsorbant alanının oransal enerji dağılımlı olduğunu gösteren Freundlich modeli ile [121] uyumlu olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.3’de verilen parametrelere göre HER2, Notch4 ve transferrin bağı QCM çip yüzeyi için regresyon katsayısının (R^2) en anlamlı bulunduğu model Langmuir izoterm modelidir. Langmuir izoterm modelinde adsorbanın, çözüneni bağlayabilen ve farklı eşdeğer bölgelerden oluşan ideal bir katı yüzey olduğu varsayılmaktadır. Langmuir modelinde düz düzlem üzerindeki bitişik alanlarda çözünen moleküller arasında hiçbir etkileşimin olmadığı ve her adsorbe edici alanın yalnızca bir çözünen molekülü tutabileceği varsayılmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre HER2, Notch4 ve transferrin bağı QCM çipinin antikoru ve hücreleri bağlama modeli eş enerji ve minimum yanal etkileşime sahip homojen olarak dağılmış tek bir tabaka olarak Langmuir [121] modeliyle uyumlu olarak belirlenmiştir.

4.4. Seçicilik Çalışmaları

Seçicilik HER2/neu bağı QCM sensörünün SKBR3 hücrelerini yüzeyine bağlayıp tespit edebilme yeteneğinin incelenmesi için oldukça önemli bir parametredir. Bu nedenle HER2/neu kaplı QCM sensörü L929 fare fibroblast ve MDA-MB 231 insan meme kanseri hücrelerinin 10-500 hücre/ml olmak üzere rekabetçi adsorpsiyonu için kullanılmıştır. HER2/neu bağı QCM sensörü SKBR3 hücrelerine seçici olup SKBR3 hücreleri sensör yüzeyinden geçirildiğinde sinyal alınmış olup fibroblast ve MDA-MB 231 hücreleri çip yüzeyinden geçirildiğinde herhangi bir sinyal alınamamıştır. Bu nedenle geliştirilen HER2 bağı QCM çipi MDA-MB 231 ve L929 fibroblast hücreleri için seçici değildir. HER2/neu QCM

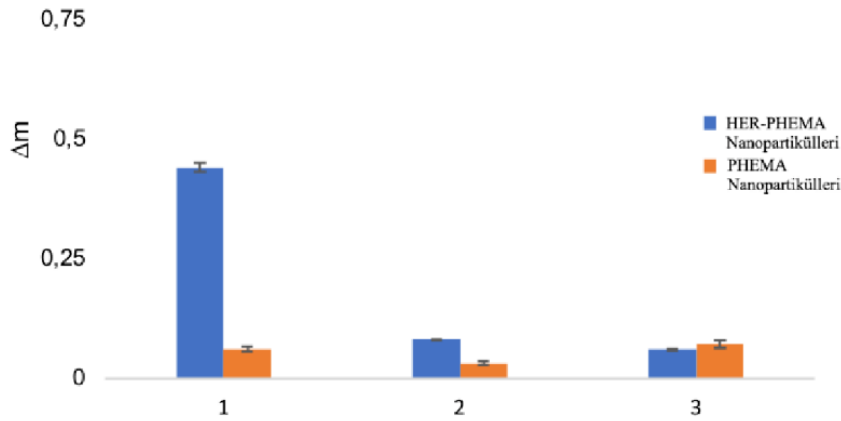
sensörünün seçiciliğini analiz etmek için ise aşağıdaki terimler ve formüller kullanılmıştır:

$$\text{Dağılım katsayısı: } Kd = \frac{Ci - Cf}{Cf} \quad (4.5.)$$

$$\text{Seçicilik katsayısı: } k = \frac{Kd(\text{meme kanseri})}{Kd(\text{fibroblast})} \quad (4.6.)$$

$$\text{Göreceli seçicilik katsayısı: } k' = \frac{k(\text{Ab-NP}) \text{ QCM biyosensör}}{k(\text{NP}) \text{ QCM biyosensör}} \quad (4.7.)$$

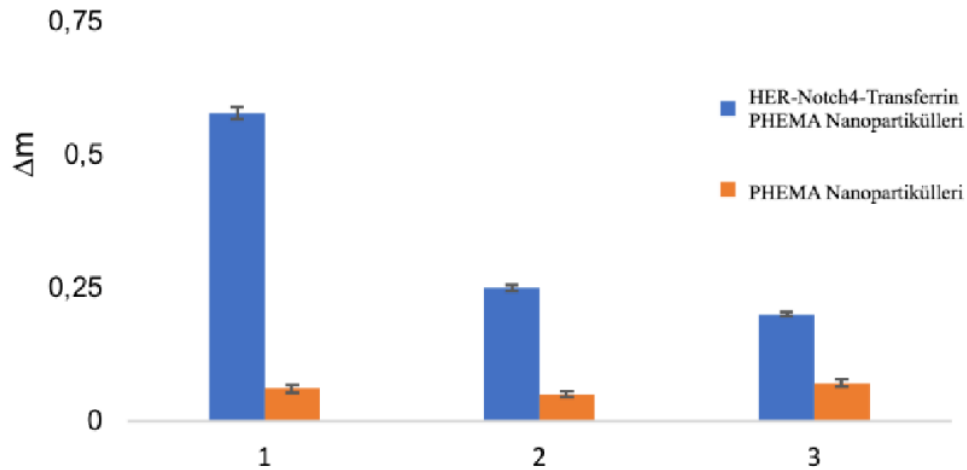
Formül 4.5, 4.6 ve 4.7' de yer alan Ci (hücre/ml) başlangıçta ve Cf (hücre/ml) son SKBR3 hücre sayısıdır. Antikor bağlı QCM ve yalnız PHEMA bağlı QCM sensörü için seçicilik katsayıları (k) ve göreceli seçicilik katsayıları ise (k')'dir [120].



Şekil 4.18. PHEMA nanopartiküllerinin ve HER2 bağlı PHEMA partiküllerinin Δm değerleri (1: SKBR3, 2: MDA-MB 231, 3: Fibroblast hücreleri).

Tablo 4.4. HER2 bağlı ve bağlı olmayan QCM çip için Δm , k ve k' değerleri.

Hücreler	Antikor bağlı QCM çip		Antikor bağlı olmayan QCM çip		k'
	Δm	k	Δm	k	
SKBR3	0.44	-	0.063	-	
MDA-MB 231	0.081	5.43	0.071	0.86	6.32
L929 Fibroblast	0.061	7.21	0.071	0.86	8.40



Şekil 4.19. PHEMA nanopartiküllerinin ve HER2, Notch4 ve transferrin bağlı PHEMA partiküllerinin Δm değerleri (1: SKBR3, 2: MDA-MB 231, 3: Fibroblast hücreleri).

Tablo 4.5. HER2, Notch4 ve transferrin bağlı ve bağlı olmayan QCM çip için Δm , k ve k' değerleri.

Hücreler	Antikor bağlı QCM çip		Antikor bağlı olmayan QCM çip		k'
	Δm	k	Δm	k	
SKBR3	0.58	-	0.061	-	-
MDA-MB 231	0.251	2.31	0.051	1.20	1.93
L929 Fibroblast	0.201	2.89	0.071	0.86	3.36

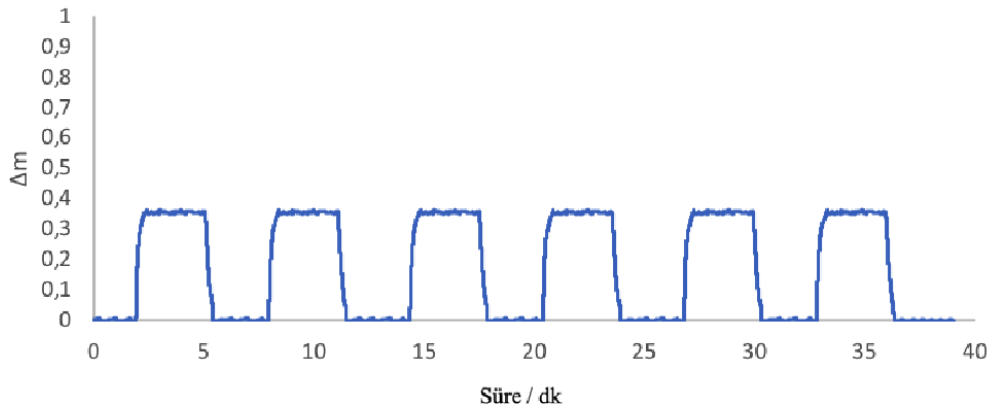
Tablo 4.4 ve 4.5' de yalnız HER2 bağlı ve HER2, Notch4 ve transferrin bağlı sensörlerin seçiciliklerine ilişkin veriler gösterilmiştir. Şekil 4.18' de görüldüğü gibi Δm değerleri grafiksel görsel ile PHEMA ve yalnız HER2 bağlı PHEMA nanopartikülleri için karşılaştırılmıştır. Elde edilen grafikte 1 numaradaki kolon SKBR3 hücrelerinin bağlanmasıyla meydana gelen Δm değerlerindeki artışı temsil etmektedir. Tablo 4.4' de verildiği gibi HER2 bağlı çipte meydana gelen Δm 0.44 iken HER2 bağlı olmayan ve yalnızca PHEMA nanopartiküllerini içeren çipte ise Δm 0.063'dür.

