



# **Nanometre Ölçeğinde Yapışma: Göğüs Kanseri Hücreleri ve Normal Epitel Hücreler**

**Program Kodu: 1001**

**Proje No: 111T026**

Proje yürütücüsü:

**Doç. Dr. Devrim Pesen Okvur**

## **Bursiyerler:**

Berrin ÖZDİL  
Deniz VURMAZ  
Utku HORZUM

AĞUSTOS 2014  
İZMİR



## ÖNSÖZ

Bu projede, meme kanseri hücreleri ile normal meme epitel hücrelerinin, elektron demeti litografisi ile oluşturulan nanometre büyüklüğünde ve mikrometre ölçeğinde sabit ve değişken aralıklardaki yüzey protein desenleri üzerinde durgun ve akış altındaki yapışmaları incelenmiştir. Meme kanseri hücrelerinin normal meme epitel hücrelerinden daha dinamik ve esnek bir yapışma profili sergiledikleri gösterilmiştir.

Yüzeyler İYTE Uygulamalı Kuantum Araştırma Merkezi (UKAM) altyapısı kullanılarak hazırlanmıştır.

Bu proje TÜBİTAK tarafından desteklenmiş ve Doç. Dr. Devrim Pesen Okvur yürütücülüğünde tamamlanmıştır.



## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ .....	vi
TABLO LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT .....	xiii
1.GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER .....	1
1.1 ODAKSAL YAPIŞMALARIN HÜCRE BİYOLOJİSİNDEKİ ÖNEMİ .....	1
1.2 HÜCRELERARASI MADDE.....	1
1.3 HÜCRELERARASI MADDENİN TAKLİTLENMESİ.....	2
1.4 ODAKSAL YAPIŞMA MEKANİZMASI VE BİLEŞENLERİ .....	3
1.5 AKTİN POLİMERİZASYONU VE KUVVET AKTARIMI.....	5
1.6 SIVI KAYMA GERİLİMİ .....	6
1.7 İNTEGRİNLER.....	7
2. GEREÇ VE YÖNTEM .....	9
2.1 HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	9
2.1.1 MDA-MB-231 HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	10
2.1.2 MCF10A HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	11
2.2 ÇİP HAZIRLAMA .....	12
2.2.1 PLURONİC POLİMERİNİN KAPATICILIK ÖZELLİĞİNİ TEST ETME.....	13
2.2.2 İTO-CAMLARA K-KAZEİN KAPLAMA DENEMELERİ VE K-KAZEİN, FİBRONEKTİN, LAMİNİN KAPLAMA .....	13
2.2.3 ELEKTRON DEMETİ LİTOGRAFİSİ .....	13
2.3 TEST YÜZEYLERDE HÜCRE UYGULAMALARI.....	14
2.3.1 HÜCRELERİ TEST YÜZEYLERE AKTARMA İÇİN UYGULANACAK YÖNTEMİN BELİRLENMESİ .....	14
2.3.1.1 SAYKLOHEKSİMİT UYGULAMASI .....	14
2.3.1.2 HÜCRELERİN AÇ BIRAKILMASI UYGULAMASI .....	14
2.3.2 TEST YÜZEYLERE EKİLECEK HÜCRE SAYISININ BELİRLENMESİ.....	15
2.3.3 HÜCRELERİN FİBRONEKTİN VE K-KAZEİN YÜZEYLERDE TEST EDİLMESİ .....	15
2.3.4 K-KAZEİN ÜZERİNDE FİBRONEKTİN NANODESEN YÜZEYLERİNDE ODAKSAL YAPIŞMA DENEYLERİ İÇİN HÜCRE UYGULAMALARI .....	15

2.3.5 K-KAZEİN ÜZERİNDE FİBRONEKTİN NANODESEN YÜZEYLERİNDE ODAKSAL YAPIŞMALARINI İÇİN ANALİZ BASAMAKLARI .....	16
2.3.6 K-KAZEİN ÜZERİNDE FİBRONEKTİN NANODESEN YÜZEYLERİNDE HÜCRE ŞEKLİ VE İSKELETİ.....	16
2.3.7 ÇİFT AKTİF ÇİPLERİN HAZIRLANMASI .....	16
2.4 AKIŞ DENEYLERİ İÇİN UV LİTOGRAFI YÖNTEMİYLE KANAL HAZIRLAMA .....	17
2.4.1 FOTOLİTOGRAFI .....	17
2.4.2 AKIŞ DENEY DÜZENİĞİNİN HAZIRLANMASI .....	18
3. BULGULAR .....	21
3.1 İTO ÜZERİNDE MDA-MB-231 KONTROL VE TEK AKTİF DESENLENEN YÜZEYLER .....	21
3.1.1 İTO YÜZEY ÜZERİNDE KAPATICI OLARAK PLURONİK POLİMERKAPLAMASI DENEMELERİ .....	21
3.1.1.1 TMCS KAPLAMASI.....	22
3.1.1.2 APTES KAPLAMASI .....	22
3.1.1.3 POLİ-L-LİZİN KAPLAMASI .....	22
3.1.2 İTO YÜZEY ÜZERİNDE KAPATICI OLARAK K-KAZEİN KAPLAMASI .....	23
3.1.3 İTO YÜZEY ÜZERİNDE K-KAZEİN KAPLAMASI ÜZERİNE FİBRONEKTİN KAPLAMA .....	24
3.1.4 İTO-CAM YÜZEYLERDE ELEKTRON DEMETİ LİTOGRAFİSİ UYGULAMASINDA DOZ TESİPİTİ .....	24
3.1.5 İTO-CAM YÜZEYLERDE ELEKTRON DEMETİ LİTOGRAFİSİ UYGULAMASINDA NANONOKTA DESENLEME .....	26
3.1.6 MDA-MB-231 VE MCF10A HÜCRELERİNİN TEST YÜZEYLERDE UYGULAMALARI .....	35
3.1.6.1 SAYKLOHEKSİMİT UYGULAMASI .....	36
3.1.6.2 HÜCRELERİN AÇ BIRAKILMASI UYGULAMASI .....	39
3.1.6.3 TEST YÜZEYLERE EKİLECEK HÜCRE SAYISININ BELİRLENMESİ.....	48
3.2 MDA-MB-231 VE MCF10A HÜCRELERİNİN K-KAZEİN ÜZERİNE FİBRONEKTİN (TEK AKTİF) DESENLENMESİNDEN ELDE EDİLEN SONUÇLAR.....	48
3.2.1 HÜCRELERİN FİBRONEKTİN VE K-KAZEİN YÜZEYLERDE TEST EDİLMESİ .....	49
3.2.2 TEK AKTİF DESENDE MDA-MB-231 VE MCF10A HÜCRELERİNİN NİTELİKSEL OLARAK KARŞILAŞTIRILMASI .....	49



3.2.3 TEK AKTİF DESENDE MDA-MB-231 VE MCF10A HÜCRELERİNİN HÜCRE ALANI VE UZUN EKSEN/KISA EKSEN ORANLARI KARŞILAŞTIRILMASI.....	50
3.2.4 TEK AKTİF DESENDE MDA-MB-231 VE MCF10A HÜCRELERİNİN ODAKSAL YAPIŞMALARININ KARŞILAŞTIRILMASI .....	52
3.2.5 TEK AKTİF DESENDE MDA-MB-231 VE MCF10A HÜCRELERİNİN MORFOLOJİK KARŞILAŞTIRMASI İÇİN AKTİN İSKELETİ ANALİZİ .....	57
3.3 MDA-MB-231 VE MCF10A HÜCRELERİNİN LAMİNİN ÜZERİNE FİBRONEKTİN (ÇİFT AKTİF) DESENLENMESİNDEN ELDE EDİLEN SONUÇLARI.....	74
3.3.1.1 İTO YÜZEY ÜZERİNDE FİBRONEKTİN KAPLAMA .....	74
3.3.1.2 İTO YÜZEY ÜZERİNDE LAMİNİN KAPLAMA.....	79
3.3.1.3 İTO YÜZEY ÜZERİNDE LAMİNİN KAPLAMASI ÜZERİNE FİBRONEKTİN KAPLAMA .....	80
3.3.2 ÇİFT AKTİF DESENDE MDA-MB-231 VE MCF10A HÜCRELERİNİN HÜCRE ALANI VE UZUN EKSEN/KISA EKSEN ORANLARI KARŞILAŞTIRILMASI.....	81
3.3.3 ÇİFT AKTİF DESENDE MDA-MB-231 VE MCF10A HÜCRELERİNİN ODAKSAL YAPIŞMALARININ KARŞILAŞTIRILMASI .....	82
3.3.4 ÇİFT AKTİF DESENDE MDA-MB-231 VE MCF10A HÜCRELERİNİN MORFOLOJİK KARŞILAŞTIRMASI İÇİN AKTİN İSKELETİ ANALİZİ .....	88
3.4 AKIŞ DENEYLERİ .....	104
3.4.1 AKIŞ DENEYLERİNDE KULLANILMAK ÜZERE OLUŞTURULAN KANAL DESENLERİ.....	104
3.4.2.1 AKIŞ ALTINDA TEK AKTİF DESENDE MDA-MB-231 VE MCF10A HÜCRELERİNİN ODAKSAL YAPIŞMALARININ KARŞILAŞTIRILMASI .....	113
3.4.2.2 AKIŞ ALTINDA TEK AKTİF DESENDE MDA-MB-231 VE MCF10A HÜCRELERİNİN AKTİN İSKELETİ ANALİZİNDEN GELEN BULGULAR .....	121
3.4.2.3 AKIŞ ALTINDA TEK AKTİF DESENDE MDA-MB-231 VE MCF10A HÜCRELERİNİN ODAKSAL YAPIŞMALARININ VE AKTİN İSKELETLERİNİN KUTUPSALLIĞININ KARŞILAŞTIRILMASI .....	125
4. TARTIŞMA/SONUÇ/ÖNERİLER .....	130
REFERANSLAR.....	133

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Aktin tipleri .....	6
Şekil 2. İntegrin alt üniteleri ve onların etkileşime girdiği proteinler .....	8
Şekil 3. Akış hızı hesaplamasında kullanılan formül ve akış hızı hesabını yapmakta kullanılan LabView bilgisayar programının basamaklandığı formülün her bir basamağının akış şeması. ....	19
Şekil 4. Akış altında hücre yapışmasının sağlanabilmesi için kurulan sistemin genel görünümü. ....	20
Şekil 5. İTO üzerine TMCS ve APTES kaplamaları .....	23
Şekil 6. İTO-cam-APTES-K-kazein-EDL-Fibronektin alan desenlenmesi. ....	26
Şekil 7. Büyük adım aralıklı çizgilerle İTO-cam-APTES-K-kazein-EDL-Fibronektin nanonokta desenlenmesi. ....	27
Şekil 8. İTO-cam-K-kazein-EDL-Fibronektin desenlemesi. ....	28
Şekil 9. İTO-cam-APTES-K-kazein-EDL-Fibronektin desenlenmesi. ....	29
Şekil 10. Farklı alan dozlarında tasarlanmış EDL deseni .....	31
Şekil 11. Silikon-APTES-K-kazein-EDL-fibronektin desenlemesi .....	32
Şekil 12. İTO-cam-TMCS-pluronik-EDL-fibronektin desenlemesi .....	33
Şekil 13. 30 µm açıklıkta desenleme .....	34
Şekil 14. Kullanılan hücre hatları .....	36
Şekil 15. Saykloheksimit (10 µg/ml) uygulaması .....	37
Şekil 16. MCF10A hücre hattında iki saat 10 µg/ml saykloheksimit uygulamasından sonra fibronektin kontrol İTO-cam yüzeyler üzerinde dört saatlik kültürün ardından sabitlenip yapılan floresan boyamaları .....	38
Şekil 17. MCF10A hücrelerini iki saat 10 µg/ml saykloheksimit uygulamasından sonra K-kazein kontrol İTO-cam yüzeyler üzerinde dört saatlik kültürün ardından sabitlenip yapılan floresan boyamaları .....	39
Şekil 18. MDA-MB-231 hücrelerinin İTO-cam yüzeylerde rasgele alanlarda çekilen faz-kontrast resimlerinden temsili birer örnek .....	40
Şekil 19. MCF10A hücrelerini iki saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra tripsin-EDTA ile petrilere ayırıldı ve Fibronektin kontrol yüzeylerine ekildi. ....	41
Şekil 20. MCF10A hücrelerini iki saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra tripsin-EDTA ile petrilere ayırıldı ve fibronektin kontrol yüzeylerine ekildi. ....	42
Şekil 21. MCF10A hücrelerini iki saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra tripsin-EDTA ile petrilere ayırıldı ve K-kazein kontrol yüzeylerine ekildi. ....	43
Şekil 22. MCF10A hücrelerini iki saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra tripsin-EDTA ile petrilere ayırıldı ve K-kazein kontrol yüzeylerine ekildi. ....	44
Şekil 23. MDA-MB-231 hücrelerini iki saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra tripsin-EDTA ile petrilere ayırıldı ve fibronektin kontrol yüzeylerine ekildi. ....	45
Şekil 24. MDA-MB-231 hücrelerini iki saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra tripsin-EDTA ile petrilere ayırıldı ve fibronektin kontrol yüzeylerine ekildi. ....	46
Şekil 25. MDA-MB-231 hücrelerini iki saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra tripsin-EDTA ile petrilere ayırıldı ve K-kazein kontrol yüzeylerine ekildi. ....	47
Şekil 26. MDA-MB-231 hücrelerini iki saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra tripsin-EDTA ile petrilere ayırıldı ve K-kazein kontrol yüzeylerine ekildi. ....	48
Şekil 27. MDA-MB-231 ve MCF1A hatlarına ait hücrelerin 2,4,8 mikrometre aralıklı tek aktif nanodesen üzerindeki fotoğrafları .....	50