Tablo 4.5 ile Şekil 4.19' da ise çoklu analiz için HER2, Notch4 ve transferrin bağlı PHEMA nanopartiküllerinin Δm değerleri gösterilmektedir. Burada da HER2 bağlı PHEMA partiküllerinde olduğu gibi SKBR3 hücrelerinin membranında bulunan HER2 reseptörüne karşı seçici olduğu gösterilmiştir. SKBR3 için HER2,

Notch4 ve transferrin bağılı çipte Δm değeri 0.58 iken yalnızca PHEMA bağılı çipte bu değer 0.061' dir.

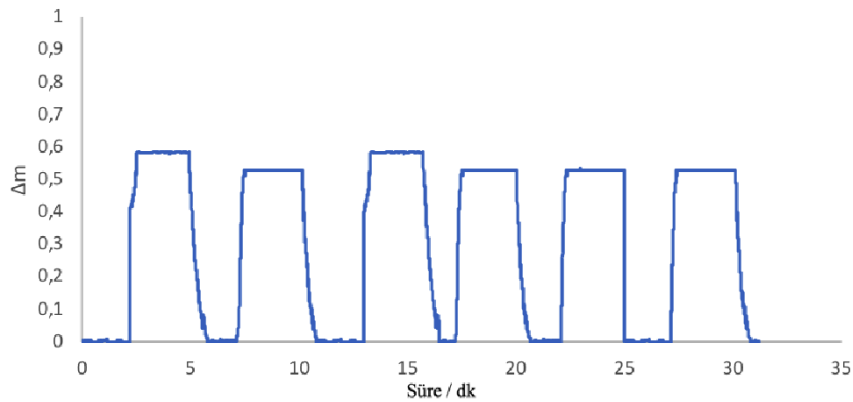
4.5. Tekrar Kullanılabilirlik

Dengeleme bağlayıcı rejenerasyon döngüleri 10-500 SKBR3 hücre/ml kullanılarak 5 kez tekrar edildi.



Şekil 4.20. HER2 bağılı QCM çip için tekrar kullanılabilirlik değerleri için yapılan rejenerasyon döngüleri.

Şekil 4.20' de gösterildiği gibi HER2 bağılı QCM çipin 5 döngü boyunca bağlanma kapasitesinde herhangi bir azalma olmadığı gösterilmiş ve tekrar kullanılabilirliği 250 hücre/ml olarak bulunmuştur.



Şekil 4.21. HER2, Notch4 ve transferrin bağılı QCM çip için tekrar kullanılabilirlik değerleri için yapılan rejenerasyon döngüleri.

Şekil 4.21' de ise HER2, Notch4 ve transferrin bağı QCM çipin 5 döngü boyunca bağlanma kapasitesinde herhangi bir azalma olmadığı gösterilmiş ve tekrar kullanılabilirliği 500 hücre/ml olarak bulunmuştur.



5. TARTIŞMA

Reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olan HER2 membran reseptörü normal ve malignant kanser hücrelerinin önemli birçok hücresel sinyalleşme yolunda görev almaktadır. HER2, yalnız meme epitel hücrelerinde bulunmayıp aynı zamanda kolon, mide, yumurtalık, akciğer ve rahim hücre epitelinde de bulunmaktadır. HER2 ekspresyonundaki aşırı artış bu bölgelerde kanser hücrelerinin oluşumuna, tümörün sağ kalımı ve metastazı için de gerekli olan anjiyogenez ile agresif davranışlarına katkıda bulunmaktadır [28, 122]. Bu nedenle yüksek HER2 ekspresyonu yüksek mortalite oranı ve insidansı ile meme kanseri hastalarında kötü prognoz ile ilişkilidir [123]. Dolayısıyla HER2 ile ilişkili tanıma testlerinin ve yöntemlerinin önemi giderek artmaktadır. Yapılan tez çalışmasında HER2 pozitif meme kanseri hücrelerinin erken tespit edilebilmesine imkân tanıyabilecek kullanımı kolay, güvenilir, etkili, hızlı, duyarlı, özgül ve doğrudan gerçek zamanlı izlemeye olanak sağlayan QCM sensör sistemi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Molekül tanıma sistemleri ve stratejileri işaretli ve işaret gerektirmeyen sistemler olarak ikiye ayrılmaktadır. İşaretli sistemlerde, hedef molekül veya moleküler aktiviteyi belirlemek etmek için kimyasal veya geçici olarak bağlanıp molekülün yapısal özelliklerini potansiyel olarak değiştirebilen hedef molekülden farklı moleküller kullanılmaktadır. Bu yabancı moleküller floresan, kemilüminesan veya elektrokimyasal yapıda olabilmekte ve hedeflenen molekülün analizine imkân tanımaktadır. İşaret gerektirmeyen sistemlerde ise hedef molekülü veya moleküler aktiviteyi belirlemek için moleküler ağırlık, kırılma indeksi veya moleküler yük gibi biyofiziksel özellikler kullanılmaktadır [96]. Yapılan çalışmada kütle artışına dayalı, işaretleme gerektirmeyen QCM temelli bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir. İşaretleme gerektirmeyen sistemler, numune hazırlamak için gereken maliyet ile zamanı önemli ölçüde azaltmaları ve gerçekleşen reaksiyonların eş zamanlı olarak doğrudan ve kolay takibini sağlamaları açısından oldukça faydalı sistemlerdir. İşaretleme gerektirmeyen sistemler, çeşitli alanlarda sundukları birçok avantajları nedeniyle günümüz teknolojik sistemlerinde ve birçok klinik çalışmada ilgi odağı haline gelmiştir. Bu nedenle geliştirilen HER2 bağlı QCM sisteminin işaret gerektirmeyen bir sistem olması maliyet, eş zamanlı ölçüm ve zaman açısından

sunduğu kolaylıklarla klinik alanda uygulanan birçok tanı yöntemlerine göre oldukça avantajlıdır.

QCM sensör yüzeyinde bulunan altın yüzey sahip olduğu hidrofobisite nedeniyle hidrofilik molekülleri yüzeyine bağlaması mümkün değildir. Bu nedenle tez çalışmasında geliştirilmesi hedeflenen HER2 antikor bağlı QCM çipin işlevselleştirilebilmesi için altın yüzeyin hidrofilik bir yapı ile modifiye edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla sahip olduğu -OH gruplarıyla hidrofilik olduğu bilinen ve daha önce QCM üzerine eklenerek QCM çipin altın yüzeyinin modifikasyonunu sağlayarak çip yüzey alanını ve hassasiyetini arttıran poli 2-hidroksietilmetakrilat nanopartikülleri (PHEMA) tercih edilmiştir [108, 109, 124]. Hassasiyetin ve yüzey alanının arttırılması, HER2 ekspresyonunun arttığı SKBR3 hücrelerinin seçici tespiti için önemlidir. Bu nedenle ilk olarak PHEMA sentezlendi ve QCM çip yüzeyine UV ışık yardımıyla tutturuldu (fiksasyon). Çip yüzeyine PHEMA nanopartiküllerinin tutturulmasından sonra yapılan işlemin kantitasyonu için çeşitli karakterizasyonlar yapıldı. PHEMA nanopartikülleri FTIR ile karakterize edilirken QCM çip yüzeyi elipsometri, temas açısı ölçümleri ve atomik kuvvet mikroskopisi ile analiz edilmiştir.

FTIR yöntemi ile PHEMA nanopartiküllerinin moleküler bağ karakterizasyonu yapılmıştır. PHEMA yapısındaki fonksiyonel grupların analizi ile monomer ve polimer yapıdaki bileşiğin aynı olup olmadığı, bağlanma yerleri ve yapıdaki bağların durumu incelenerek polimerleşmenin gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmiştir. FTIR ölçümünde moleküldeki her bir fonksiyonel grubun spesifik infrared bantları bulunmaktadır [125]. FTIR ölçümleri sonucunda Şekil 4.3' de gösterildiği gibi 2925 cm^{-1} ' deki bandın ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$) gerilmesine, 1722 cm^{-1} 'deki bandın HEMA ester grubunun (C=O) karboniline, 3417 cm^{-1} ' deki geniş bandın ise HEMA' da bulunan hidroksil grubunun (-OH) karakteristik gerilmesine ait olduğu gösterildi. Bu sonuçlardan PHEMA nanopartiküllerinin HEMA monomerinden sentezinin başarılı bir şekilde tamamlandığı ve QCM çip yüzeyine bağlandığı saptandı.

Şekil 4.5 ve Şekil 4.7' de sırasıyla boş QCM yüzeyi ve PHEMA kaplı QCM yüzeyi verilmiştir. Elipsometre yöntemiyle elde edilen verilerle QCM yüzeyindeki 87 nm ' lik kalınlık artışıyla sentezlenen 73.22 nm ' lik PHEMA nanopartiküllerin

boyutları arasında doğru orantı bulunmuş ve QCM yüzeyin PHEMA ile başarılı bir şekilde kaplandığı anlaşılmıştır. Elipsometre ölçümlerinden QCM çip yüzeyinin PHEMA ile kaplandığı gösterildikten sonra temas açısı ölçümleri yapılarak yüzey hidrofobisitesi değerlendirilmiştir. Şekil 4.6 ve Şekil 4.8’ de sırasıyla boş QCM çipinin ve PHEMA kaplı QCM çipinin yüzeylerine damlatılan suyun altın yüzey ile oluşturduğu açılar gösterilmiştir. Tablo 4.1’ de 5 kez tekrarlanan ve ortalaması alınan temas açısı verileri özetlenmiştir. Yüzeydeki hidrofobisite azaldıkça su damlasının çip yüzeyi ile yapacağı açının da düşmesi beklenmektedir. Ölçümler sonucunda boş QCM yüzeyine damlatılan su damlası ile yüzey arasındaki açı, nanopartikül kaplı çip yüzeyinin su damlası ile arasındaki açıdan yaklaşık 28° daha fazla bulunmuştur. Daha önceki QCM ile ilişkili çalışmalarda çip yüzeyinin özellikle hidrofilik molekülleri bağlamaya uygun hale getirilmesi için PHEMA ile modifikasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir [108, 109, 125]. Burada da, normalde hidrofobik olan altın yüzeyin nanopartiküllerle kaplanarak hidrofilik özelliğinin artırıldığı dolayısıyla antikorların ve transferrinin bağlanması için uygun bir yüzey oluşturulduğu gösterilmiş oldu. Ayrıca Şekil 4.9’ da verilen SEM analiz görüntüsü ile PHEMA nanopartiküllerinin QCM yüzeyinde homojen olarak dağılım gösterdikleri ve tüm yüzeyi kapladıkları gösterilmiştir. PHEMA ile altın çip yüzeyi kaplandıktan sonra HER2 reseptör antikoru ile modifiye edilerek SKBR3 meme kanseri hücrelerinin yüksek seçicilik ve hassasiyet ile tespiti amaçlandı.

Şekil 4.15 ve 4.16’ da bulunan sırasıyla boş QCM çipinin altın yüzeyi için ve PHEMA kaplı QCM yüzeyi için FTIR analiz sonuçları verilmiştir. Şekil 4.15’ de 2854 cm^{-1} ile 2926 cm^{-1} arasındaki bant yüzeyde bulunan altın elementinin C-H bağının gerilmesine aittir. PHEMA nanopartiküllerinin bağları FTIR analizi sonucunda elde edilen spesifik bant aralıkları Şekil 4.3’ de verilmiştir. Şekil 4.17’ de boş QCM çip yüzeyi, PHEMA nanopartikülleri ve PHEMA kaplı QCM çip yüzeyi için karşılaştırılmış FTIR sonucu verilmiştir. Şekil 4.17’ ye bakılarak karşılaştırılma yapıldığında, C-H bağ gerilmesinin yerini 3234 cm^{-1} ’ de PHEMA’ da bulunan -OH grubunun bağ gerilmesi aldığı görülmektedir. Aynı şekilde 1725 cm^{-1} ’ de PHEMA’ nın C=O bağının gerilmesi, çip üzerinde 1742 cm^{-1} ’ deki aldehit bağ [7] gerilmesinin yerini almıştır. Altın elementinin 851 cm^{-1} ’ de bulunan geniş aromatik C-H bağ gerilmesinin yerini ise 1140 cm^{-1} ’ de ester (-C-O-C) grubu almıştır. Tüm bu

karşılaştırmalı sonuçlardan elde edilen verilerle, QCM çipinin altın yüzeyinin PHEMA nanopartikülleriyle başarılı bir şekilde kaplandığı gösterilmiştir.

Temas açısı, elipsometre ve SEM analizlerine ek olarak boş QCM çip yüzeyi, PHEMA kaplı QCM çip yüzeyi ve PHEMA ile HER2 antikorunun bağlı olduğu çip yüzeyi için AFM analizleri yapıldı. AFM analizleri ile çip yüzeyinin ayrıntılı morfolojisi görüntülenerek temas açısı ölçümlerinde elde edilen kalınlık değişimlerine 3 boyutlu görüntüler ile kantitasyon sağlandı. Şekil 4.10, 4.11 ve 4.13' de sırasıyla boş QCM altın yüzeyinin, PHEMA kaplı QCM yüzeyinin ve PHEMA ile HER2 antikorunun kaplı olduğu QCM yüzeyinin 5 μm ' lik alanda morfolojisi gösterilmektedir. Elde edilen AFM görüntüleriyle sensör yüzeyinde PHEMA' dan oluşan polimerik nanopartikül yapısının homojen bir şekilde oluşturulduğu açıkça gösterilmektedir.

QCM çip yüzeyinin modifikasyonunun ardından yalnız HER2 bağlı çip yüzeyinden eş zamanlı hücre çözeltileri geçirilmiştir. QCM sensör yüzeyi için hücre/cm² birim alanda meydana gelen kütle artışları (Δm) QCM sensör sistemindeki bağlanmayı dolayısıyla seçiciliği belirleyen önemli bir parametredir [120]. Tablo 4.4' de HER2 bağlı QCM sensör yüzeyi için Δm değerleri özetlenmiştir. HER2 bağlı sensör yüzeyinde Δm 0.44 iken HER2 bağlı olmayan ve yalnızca PHEMA nanopartiküllerini içeren çipte ise Δm 0.063 olarak bulunmuştur. Δm değerinde meydana gelen artış, QCM çip yüzeyinde bulunan antikorun hücreleri bağlaması ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Buradaki artıştan da anlaşıldığı gibi QCM sistemi SKBR3 hücre membranında bulunan HER2 reseptörüne seçici olarak bağlanmış ve çip yüzeyinde yaklaşık 7 kat kütle artışına neden olmuştur. MDA-MB 231 hücreleri için yalnız HER2 bağlı çip yüzeyinde Δm değeri 0.081 iken yalnız PHEMA bağlı çip yüzeyinde bu değer 0.071 olarak bulunmuştur. Fibroblast hücreleri için ise bu değerler sırasıyla 0.061 ve 0.071 olarak elde edilmiştir. MDA-MB 231 hücreleri için yalnız HER2 bağlı çip yüzeyindeki kütle artışı yaklaşık 1.14 kat iken fibroblast hücreleri için çip yüzeyinde herhangi bir kütle artışı meydana gelmemiştir. Aynı zamanda HER2 bağlı QCM çipten elde edilen seçicilik katsayıları da karşılaştırılmalı olarak Tablo 4.4' de özetlenmiştir. HER2 bağlı çip, HER2 bağlı olmayan çiple karşılaştırıldığında, SKBR3 hücreleri MDA-MB 231 hücrelerine göre 6.32 kat, fibroblast hücrelerine göre ise 8.40 kat daha fazla seçiciliğe sahip olarak

bulunmuştur. Böylelikle QCM etkinliğinin SKBR3 hücrelerini hassas tespit etmesi için HER2 antikorunu kullanılarak artırılabilmesi gösterilmiştir.

Eş zamanlı hücre analizlerinin ardından HER2 bağlı QCM çipin tespit limiti (LOD) 10 hücre/ ml olarak bulunmuştur. Şimdiye kadar literatürde bulunan HER2 antikoruna spesifik en hassas tespit sağlayan sistem Zhu, Y. ve arkadaşları tarafından yapılmıştır ve LOD değeri 26 hücre/ ml' dir. Zhu, Y. ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada SKBR3 hücrelerini HER2 reseptörü aracılığıyla tespiti için anti-HER2 antikorunu AuNP'lere absorbe ettikten sonra camsı karbon elektrot yüzeyine immobilize ettikleri sandviç yapısını kullanmıştır. Daha sonra HER2 reseptörlerine özgü RNA aptamerleri tarafından modifiye edilmiş AuNP'ler kullanmışlardır. Hidrazin ile indirgenen gümüş iyonları AuNP'lerde depolanmış, kare dalga voltametriyle tespit edilmiş ve sistemin LOD değeri 26 hücre/ ml olarak bulunmuştur [126]. Bu tez çalışmasında geliştirilen HER2 bağlı QCM sensör ise elde edilen 10 hücre/ ml LOD değeriyle daha hassas bir sensör modeli oluşturmuştur. Bunun nedenleri aptamer değil antikor kullanılmış olması, altın değil polimerik nanopartikül kullanılması ve QCM temelli olmasıdır. Dolayısıyla, hassasiyetine ek olarak maliyet açısından da avantajlıdır.

Literatürde daha önce HER2 tanıyaya yönelik QCM sistemi bulunmasa da HER2 hedefli başka sensör çalışmaları bulunmaktadır. Örneğin, Poturnayová, A. ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, HER2 reseptörüne spesifik akustik aptasensör geliştirilmiş ancak hücre saptama sınırlarını HB5 aptamer temelli sensörde 1574 ml/ hücre, HeA2_3 aptamer temelli sensörde ise 1418 hücre/ml'den 550 hücre/ ml' ye düşürebilmişlerdir [127]. Yöntemlerinde akustik sensör yüzeyine neutravidin aracılı biyotinlenmiş DNA aptamerleri immobilize edilmiş ve spesifik tespit yapmışlardır ancak hücre tespit limitleri bu çalışmada yapılan QCM çipin tespit limitinden yüksek bulunmuştur. Ek olarak bu çalışmada DNA aptamerleri veya neutravidin gibi pahalı biyolojik moleküller kullanılmamış, eldesi kolay ve dayanıklı PHEMA partikülleri tercih edilerek yalnızca tek basamakta QCM çip yüzeyi antikor çözeltisi için uygun hale getirilmiştir. PHEMA kullanarak Poturnayová, A. ve arkadaşlarının akustik sensörde karşılaştıkları hücre katman kalınlığının kayma dalgası penetrasyon derinliğine kıyasla büyük olması dolayısıyla hücre tespitini

zorlaşması gibi engellerle karşılaşılmamış ve QCM sisteminin daha kullanışlı olabileceği gösterilmiştir.