Şekil 28. Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre alanlarının dağılımları .....	51
Şekil 29. Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre simetri oranlarının dağılımları .....	52
Şekil 30. Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre başına düşen odaksal yapışma sayısının dağılımı .....	53
Şekil 31. Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde odaksal yapışma alanlarının dağılımı .....	54
Şekil 32. Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre başına düşen odaksal yapışma alan toplamının dağılımı .....	55
Şekil 33. Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde odaksal yapışma daireselliğinin dağılımı .....	56
Şekil 34. Tek aktif nanodesen üzerinde odaksal yapışma alanlarının odaksal yapışma daireselliğine bağlı dağılımı.....	57
Şekil 35. Hücrelerin aktin iskeletlerinin analiz aşamaları .....	58
Şekil 36. MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ve nanonoktalar üzerinde açıları-Yönsellik grafiği .....	59
Şekil 37. Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde aktin iskeletindeki iplikçiklerin kartezyen koordinatlarındaki açıların dağılımları .....	60
Şekil 38. Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre içindeki aktin iskeletin hücre içi dağılımındaki uyumu .....	60
Şekil 39. Fibronektin kontrol yüzeyi üzerinde aktin ortalama dağılım grafiği.....	61
Şekil 40. MDA-MB-231 hücrelerinin Fibronektin yüzeyde MCF10A hücrelerinin oluşturduğu hücre çeper kısmındaki çıkıntılara benzer yapılar oluşturması.....	62
Şekil 41. Tek aktif desen üzerinde hücrenin en dışında bulunan aktin bandı yönselliği.....	63
Şekil 42. Tek aktif desen üzerinde hücrenin en dışında bulunan aktin bandı dağılımı.....	63
Şekil 43. Tek aktif desen üzerinde hücrenin en dışında bulunan aktin bandı örtüşme düzeyi .....	64
Şekil 44. Tek aktif desen üzerinde hücrenin en dışında bulunan aktin/tüm aktin yoğunlaşması .....	65
Şekil 45. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradient fotoğrafları .....	66
Şekil 46. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma sayısı kutupsallığı grafikleri .....	67
Şekil 47. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma sayısı dağılımı.....	68
Şekil 48. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma alanı kutupsallığı grafikleri.....	68
Şekil 49. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma alanlarının dağılımı.....	69
Şekil 50. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde toplam odaksal yapışma alanı kutupsallığı grafikleri .....	70
Şekil 51. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde toplam odaksal yapışma alanlarının hücre başına düşen dağılımı ...	71
Şekil 52. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma daireselliği kutupsallığı grafikleri.....	71

Şekil 53. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma daireselliklerinin dağılımı.....	72
Şekil 54. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma daireselliklerinin odaksal yapışma alanına bağlı dağılımı .....	73
Şekil 55. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde aktin kutupsallığı.....	74
Şekil 56. Çift aktif desen oluşturma denemeleri-Laminin kaplamada arka plandan kurtulma.	77
Şekil 57. Çift aktif desen oluşturma denemeleri-Laminin konsantrasyonu.....	79
Şekil 58. MDA-MB-231 ve MCF10A hatlarına ait hücrelerin 2,4,8 mikrometre aralıklı çift aktif nanodesen üzerindeki fotoğraları .....	80
Şekil 59. Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerindeki hücre alanlarının dağılımları .....	81
Şekil 60. Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre simetri oranlarının dağılımları .....	82
Şekil 61. Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre başına düşen odaksal yapışma sayısının dağılımı.....	83
Şekil 62. Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde odaksal yapışma alanlarının dağılımı.....	84
Şekil 63. Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre başına düşen odaksal yapışma alan toplamının dağılımı.....	85
Şekil 64. Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde odaksal yapışma daireselliğinin dağılımı.....	86
Şekil 65. Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde odaksal yapışma alanlarının odaksal yapışma daireselliğine bağlı dağılımı .....	87
Şekil 66. Çift aktif desende MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ve nanonoktalar üzerinde açıları-Yönsellik grafiği .....	88
Şekil 67. Çift aktif desende aktin iskeletindeki iplikçiklerin kartezyen koordinatlarındaki açılarının dağılımları.....	89
Şekil 68. Çift aktif desende hücre içindeki aktin iskeletin hücre içi dağılımındaki uyumu.....	89
Şekil 69. Çift aktif desende Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ve nanonoktalar üzerinde MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin en dış bantta aktin açıları-Yönsellik grafiği .....	90
Şekil 70. Çift aktif desende Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ve nanonoktalar üzerinde MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin en dış bantta aktin açıları dağılımı.	91
Şekil 71. Çift aktif desende Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ve nanonoktalar üzerinde MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin en dış bantta aktin açıları örtüşme düzeyi.....	92
Şekil 72. Çift aktif desen üzerinde hücrenin en dışında bulunan aktin/tüm aktin yoğunlaşması .....	92
Şekil 73. Çift aktif desende MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin adım aralığı değişken çift aktif desenleme üzerindeki genel dağılımları.....	93
Şekil 74. Çift aktif gradient desen üzerinde MDA-MB-231 ve MCF10A hücreleri için örnek fotoğraflar.....	94
Şekil 75. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında Laminin üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma sayısı kutupsallığı grafikleri .....	94
Şekil 76. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında Laminin üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma sayısı dağılımı.....	95

Şekil 77. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında Laminin üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma alanı kutupsallığı grafikleri.....	96
Şekil 78. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında Laminin üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma alanlarının dağılımı.....	97
Şekil 79. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında Laminin üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde toplam odaksal yapışma alanı kutupsallığı grafikleri .....	98
Şekil 80. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında Laminin üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde toplam odaksal yapışma alanlarının hücre başına düşen dağılımı ...	99
Şekil 81. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma daireselliği kutupsallığı grafikleri.....	99
Şekil 82. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında Laminin üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma daireselliklerinin dağılımı .....	100
Şekil 83. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma daireselliklerinin odaksal yapışma alanına bağlı dağılımı. ....	101
Şekil 84. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında Laminin üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde aktin kutupsallığı.....	101
Şekil 85. MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin Fibronektin, K-kazein ve Laminin kontrol yüzeyleri üzerinde açıları-Yönsellik grafiği.....	102
Şekil 86. Aktin iskeletindeki iplikçiklerin kartezyen koordinatlarındaki açılarının dağılımları. ....	103
Şekil 87. Hücre içindeki aktin iskeletin hücre içi dağılımındaki uyumu .....	103
Şekil 88. Beyaz peçete üzerine yerleştirilmiş maskelerin fotoğrafı .....	104
Şekil 89. Silikon yüzeylerde oluşturulan SU8 kalıplar. 5, 10 ve 15 mm genişliğinde kısa ve uzun kanalların kalıpları .....	105
Şekil 90. PDMS kanallar .....	105
Şekil 91. Lab-on-a-chip. SU-8 kalıp üzerinde oluşturulan PDMS kalıpların yüzeyi K-kazein veya FN kaplı İTO-camlar ile birleştirilmiş ve kanalların giriş ve çıkışlarına silikon hortumlar bağlanmış, akış için hazır durumdaki görüntüleri .....	106
Şekil 92. 0.125 dyne/cm <sup>2</sup> akış gerilimi ve 0.177 ml/dk akış hızı ile 381 mikrometre yüksekliğe ve 1000 mikrometre genişliğe sahip zemini FN kaplı kanaldan geçirilen MDA-MB-231 hücrelerinin akış başlangıcında zıt-evre mikroskopuna bağlı kamerayla saniyede 15 fotoğraf karesiyle kaydedilen görüntülerinden 10 saniyenin tek bir fotoğraf karesine yansıtılmasıyla elde edilen görüntü. ....	108
Şekil 93. 0.125 dyne/cm <sup>2</sup> akış gerilimi ve 0.177 ml/dk akış hızı ile 381 mikrometre yüksekliğe ve 1000 mikrometre genişliğe sahip zemini FN kaplı kanaldan yaklaşık 34 dakika boyunca geçirilen 6 ml MCF10A hücrelerinin yaklaşık 34 dakika sonunda zıt-evre mikroskopuna bağlı kamerayla saniyede 1 fotoğraf karesiyle 30 saniye boyunca kaydedilen görüntülerinin tek bir fotoğraf karesine yansıtılmasıyla elde edilen görüntü .....	109
Şekil 94. Akış gerilimi altında Fibronektin kaplı İTO-cam yüzey üzerindeki MDA-MB-231 hücreleri .....	110
Şekil 95. Akış gerilimi altında Kcas kaplı İTO-cam yüzey üzerindeki MDA-MB-231 hücreleri .....	111
Şekil 96. Akış gerilimi altında Kcas üzerine Fibronektin nano noktalarla kaplı İTO-cam yüzey üzerindeki MDA-MB-231 hücreleri.....	112
Şekil 97. Akış gerilimi altında MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin fibronektin kaplı yüzeydeki görüntüleri .....	115

Şekil 98. Akış gerilimi altında K-kazein üzerine desenlenmiş fibronektin nanonoktalar içeren yüzeylere yapışmış MDA-MB-231 ve MCF10A hücreleri .....	115
Şekil 99. Akış altında Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile K-kazein yüzeyde desenlenmiş fibronektin nanonoktalar üzerinde hücre başına düşen odaksal yapışma sayılarının dağılımı .....	117
Şekil 100. Akış altında Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile K-kazein yüzeyde desenlenmiş Fibronektin nanonoktalar üzerinde odaksal yapışma alanı dağılımı .....	118
Şekil 101. Akış altında Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile K-kazein üzerine desenlenmiş Fibronektin nanonoktalar içeren yüzeyler üzerinde hücre başına düşen odaksal yapışma alan toplamının dağılımı .....	118
Şekil 102. Akış altında Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile K-kazein üzerine desenlenmiş Fibronektin nanonoktalar içeren yüzeyler üzerinde odaksal yapışma daireselliğinin dağılımı .....	119
Şekil 103. Akış altında tek aktif yüzeylerde odaksal yapışma alanlarının odaksal yapışma daireselliğine bağlı dağılımı .....	120
Şekil 104. Akış gerilimi altında fibronektin yüzeye yapışmış MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin aktin organizasyonları .....	121
Şekil 105. Akış altında MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ve nanonoktalar üzerinde açıları-Yönsellik grafiği .....	122
Şekil 106. Akış altında Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde aktin iskeletindeki iplikçiklerin kartezyen koordinatlarındaki açıların dağılımları .....	123
Şekil 107. Akış altında Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre içindeki aktin iskeletin hücre içi dağılımındaki uyumu .....	124
Şekil 108. Akış altında MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile K-kazein üzerine desenlenmiş fibronektin nanonoktalar içeren yüzeylerde odaksal yapışma sayılarının dağılımı .....	125
Şekil 109. Akış altında MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile K-kazein üzerine desenlenmiş fibronektin nanonoktalar içeren yüzeylerde odaksal yapışma alanlarının dağılımı .....	126
Şekil 110. Akış altında MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile K-kazein üzerine desenlenmiş fibronektin nanonoktalar içeren yüzeylerde hücre başına düşen toplam odaksal yapışma alanının dağılımı .....	127
Şekil 111. Akış altında MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile K-kazein üzerine desenlenmiş fibronektin nanonoktalar içeren yüzeylerde odaksal yapışma daireselliğinin dağılımı .....	128
Şekil 112. Akış altında tek aktif nanodesen üzerinde odaksal yapışma alanlarının odaksal yapışma daireselliğine bağlı dağılımı .....	129
Şekil 113. Akış gerilimi altında kazein üzerine desenlenmiş fibronektin nanonoktalar içeren yüzeylere yapışmış MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin aktin kutupsallığı .....	130



## TABLO LİSTESİ

Tablo 1. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hatlarında bulunan alpha2, alpha3, alpha6, beta1,beta4 integrin alt gruplarının ifadenme profili .....	9
Tablo 2. Yüzeylerde hücre kültürü optimizasyonu için denenen koşullar. ....	15
Tablo 3. Poiseuille denkleminde göre hesaplanan akış gerilimleri ve hızları .....	107



## ÖZET

Hücrelerarası maddeye hücre yapışması hem sağlık hem de hastalık durumları için önemli bir süreçtir. Topografik olarak düz ve başka kimyasal, topografik ya da sertlik ile ilgili işlevsellik getirmeyen ve daha önemlisi canlıdaki hücrelerarası madde düzenlenmesini taklitleyen yüzey protein desenleri arzu edilmektedir. Daha önceki çalışmalar göstermiştir ki vinkülin ve hücre iskeletinin düzenlenmesi yüzey nanodesenlerinin büyüklüğü ve şekli ile değişmektedir. Fakat, protein nanodesenlerinin mikrometre ölçeğindeki aralıklarına bağlı olarak normal ve kanserli hücrelerin morfolojileri ve odaksal yapışmalarının karşılaştırmalı sayısal analizi eksiktir. Burada, elektron demeti litografisi kullanılarak silikondan farklı olarak şeffaf ve böylece birçok mikroskop tekniğine uygun olan indiyum kalay oksit (ITO) üzerinde K-kazein arka planında (tek aktif) ve laminin arka planında (çift aktif) mikrometre ölçeğinde aralıklarla fibronektin (FN) nanonoktaları desenlenmiştir. Yazım zamanları mikrometre ölçeğinde adım büyüklükleri ile çizgi yazım modu kullanılarak önemli ölçüde kısaltılmıştır. FN nanonoktalarının mikrometre ölçeğinde 2, 4, 8 mikron ve değişken aralıkları hem meme kanseri hücreleri hem de normal meme epitel hücrelerinde hücre yapışmasını hücre alanı, hücre simetrisi, aktin düzenlenmesi, odaksal yapışma sayısı, alanı ve daireselliği ile hem durgun hem de akış koşullarında değiştirmiştir. Toplamda hücre davranışının görünen eşik değeri olarak 4 mikron aralıkta değiştiği gösterilmiştir. Sonuçlar gösterdi ki hücre yapışması bağlamında meme kanseri hücreleri ile normal meme epitel hücreleri arasında, özellikle çift aktif bileşenli yüzeylerde belirgin farklar bulunmaktadır: Meme kanseri hücreleri normal meme epitel hücrelerinden daha dinamik ve esnek bir yapışma profili sergilemişlerdir. Bu çalışmanın yeniliği ve özgünlüğü aşağıdaki noktalar ile elde edilmiştir:

- İTO yüzeyler üzerinde ilk elektron demeti litografisi ve sadece protein bazlı desenlemenin gerçekleştirilmesi.
- Meme kanseri hücreleri ve normal meme epitel hücrelerinin nanometre ölçeğindeki protein desenleri üzerinde yapışmalarının ilk karşılaştırmalı ve sayısal analizi.
- Laminin arkaplanı üzerinde FN nanonoktaları şeklinde çift aktif yüzey desenleri üzerinde ilk hücre yapışması çalışması.
- Gradyan aralıklı nanometre ölçeğinde protein desenleri üzerinde ilk hücre yapışması çalışması.
- Nanometre ölçeğinde protein desenleri üzerinde durgun ve akış koşullarında hücre yapışmasının ilk karşılaştırmalı çalışması.