Benzer bir çalışmada Lu, W. ve arkadaşları multifonksiyonel (monoklonal anti-HER2 ve S6 RNA aptamer konjugatlı) yuvarlak şekilli AuNP temelli nanokonjugat oluşturmuş, kolorimetrik yöntem ve iki foton saçılması testlerini kullanarak meme kanseri hücrelerini tespit etmişlerdir. Yöntem QCM sensör sistemiyle ilişkili olmasada 100 hücre/ ml gibi hassas LOD değerinde SKBR3 hücrelerini HER2 ekspresyonundan tespit etmişlerdir [128]. Tüm bu yöntemlerin ortak özelliği ise SKBR3 hücrelerini HER2 reseptör aracılı tayin etmeleridir ancak hiçbir çalışmada bu amaca yönelik QCM sensör sistemi kullanılmamıştır.

Tablo 5.1. Meme kanseri hücrelerini tanımaya yönelik yapılmış yöntemler ve LOD değerleri.

Tanım Sistemi	LOD (hücre/ml)	Tanınma Elemanı	Referans
Hidrazin- Au nanopartikül aptamer biyokonjugat	26	HER2	[126]
Oval şekilli Au nanopartikül bazlı kolorimetrik yöntem	100	HER2	[128]
H5B aptamer bazlı akustik sensör	1574	HER2	[127]
HeA2_3 bazlı akustik sensör	1418	HER2	[127]
Au nanopartikül modifiye aptamer	550	HER2	[127]
Kitosan temelli QCM sensör	430	Folik asit	[129]
Sızdıran yüzey akustik dalga aptasensör	32	MUC1	[130]
QCM sensör	500	Transferrin	[108]
Elektrokimyasal impedans sitosensör	10	Mannoz	[131]
Elektrokimyasal impedans spektroskopisi	10	EpCAM	[132]
QCM sensör	12	Notch4	[109]

Tablo 5.1' de de görüldüğü gibi daha önce yapılmış çalışmalarda HER2 reseptörünü tanımaya yönelik geliştirilen düşük LOD değerine sahip bir QCM sistemi bulunmamaktadır ve bu nedenle yapılan bu çalışma öncü niteliktedir. Bu tez çalışması QCM ve antikor-ligant bağlı sistemde denenen ilk çalışma olarak, QCM etkinliğinin HER2 antikorunu kullanılarak HER2 pozitif agresif tümör hücrelerinin hassas tespitinde etkin bir sistem oluşturulabileceğini göstermiştir. Daha önceki

çalışmalarda Notch4 ve transferrin bağlı QCM sistemleri kullanılmıştır ancak SKBR3 hücresiyle denenmemiş olmalarının yanı sıra LOD değerleri geliştirmiş olduğumuz QCM sisteminden daha yksek bulunmuştur.

HER2 bağlı QCM sensrünün yanı sıra daha nce yapılan QCM ile antijen-antikor temelinde dayalı hcre tespit sistemlerine ek olarak bu çalışmada uę farklı reseptre nzeğli antikor ve ligant ile işlevselleştirilen QCM sensrlerinin etkinlikleri karşılaştırılarak geliştirilen en etkin sensr sisteminin belirlenmesi amaçlandı. Laboratuvarımızda daha nce yapılan QCM-transferrin [108] ve QCM-Notch4 [109] sistemlerine ek olarak, bu çalışmada HER2, transferrin ve Notch4 antikorunu bir arada QCM ip yzeyeine bağlanarak çoklu antikor/ligantla işlevselleştirilmiş ilk QCM bazlı sistem elde edilmiştir.

Çoklu analiz için yapılan HER2, Notch4 ve transferrinin bağlı olduğu QCM sensr yzeyi için Δm değerleri Tablo 4.5’ de nzetlenmiştir. HER2, Notch4 ve transferrinin bağlı olduğu ipte SKBR3 hücresi için Δm değeri 0.58 iken yalnızca PHEMA nanopartiküllerinin bağlı olduğu ip yzeyi için bu değer 0.061’dir. Burada HER2, Notch4 ve transferrinin bağlı olduğu QCM yzeyinde SKBR3 hücresi için yalnızca PHEMA bağlı yzeye gne yaklaşık 9.5 kat ktle artışı elde edilmiştir. MDA-MB 231 için bu değerler sırasıyla 0.251 ve 0.051 iken fibroblast hücresi için 0.201 ve 0.071’dir. MDA-MB 231 hücresi için ip yzeyinde meydana gelen ktle artışı yaklaşık 4,9 kat iken fibroblast hücresi için bu artış yaklaşık 2,8 kat olarak elde edilmiştir. HER2, Notch4 ve transferrinin bağlı olduğu ipte SKBR3 için 9.5 kat ktle artışı elde edilmiş olmasına rağmen HER2 bağlı çipte 7 kat ktle artışı meydana gelmiştir. Bunun nedeni ip yzeyinde bulunan transferrinin de hcre tanınmasında katkı sağlamasındandır. Transferrin, tm memeli hcrelerinde oksijen transportu, enerji metabolizması, hcre bnymesi gibi birçok metabolik yollarda nnel rol oynayan demir elementinin hcrelere alımından sorumlu glikoprotein yapılı bir membran proteindir [133]. Bu nedenle kanser gelişimine katkı sağlayan nnel reseptrlerden biri olup kanser gelişimi sırasında kanser hcrelerinin membranlarında ekspresyonları artmaktadır [86]. Transferrinin hcre metabolizmasındaki rolü nedeniyle kanser ve kanser olmayan hcrelerin membranında bulduklarından, QCM ip üzerinde bağlanan transferrinle SKBR3 hcrelerine ek olarak fibroblast ve MDA-MB 231 hcreleri de transferrin aracılığıyla

bağlanarak tanınmıştır. Transferrine ek olarak Notch4, poliferasyon, farklılaşma ve apoptozis gibi önemli hücrel gelişim yollarında rol alan diğer bir membran proteindir [51]. Artmış Notch4 ekspresyon seviyeleri kanser kök hücrelerinin devamlılığını sağlayan γ -sekretaz ile ilişkili sinyalleri indüklemekte ve kanser hücrelerinin devamlılığını sağlamaktadır [134]. Daha önceki yapılan çalışmalarda MDA-MB 231 hücrelerinde artmış Notch4 ekspresyonu belirlenmiş ve potansiyel terapi hedefi olarak gösterilmiştir [135]. Her ne kadar hücre tanınmasında Notch4 ve transferrinin de katkısı olsa da yalnız SKBR3 için seçiciliğin sağlanabilmesi burada önem taşımaktadır. Yalnız HER2 bağlı çip yüzeyinde MDA-MB 231 hücreleri için 1.14 kat kütle artışı meydana gelirken HER2, Notch4 ve transferrinin bağlı olduğu çip yüzeyinde bu kütle artışı 4.9 kat olarak elde edilmiştir. Bu sonuçtan da anlaşıldığı üzere yalnız HER2 bağlı çip yüzeyi SKBR3 hücrelerini seçici tanıma konusunda daha etkilidir. Elde edilen Δm değerlerine dayanarak HER2 bağlı QCM çipinin amaçlandığı gibi fibroblast veya MDA-MB 231 hücreleri için değil yalnızca SKBR3 hücreleri için seçici olduğu gösterilmiştir.

HER2, Notch4 ve transferrin bağlı QCM çipten elde edilen seçicilik katsayıları karşılaştırılmalı olarak Tablo 4.5' de özetlenmiştir. Elde edilen verilerden HER2, Notch4 ve transferrinin bağlı olduğu çipte, HER2, Notch4 ve transferrinin bağlı olmadığı çipe kıyasla SKBR3 hücreleri, MDA-MB 231 hücrelerine göre 1.93, fibroblast hücrelerine göre ise 3.36 kat daha fazla seçiciliğe sahip olarak bulunmuştur. Ancak yalnızca HER2 bağlı çipten farklı olarak HER2, Notch4 ve transferrin bağlı çipte MDA-MB 231 hücreleri ile fibroblast için de bir bağlanma söz konusudur. HER2, Notch4 ve transferrin bağlı QCM çipinde MDA-MB 231 hücreleri için SKBR3 hücrelerine kıyasla 1.93 kat daha az seçicilik bulunmuştur ancak yine de QCM çip tarafından MDA-MB 231 hücreleri tanınmıştır. Bunun nedeni, Notch4'ün MDA-MB 231 hücrelerinde aşırı ekspresyona sahip olması ve çip üzerinde bulunan Notch4 antikoru tarafından tanınıp tutulmasıdır.

HER2, Notch4 ve transferrin bağlı QCM çiptin LOD değeri 4 hücre/ ml olarak bulunmuştur. Elde edilen verilerle daha önce QCM-transferrin kullanılarak yapılan QCM sistemi [108] karşılaştırıldığında 3 farklı reseptör ligant etkileşiminin olduğu HER2, Notch4 ve transferrin bağlı çipin, Tablo 5.1' de gösterilen QCM-transferrin sisteminin 500 LOD değerine karşılık düşük 4 LOD değeri ile birden fazla

antikor kullanıldığında daha hassas hücre tespiti sağladığı belirlendi. Ayrıca QCM ve antikor kullanılarak yapılmış diğer bir çalışmada da, QCM-Notch4 kullanılarak MDA-MB 231 tespitinde kullanılan sensör sisteminin LOD değeri 12 olarak bulunmuştur [109] ve buradan da bu çalışmada geliştirilen HER2, Notch4 ve transferrin bağlı QCM çipinden elde edilen 4 LOD değeri ile yine 3 farklı reseptör ligant etkileşiminin hücre tespitinde şimdiye kadar yapılan tüm çalışmalardan daha hassas ölçümler sağladığı gösterilmiş oldu.

Ayrıca tekrar kullanılabilirlik testleri her iki çip yüzeyi için de uygulanmıştır. Şekil 4.20' de gösterildiği gibi yalnız HER2 bağlı çipin tekrar kullanılabilirliği 250 hücre/ml iken Şekil 4.21' de gösterilen HER2, Notch4 ve transferrin bağlı çipin tekrar kullanılabilirliği 500 hücre/ml olarak bulunmuştur. Elde edilen verilerden de anlaşıldığı üzere, hazırlanan her iki QCM çipi de uzun süre tekrar kullanılabilir olup aynı zamanda 5 döngü boyunca bağlanma kapasitelerinde bir değişiklik olmadığı için stabil yapıdadırlar.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

QCM çip yüzey alanının artırılması ve yüzey hidrofobitesinin azaltılarak antikör bağlanmasına uygun hale getirilmesi için hidrofilik PHEMA nanopartikülleri EDMA ve HEMA' dan sentezlendi.

Sentezlenen PHEMA' nın uygun boyut ve yapıda başarıyla sentezlendiği Zeta Sizer ve FTIR analizleriyle doğrulandı.

Nanopartiküller QCM çip yüzeyine tutturuldu ve nanopartikül bağlı çip yüzeyinin özellikleri, temas açısı ölçümleri, elipsometre, SEM ve AFM ile incelenerek yüzeydeki kalınlık artışı ve hidrofobitesinin azalmasıyla QCM yüzeyinin modifikasyonunun istenen şekilde gerçekleştirildiği saptandı.

Boş QCM çip yüzeyi, PHEMA bağlı çip yüzeyi ve HER2 ile modifiye edilmiş çip yüzeyinin morfolojisi AFM ile inceleme sonucunda nanopartiküllerin çip yüzeyinde homojen olarak dağıldığı ve HER2 antikoru ile yüzeyin modifikasyonunun gerçekleştiği doğrulandı.

SKBR3, MDA-MB 231 ve fibroblast hücreleri 10-500 hücre/ml olacak şekilde HER2 antikör ile işlevselleştirilmiş çip yüzeyinden geçirilerek yapılan ölçümlerde elde edilen Δm , k ve LOD değerleriyle HER2 ile işlevselleştirilmiş QCM çipin SKBR3 hücrelerini seçici ve hassas şekilde tespit edebildiği anlaşıldı. Hücre bağlanma kinetiğinin Freundlich izoterm modeline uygun olduğu saptandı.

HER2, Notch4 antikörleriyle ve transferrin ile işlevselleştirilerek yine QCM temelli bir çoklu analiz sistemi geliştirildi. Böylece, SKBR3, MDA-MB 231 ve fibroblast hücreleriyle elde edilen Δm , k ve LOD değerleri göz önüne alınarak, HER2, Notch4 ve transferrin ile işlevselleştirilmiş QCM çipin SKBR3 hücrelerini daha önceki yapılmış çalışmalara göre daha hassas ve seçici şekilde tespit edebildiği saptandı, farklı reseptör ligant etkileşiminin hücre tespitine katkı sağlayarak daha hassas ölçümlere olanak verdiği gösterildi. Bu sensör sisteminde de bağlanma kinetiğinin Langmuir izoterm modeline uygun olduğu anlaşıldı.

HER2 antikör temelli QCM sisteminden daha hassas hücre tanıma amaçlı yöntem bulunmamaktadır. Dolayısıyla QCM sisteminde antikör-antijen temelli HER2 tespit eden bir çalışma ilk kez gerçekleştirildi.

Geliştirilen bu sistemin diğer elektrokimyasal sensörlere göre yüksek afinite ve düşük LOD değeri açısından üstün olduğu saptandı.

Sonuç olarak, tez çalışması sonucunda geliştirilen bu sistem, SKBR3 meme kanseri hücrelerinde incelenmiş olsa da HER2/neu ekspresyonu gösteren diğer meme kanseri hücrelerini ve diğer kanser hücrelerini belirlemek amacıyla kullanılabilir. Etik kurul izni alınmak koşulu ile geliştirilen kanser hücresi tanıyan sensör modelinin ileride kanserin tanı ve takibinde kullanılma potansiyeli bulunmaktadır.



7. KAYNAKLAR

1. Bray, Freddie, Ferlay, Jacques, Soerjomataram, Isabelle, et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018. **68**(6): p. 394-424.
2. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., et al., *Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods*. International Journal of Cancer, 2019. **144**(8): p. 1941-1953.
3. Dagogo-Jack, Ibiayi and Shaw, Alice T., *Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2017. **15**: p. 81.
4. Seyfried, Thomas N. and Huysentruyt, Leanne C., *On the origin of cancer metastasis*. Critical reviews in oncogenesis, 2013. **18**(1-2): p. 43-73.
5. Akhtar, Mohd Javed, Ahamed, Maqsood, Alhadlaq, Hisham A., et al., *Targeted anticancer therapy: Overexpressed receptors and nanotechnology*. Clinica Chimica Acta, 2014. **436**: p. 78-92.
6. Siegel, Rebecca L., Miller, Kimberly D., and Jemal, Ahmedin, *Cancer statistics, 2019*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2019. **69**(1): p. 7-34.
7. Chang, Ying-Feng, Hung, Shuo-Hui, Lee, Yi-Jang, et al., *Discrimination of Breast Cancer by Measuring Prostate-Specific Antigen Levels in Women's Serum*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(13): p. 5324-5328.
8. Schiffman, J. D., Fisher, P. G., and Gibbs, P., *Early detection of cancer: past, present, and future*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2015: p. 57-65.
9. Roy, PS and Saikia, BJ, *Cancer and cure: A critical analysis*. Indian Journal of Cancer, 2016. **53**(3): p. 441-442.
10. Boyd, Norman F., Guo, Helen, Martin, Lisa J., et al., *Mammographic Density and the Risk and Detection of Breast Cancer*. New England Journal of Medicine, 2007. **356**(3): p. 227-236.
11. Medicine, Institute of and Council, National Research, *Mammography and Beyond: Developing Technologies for the Early Detection of Breast Cancer: A Non-Technical Summary*, ed. M. Patlak, et al. 2001, Washington, DC: The National Academies Press. 32.
12. Wang, Lulu, *Early Diagnosis of Breast Cancer*. Sensors (Basel, Switzerland), 2017. **17**(7): p. 1572.
13. Wang, Lulu, *Early Diagnosis of Breast Cancer*. Sensors, 2017. **17**(7): p. 1572.
14. Dai, Xiaofeng, Xiang, Liangjian, Li, Ting, et al., *Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes*. Journal of Cancer, 2016. **7**(10): p. 1281-1294.
15. Ali, Shadan, Almhanna, Khaldoun, Chen, Wei, et al., *Differentially expressed miRNAs in the plasma may provide a molecular signature for aggressive*

- pancreatic cancer*. American journal of translational research, 2010. **3**(1): p. 28-47.
16. Sethi, Seema, Kong, Dejuan, Land, Sue, et al., *Comprehensive molecular oncogenomic profiling and miRNA analysis of prostate cancer*. American journal of translational research, 2013. **5**(2): p. 200-211.
 17. Kitkumthorn, Nakarin and Mutirangura, Apiwat, *Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications*. Clinical epigenetics, 2011. **2**(2): p. 315-330.
 18. Lao, Victoria Valinluck and Grady, William M., *Epigenetics and colorectal cancer*. Nature reviews. Gastroenterology & hepatology, 2011. **8**(12): p. 686-700.
 19. Sethi, Seema, Ali, Shadan, Philip, Philip A., et al., *Clinical advances in molecular biomarkers for cancer diagnosis and therapy*. International journal of molecular sciences, 2013. **14**(7): p. 14771-14784.
 20. Heneghan, H. M., Miller, N., Lowery, A. J., et al., *Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer*. Ann Surg, 2010. **251**(3): p. 499-505.
 21. Tothill, Ibtisam E., *Biosensors for cancer markers diagnosis*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2009. **20**(1): p. 55-62.
 22. Weigel, Marion T and Dowsett, Mitch, *Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction*. 2010. **17**(4): p. R245.
 23. Spitale, A., Mazzola, P., Soldini, D., et al., *Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland*. Annals of Oncology, 2008. **20**(4): p. 628-635.
 24. Tang, Ping, Wang, Jianmin, and Bourne, Patria, *Molecular classifications of breast carcinoma with similar terminology and different definitions: are they the same?* Human Pathology, 2008. **39**(4): p. 506-513.
 25. Srivastava, Anubhav and Creek, Darren John, *Discovery and Validation of Clinical Biomarkers of Cancer: A Review Combining Metabolomics and Proteomics*. PROTEOMICS, 2019. **19**(10): p. 1700448.
 26. *Breast cancer by the numbers*. P T, 2014. **39**(3): p. 213-4.
 27. Bertos, N. R. and Park, M., *Breast cancer - one term, many entities?* J Clin Invest, 2011. **121**(10): p. 3789-96.
 28. Dai, Xiaofeng, Li, Ting, Bai, Zhonghu, et al., *Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends*. American journal of cancer research, 2015. **5**(10): p. 2929-2943.
 29. Holliday, Deborah L. and Speirs, Valerie, *Choosing the right cell line for breast cancer research*. Breast cancer research : BCR, 2011. **13**(4): p. 215-215.