**Elektron demeti litografisi, İndiyum kalay oksit, Fotolitografi, Polidimetilsiloksan, Hücrelerarası madde, K-kazein, Fibronektin, Laminin, Odaksal yapışma, Vinkülin, Aktin, Akış gerilimi, Meme kanseri, Floresan mikroskop, ImageJ**





## ABSTRACT

Cell adhesion to extracellular matrix is an important process for both health and disease states. Surface protein patterns that are topographically flat, and do not introduce other chemical, topographical or rigidity related functionality and, more importantly, that mimic the organization of the *in vivo* extracellular matrix are desired. Previous work showed that vinculin and cytoskeletal organization are modulated by size and shape of surface nanopatterns. However, a comparative and quantitative analysis on normal and cancerous cell morphology and focal adhesions as a function of micrometer scale spacings of protein nanopatterns was absent. Here, electron beam lithography was used to pattern fibronectin (FN) nanodots with micrometer scale spacings on a K-casein background (single active) and on a laminin background (double active) on indium tin oxide (ITO) coated glass which, unlike silicon, is transparent and thus suitable for many light microscopy techniques. Exposure times were significantly reduced using the line exposure mode with micrometer scale step sizes. Micrometer scale spacings of 2, 4, 8 microns and gradients between FN nanodots modulated cell adhesion for both breast cancer and normal mammary epithelial cells, through modification of cell area, cell symmetry, actin organization, focal adhesion number, size and circularity under both static and flow conditions. Overall, cell behavior was shown to shift at the apparent threshold of 4  $\mu\text{m}$  spacing. Results showed that there were significant differences in terms of cell adhesion between breast cancer and normal mammary epithelial cells, particularly on double active component surfaces: Breast cancer cells exhibited a more dynamic and flexible adhesion profile than normal mammary epithelial cells. Novelty and originality of this work is accomplished by the following points:

- First electron beam lithography and protein-only based surface patterning on ITO surfaces.
- First comparative analysis of breast cancer and normal mammary epithelial cells on nanometer scale protein patterns.
- First cell adhesion study on double active surface patterns in the form of FN nanodots on a laminin background.
- First cell adhesion study on nanometer scale protein patterns with gradient spacings.
- First comparative cell adhesion study on nanometer scale protein patterns under static and flow conditions.

**Electron beam lithography, Indium tin oxide, Photolithography, Polydimethylsiloxane, Extracellular matrix, K-casein, Fibronectin, Laminin, Focal adhesion, Vinculin, Actin, Shear stress, Breast cancer, Fluorescence microscope, ImageJ**

## 1.GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

### 1.1 Odaksal Yapışmaların Hücre Biyolojisindeki Önemi

Odaksal yapışmalar ilgili birçok proteinin katılımıyla oluşan hücrenin çevresiyle kurduğu mekanik ve kimyasal etkileşimlerde etkin role sahip dinamik oluşumlardır ve kanser metastazı başta olmak üzere anjiyogenez, embriyonik morfogenez, doku homeostazisi, aterosklerosis ve yara iyileşmesinde merkezi rol oynarlar. Hücre yapışmasını sağlayan bu biyolojik oluşumlar sağlıklı ve hastalıklı durumların her ikisinde de önem arzeden işleyişlerdir. Hücrelerin hücrelerarası maddeyle etkileşerek kurduğu odaksal yapışmalar büyüklükleri 10 nanometreden 10 mikrometreye kadar değişen proteinler ve komplekslerce oluştururlar. Yüzü aşkın proteini içeren odaksal yapışmalara birimsel bazda bakıldığında hücrelerarası maddede bulunan bir protein olan fibronektin, bir transmembran protein olan integrin ve bir hücre içi protein olan vinkülin temellidirler (Berginski vd., 2011; Berrier ve Yamada, 2007; Zaidel-Bar vd., 2004; Zaidel-Bar vd., 2007; Zamir ve Geiger, 2001). İçerdiği zengin protein kompozisyonunun ve bu proteinlerin diğer proteinlerle etkileşimlerinin de sonucu olarak odaksal yapışmalar hücre davranışının düzenlenmesinde oldukça etkin role sahiptirler öyle ki hem hücrelerin mekanik sensörleri hem de yapışmalarını sağlayan yapılarıdır ve hücre yapışması, göçü, çoğalması ve farklılaşmasını düzenlemektedirler (Schwarz vd., 2006; Wozniak vd., 2004; Zhao ve Guan, 2009).

### 1.2 Hücrelerarası Madde

Hücrelerarası madde biyofiziksel, mekanik ve biyokimyasal özellikleriyle nitelendirilen, dokuya özgü dinamik ve kompleks bir çevredir. Bileşiminde bulunan makromoleküllerin miktarı ve organizasyonunun değişimiyle dokularda farklılaşırken içeriğindeki moleküllerin üretim, bozulma ve tekrar modellenme vasıflarının kontrolüyle dinamiktir. Hücrelerarası maddenin sertliği, gözenekliliği, topografisi ve çözünübilirliği gibi fiziksel özellikleri hücrelerin bağlanması yahut kendini sabitlemesiyle alakalı hücre göçü, bölünmesi veya doku kutupluluğu gibi biyolojik fonksiyonlarda önemliken bileşiminde bulunan moleküllerin gösterdiği sinyal kapasitesiyle biyokimyasal işleve de sahiptir (Gattazzo vd., 2014). Hücrelerarası maddenin özellikleri birçok hastalığın nedenlerinden veya sonuçlarından olacak biçimde patolojik olarak değişikliğe uğrar. Kanser hastalarında yoğun ve anormal modellenmiş şekilde hücrelerarası madde üretilir, örneğin meme kanseri hastalarından alınan meme hücreleri arası maddesinde kollajen ve proteoglikan miktarının normal seviyenin çok üstünde olduğu bilinmektedir (Gill ve West, 2014). Hücrelerarası maddeyi oluşturan proteinler kollajen ve elastin başta olmak üzere

fibronektin, laminin ve diğer proteoglikanlar ile glikoproteinlerdir. Fibronektin ve laminin hücrelerarası maddede en çok bulunan glikoproteinlerdir ve hücre dışında kollajen, heparin ve diğer fibronektin veya laminin proteinleriyle ilişkilendirilip dallanmış lifli bir ağ oluşturmalarının yanı sıra integrinlerin tanıyabileceği uygun amino asit dizilerini de taşırlar (Aumailley ve Smyth, 1998; Muiznieks ve Keeley, 2013).

### 1.3 Hücrelerarası Maddenin Taklitlenmesi

Hücrelerarası maddeye olan hücre yapışması homojen yüzeylerde geniş çapta araştırılmıştır; fakat *in vivo* hücrelerarası madde ve hücrelerce sağlanan *in vitro* hücrelerarası madde sahip oldukları yapışkan ve yapışkan olmayan boşluklarıyla oldukça kompleks yapılardır (Kim vd., 2012; Provenzano vd., 2009; Soucy ve Romer, 2009; Wolf vd., 2009; Zoumi vd., 2002).

Hücrelerarası madde organizasyonunu uygun platformlarda *in vivo* karakterde taklitlemek hücre yapışmasını daha iyi anlamak için ihtiyaç duyulan bir yöntemdir. Bu konuda nanometrik ve mikrometrik ölçekte yapılmış önemli çalışmalar bulunmaktadır (Agheli vd., 2006; Alsberg vd., 2006; Biggs vd., 2010; Cavalcanti-Adam vd., 2007; Chen vd., 1997; Deeg vd., 2011; Elineni ve Gallant, 2011; Gingras vd., 2009; JinSeok vd., 2012; Li vd., 2012; Lutz vd., 2011; Malmstrom vd., 2011; Oliva vd., 2003; Pesen ve Haviland, 2009). Bu alana öncülük eden kaydadeğer çalışmalar Mirkin ve Spatz tarafından yürütülmüştür (Geiger vd., 2009; Piner vd., 1999). Bu çalışmalarda yüksek verimlilikle mikrodesenler üretiliyorlarken, nanometrik ölçekte çözünürlük sağlanamıyor ve yalnızca yüzeyde geniş alanlarda homojen yapışma kapasitesi sağlanmış oluyor, öte yandan birçok nanometrik ölçekte desenleme yapan mekanizma desen oluşturma kapasitesinde yetersiz kalmaktadır. İlaveten oluşturulan desenler topografik, biyokimyasal ve rijidite sinyalleri taşıyan kombine yüzeylerdir (Alsberg vd., 2006; Cavalcanti-Adam vd., 2007; JinSeok vd., 2012; Lussi vd., 2004; Lussi vd., 2005). Bu üç sinyal tipi de hücrelerin tepkilerinin incelenmesinde önem arz ederler ve birbirlerinden bağımsız incelenmeleri idealdir. Yüzey üzerinde proteinlerle oluşturulmuş desenlerle yapılan önemli çalışmalar mevcuttur; fakat bu çalışmalarda kullanılan yüzeylerde fabrikasyonda kullanılan metodun yetersizliğinden kaynaklı biyokimyasal ve topografik sinyaller beraber bulunur. Oksit tabakalar üzerinde gerçekleştirilen desenlemelerde kaçınılmaz bir şekilde protein ve polimerin adsorpsiyon olduğu bölgeler hem biyokimyasal (protein yahut polimer) hem de topografik (yüzeydeki yüksek yahut alçak alanlar) olarak ayrılırlar (Lussi vd., 2004; Lussi vd., 2005). Yine aynı alanda kullanılan başka bir metotta altın nanoparçacıklarına bağlanmış çeşitli uzunluklardaki polimerler proteinler arasındaki uzaklıkları çok iyi derecede kontrol edebilmek olanağı sunarken bu işlemi belirli aralıklarda desen oluşturacak bir fabrikasyona dönüştürmeye olanak sağlamamaktadır ve ayrıca altın nanoparçacıklarının kurulan yüzeydeki varlığı

bunlardan kaynaklı fazladan sinyaller oluşturmaktadır (Cavalcanti-Adam vd., 2007). Bu alanda kullanılmaya başlanan elektron demetiyle litografi metodu iyi derecede odaklanmış (2 nm çapta) elektron ışınının kullanılması dolayısıyla nanometrik ölçekte yüksek çözünürlüğe sahiptir. Elektron demetiyle litografi birkaç nanometreden başlayıp santimetrelerce kadar uzanan bir aralıkta desenleri imal etmeyi ışık maskesi kullanımını gerektirmeden sağlayabilen bir doğrudan yazım metodudur. Bu metodla ulaşılabilen kapasite hücre biyolojisi incelemeleri için önem arz eder. Şimdiye kadar yüzeylerde protein desenleri oluşturulabilmiş ve bu yüzeyler hücre seviyesinde test edilip fonksiyonelliği göz önüne serilmiştir (Alonso vd., 2013; Hoa vd., 2008; Palankar vd., 2013; Pesen vd., 2007a; Pesen ve Haviland, 2009; Pesen vd., 2007b; Ron vd., 2011; Rundqvist vd., 2007). Yapılan bir uygulamada üretilen desenin yalnızca biyokimyasal sinyal sağlama vasfında olduğu, kullanılan yüzeyde sertlikte topografik farkı olmadan protein desenlerinin sadece 2 nanometrelik bir kalınlıkla oluşturulabildiği gösterilmiştir (Pesen vd., 2007a). Elektron demetiyle litografi metodu protein yüzeyin resist olarak kullanılabilmesini de mümkün kıldığından aynı şekilde iki proteinin desenlenebilmesine de imkan vermektedir (Pesen ve Haviland, 2009). Bu metodun kullanıldığı öncü çalışmada yüzeye bağlı olarak bulunan protein, örneğin fibronektin, odaklanmış ışınlarla etkisizleştirilmiştir (Rundqvist vd., 2007). Işınlarla etkisizleştirilmiş protein yüzeyin yani desenin başka bir proteinin bağlanmasına uygun olduğu bilindiğinden, deseni oluşturan proteinin ilgilenilen protein olarak seçilip yalnızca biyokimyasal sinyallerin alındığı uygun yüzeyler oluşturulabilmesi ve bu yüzeylerde hücre biyolojisine dair araştırmalar yapılabilmesi mümkündür. Örnek çalışmalardan birinde K-kazein yüzeyler elektron demetiyle litografi metoduyla nokta ve halka olarak desenlenmiş ve desenler fibronektin proteiniyle kaplanarak oluşturulmuş yüzeylerde hücrelerin vinkülin ve aktin iskeletleri incelenmiştir (Pesen ve Haviland, 2009; Pesen vd., 2007b). Elektron demetiyle litografi metoduyla yapılan desenlemelerde ana yüzey olarak silikon yerine saydam özellikte indiyum kalay oksit kaplı camların kullanımı hücre biyolojisi çalışmalarında kullanılan birçok ışık mikroskobu uygulamasının da bu yüzeylerde gerçekleştirilebilmesine olanak vermiştir (Horzum vd., 2014).

#### **1.4 Odaksal Yapışma Mekanizması ve Bileşenleri**

Odaksal yapışmalar ilk olarak Ambrose (1961) tarafından hücreler ve katılar arasında yüzey temaslı ışık mikroskobu kullanılarak gözlemlendi ve daha sonrasında Curtis (1964) tarafından enterferans yansıma mikroskop tekniğiyle yüzeye 10 nanometrelik yakınlıkta yapılar olduğu rapor edildi. Morfolojik açıdan bakıldığında noktasal ve çizgisel olarak ikiye ayrılırlar; noktasal yapışmalar henüz olgunlaşmamış ve aktin iskeletiyle ilişkilinmeyen yapışmaları içerirken çizgisel yapışmalar aktin iskeletine bağlı olan ve hücrenin aktif kenarlarına yerleşmiş yapışmaları içerir. Aslında noktasal yapışmalar '*lamellipodia*'nın kenarlarında oluşan 1 µm

çaptan küçük yeni oluşan yahut olgunlaşmamış odaksal yapışmalardır ve birçoğu saniyeler içinde dağılırlarken bir kısmı yavaşça olgunlaşıp birkaç dakikalık ömürlük komplekslere dönüşürler. Çizgisel yapışmalar genel olarak 2-10  $\mu\text{m}$  uzunluğunda ve 0.5  $\mu\text{m}$  genişliğinde yapılardır ve noktasal yapışmaların olgunlaşmasıyla oluşurlar. Çizgisel yani olgunlaşmış odaksal yapışmaların yaşam ömrü ise asgari 20 dakikadır. Olgunlaşmış odaksal yapışmalar hücrenin ekstraselüler kısmını hücre içi hücre iskeleti kısmına bağlarlar (Berginski vd., 2011; Hoffman vd., 2011; Owen vd., 2005).