30. Kunc, Michał, Biernat, Wojciech, and Senkus-Konefka, Elżbieta, *Estrogen receptor-negative progesterone receptor-positive breast cancer – “Nobody's land” or just an artifact?* Cancer Treatment Reviews, 2018. **67**: p. 78-87.
31. Badowska-Kozakiewicz, Anna M., Patera, Janusz, Sobol, Maria, et al., *The role of oestrogen and progesterone receptors in breast cancer - immunohistochemical evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in invasive breast cancer in women.* Contemporary oncology (Poznan, Poland), 2015. **19**(3): p. 220-225.
32. Yip, Cheng-Har and Rhodes, Anthony, *Estrogen and progesterone receptors in breast cancer.* Future Oncology, 2014. **10**(14): p. 2293-2301.
33. Browne, B. C., O'Brien, N., Duffy, M. J., et al., *HER-2 signaling and inhibition in breast cancer.* Curr Cancer Drug Targets, 2009. **9**(3): p. 419-38.
34. Sauter, Guido, Lee, James, Bartlett, John M.S., et al., *Guidelines for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing: Biologic and Methodologic Considerations.* Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(8): p. 1323-1333.
35. Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., et al., *Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping.* J Cancer, 2017. **8**(16): p. 3131-3141.
36. Ross, J. S. and Fletcher, J. A., *The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy.* Oncologist, 1998. **3**(4): p. 237-252.
37. Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., et al., *A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes.* Cancer Cell, 2006. **10**(6): p. 515-27.
38. Ferretti, G., Felici, A., Papaldo, P., et al., *HER2/neu role in breast cancer: From a prognostic foe to a predictive friend.* Current Opinion in Obstetrics and Gynecology, 2007. **19**(1): p. 56-62.
39. Ahmed, Shahid, Sami, Amer, and Xiang, Jim, *HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer.* Breast Cancer, 2015. **22**(2): p. 101-116.
40. Elmore, Joann G., Barton, Mary B., Mocerri, Victoria M., et al., *Ten-Year Risk of False Positive Screening Mammograms and Clinical Breast Examinations.* New England Journal of Medicine, 1998. **338**(16): p. 1089-1096.
41. McKeage, Kate and Perry, Caroline M., *Trastuzumab.* Drugs, 2002. **62**(1): p. 209-243.
42. Ross, J. S., Fletcher, J. A., Linette, G. P., et al., *The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy.* Oncologist, 2003. **8**(4): p. 307-25.
43. Kontomanolis, Emmanuel N., Kalagasidou, Sofia, Pouliliou, Stamatia, et al., *The Notch Pathway in Breast Cancer Progression.* TheScientificWorldJournal, 2018. **2018**: p. 2415489-2415489.

44. Blanco, R. and Gerhardt, H., *VEGF and Notch in tip and stalk cell selection*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(1): p. a006569.
45. Dufraigne, J., Funahashi, Y., and Kitajewski, J., *Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms*. Oncogene, 2008. **27**(38): p. 5132-7.
46. Aster, J. C., *In brief: Notch signalling in health and disease*. J Pathol, 2014. **232**(1): p. 1-3.
47. Ribatti, D. and Crivellato, E., *"Sprouting angiogenesis", a reappraisal*. Dev Biol, 2012. **372**(2): p. 157-65.
48. Kontomanolis, E. N., Kalagasidou, S., Pouliliou, S., et al., *The Notch Pathway in Breast Cancer Progression*. ScientificWorldJournal, 2018. **2018**: p. 2415489.
49. Hellstrom, M., Phng, L. K., and Gerhardt, H., *VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting*. Cell Adh Migr, 2007. **1**(3): p. 133-6.
50. Dontu, Gabriela, Jackson, Kyle W., McNicholas, Erin, et al., *Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells*. Breast Cancer Research, 2004. **6**(6): p. R605.
51. Wang, Jing-Wei, Wei, Xiao-Long, Dou, Xiao-Wei, et al., *The association between Notch4 expression, and clinicopathological characteristics and clinical outcomes in patients with breast cancer*. Oncology letters, 2018. **15**(6): p. 8749-8755.
52. Harrison, Hannah, Farnie, Gillian, Howell, Sacha J., et al., *Regulation of Breast Cancer Stem Cell Activity by Signaling through the Notch4 Receptor*. Cancer Research, 2010. **70**(2): p. 709-718.
53. Soares, R., Balogh, G., Guo, S., et al., *Evidence for the Notch Signaling Pathway on the Role of Estrogen in Angiogenesis*. Molecular Endocrinology, 2004. **18**(9): p. 2333-2343.
54. Lopez, F, Belloc, F, Lacombe, F, et al., *Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes*. Cytometry, 1991. **12**: p. 42-49.
55. Cheang, M. C., Chia, S. K., Voduc, D., et al., *Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(10): p. 736-50.
56. Viale, G., Giobbie-Hurder, A., Regan, M. M., et al., *Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole*. J Clin Oncol, 2008. **26**(34): p. 5569-75.
57. Ring, B. Z., Seitz, R. S., Beck, R., et al., *Novel prognostic immunohistochemical biomarker panel for estrogen receptor-positive breast cancer*. J Clin Oncol, 2006. **24**(19): p. 3039-47.
58. Tang, S. S. and Gui, G. P., *Biomarkers in the diagnosis of primary and recurrent breast cancer*. Biomark Med, 2012. **6**(5): p. 567-85.

59. Sahin, S., Isik Gonul, I., Cakir, A., et al., *Clinicopathological Significance of the Proliferation Markers Ki67, RacGAP1, and Topoisomerase 2 Alpha in Breast Cancer*. *Int J Surg Pathol*, 2016. **24**(7): p. 607-13.
60. Carbognin, L., Sperduti, I., Fabi, A., et al., *Prognostic impact of proliferation for resected early stage 'pure' invasive lobular breast cancer: Cut-off analysis of Ki67 according to histology and clinical validation*. *Breast*, 2017. **35**: p. 21-26.
61. Ellis, M. J., Suman, V. J., Hoog, J., et al., *Ki67 Proliferation Index as a Tool for Chemotherapy Decisions During and After Neoadjuvant Aromatase Inhibitor Treatment of Breast Cancer: Results From the American College of Surgeons Oncology Group Z1031 Trial (Alliance)*. *J Clin Oncol*, 2017. **35**(10): p. 1061-1069.
62. de Azambuja, E., Cardoso, F., de Castro, G., Jr., et al., *Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients*. *Br J Cancer*, 2007. **96**(10): p. 1504-13.
63. Yerushalmi, R., Woods, R., Ravdin, P. M., et al., *Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(2): p. 174-83.
64. Ahlin, Cecilia, Lundgren, Claudia, Embretsén-Varro, Elin, et al., *High expression of cyclin D1 is associated to high proliferation rate and increased risk of mortality in women with ER-positive but not in ER-negative breast cancers*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2017. **164**(3): p. 667-678.
65. Mohammadizadeh, Fereshteh, Hani, Mohsen, Ranaee, Mohammad, et al., *Role of cyclin D1 in breast carcinoma*. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 2013. **18**(12): p. 1021-1025.
66. O'Leary, B., Finn, R. S., and Turner, N. C., *Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016. **13**(7): p. 417-30.
67. Ravikumar, Gayatri and Ananthamurthy, Anuradha, *Cyclin D1 expression in ductal carcinoma of the breast and its correlation with other prognostic parameters*. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2014. **10**(3): p. 671-675.
68. Ortiz, A. B., Garcia, D., Vicente, Y., et al., *Prognostic significance of cyclin D1 protein expression and gene amplification in invasive breast carcinoma*. *PLoS One*, 2017. **12**(11): p. e0188068.
69. Han, E. K., Sgambato, A., Jiang, W., et al., *Stable overexpression of cyclin D1 in a human mammary epithelial cell line prolongs the S-phase and inhibits growth*. *Oncogene*, 1995. **10**(5): p. 953-61.
70. Keyomarsi, K., Tucker, S. L., Buchholz, T. A., et al., *Cyclin E and survival in patients with breast cancer*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(20): p. 1566-75.
71. Harwell, Richard M., Porter, Donald C., Danes, Christopher, et al., *Processing of Cyclin E Differs between Normal and Tumor Breast Cells*. *Cancer Research*, 2000. **60**(2): p. 481-489.