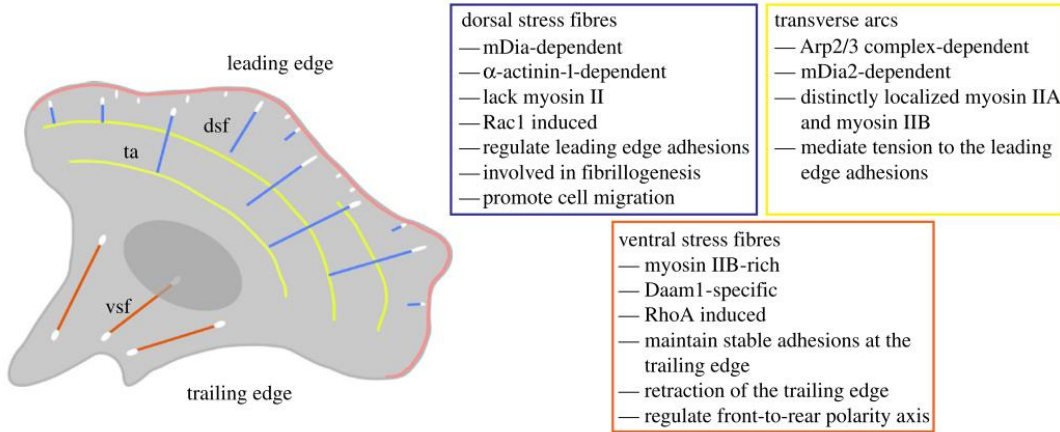
Odaksal yapışmalar hücre zarındaki integrinlerin hücre dışındaki hücrelerarası maddeyi ve hücre içindeki aktin hücre iskeletini birleştirdiği, birçok adaptör ve modülatör proteinin de katıldığı bir protein karmaşığdır. İntegrin protein ailesi  $16\alpha$  ve  $8\beta$  altbiriminin oluşturduğu tanımlanmış  $24\alpha\beta$  heterodimerini kapsar. Her bir heterodimer hücrelerarası maddede bulunan molekülere spesifik bağlanabilme yeteneğindedir (Boudreau ve Jones, 1999; Ciobanasu vd., 2013). İntegrin hücre dışında hücrelerarası maddede bulunan ligandına bağlandığında iki farklı biyokimyasal değişikliğe uğrar, birincisi yapısal değişikliğe uğraması ikincisi ise sitoplazmik kuyruğunun fosforlanmasıdır. Yapısal değişiklik integrinlerin ligandına bağlanmasını kuvvetlendirip hücre zarında kümelenmelerini sağlarken sitoplazmik kuyruklarının fosforlanması hücre yapışmasında sorumlu diğer proteinlerin regülasyonunda ve integrinlerle etkileşiminde önemlidir (Blystone, 2004). İntegrinler, proteinlerdeki belirli aminoasit dizilerini tanırlar ve bağlanırlar, örneğin arjinin-glisin-asparajin aminoasit dizisi fibronektin, vitronektin ve fibrinojen gibi proteinlerde bulunur ve belirli integrin reseptörlerince tanınırlar (Owen vd., 2005). Hücre içinde kinazları, fosfotazları ve yapısal proteinleri içeren yaklaşık 150 protein integrinle başlayan bu yapışkan yapının oluşmasında rol alırken 600'ü aşkın protein oluşan yapışkan yapının kontrolünde görev alır (Le Devedec vd., 2010). Odaksal yapışmanın olgunlaşması hücrelerarası maddeye bağlı integrin kümesinin olduğu bölgeye içerden ya da dışardan kuvvet uygulanmasıyla gelişir ve burada odaksal yapışmanın aktin iskeletiyle bağlanımı kuvvete bağlı yapıyı dengeleyici proteinlerden talin ve vinkülin ile güçlendirilir (Harjanto ve Zaman, 2010). Talin proteini aktin iplikçiklerini integrinlerin sitoplazmik bölgelerine bağlayan ve odaksal yapışmaların kurulmasında ve sağlamlaştırılmasında yüksek önem arzeden bir proteindir. Odaksal yapışmada görevli diğer proteinlerden  $\alpha$ -aktinin bağlayıcı proteinlerden olan ziksinin ve vinkülinin sitoplazmik bölgeleriyle aktinin bağlanmasında fonksiyoneldir. Ayrıca fosfotidil inositol-4-5 bifosfatın odaksal yapışmalarla etkileşimi rapor edilmiştir. Reseptör olmayan protein tirozin kinaz ailesinden odaksal yapışma kinazı da odaksal yapışma bölgesinde yerleşiktir ve integrinlerin ligandıyla ilişkilmesi sonucunda aktifleşip, hücre yayılması, göçü ve odaksal yapışmalara bağlı anti-apoptotik sinyal üretiminin sorumludurlar. Paksilin ve tensin aktin-membran bağlantı yerlerinde bulunan odaksal yapışma kinazı sinyal yolağının

içerisinde görevli proteinlerdir. Vinkülin spesifik bir şekilde odaksal yapışmalarla ilişkilenen bir bağlayıcı proteindir. Vinkülin aktinin odaksal yapışmalar aracılığıyla hücre zarına bağlanmasında etkin role sahip olmasının yanısıra talin,  $\alpha$ -aktinin, paksilin, F-aktin, Arp2/3, vazodilatör uyarıcı fosfoprotein ve asidik fosfolipitlerle ile etkileşim halinde olduğu bilinmektedir. Vinkülin proteininin baş-kuyruk şeklindeki doğal yapısı başka birçok proteinin bağlanmasına olanak sağlayacak bölgelerin protein üzerinde mevcut bulunmasını sağlamaktadır. Odaksal yapışmaların niceliksel incelenmesinde kompleks içindeki herhangi bir proteinin etiketlenip takip edilmesi mümkündür ancak her proteinin özgül özellikleri ve odaksal yapışmalardaki mevcut rolü nitelikli bir ölçüm için seçenekleri sınırlamaktadır. Örneğin, integrin proteinlerinin bütün kombinasyonlarının etiketlenmesi pratik olarak zorluk oluşturmaktadır yahut odaksal yapışma çeşitlerindeki bağlantı proteinlerinin dağılımı yine göz önünde bulundurulması gereken bir faktördür. Odaksal yapışmaların immün etiketlenmesine en uygun üç proteini  $\alpha$ -aktinin, talin ve vinkülin dir.  $\alpha$ -aktinin odaksal yapışma bölgelerindeki aktin iplikçiklerinin yanısıra sitoplazmik aktin iplikçiklerinin olduğu bazı bölgelerde de gözlemlenmiştir. Talin ve vinkülin arasından etiketlemek için vinkülinin seçiliyor olması ticari olarak uygun monoklonal antikorların üretim bandında birkaç türden elde edilmiş halde bulunuyor olmasından ibarettir (Ciobanasu vd., 2013; Hoffman vd., 2011; Hytonen ve Wehrle-Haller, 2014; Owen vd., 2005; Thievensen vd., 2013).

### **1.5 Aktin Polimerizasyonu ve Kuvvet Aktarımı**

Aktin polimerizasyonu ve depolimerizasyonu kuvvet dağılımını yöneterek hücre şeklinin değişiminde ve hücre sel moleküllerin organizasyonunda etkindir ve bunların yanında bölgesel bazda çalışan sinyal yollarına bağlı dinamiğiyle hücre hareketini sağlayan gücü oluşturur (Fletcher ve Mullins, 2010; Tojkander vd., 2012). Odaksal yapışmalarla ilişkili aktin stres fiberlerinin gözlemlenmesi aktin iplikçiklerinin uzamasıyla kuvvet aktarımının düzenlendiğini desteklemiştir (Goode ve Eck, 2007; Romero vd., 2004). Hücreler en az üç farklı tipte aktin stres fiberine sahiptir: (i) çapraz kemerler her iki ucundan da odaksal yapışmalarla ilişkilene memiş kıvrımlı aktin fiberlerini, (ii) dorsal fiberler bir ucu odaksal yapışmalara bağlı diğer ucu çekirdek veya çapraz kemerlerle ilişkili aktin fiberlerini ve (iii) ventral fiberler her iki ucuyla odaksal yapışmalara bağlanıp bunları köprüleyen aktin fiberlerini temsil eder (Kim vd., 2012).





Şekil 1. Aktin tipleri

(Vallénus, 2013)

Aktin iplikçiklerinin organizasyonunda rol oynayan başlıca proteinler vazodilatör uyarıcı fosfoprotein (VASP), Mena ve Ena-VASP-benzeri aktin uçlarında polimerizasyonu sağlayıcı ve vinkülin ve tensin gibi aktin uçlarında polimerizasyonu engelleyen proteinlerdir. Vinkülin sadece aktine bağlanmakla kalmayıp başlık benzeri bir mekanizmayla aktin uçlarında polimerizasyonu engeller (Krause vd., 2003; Le Clair vd., 2010). Aktin iplikçiklerinin odaksal yapışmalara bağlanıp uzaması tansiyonun oluşturulan aktin hattıyla dağılmasını sağlar. Aktin iplikçiklerini odaksal yapışmalara bağlayan proteinlerin bir başka görevi de aktin iplikçiklerini birbirine paralel olarak yöneltmek ve  $\alpha$ -aktininin iplikçikleri birbirine bağlamasına uygun hale getirmektir. Sonuç olarak hücrelerde odaksal yapışmalar üzerinde kümelenmiş birbirine bağlı, sert ve yönlü bir aktin yığınıyla belirlenmiş bir kutupsallık ortaya çıkar (Cramer vd., 1997).

### 1.6 Sıvı Kayma Gerilimi

Metastaz kanser hücrelerinin birincil bölgelerinden kopup göç ederek uzak bir yere yerleşmelerini kapsayan bir olaylar serisidir ve kanser kaynaklı ölümlerin yüzde doksanına sebeptir (Beerling vd., 2011; Chaffer ve Weinberg, 2011). Metastaz hücrelerinin yaşamları, kayma gerilimi altında yapışma ve göç edebilmeyi sürdürebilmelerine bağlıdır. Dokular içi ve arası sıvı akışı tümör metastazı ve işgaline sebep kayma gerilimi, hücreler yüzeyindeki basınç ve tutunma kuvvetlerini etkiler (Chang vd., 2008). Dolaşımdaki hücreler geniş aralıkta kayma gerilimine mahsurdurlar, toplar damarlarda yaklaşık olarak  $0.5-4 \text{ dyn/cm}^2$ , atar damarlarda  $4-30 \text{ dyn/cm}^2$  kayma gerilimi şiddet aralığı gözlemlenirken, dokular içi kayma gerilimi  $0.007-0.015 \text{ dyn/cm}^2$  olarak tahmin edilmektedir. Uygulanacak kayma gerilimine uygun akış hızı, Q,

tasarlanan mikroakışkan cihazının kanal genişliğine ve yüksekliğine ve de kullanılan sıvının akışmazlığına bağlı olarak değişir,  $Q=wh^2\tau/(6\eta)$ ,  $w$  genişlik,  $h$  yükseklik,  $\tau$  kayma gerilimi ve  $\eta$  akışmazlık (Gutierrez vd., 2008; Mitchell ve King, 2013). Homojen yüzeylerde yapışmış hücelere uygulanan farklı kayma gerilimlerinin hücre morfolojisi, kalsiyum taşıması, gen ifadesi ve hücre yapışmasını mekanik uyarılmaya bağlı olarak değiştirdiği rapor edilmiştir (Helmke vd., 2000; Helmke vd., 2001; Jang vd., 2011; Kou vd., 2011; Lawler vd., 2009; Lu vd., 2004; Tzima vd., 2001; Zhu vd., 2008).

## 1.7 İntegrinler

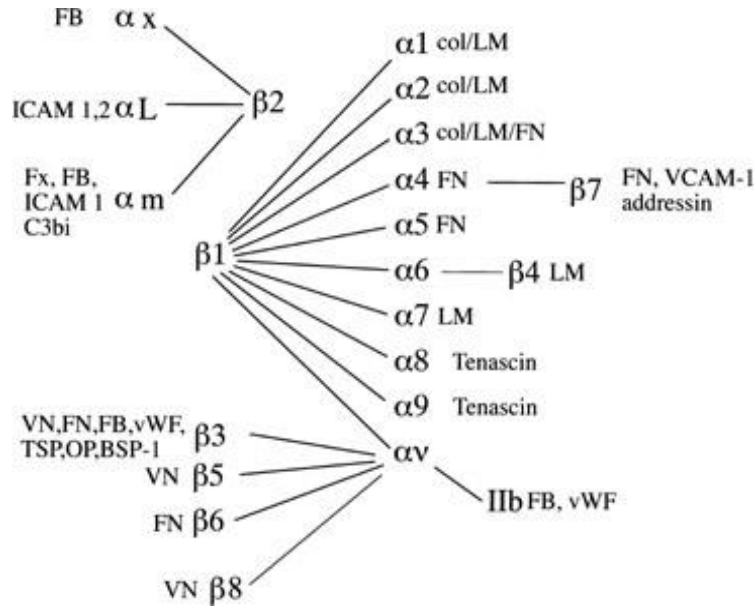
İntegrin ailesinde proteinlerin gen ifadelenmesi hücre tipine özgüdür. Örnek olarak, trombositlerdeki ana integrin proteinlerinden biri  $\alpha 1\beta 3$  olarak bilinir ve bu integrinler fibrinojenleri, von Willebrand faktörünü ve fibronektin proteinlerini tanıyan alıcılardır, homeostazı sağlamada olarak görev alırlar (Gilcrease, 2007; Hynes, 2002). Bu durumda  $\alpha 1\beta 3$  proteinleri hücre-hücre etkileşiminde görev almış olur. Epitel hücreler yüzeye yapışan hücrelerdir ve hücre-hücre etkileşimi için gerekli olan integrinlerin yanı sıra hücrelerarası madde ile bağlantı için çeşitli integrin proteinleri sentezlerler. Hücrelerarası maddeler içinde en çok bulunan protein kollajendir ve hücreler hücrelerarası maddeye yapışmak için kollajen alıcısı olan  $\alpha 1\beta 1$  ve  $\alpha 2\beta 1$  integrinlerini üretirler. Laminin izoformlarını tanımaya yönelik ise  $\alpha 3\beta 1$  ve  $\alpha 6\beta 1$  integrin proteinlerini kullanırlar (Gilcrease, 2007; Matlin vd., 2003). İntegrin proteinleri transmembran proteinleridir ve sitoplasmik kısmı hücre dışına bakan bölgesine göre daha kısadır, fakat hücre içinde gerçekleşen birçok olayı başlatıcı göreve sahiptir. RAS-RAF-MEK-ERK yolağında hücre dışından sinyal almada ve bu sinyali hücre için uyarlamada görevlidir. Fibronektin proteini de hücrelerarası maddede bulunan diğer proteinler gibi hücrenin yaşaması için gerekli görevlere sahiptir (Danen ve Yamada, 2001). İntegrinler epitel hücrelerin her üç yüzünde (bazal, yan ve apikal) bulunmaktadır ve bulunma oranları hücreye ve hücrelerarası madde bileşimine göre değişebilir.  $\alpha 2\beta 1$  integrin proteini bazal membranda en çok bulunan integrindir ve kollajenIV ile etkileşime girer (Kern ve Marcantonio, 1998).  $\alpha 5\beta 1$  ve  $\alpha v\beta 3$  fibronektin proteinine özgü integrin proteinleridir. Mezenkimal ve amibik hücre göçü karşılaştırıldığında, mezenkimal hücre göçü amibik hücre göçünün tersine integrin proteinlerinin hücrelerarası maddeye yapışmalarına bağlıdır (Friedl ve Wolf, 2010).

İstilacı kanser hücreleri genellikle hücre ve hücrelerarası madde arası integrinler sayesinde yapışma eğilimdedir ve bu durum podosome ve işgalci ayak yapılarının aktin yoğun bölgelerde ve aktin iskeletinin oluşumunu düzenleyen proteinlerle etkileşim sonucu oluşur (van Dijk vd., 2013). Ayrıca kanser hücrelerin istila modu hücrelerarası madde bileşimine ve çevre koşullarına göre değişmektedir (van Dijk vd., 2013).



İntegrinlerin hücre tipine göre gen ifadelerinin farklı olması yanısıra kanser hücrelerinde de integrin proteinleri genelde farklı seviyede ifadelenir.  $\alpha\beta3$  ve  $\alpha5\beta1$  integrinleri normal epitel hücrede düşük seviyelerde iken bazı kanser tiplerinde bu proteinlerin seviyeleri yüksektir. Bunun yanında,  $\alpha2\beta1$  integrin seviyesi normal epitel hücresinde normal seviyede iken, genellikle kanser hücrelerinde düşüktür. Meme kanseri hücrelerinde  $\alpha2\beta1$  integrin seviyesinin normal seviyeye çekilmesiyle hücrelerin tutunmasına bağlı olmayan büyümesinde ve membranda işgal için değişikliklerde düşüş görülmüştür. Sonuç olarak integrinlerin meme kanseri hücrelerinin işgalini durdurma rolü olabileceği ortaya çıkmıştır (van Dijk vd., 2013). Bununla beraber  $\alpha6\beta4$  integrin proteininin düşük seviyede olması normal meme hücrelerinin kötü huylu meme kanseri hücrelerine dönüşmesi anlamına gelir ve bu integrin proteininin meme kanseri hücresinde yüksek seviyede ifadelenmesi sonucu hücre normal meme hücresi fenotipi gösterir (Gilcrease, 2007; Natali vd., 1992).

Daha öncede belirtildiği gibi hücreler integrin alt üniteleriyle farklı integrin proteinleri üretmektedir ve her integrin proteininin kendine özgü seçiciliği vardır. Şekil 2'de görüldüğü gibi  $\alpha\beta3$  ve  $\alpha5\beta1$  fibronektin proteiniyle etkileşime geçerken  $\alpha2\beta1$  proteini kollajen ve laminin proteinini tercih eder (Groll, 2009; Hollinger, 2011; Hood ve Cheresh, 2002).



Şekil 2. İntegrin alt üniteleri ve onların etkileşime girdiği proteinler

(Gordon vd., 2003)

Tablo 1'de görüldüğü gibi integrin proteininin altgrupları sıralanmıştır. Bu tablo iki hücre hattında da ifadelenen proteinleri göstermiştir ve her iki hücre hattında da  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  ve  $\beta 4$  integrin alt gruplarının olduğu belirtilmiştir (Gordon vd., 2003). Ayrıca MCF10A normal epitel hücre

olarak kullanılmasına rağmen ortalama işgal göstergesi % 37.7 iken MDA-MB-231 hücreleri için bu oran %42.1'dir (Gordon vd., 2003). Diğer çalışmada ise iki hücre hattı karşılaştırıldığında  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$  proteinleri her iki hücre hattında da ifadelendiği görülmüş, fakat ifadelene seviyesinin MDA-MB-231 hücre hattında daha fazla olduğu Western blotlama yöntemiyle gösterilmiştir, akış sitometri yöntemiyle de doğrulanmıştır (Lichtner vd., 1998). MDA-MB-231 hücreleri ile yapılan deneylerde laminin proteinine özgü olan  $\alpha 3\beta 1$  integrinin hücre göçündeki rolü incelenmiş ve RNA interferaz ile baskılandığında hücre göçünün azaldığı gözlenmiştir (Mitchell vd., 2010).

Tablo 1. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hatlarında bulunan alpha2, alpha3, alpha6, beta1,beta4 integrin alt gruplarının ifadelene profili

(Gordon vd., 2003)

-MARKER EXPRESSION PROFILE IN BREAST CELL LINES BY IMMUNOHISTOCHEMICAL AND RT-PCR ANALYSIS

Marker	MDA 231	MCF 10A
$\alpha 2$ integrin	+	+
$\alpha 3$ integrin	+	+
$\alpha 6$ integrin	+	+
$\beta 1$ integrin	+	+
$\beta 4$ integrin	+	+
Vimentin	+	+
CK14	+/-	+
CK18	+	+
$\alpha$ -SMA	-	-
Tenascin	+	+
CALLA	-	-
E-cadherin	-	+
EMA	-	+
HMFG1	-	+
DSc2	+	+
DSg3	-	+
MMP-7	+	+

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1 Hücre Kültürü

Projede kullanılan hücre hatları MDA-MB-231 ve MCF10A dir.

MDA-MB-231 hücreleri için gerekli besi yeri olarak %10 serumlu yüksek glikozlu DMEM (High glucose DMEM) kullanıldı. Bunun için 450 ml High glucose DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Biological Industries-01-055-1A), 50 ml fetal sığır serumu Biological Industries, 5 ml Penisilin Streptomisin (Biological Industries-03-031-1B), 5 ml L-glutamin (Biological Industries-03-020-1B) karıştırıldı, filtrelendi ve besiyeri olarak kullanıldı.

MCF10A besi yeri için DMEM/F12-(HAM)1:1 (Biological Industries-01-170-1A), verici at serumu (donor horse serum-Biological Industries-04-004-1A), epidermal büyüme faktörü (EGF), hidrokortizon, koleratoksin, insulin, Penisilin Streptomisin, L-glutamin kullanıldı. Karışım oranları ise şu şekildedir;

DMEM-F12 High glucose/NO L-Glutamine/ With Sodium Pyruvate /With HEPES) 500 ml, verici at serumu 25 ml, EGF(Sigma(E96442 MG)) 100 µl, hidrokortizon(Sigma (H0888-1G)) 250 µl, koleratoksin(Sigma (C8052-1MG)) 50 µl, insulin(Sigma(I1882-100MG)) 500 µl, Penisilin Streptomisin 5 ml, L-Glutamin 5 ml.

Basal koşullarda yapılan deneyler için kullanılan besi yeri 500 ml Leibovitz's (1X) (gibco by life technologies-21083-027-500ml) ile 1,725 gram albumin sığır serumunun (Sigma-A9418-5G) karıştırılmasıyla oluşturuldu. L15-BSA olarak kısaltıldı ve aç bırakılma koşulları sırasında hücrelere uygulandı.

Akış deneylerinde CO<sub>2</sub> dengesinin bozulma olasılığını ortadan kaldırmak için 500 ml Leibovitz's (1X) (gibco by life technologies-21083-027-500ml) ile 50 ml Fetal sığır serumunun karıştırılmasıyla oluşturulan L15-serum kullanıldı.

Hücre kültürü laminar flow kabin (Thermo Scientific MSC1.2 ve Nüve MN120) içinde yapılırken, hücreler sıcaklık ve CO<sub>2</sub> dengesi için inkübatörde (Binder ve ThermoScientific 3404) tutuldu. Hücre kültürü esnasında gözlem yapabilmek için ters bakışlı faz-kontrast mikroskobu kullanıldı (Olympus CKX41).

### **2.1.1 MDA-MB-231 Hücre Kültürü**

MDA-MB-231 hücreleri pasaj 30 ile pasaj 50 arasındaki dönemde kullanıldı.

MDA-MB-231 hücre hattı için çözme işlemi;

Öncelikle petri kabının içerisine belirli miktarda besi yeri konuldu, ısının ve CO<sub>2</sub> yüzdesinin dengelenmesi için inkübatöre yerleştirildi. Daha önceden 37°C ye getirilen su banyosunda (Nüve bath nb2) sıvı nitrojen tankından (Thermo Scientific Locator JR Plus) çıkarılan cryo tüp yarısı eriyecek şekilde bekletildi, daha sonra cryo tüp içerisindeki solüsyon tamamı falkon tüp içine alındı. Bu solüsyon taze besi yeri ile 10 ml ye tamamlandı ve 1000 rpm dönüş ile 5 dakika santrifüj (Nüve bench top centrifuge NF 400R) edildi. Bu işlemin amacı, hücreleri çöktürerek dondurma işlemi için gerekli DMSO dan ayırmaktır. Santrifüj işleminden sonra hücre falkon tüpde en aşağıda çökelti olarak kaldı. Hücreye zarar vermeyecek şekilde tüm solüsyon vakumla çekildi. Daha sonra hücre çökeltisi taze besi yerinde çözüldü ve önceden inkübatöre yerleştirilen petri kap içerisine eklendi. Hücrelerin, çözme işleminden sonra, ritüele girmeleri



yaklaşık bir buçuk hafta aldı. Hücreler ATCC nin önerdiği gibi periyodik olarak iki-üç günde bir pasajlandı.

MDA-MB-231 hücre hattı için pasaj işlemi;

Hücre ekimi yapıldıktan sonra petri ler mikroskop altında 2 günde bir gözlemlendi. Konfluensi oranı yaklaşık %80 olan petri kapları pasaj için kullanıldı.

Öncelikle petri kabının (Treated CORNING) içerisine belirli miktarda besi yeri konuldu, ısının ve CO<sub>2</sub> yüzdesinin dengelenmesi için inkübatöre yerleştirildi. Pasaja hazır olan hücreler laminar flow kabinde işlemler yapılacak şekilde önce petri içinde bulunan besi yerleri vakumla çekildi. Daha sonra 2 ml Tripsin ile yıkandı, ve ardından 4 ml Tripsin eklendi. MDA-MB-231 hücreleri yüzeye tutunan hücrelerdir ve tripsin etkisiyle yüzeyden kalkarlar. Enzimin etkili olması için petri kaplar 3 dakika inkübatörde tutuldu. 3 dakika sonunda hücreler mikroskop altında gözlemlendi ve laminar flow kabine alındı. Enzim aktivitesini durdurmak için serumlu besi yeri eklendi ve petri içinde bulunan solüsyon 5-6 kez toplanıp bırakıldı. Son toplama sonrasında solüsyon falkon tüpe aktarıldı. Daha sonra petri kabı 5 ml taze besi yeri ile solüsyonun bırakılıp toplanmasıyla yıkandı ve falkona eklendi. Toplamda 10 ml olan solüsyon 1000 rpm dönüşle 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj işleminden sonra hücre falkon tüpde en aşağıda çökelti halini aldı. Hücreye zarar vermeyecek şekilde tüm solüsyon vakumla çekildi. Daha sonra hücre taze besi yerinde çözüldü ve önceden inkübatöre yerleştirilen petri kap içerisine eklendi.

MDA-MB-231 hücre hattı için dondurma işlemi;

Dondurma işlemi için hücre çökeltisi pasaj işleminden sonra yaklaşık %7 lik DMSO da çözüldü, ve cryo tüplere yüklendi. Hücrelerin bulunduğu cryo tüpler bu işlemde sonra izopropanol dolu hücre dondurma kabında yaklaşık bir hafta -80°C de bırakıldı ve sonra sıvı nitrojen bulunan hücre tankında saklandı.

### **2.1.2 MCF10A Hücre Kültürü**

MCF10A hücreleri pasaj 5 ile pasaj 30 arasındaki dönemde kullanıldı.

MCF10A hücre hattı için çözme işlemi;

Öncelikle petri kabının içerisine belirli miktarda besi yeri konuldu, ısının ve CO<sub>2</sub> yüzdesinin dengelenmesi için inkübatöre yerleştirildi. Daha önceden 37°C ye getirilen su banyosunda sıvı nitrojenden çıkarılan cryo tüp yarısı eriyecek şekilde bekletildi, daha sonra cryo tüp içerisindeki solüsyon tamamı falkon tüp içine alındı. Bu solüsyon taze besi yeri ile 10 ml ye tamamlandı ve

1000 rpm dönüş ile 5 dakika santrifüj edildi. Bu işlemin amacı, hücreleri çöktürerek dondurma işlemi için gerekli DMSO'dan ayırmaktır. Santrifüj işleminden sonra hücre falkon tüpte en aşağıda çökelti olarak kaldı. Hücreye zarar vermeyecek şekilde tüm solüsyon vakumla çekildi. Daha sonra hücre çökeltisi taze besi yerinde çözüldü ve önceden inkübatöre yerleştirilen petri kap içerisine eklendi. Hücrelerin, çözme işleminden sonra, ritüele girmeleri yaklaşık bir buçuk hafta aldı. Hücreler ATCC nin önerdiği gibi periyodik olarak iki-üç günde bir pasajlandı.

MCF10A hücre hattı için pasaj işlemi;

Hücre ekimi yapıldıktan sonra petri mikroskop altında 2 günde bir gözlemlendi. Konfluensi oranı yaklaşık %80 olan petri kapları pasaj için kullanıldı.

Öncelikle petri kabının (Treated CORNING) içerisine belirli miktarda besi yeri konuldu, ısının ve CO<sub>2</sub> yüzdesinin dengelenmesi için inkübatöre yerleştirildi. Pasaja hazır olan hücreler laminar flow kabinde işlemler yapılacak şekilde önce petri içinde bulunan besi yerleri vakumla çekildi. Daha sonra 2 ml Tripsin-EDTA solüsyon C (Biological Industries-03-053-1B-100 ml) ile yıkandı, ve ardından 4 ml Tripsin-EDTA eklendi. MDA-MB-231 hücreleri yüzeye tutunan hücrelerdir ve tripsin etkisiyle yüzeyden kalkarlar. Enzimin etkili olması için petri kaplar 17 dakika inkübatörde tutuldu. 17 dakika sonunda hücreler mikroskop altında gözlemlendi ve laminar flow kabine alındı. Enzim aktivitesini durdurmak için serumlu besi yeri eklendi ve petri içinde bulunan solüsyon 5-6 kez toplanıp bırakıldı. Son toplama sonrasında solüsyon falkon tüpe aktarıldı. Daha sonra petri kabı 5 ml taze besi yeri ile solüsyonun bırakılıp toplanmasıyla yıkandı ve falkona eklendi. Toplamda 10 ml olan solüsyon 1000 rpm dönüşle 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj işleminden sonra hücre falkon tüpte en aşağıda çökelti halini aldı. Hücreye zarar vermeyecek şekilde tüm solüsyon vakumla çekildi. Daha sonra hücre taze besi yerinde çözüldü ve önceden inkübatöre yerleştirilen petri kap içerisine eklendi.

MCF10A hücre hattı için dondurma işlemi;

Dondurma işlemi için hücre çökeltisi pasaj işleminden sonra yaklaşık %7 lik DMSO da çözüldü, ve cryo tüplere yüklendi. Hücrelerin bulunduğu cryo tüpler bu işlemden sonra izopropanol dolu hücre dondurma kabında yaklaşık bir hafta -80°C de bırakıldı ve sonra sıvı nitrojen bulunan hücre tankında saklandı.