72. Lopez-Beltran, A., MacLennan, G. T., and Montironi, R., *Cyclin E as molecular marker in the management of breast cancer: a review*. Anal Quant Cytol Histol, 2006. **28**(2): p. 111-4.
73. Wang, L. and Shao, Z. M., *Cyclin e expression and prognosis in breast cancer patients: a meta-analysis of published studies*. Cancer Invest, 2006. **24**(6): p. 581-7.
74. Hunt, K. K., Karakas, C., Ha, M. J., et al., *Cytoplasmic Cyclin E Predicts Recurrence in Patients with Breast Cancer*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(12): p. 2991-3002.
75. Smith, ML and Seo, YR, *Sensitivity of cyclin E-overexpressing cells to cisplatin/taxol combinations*. Anticancer Research, 2000. **20**: p. 2537-2539.
76. Paul, A., Drecourt, A., Petit, F., et al., *FDXR Mutations Cause Sensorial Neuropathies and Expand the Spectrum of Mitochondrial Fe-S-Synthesis Diseases*. Am J Hum Genet, 2017. **101**(4): p. 630-637.
77. Ghosh, C., Seal, M., Mukherjee, S., et al., *Alzheimer's Disease: A Heme-Abeta Perspective*. Acc Chem Res, 2015. **48**(9): p. 2556-64.
78. Drakesmith, H., Nemeth, E., and Ganz, T., *Ironing out Ferroportin*. Cell Metab, 2015. **22**(5): p. 777-87.
79. Kawamoto, Megumi, Horibe, Tomohisa, Kohno, Masayuki, et al., *A novel transferrin receptor-targeted hybrid peptide disintegrates cancer cell membrane to induce rapid killing of cancer cells*. BMC Cancer, 2011. **11**(1): p. 359.
80. Daniels, Tracy R., Bernabeu, Ezequiel, Rodríguez, José A., et al., *The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer*. Biochimica et biophysica acta, 2012. **1820**(3): p. 291-317.
81. Gu, Z., Wang, H., Xia, J., et al., *Decreased ferroportin promotes myeloma cell growth and osteoclast differentiation*. Cancer Res, 2015. **75**(11): p. 2211-21.
82. Ohkuma, M., Haraguchi, N., Ishii, H., et al., *Absence of CD71 transferrin receptor characterizes human gastric adenocarcinoma stem cells*. Ann Surg Oncol, 2012. **19**(4): p. 1357-64.
83. Singh, M., Mugler, K., Hailoo, D. W., et al., *Differential expression of transferrin receptor (TfR) in a spectrum of normal to malignant breast tissues: implications for in situ and invasive carcinoma*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2011. **19**(5): p. 417-23.
84. Yang, D. C., Wang, F., Elliott, R. L., et al., *Expression of transferrin receptor and ferritin H-chain mRNA are associated with clinical and histopathological prognostic indicators in breast cancer*. Anticancer Res, 2001. **21**(1B): p. 541-9.
85. Daniels, T. R., Delgado, T., Rodriguez, J. A., et al., *The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer*. Clin Immunol, 2006. **121**(2): p. 144-58.

86. Rychtarcikova, Z., Lettlova, S., Tomkova, V., et al., *Tumor-initiating cells of breast and prostate origin show alterations in the expression of genes related to iron metabolism*. *Oncotarget*, 2017. **8**(4): p. 6376-6398.
87. Wang, B., Zhang, J., Song, F., et al., *EGFR regulates iron homeostasis to promote cancer growth through redistribution of transferrin receptor 1*. *Cancer Lett*, 2016. **381**(2): p. 331-40.
88. Miller, L. D., Coffman, L. G., Chou, J. W., et al., *An iron regulatory gene signature predicts outcome in breast cancer*. *Cancer Res*, 2011. **71**(21): p. 6728-37.
89. Bohunicky, Brian and Mousa, Shaker A., *Biosensors: the new wave in cancer diagnosis*. *Nanotechnology, science and applications*, 2010. **4**: p. 1-10.
90. Mehrotra, P., *Biosensors and their applications - A review*. *J Oral Biol Craniofac Res*, 2016. **6**(2): p. 153-9.
91. Monošík, Rastislav, Stred'anský, Miroslav, and Šturdík, Ernest, *Biosensors - classification, characterization and new trends*. 2012. **5**(1): p. 109.
92. Tombelli, Sara, Minunni, Maria, and Mascini, Marco, *Piezoelectric biosensors: strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices*. *Methods (San Diego, Calif.)*, 2005. **37**(1): p. 48-56.
93. Janshoff, A., Galla, H. J., and Steinem, C., *Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors-An Alternative to Optical Biosensors?* *Angew Chem Int Ed Engl*, 2000. **39**(22): p. 4004-4032.
94. Zhang, Yuqian, Yang, Dongliang, Weng, Lixing, et al., *Early Lung Cancer Diagnosis by Biosensors*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013. **14**(8): p. 15479-15509.
95. Steinem, Claudia and Janshoff, Andreas, *Piezoelectric sensors*. Vol. 5. 2007: Springer Science & Business Media.
96. Syahir, A., Usui, K., Tomizaki, K. Y., et al., *Label and Label-Free Detection Techniques for Protein Microarrays*. *Microarrays (Basel)*, 2015. **4**(2): p. 228-44.
97. Huang, X. H., Pan, W., Hu, J. G., et al., *The Exploration and Confirmation of the Maximum Mass Sensitivity of Quartz Crystal Microbalance*. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 2018. **65**(10): p. 1888-1892.
98. Sin, Mandy L. Y., Mach, Kathleen E., Wong, Pak Kin, et al., *Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases*. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2014. **14**(2): p. 225-244.
99. Bragazzi, Nicola Luigi, Amicizia, Daniela, Panatto, Donatella, et al., *Chapter Six - Quartz-Crystal Microbalance (QCM) for Public Health: An Overview of Its Applications*, in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, R. Donev, Editor. 2015, Academic Press. p. 149-211.
100. O'Sullivan, C. K. and Guilbault, G. G., *Commercial quartz crystal microbalances - Theory and applications*. *Biosensors and Bioelectronics*, 1999. **14**(8-9): p. 663-670.

101. Sauerbrey, Günter, *Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung*. Zeitschrift für Physik, 1959. **155**(2): p. 206-222.
102. Rodahl, Michael and Kasemo, Bengt, *A simple setup to simultaneously measure the resonant frequency and the absolute dissipation factor of a quartz crystal microbalance*. Review of Scientific Instruments, 1996. **67**(9): p. 3238-3241.
103. Dixon, M. C., *Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring: Enabling real-time characterization of biological materials and their interactions*. Journal of Biomolecular Techniques, 2008. **19**(3): p. 151-158.
104. Cooper, M. A., *Label-free screening of bio-molecular interactions*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003. **377**(5): p. 834-842.
105. Zeng, X., Shen, Z., and Mernaugh, R., *Recombinant antibodies and their use in biosensors*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012. **402**(10): p. 3027-3038.
106. Badila, E., Japie, C., and Bartos, D., *Cancer biomarkers in clinical practice*. Rom J Intern Med, 2014. **52**(4): p. 223-32.
107. Wang, Joseph, *Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics*. Biosensors and Bioelectronics, 2006. **21**(10): p. 1887-1892.
108. Atay, Seda, Piskin, Kevser, Yilmaz, Fatma, et al., *Quartz crystal microbalance based biosensors for detecting highly metastatic breast cancer cells via their transferrin receptors*. Analytical Methods, 2016. **8**(1): p. 153-161.
109. Bakhshpour, Monireh, Piskin, Ayse Kevser, Yavuz, Handan, et al., *Quartz crystal microbalance biosensor for label-free MDA MB 231 cancer cell detection via notch-4 receptor*. Talanta, 2019. **204**: p. 840-845.
110. Yardley, Denise A., Kaufman, Peter A., Huang, Weidong, et al., *Quantitative measurement of HER2 expression in breast cancers: comparison with 'real-world' routine HER2 testing in a multicenter Collaborative Biomarker Study and correlation with overall survival*. Breast cancer research : BCR, 2015. **17**(1): p. 41-41.
111. Zakrzewski, Falk, de Back, Walter, Weigert, Martin, et al., *Automated detection of the HER2 gene amplification status in Fluorescence in situ hybridization images for the diagnostics of cancer tissues*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 8231.
112. Heydari, Somayeh and Haghayegh, Gholam Hossein, *Application of Nanoparticles in Quartz Crystal Microbalance Biosensors*. Journal of Sensor Technology, 2014. **Vol.04No.02**: p. 20.
113. Liu, Li-shang, Wu, Congcong, and Zhang, Shusheng, *Ultrasensitive Detection of DNA and Ramos Cell Using In Situ Selective Crystallization Based Quartz Crystal Microbalance*. Analytical Chemistry, 2017. **89**(7): p. 4309-4313.

114. Liu, L. S., Wu, C., and Zhang, S., *Ultrasensitive Detection of DNA and Ramos Cell Using In Situ Selective Crystallization Based Quartz Crystal Microbalance*. *Anal Chem*, 2017. **89**(7): p. 4309-4313.
115. Shen, Zhi-Qiang, Wang, Jing-Feng, Qiu, Zhi-Gang, et al., *QCM immunosensor detection of Escherichia coli O157:H7 based on beacon immunomagnetic nanoparticles and catalytic growth of colloidal gold*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. **26**(7): p. 3376-3381.
116. Morris, Todd, Kloepper, Kathy, Wilson, Scott, et al., *A Spectroscopic Study of Mercury Vapor Adsorption on Gold Nanoparticle Films*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2002. **254**(1): p. 49-55.
117. Clogston, J. D. and Patri, A. K., *Zeta potential measurement*. *Methods Mol Biol*, 2011. **697**: p. 63-70.
118. Zhou, Y., Gao, C., and Guo, Y., *UV assisted ultrasensitive trace NO₂ gas sensing based on few-layer MoS₂ nanosheet-ZnO nanowire heterojunctions at room temperature*. *Journal of Materials Chemistry A*, 2018. **6**(22): p. 10286-10296.
119. Shrivastava, Alankar and Gupta, Vipin, *Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods*. *Chronicles of Young Scientists*, 2011. **2**(1): p. 21-25.
120. Foo, K. Y. and Hameed, B. H., *Insights into the modeling of adsorption isotherm systems*. *Chemical Engineering Journal*, 2010. **156**(1): p. 2-10.
121. Ayawei, Nimibofa, Ebelegi, Augustus Newton, and Wankasi, Donbebe, *Modelling and Interpretation of Adsorption Isotherms*. *Journal of Chemistry*, 2017. **2017**: p. 11.
122. Zeng, P., Sun, S., Li, R., et al., *HER2 Upregulates ATF4 to Promote Cell Migration via Activation of ZEB1 and Downregulation of E-Cadherin*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(9).
123. Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X., *Untangling the ErbB signalling network*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(2): p. 127-37.
124. Bakhshpour, Monireh, Özgür, Erdoğan, Bereli, Nilay, et al., *Microcontact imprinted quartz crystal microbalance nanosensor for protein C recognition*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017. **151**: p. 264-270.
125. *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy*, in *Characterization of Materials*. p. 1-33.
126. Zhu, Ye, Chandra, Pranjali, and Shim, Yoon-Bo, *Ultrasensitive and Selective Electrochemical Diagnosis of Breast Cancer Based on a Hydrazine–Au Nanoparticle–Aptamer Bioconjugate*. *Analytical Chemistry*, 2013. **85**(2): p. 1058-1064.
127. Poturnayová, Alexandra, Dzubinová, Ľudmila, Buríková, Monika, et al., *Detection of Breast Cancer Cells Using Acoustics Aptasensor Specific to HER2 Receptors*. *Biosensors*, 2019. **9**(2): p. 72.