## 2.2 Çip hazırlama

Deneylerde silikon (Universal wafer) ve bir yüzü Indiumtinoxide (İTO-Teknoma Ltd.) kaplı camlar kullanıldı. İTO kaplı yüzeyin testi multimetre ile yapıldı.

### 2.2.1 Pluronic polimerinin kapaticılık özelliğini test etme

Çip kaplama optimizasyonlarında öncelikle pluronic polimerinin BSA ve K-kazein kadar iyi bir kapatici olup olmadığı incelendi. Denemelerde yüzey önce APTES ile daha sonra pluronic ile kaplandı.

Tüm yüzeyler kaplamalardan önce sırayla aseton, izopropanol ve su içinde ultrasonik banyoda temizlenip kurulandı ve deneyler için kullanıldı.

Kaplamadan önce hidrofobik yüzey sağlamak için APTES ve TMCS kimyasalları buhar ve sıvı fazda denendi.

### 2.2.2 İTO-camlara K-kazein kaplama denemeleri ve K-kazein, Fibronektin, Laminin kaplama

İTO-cam yüzeyleri K-kazein ile kaplamak için buhar ve sıvı fazda APTES kimyasını kullanıldı. Homojen yüzey oluşturmak üzere UV/ozon kullanıldı. Bu cihazla en az beş en fazla on dakika temizlenen İTO-cam yüzey, %2-3 APTES içeren aseton içinde 30 dakika bekletildikten sonra aseton ile ardında iyonsuz su ile durulanıp kurutuldu ve ~110°C de bir saat ısıtıldı.

APTES olmayan süre içinde UV/ozon ile temizlenen İTO-camı poli-L-lizin (%0.01) ile beş dakika kaplandıktan sonra % 0.5'lik glutaraldehit (PBS çözelti) içinde 15 dakika bekletildi ve yüzey yıkandıktan sonra kurutulmadan K-kazein ile kaplandı.

Fibronektin, K-kazein ve Laminin kaplamaları stok protein tüplerinden alikotlanarak, Fibronektin ve K-kazein -80°C, Laminin -20°C'de saklandı, ve gerekli olduğunda yarım saat önce çıkarılıp kaplama için bekletildi. Fibronektin ve Laminin kaplaması bir saat uygulandı, K-kazein ise 24 saat uygulandı.

### 2.2.3 Elektron Demeti Litografisi

Elektron demeti Litografisi enstitünün Fizik bölümünde bulunan Raith E-line electron demeti litografi cihazıyla (Raith GmbH, Dortmund, Germany) ile gerçekleştirildi.

Cihaza örnek koymak için öncelikle cihazdaki vakum azaltıldı ve böylece cihazın kapağının açılabilir olması sağlandı. Bunun için "Navigator" sekmesinden "Unload" seçildi. Yaklaşık iki dakika beklendikten sonra cihaza bağlı bulunan gaz nitrojen açıldı ve cihaza gaz gitmesi, böylece vakumun azalması ve kapağın açılması sağlandı. Kapak açıldıktan sonra içinde bulunan örnek koyma zemini dışarıya çıkarıldı ve zeminde bulunan mandallarla örnek sabitlendi. Daha sonra örnek haznenin içine kondu ve kapak kapatıldı. Kapağın tam kapanması için tekrar vakum yapıldı. Bunun için "Navigator" sekmesinden "Load" seçildi ve

cihaza azot gazı akışı kapatıldı. Vakum makinesi yaklaşık on beş dakika hazne içindeki havayı çekip örneğin bulunduğu hazneyi vakumladı. Cihaza yerleştirilen örneğin koordinatları cihaza tanıtıldı. Yazma işleminin hassasiyetini sağlamak için “*stigmation*” ve “*aperture*” değerleri düzeltildi. Elektron tabancasının çalıştığı alanda merkezlenmesi işlemi “*writefield alignment*” ayarlanmalarıyla kesinleştirildi. Örnek üzerinde üç ayrı noktadan z ekseninde çalışma mesafesi ölçüldü. Ortalama çalışma mesafesinden akım ölçümü “*Faraday Cup*” konumunda gerçekleştirildi. İstenen adım aralığına bağlı olarak değişecek olan bekleme süresi “*Dwell time*” programa hesaplatıldı. Daha sonra desenler örnek üzerine tasarlanan şekilleriyle yerleştirildi ve program yazım işlemine başlatıldı. Alan olarak 5–100  $\mu\text{C cm}^{-2}$  ve çizgi dozu olarak 2–3200  $\text{pAs cm}^{-1}$  denendi. Uygulanan voltaj değeri 5 kV'dir.

## **2.3 Test yüzeylerde hücre uygulamaları**

### **2.3.1 Hücreleri test yüzeylere aktarma için uygulanacak yöntemin belirlenmesi**

Hücreleri yüzeyden ayırmak için tripsin-EDTA enzimatik çözeltisini ve enzimatik olmayan hücre ayrıştırma çözeltisi denendi.

#### **2.3.1.1 Saykloheksimit uygulaması**

0, 5, 10, 20, 40 ve 80  $\mu\text{g/ml}$  saykloheksimit 2 saat süresince normal hücre kültürü yüzeylerindeki hücrelerle test edildi.

#### **2.3.1.2 Hücrelerin aç bırakılması uygulaması**

Hücreler serumsuz ortamda Tripsin-EDTA muamelesi öncesi, sonrası ve olmadan, ayrıca Fibronektin ve K-kasein yüzeyler üzerinde serumsuz ve normal ortamda bekletildiler.

Hücre kültürü deneylerinin optimizasyonu için farklı kombinasyonlarda denenen koşullar Tablo 2' de belirtilmiştir.



Tablo 2. Yüzeylerde hücre kültürü optimizasyonu için denenen koşullar

Bu koşulların çok çeşitli kombinasyonları denendi. (Birkaç örnek: II-2saat + III-1saat + IV-2saat;II-2saat + IV-2saat;I-2saat + IV-2saat + V-4saat; I-2saat + V-4saat;....)

Koşullar	Denenen Süreler				
<i>I Tripsin-EDTA öncesi serumsuz ortam</i>	0 saat	2 saat			
<i>II Tripsin-EDTA sonrası serumsuz ortam</i>	0 saat	2 saat			
<i>III Serumsuz ortam içinde bekletme</i>	0 saat	1 saat	2 saat		
<i>IV Yüzey üzerinde serumsuz ortam</i>	0 saat	1 saat	2 saat		
<i>V Yüzey üzerinde normal ortam</i>	0 saat	2 saat	3 saat	4 saat	18 saat

### 2.3.2 Test yüzeylere ekilecek hücre sayısının belirlenmesi

Yüzeylere farklı sayılarda ( $0.025 \times 10^6$ ,  $0.17 \times 10^6$ ,  $0.37 \times 10^6$ ,  $0.66 \times 10^6$ ,  $0.8 \times 10^6$ ,  $1.00 \times 10^6$ ,  $8.00 \times 10^6$ ) hücreler ekildi.

### 2.3.3 Hücrelerin Fibronektin ve K-kazein yüzeylerde test edilmesi

Hücreler K-kazein veya Fibronektin kaplı kontrol ITO-cam yüzeylerde test edildi. Bunun için önce hücreler 2 saat serumsuz ortamda bekletildi, tripsin-EDTA ile petrilere ayrıldı ve kontrol yüzeylerde normal ortamda kültür yapıldı.

### 2.3.4 K-kazein üzerinde Fibronektin nanodesen yüzeylerinde odaksal yapışma deneyleri için hücre uygulamaları

Optimize edilen koşullarda ITO-cam üzerinde K-kazein üzerinde Fibronektin nanodesenleri elektron demeti litografisi ile oluşturuldu. Ardından MDA-MB-231 hücreleri optimize edilen koşullarda K-kazein üzerine desenlenmiş Fibronektin nanonoktaları üzerinde kültürlendi. Daha sonra odaksal yapışma proteini olan vinkulin için ve yüzeyde desenlenmiş fibronektin için immün floresan boyamaları yapıldı. Desenleme ile ilgili olarak bazı örneklerde elektron ışınına maruz kalan yüzeye bağlanacak olan FN, DyLight ile floresan olarak işaretlendi ve hücrelerle test edildi. Burada amaç ilerdeki akış deneylerinde immün boyama yapmadan desenlerin olduğu bölgeleri gözlemlemektir. Floresan mikroskopta alınan görüntüler imageJ programı kapsamında çeşitli aşamalardan geçirilerek analizleri gerçekleştirildi.



### **2.3.5 K-kazein üzerinde Fibronektin nanodesen yüzeylerinde odaksal yapışmaları için analiz basamakları**

RGB formatta floresan mikroskop görüntüleri imageJ programıyla renk kanallarına ayrıldı. Analiz işlemleri için 8 bit resim formatı kullanıldı. Vinkülin boyamalarını yani odaksal yapışmaları gösteren resimler ayrılıp imageJ üzerinden uygulanan basamaklarla odaksal yapışmaların niteliksel analizi yapıldı. Kullanılan başlıca işlemler ve analiz eklentileri şöyle: *subtract background-rolling ball radius>sliding paraboloid, Brightness&Contrast, math>subtract, math>exp, CLAHE, Log3D, analyze particles, ve adjust>threshold*. Odaksal yapışma bölgelerinin belirlenmesinin ardından desen fotoğraflarıyla eşleştirilen ilgili alanların nanonoktalara göre durumları tespit edildi.

### **2.3.6 K-kazein üzerinde Fibronektin nanodesen yüzeylerinde hücre şekli ve iskeleti**

Hücre şekli ve iskeletinin İTO-cam yüzeyde oluşturulan protein nanodesenleri üzerinde sınanması gerçekleştirildi. Hem MCF10A hem de MDA-MB-231, sırasıyla normal epitel ve meme kanseri hücreleri, İTO-cam yüzeydeki K-kazein üzerinde desenlenen FN nanonoktaları üzerinde kültürlendi. Hücre iskeletini gözlemlemek için hücrelere F-aktin proteinine doğrudan bağlanan floresan falloidin (phal488, phal350, phal647-Sigma) boyaması yapıldı ve bununla beraber hem hücrenin kendi ürettiği hem de yüzeydeki desenleri oluşturan fibronektin (FN), FN'yi tanıyan birincil antikolar ardından bu birincil antikoları tanıyan floresan ikincil antikolar, vinkülin proteini de vinkülin'i tanıyan birincil antikolar ve bu birincil antikoları tanıyan floresan ikincil antikolar ile boyandı. Antikor seyreltmelerinin optimizasyonu için çeşitli oranlar kullanıldı. MDA-MB-231 hücrelerinin üzerlerinde kültürlendiği yeni yüzeylerde FN proteini DyLight ile floresan olarak işaretlendiği için tekrar antikolarla boyanmadı. İki hücre hattı arasındaki hücre şekli ve iskeleti arasındaki farklar öncelikle niteliksel olarak aktin iskelet yapısının farklılıklarının gözlenmesiyle elde edildi. Daha sonra niceliksel değerlere aktarmak üzere ImageJ ile analizleri yapıldı.

### **2.3.7 Çift aktif çiplerin hazırlanması**

Çift aktif çiplerin hazırlanması iki şekilde gerçekleştirildi.

-Fibronektin kaplı çip üzerine elektron demeti litografisi yapıldıktan sonra Laminin proteini ile kaplandı, farklı Laminin yoğunlukları denendi.

-Laminin kaplı çip üzerine elektron demeti litografisi yapıldıktan sonra Fibronektin proteini ile kaplandı.

Tek aktif deneylerinde uygulanan yöntem ile kültürlendi ve immuno boyama yapıldı.

## 2.4 Akış deneyleri için UV litografi yöntemiyle kanal hazırlama

### 2.4.1 Fotolitografi

Farklı kanal şekilleri için fotomaske dosyaları CorelDraw yazılımı ile çizildi ve maskeler hizmet alımı yoluyla temin edildi. UV litografi uygulamasında kullanılmak üzere elde edilen maskeler bulgular kısmı Şekil 88 de fotoğraflanmıştır.

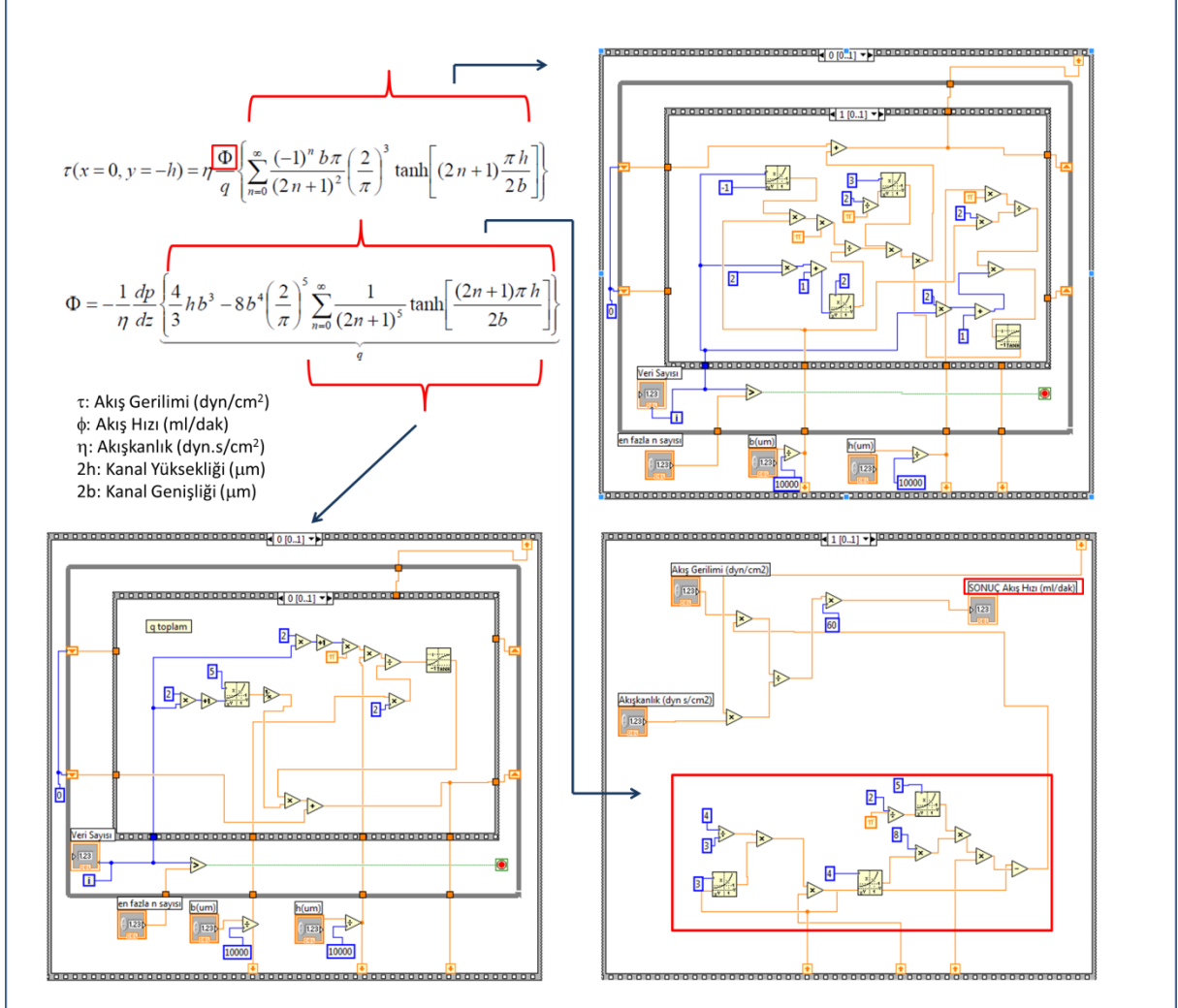
Silikon wafer yüzeyiyle yapılan deneylerde öncelikle yüzeyde herhangi bir toz olmaması sağlandı. Silikon wafer'in orta bölümüne yaklaşık 4 mililitre SU-8 döküldü, sonra 65°C ısıtıcı üzerinde yayıldı ve baloncuk olmamasına dikkat edildi. Pişirmeyi önlemek için döküm ve yayma işleminin kısa sürede tamamlandı. Yayma işleminden sonra örnek on dakika oda sıcaklığında düz bir zeminde bekletildi. Döndürme basamağı için spinnerın çalışması kontrol edildikten sonra örnek spinner a yerleştirildi ve çalıştırıldı. İstenilen kalınlık için uygulanan program 5 saniyede 500 rpm'e çıkış, 15 saniye 500 rpm, 5 saniyede 1000 rpm'e çıkış, 30 saniye 1000 rpm ve 10 saniyede 0 rpm'e iniş idi. Bu programla 300 mikro metrelik bir kalınlık elde edildi. Daha sonra ön pişirme basamağı uygulandı. Ön pişirme iki basamaktan oluşmaktaydı; 65°C ve 95°C. İlk basamakta; 65°C'ye getirilen ısıtıcıda denenen süreler 2 dakikayla 60 dakika arasındadır ve uygulanan süre 20 dakika idi. İkinci basamakta; 95°C ye ayarlanan ısıtıcıda denenen süreler 1 saat ile 6 saat aralığındadır ve uygulanan süre 4 saat idi. 4 saat sonunda örnek bir sonraki güne kadar ısıtıcı üzerinde bekletildi. UV ışınlama basamağına geçmeden önce, SU-8 tabakasının tamamen polimerleştiğini kontrol etmek için 95°C'de kırışıklık testi uygulandı. Kırışıklık olduğunda 95°C'de 10 dakika daha pişirilir oda sıcaklığına getirildi, kırışıklık gözlenmeyene kadar bu işlem tekrarlandı. Kırışıklık gözlemlenmediğinde oda sıcaklığında bekletilen örnek UV ışınlama basamağına hazırды. Örnek maske hizalayıcısına (840 mWatt/cm<sup>2</sup>) yerleştirildi. UV ışınlama denemeleri 5 saniye ile 70 saniye arasında yapıldı. Optimum süre 60 saniye olarak belirlendi. Işınlamadan sonra örnek oda sıcaklığında yaklaşık on dakika bekletildi. Son pişirme basamağı UV ışınlama basamağından sonraki aşama idi. İlk olarak 65°C'ye getirilen ısıtıcıda 5 dakika ile 20 dakika arasında denemeler yapıldı, 5 dakika uygun süre olarak belirlendi. Bu süre sonunda ısı 95°C'ye yükseltilerek 15 dakika uygulandı. Örnek bir sonraki güne kadar ısıtıcı üzerinde bekletildi. Fotolitografinin son basamağında developerla ışın görmeyen yerler örnekten uzaklaştırıldı. Bu basamak için develop süresi olarak 15 dakika ile 60 dakika aralığı denenip 40 dakika uygun süre olarak belirlendi. Developer etkisini ortadan kaldırmak için örnek izopropanol ile durulandı. Örnek mikroskop altında incelendi develop aşamasının tamamlandığı doğrulandı.

#### 2.4.2 Akış deney düzeneğinin hazırlanması

Akış deneylerinin ön basamağında SU-8 kalıpları UV litografi ile iki farklı boyda hazırlandı: 22mmx22mm ve 25mmx75mm. SU-8 kalıbının görüntüsü bulgular kısmında Şekil 89'da gösterilmiştir. İlk denemelerde 25mmx75mm boyutlarında olan İTO-camlar optimizasyonlar için yaklaşık 22mmx22mm boyutlarında kesilip kullanıldı. İTO-cam üzerinde yazılan alanların büyüklüğüne göre ya da tüm yüzeyi içine alacak şekilde genişliği 10 mm'den 15 mm'ye kadar olan kanallar kullanıldı. UV litografi ile hazırlanan silikon örnek üzerindeki SU-8 kalıplarının PDMS kanallarına dönüştürülmesi için farklı oranlarda PDMS (Polydimetilsiloksan-Sylgard 184 Silicone elastomer kit) karışımı hazırlandı. Bunun için önce SU-8 kalıp etanol ve su ile yıkandı daha sonra alüminyum folyo üzerine yerleştirildi. PDMS ile SU-8 kalıbı polimerleşme sonrasında kolayca ayırabilmek için üzerine deterjan uygulandı. PDMS karışımı PDMS ve kür solüsyonu karıştırılarak oluşturuldu. Karıştırma oranı PDMS kalıbını sertliğini etkilemektedir. PDMS ve kür solüsyonu 10:1'lik ve 5:1'lik oranlarda hazırlandı ve 5:1'lik kalıplar 10:1'liklere göre daha sert olduğu görüldü. PDMS ve kür solüsyonu yaklaşık 15 dakika karıştırılarak baloncuklu karışım elde edildi. Baloncuklar vakum ile uzaklaştırıldı. Vakum uygulaması 5'er dakika aralıklı olarak bütün baloncuklar yok olana kadar sürdürüldü. Daha sonra karışım örneğin üzerine döküldü ve düz bir zeminde iki gün polimerleşmeye bırakıldı. PDMS ve SU-8 kalıp etanol yardımı ile ayrıldı. Sonucunda oluşan kalıp bulgular kısmı Şekil 90'da gösterilmektedir. PDMS kalıpları akış deneyleri için kullanıldı.

Akış deneylerinde karşılaşılabilecek muhtemel sorunların tespitini ve giderilmesini sağlayacak öncü akış deneyleri yapıldı. Öncelikle akış düzenekleri oluşturuldu, düzenek bulgular kısmı Şekil 91'de gösterildiği gibi düzenlendi. Bunun için yukarıda açıklandığı şekilde oluşturulan PDMS kalıpları beş dakika süresince UV/ozona maruz bırakıldı ve İTO-cam üzerinde K-kazein ve İTO-cam üzerinde FN kaplı kontrol yüzeyleri ile birbirlerine yapıştırıldı. Akış sırasında olası herhangi bir sızıntıyı önlemek amacıyla birleşim yerlerine az miktarda sıvı PDMS karışımı uygulandı. Akış için oluşturulmuş giriş çıkış noktalarındaki bölgelere yerleştirilen adaptörlerin sızdırma olasılığını yükselttiği için giriş ve çıkışı sağlayan silikon hortumlar kanallara doğrudan bağlandı ve PDMS birleşim yerlerine de aynı şekilde sızıntıyı önlemek amacıyla az miktarda sıvı PDMS karışımı uygulandı. Baloncuklanmayı önlemek ve kanalı akışa hazırlamak amacıyla kanal öncelikle besiyeri ile muamele edildi ardından belirlenen oranda ( $7 \times 10^4$  hücre/ml) hücre içeren besiyer kanaldan geçirildi. MCF10A ve MDA-MB-231 hücreleri konsantrasyonları aynı olacak şekilde L15-serum besiyerinde seyreltildi ve akış için ayrı ayrı kullanıldı. Ters bakışlı faz-kontrast mikroskobuna bağlı kamera ile saniyede bir fotoğraf karesi alacak şekilde otuz saniyelik çekimler ve bir saniyede on beş fotoğraf karesi alacak şekilde otuz saniyelik videolar kayıt edildi.

Üretilen PDMS kanal boyutları Poiseuille denkleminde kullanılarak (Şekil 3), test edilecek akış gerilimleri için uygulanması gereken akış hızları hesaplandı (bulgular kısmı Tablo 3). Burada hem fizyolojik değerler hem de literatürde kullanılan değerler baz alındı.

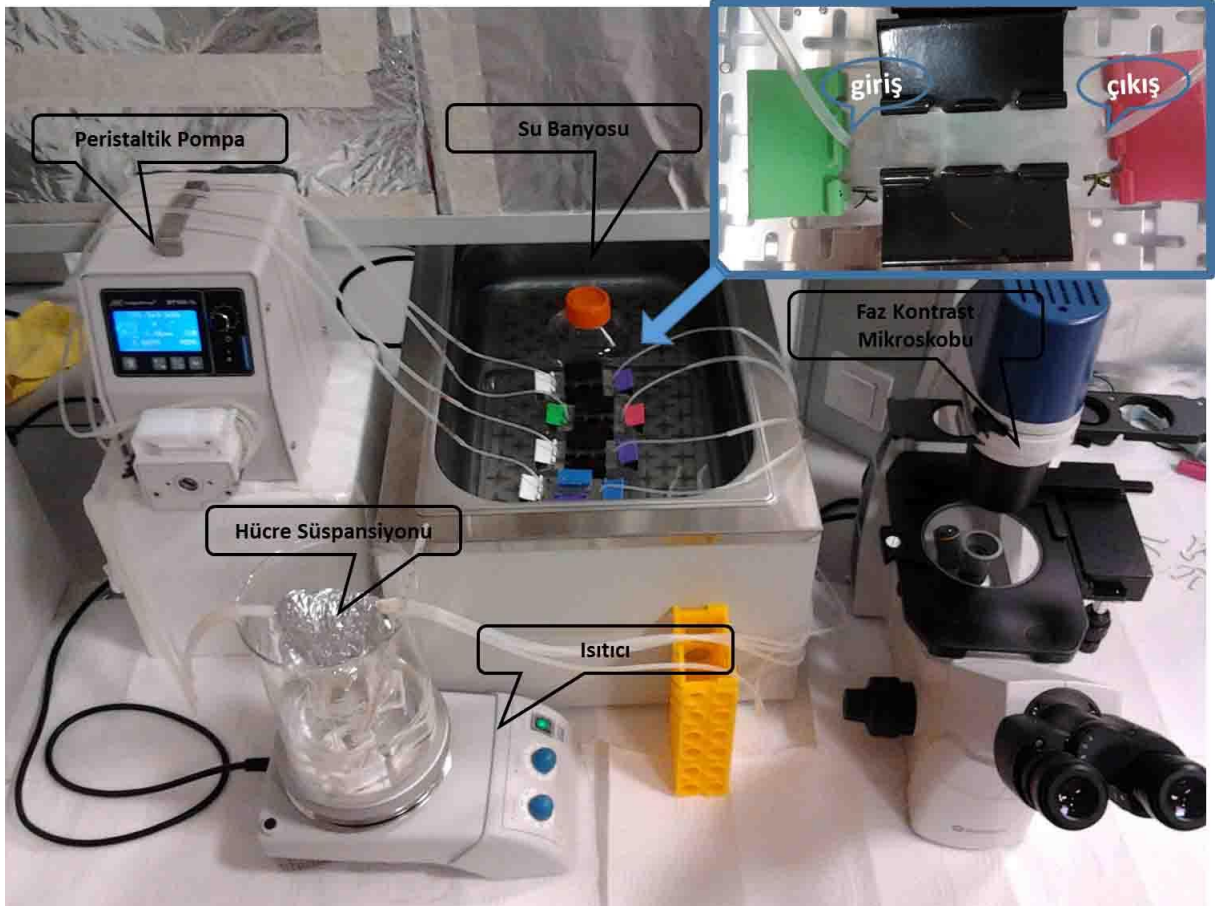


Şekil 3. Akış hızı hesaplamasında kullanılan formül ve akış hızı hesabını yapmakta kullanılan LabView bilgisayar programının basamaklandığı formülün her bir basamağının akış şeması.

Denemelerde, kalınlığı  $eni$ , boyu ve yüksekliği bilinen PDMS kanalları kullanıldı. Bu denemelerde akış gerilimi 0,25 dyn/cm<sup>2</sup>'den 2 dyn/cm<sup>2</sup>'ye kadar uygulandı. Öncelikle UV/ozona ile sterilize edilen ve aktiveleştirilen kanallar protein kaplı çiplere kalıcı olarak yapıştırıldı daha sonra akış sistemi ters bakışlı faz kontrast mikroskobu üzerinde kuruldu. Kanal %70 lik EtOH ile sterilize edildi ve EtOH kalıntısı bırakmamak üzere L15-serum besiyeri kanaldan akıtıldı. Daha sonra MDA-MB-231 hücreleri akış sistemindeki kanala aktarıldı. Hücreler kanal boyunda sisteme yüklendikten sonra bir saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra

yapışan hücrelerin akış altında ayrılması gözlemlendi. Akış gerilimleri sırasıyla 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00 dyn/cm<sup>2</sup> beşer dakika olarak uygulandı.

Hücrelerin uygulanan akışla kanala girdiği ve uygulanan akışın sürekliliğinde yüzeye yapışmalarının beklenildiği sistem düzeneği Şekil 4'de gösterilmektedir.



Şekil 4. Akış altında hücre yapışmasının sağlanabilmesi için kurulan sistemin genel görünümü

Akış altında hücre yapışmasının sağlanabilmesi için 0.02 dyn/cm<sup>2</sup> değerinde akış gerilimi 24 saat boyunca peristaltik pompa aracılığıyla çiplere uygulandı. Hücre süspansiyonu L15 serum içinde 12x10<sup>6</sup> hücre içermektedir. Su banyosu ve hücre süspansiyonu 37° C derecede tutuldu. Sızdırma olasılığına önlem olarak ITO camlara yapıştırılmış PDMS kanallar kenarlarından kışkaçlar ile desteklendi. Hücre süspansiyonu manyetik çubuk ile sürekli karıştırılarak hücre çökmesi engellendi. Kanalda hücre akışının devamlılığı faz kontrast mikroskobu ile gözlemlendi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 İTO üzerinde MDA-MB-231 Kontrol ve Tek aktif desenlenen yüzeyler

İndiumtinokside (İTO) kaplı camlar yüzeylerinin iletken olması dolayısıyla EDL için uygun olmakta ve kaplamanın saydamlığının bir sonucu olarak hücre biyolojisi çalışmalarında kullanılan ışık mikroskobu tekniklerine uygun bir malzeme olarak ön plana çıkmaktadır. Bu yüzden silikon kaplı camlar yerine İTO kaplı camların kullanımı tercih edilmiştir.