128. Lu, Wentong, Arumugam, Sri Ranjini, Senapati, Dulal, et al., *Multifunctional Oval-Shaped Gold-Nanoparticle-Based Selective Detection of Breast Cancer Cells Using Simple Colorimetric and Highly Sensitive Two-Photon Scattering Assay*. ACS Nano, 2010. **4**(3): p. 1739-1749.
129. Zhang, Shaolian, Bai, Haihua, Luo, Jinmei, et al., *A recyclable chitosan-based QCM biosensor for sensitive and selective detection of breast cancer cells in real time*. Analyst, 2014. **139**(23): p. 6259-6265.
130. Chang, Kai, Pi, Yan, Lu, Weiping, et al., *Label-free and high-sensitive detection of human breast cancer cells by aptamer-based leaky surface acoustic wave biosensor array*. Biosensors and Bioelectronics, 2014. **60**: p. 318-324.
131. Tang, Yi-Hsuan, Lin, Han-Chen, Lai, Chiao-Ling, et al., *Mannosyl electrochemical impedance cytosensor for label-free MDA-MB-231 cancer cell detection*. Biosensors and Bioelectronics, 2018. **116**: p. 100-107.
132. Shen, Huawei, Yang, Juan, Chen, Zhongping, et al., *A novel label-free and reusable electrochemical cytosensor for highly sensitive detection and specific collection of CTCs*. Biosensors and Bioelectronics, 2016. **81**: p. 495-502.
133. Lopez, A., Cacoub, P., Macdougall, I. C., et al., *Iron deficiency anaemia*. Lancet, 2016. **387**(10021): p. 907-16.
134. Kim, Su-Hyeong and Singh, Shivendra V., *The role of polycomb group protein Bmi-1 and Notch4 in breast cancer stem cell inhibition by benzyl isothiocyanate*. Breast cancer research and treatment, 2015. **149**(3): p. 681-692.
135. Nagamatsu, I., Onishi, H., Matsushita, S., et al., *NOTCH4 is a potential therapeutic target for triple-negative breast cancer*. Anticancer Res, 2014. **34**(1): p. 69-80.

8. EKLER

EK 1. Turnitin Dijital Makbuz

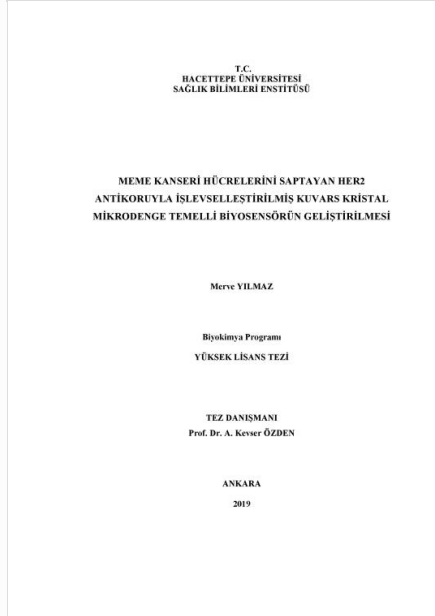


Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Ayse Kevser Ozden Piskin
Ödev başlığı: MEME KANSERİ HÜCRELERİNİ SA..
Gönderi Başlığı: MEME KANSERİ HÜCRELERİNİ SA..
Dosya adı: Meme Kanseri HÄ¼crelerini Saptay...
Dosya boyutu: 5.62M
Sayfa sayısı: 84
Kelime sayısı: 15,893
Karakter sayısı: 104,146
Gönderim Tarihi: 06-Ağu-2019 10:44AM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1158034790



EK 2. Orjinallik Raporu

TEZİN TAM BAŞLIĞI: Meme Kanseri Hücrelerini Saptayan HER2 Antikoruyla İşlevselleştirilmiş Kuvars Kristal Mikrodenge Temelli Biyosensörün Geliştirilmesi

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: Merve YILMAZ

DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI: 84

MEME KANSERİ HÜCRELERİNİ SAPTAYAN HER2 ANTİKORUYLA İŞLEVSELLEŞTİRİLMİŞ KUVARS KRİSTAL MİKRODENGİ TEMELLİ BİYOSENSÖRÜN GELİŞTİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%6	%3	%1	%5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
2	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	%1
3	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
4	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to Kahramanmaraş Sütçü İmam University Öğrenci Ödevi	<%1
6	merlab.metu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	www.umfcv.ro İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Erciyes Üniversitesi	

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Ad / Soyad	Merve YILMAZ
Adres	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.B.D. Sıhhiye / Ankara
e-posta	merveyilmaz992@gmail.com
Uyruk	Türkiye Cumhuriyeti
Doğum tarihi	23.03.1992
Doğum yeri	Türkiye – Sivas

Mesleki Deneyim

Araştırma görevlisi / Hacettepe Üniversitesi Tıbbi
Biyokimya A.B.D. (2018-)

Eğitim Bilgileri

Üniversite Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyokimya (Türkçe)
(09.2011-07.2016)

Yüksek Lisans Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Tıbbi Biyokimya A.B.D. (15.09.2016-07.02.2017)
Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi
Biyokimya A.B.D. (07.02.2016-02.01.2017)
Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi
Biyokimya A.B.D. (05.02.2018-)

Yapılan Tezler

Görüntüleme Kılavuzlu Terapide Kullanılmak Üzere
Yeni Bir Teranostik Ajanın Tasarımı (Lisans Tezi)

**Kişisel Beceri ve
Yeterlilikler**

Ana dil Türkçe
Diğer diller İngilizce (İleri Seviye)
Almanca (Başlangıç)

Burslar / Projeler

IUGEN Poster Yarışması Üçüncülük Ödülü (Mart 2013) İstanbul Üniversitesi Genetik Klübü Poster Konusu- Nöral Kök Hücre (Stem Cell) Nakli

Kurslar

Worcester State University (Amerika) – 01.07.2014-01.08.2014 (İngilizce eğitimi)

Yayınlar

Uygun Z., Şahin Ç., Yılmaz M., Akçay Y., Akdemir A., Sağın F. Fullerene-PAMAM(G5) composite modified impedimetric biosensor to detect Fetuin-A in real blood samples. Analytical Biochemistry (2018), pp. 11-15

Yılmaz M., Piskin A.K., Development of Functionalised QCM Based Biosensors to Detect Breast Cancer Cells. Turkish Journal of Biochemistry (2018), pp. 60-61

Özet Bilgiler

Meme Kanseri Hücreleri Tespit Etmek İçin İşlevselleştirilmiş QCM Temelli Biyosensörlerin Geliştirilmesi, **Sözlü Sunum**, TBD Uluslararası Biyokimya Kongresi, Ekim 2018, Muğla

“Neden Ph.D. Derecesi Almalıyım ve Nasıl Yaparım”, **Poster Sunum**, FEBS Moleküler Yaşam Bilimleri Çalıştayı: Geleceğin Bilim İnsanlarının Eğitimi, Eylül 2018, İzmir

“Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Lisansüstü Programı”,
Poster Sunum, FEBS Moleküler Yaşam Bilimleri Çalıştayı: Geleceğin Bilim İnsanlarının Eğitimi, Eylül 2018, İzmir

Kuvars Kristal Mikrodenge Temelli Biyosensörlerin Karakterizasyonu, **Poster Sunum**, 12. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, Eylül 2018, İzmir

Görüntüleme Kılavuzlu Terapide Kullanılmak Üzere Yeni Bir Teranostik Ajanın Tasarımı, **Poster Sunum**, İstanbul Teknik Üniversitesi Uluslararası Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, Ekim 2017, İstanbul.

Nöral Kök Hücre (Stem Cell) Nakli, **Poster Sunum**, İstanbul Üniversitesi Uluslararası Katılımlı XIII. İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kış Okulu, Mart 2013, İstanbul, **Üçüncülük ödülü**

Kanser ve Dejeneratif Hastalıkların gelişiminde Apoptozisin Rolü, **Poster Sunum**, Uluslararası Katılımlı XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ekim 2013 Kuşadası-Aydın

P53 ve Kanser, **Poster Sunum**, Uluslararası Katılımlı XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ekim 2013, Kuşadası-Aydın

Yerçekimsiz ortamda insan fizyolojisi Yeni bir yaklaşım: Yerçekimsiz ortamlar kansere çözüm mü? konulu **Sözlü Sunum**, Meme Kanseri Multidisipliner Yaklaşım Sempozyumu, Cumhuriyet Üniversitesi, Nisan 2016 Sivas

Mikrogravite ve İkizler Paradoksu **Sözlü ve Poster Sunum**, DERINUZAY Bilim & Teknoloji Laboratuvarları Derneği Gelecek Bilimler Öğrenci Zirvesi, Haziran 2016, İzmir