##### 3.1.1 İTO yüzey üzerinde kapatıcı olarak pluronik polimerkaplaması denemeleri

Kapatıcı olarak 12.6 kDa molekül ağırlığındaki Pluronic (F127) polimerini test etmek için önce yüzeylerin hidrofobik hale getirilmesi gerekti, çünkü pluronik üç parçalı (hidrofilik – hidrofobik – hidrofilik) bir yapıdır ve orta kısmındaki hidrofobik parça ile hidrofobik yüzeylere bağlanabilir. Böylece pluroniğin serbest hidrofilik kısımlarını barındıran yüzey hidrofilik hale geçer.

İTO-camların hidrofobik olması 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES) (Sigma-Aldrich-173648\*100 ml) kaplamasıyla sağlandı. Hidrofobikliği nitel olarak test etmek için çip üzerine 10 µl'lik damlalar bırakıldı ve damlaların yayılmadığı görüldü. Fakat APTES kaplı yüzeylerin pluronik ile kaplanmasının ardından, 10 µl'lik su damlasının yüzeyde dağılması ile nitel olarak belirlenmesi beklenen hidrofilik yüzeye dönüşüm gerçekleşmedi. Bunun, APTES'in uç grubunun (NH<sub>2</sub>) sıvı içinde artı yüklü (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) bulunarak pluronik moleküllerini itmesinden kaynaklandığını düşünüldü. Bunun üzerine, yüzeyleri hidrofobik duruma geçirmek için trimethylchlorosilane (TMCS) kaplama denendi. Burada önce TMCS kloroform içinde çözüldü (Sundberg ve ark. 2003). İTO-cam yüzeyler (150 nanometre kalınlığında kaplı, öz direnç =  $2.8 \times 10^{-4} \Omega \cdot \text{cm}$ ) 20 saniye süreyle sırasıyla 0.1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, iyonsuz su, metanol, aseton, kloroform, %5 TMCS içeren kloroform içinde bekletildikten sonra iki defa kloroform ile yıkanıp kurutuldu. Kloroform bazlı deney uygulama olarak zor ve daha fazla toksik madde ile çalışılmasını gerektirdiği gibi, bu şekilde hazırlanan yüzeyler gözle görülebilecek şekilde bir tabaka ile kaplandı ve homojen olmadıkları gözlemlendi. Ayrıca EDL (elektron demeti litografisi) desenlemesi bu yüzeylerde başarılı olarak gerçekleştirilemedi. Bunun üzerine TMCS buhar fazında kullanarak kaplama test edildi. Bunun için UV/ozon temizleme cihazında en az 5 en fazla 10 dakika temizlenen İTO-cam yüzey, içinde ağzı açık ve TMCS içeren bir tüpün bulunduğu cam petri kabın içinde çeker ocakta yaklaşık onaltı saat bekletildi. Buhar fazlı yöntem ile cam yüzeyler daha homojen bir görünüm sergilediler. İyonsuz su ile durulanan yüzeyler bir saat ~110°C de ısıtıldı. Bulgular kısmında Şekil 5'te görüldüğü gibi, bu yöntemle hazırlanan yüzeyler üzerinde on mikrolitrelik su damlasının, APTES yüzeylere göre çok daha az yayıldığı gözlemlendi.



Pluronic ile gerçekleştirilen deneyler, bulgular kısmı şekil 12’de gösterildiği gibi, umulan sonuçları vermedi.

TMCS ve APTES kaplamalarını silikon yüzeyde gerçekleştirmek üzere değiştirilen etkenler: (i) Silikon yüzey hava plazma cihazında beş dakika temizlendi;

(ii) TMCS kaplaması, buhar fazında ve otuz dakika süre ile gerçekleştirildi.

Hirofobik yüzeylerde pluronic kaplamasının en üst seviyede yapılabilmesi için, yoğunluğu yüksek (%4 lük) pluronic çözeltisi kullanıldı ve bekleme süresi en az 24 saat olarak tercih edildi.

### **3.1.1.1 TMCS kaplaması**

Buhar fazında TMCS kaplaması kloroform bazlı kaplamadan daha verimli oldu. İTO-cam-TMCS-pluronic-EDL-fibronektin deneylerinde nanonoktalar ile arka plan arasındaki floresan sinyali farkı düşük oldu. Bu sonucun pluronic kaplamasının iyi olmamasından kaynaklandığı düşünüldü. Silikon yüzeylerde 24 saat kaplama süresi sonucunda hidrofilik özelliğe dönüşüm gerçekleşmedi. EDL desenlemesi yapılmayan İTO-cam yüzeylerde 48 saat ve daha uzun inkübasyonda hidrofilik yüzeye dönüşümün daha iyi olduğunu gözlemlendi.

### **3.1.1.2 APTES kaplaması**

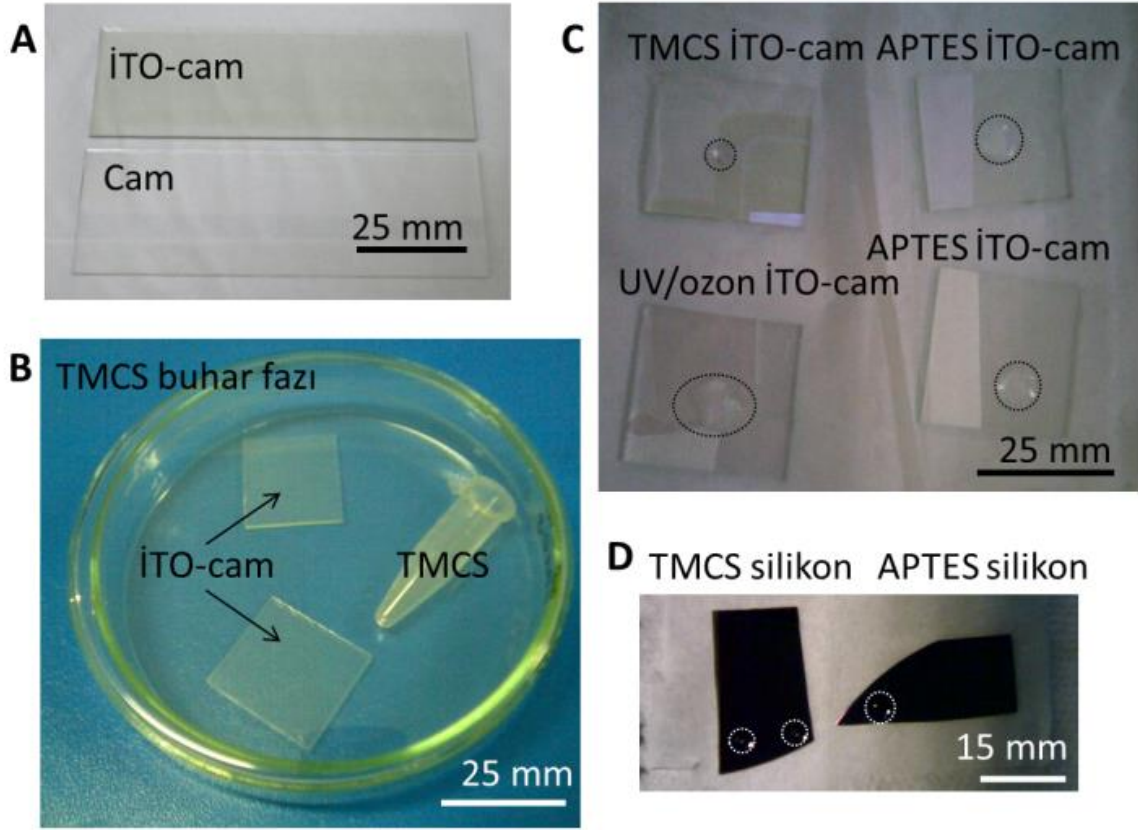
APTES kaplamasını da buhar fazında denedik ama yüzeyler TMCS’nin aksine daha az homojen göründüler ve EDL desenlemesi bu yüzeylerde başarılı olarak gerçekleştirilemedi. Bunun üzerine daha önce silikon yüzey için kullanılan yöntem kullanıldı; fakat tehlikeli pirana çözeltisi yerine UV/ozon temizleme cihazını kullandı. Daha pratik olmasının yanısıra bu temizlik seçeneği süresi kısa tutarak, İTO kaplamasının korunması hedeflendi. Bulgular bölümünde Şekil 5’de görüldüğü gibi, yüzeylerin nitel olarak hidrofobik olması su damlası testi ile belirlendi.

### **3.1.1.3 Poli-L-lizin kaplaması**

APTES olmadığı süre içinde poli-L-lizin uygulandı. Poli-L-lizin hücrelerin cam yüzeylere yapışmasını sağlamak için kullanılır. Glutaraldehit çapraz-bağ kurabildiği için sabitleme işlemlerinde kullanılır. Burada beklenen poli-L-lizin ile proteinler arasında glutaraldehitin kovalent bağ kurarak yüzey kaplamasını gerçekleştirmesiydi.

Pluronic kaplaması için çeşitli yöntemleri (farklı yüzey hidrofobikleştirme yöntemleri [aseton bazlı APTES, buhar fazlı APTES, kloroform bazlı TMCS, buhar fazlı TMCS], farklı kaplama süreleri [16 – 48 saat], farklı kaplama sıcaklıkları [oda sıcaklığında ya da +4°C’de]) denenmesine rağmen protein desenlemesi mümkün olmadı. Bu yüzden tüm örneklerde olumlu sonuç veren kapatıcı olarak K-kazein kullanımı seçildi. Yüzey olarak da İTO-cam olumlu

sonuçlar verdiği için ve hem iletken olduğu hem de ışığı geçirebildiği için tüm deneylerde silikon yerine İTO-cam kullanımı tercih edildi.



Şekil 5. İTO zerine TMCS ve APTES kaplamaları.

(A) İTO-cam görsel olarak hafif koyu rengi ile kaplamasız camdan ayırt edilebilir. Camın İTO kaplı tarafı direnç ölçer ile belirlenebilir. (B) TMCS buhar fazı kaplaması için İTO-cam ve TMCS içeren cam petri kabında bekletildi. (C), (D) UV/ozon veya hava plazma ile temizlenen, TMCS veya APTES ile kaplanmış yüzelerde nitel olarak hidrofobik yüzey testi sonuçları. Su damlalarının sınırını gözlemlemeye yardımcı olması için daireler çizildi.

### 3.1.2 İTO yüzey üzerinde kapatıcı olarak K-kazein kaplaması

Optimizasyon sonucunda izlenen metot aşağıdaki gibidir:

Çiplerin temizliği için öncelikle Őaleler asetonla çalkalandı. Daha sonra yüzeyleri tespit edilen İTO-camlar Őalelere yerleştirildi. Daha sonra izopropanol, aseton ve su ile tekrarlı bir Şekilde ultrasonik banyo yardımıyla temizlendi. Daha sonra hava nitrojen ile İTO-camlar kurutuldu. Herhangi bir organik molekülün uzaklaŐtırılması için ise İTO-camlar 10 dakika UV/ozon'a mağruz bırakıldı. Ardından yüzeyin aktifleŐmesini sağlamak amacıyla %3 APTES aseton çözeltisinin içinde hazırlandı ve İTO-camlar 30 dakika bu solüsyonda bekletildi. Daha sonra İTO-camlar aseton ve su ile tekrarlı olarak yıkandı. Daha sonra hava nitrojen ile İTO-camlar



kurutuldu ve tamamen kuruması için önceden 110°C ye ayarlanmış fırında (Nüve dryheat sterilizör FN032) 1 saat kurumaya bekletildi. Daha sonra fırın kapatıldı ve İTO-camlar bir sonraki güne kadar soğumaya bırakılan fırında tutuldu. Takip eden günde İTO-camlar öncelikle APTES kaplaması kaynaklı hidrofobiklik için test edildi. Her İTO-cam yaklaşık 10 µm su damlatılarak test edildi ve su damlalarının cam üzerinde yayılmadığı görüldü.

Bundan sonra %1 Gluteraldehit solüsyonu (Gluteraldehyde 70% solution EM grade distillation purified- Electron Microscopy Sciences) 1X PBS içinde hazırlandı ve İTO-camlar bu solüsyon içinde 1 saat kaplandı.

K-kazein kaplama: Petri kabın alt yüzeyi parafilm ile kaplandı. K-kazein alikotları (1 mg/ml olacak şekilde) kullanılmadan yaklaşık yarım saat önce -80 °C den +4°C ye çıkarıldı. Alikotlar 5 ml olarak saklandı. İTO-cam kaplanmış yüzeyi protein solüsyonuna değecek şekilde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra İTO-cam 3 kez 1X UB ile ardından 3 kez ultra saf su ile çalkalanıp, hava nitrojenle kurutuldu. Daha sonra kullanılmak üzere vakum (portable suction-Polymed, Polylob) altında saklandı.

### 3.1.3 İTO yüzey üzerinde K-kazein kaplaması üzerine Fibronektin kaplama

Fibronektin(F2006 Sigma) kaplama: Petri kabın alt yüzeyi parafilm ile kaplandı. Fibronektin alikotları (1 mg/ml olacak şekilde) kullanılmadan yaklaşık yarım saat önce -80°C den +4°C ye çıkarıldı. Alikot 1X UB ile 1 ml'ye tamamlandı ve pipetleme yapmadan parafilm üzerine bırakıldı. İTO-cam kaplanmış yüzeyi protein solüsyonuna değecek şekilde 2 saat inkübasyona bırakıldı. 2 saat sonra İTO-cam 3 kez 1X UB ile ardından 3 kez ultra saf su ile çalkalanıp, hava nitrojenle kurutuldu. Daha sonra kullanılmak üzere vakum altında saklandı. Yaklaşık 2 hafta içinde kullanıldı.

### 3.1.4 İTO-cam yüzeylerde Elektron Demeti Litografisi uygulamasında doz tesipiti

EDL için en uygun electron ışını ölçüsü–doz– (D), bekleme zamanı (t) ve adım aralığını (s) belirlemek için doz testleri yapıldı. Bu üç etken, akım şiddetine (I) bağlı olarak birbiriyle ilişkilidir:

Alan yazımı için  $D = (I * t) / (s * s)$ ;

Çizgi yazımı için  $D = (I * t) / (s)$ ;

Nokta yazımı için  $D = (I * t)$ .

Akım büyüklüğü ivme voltajı ve elektron ışınının geçeceği açıklığın genişliği ile artar. 10 kV'deki akım 5 kV'deki akımdan daha yüksektir bu da bekleme zamanını azaltır; fakat protein desenlemesi geri saçılan elektron ile yapıldığı için düşük voltaj protein kaplamasını işleyebilmek için daha avantajlıdır. Elektronların geçeceği açıklık artınca yine akım artar; fakat

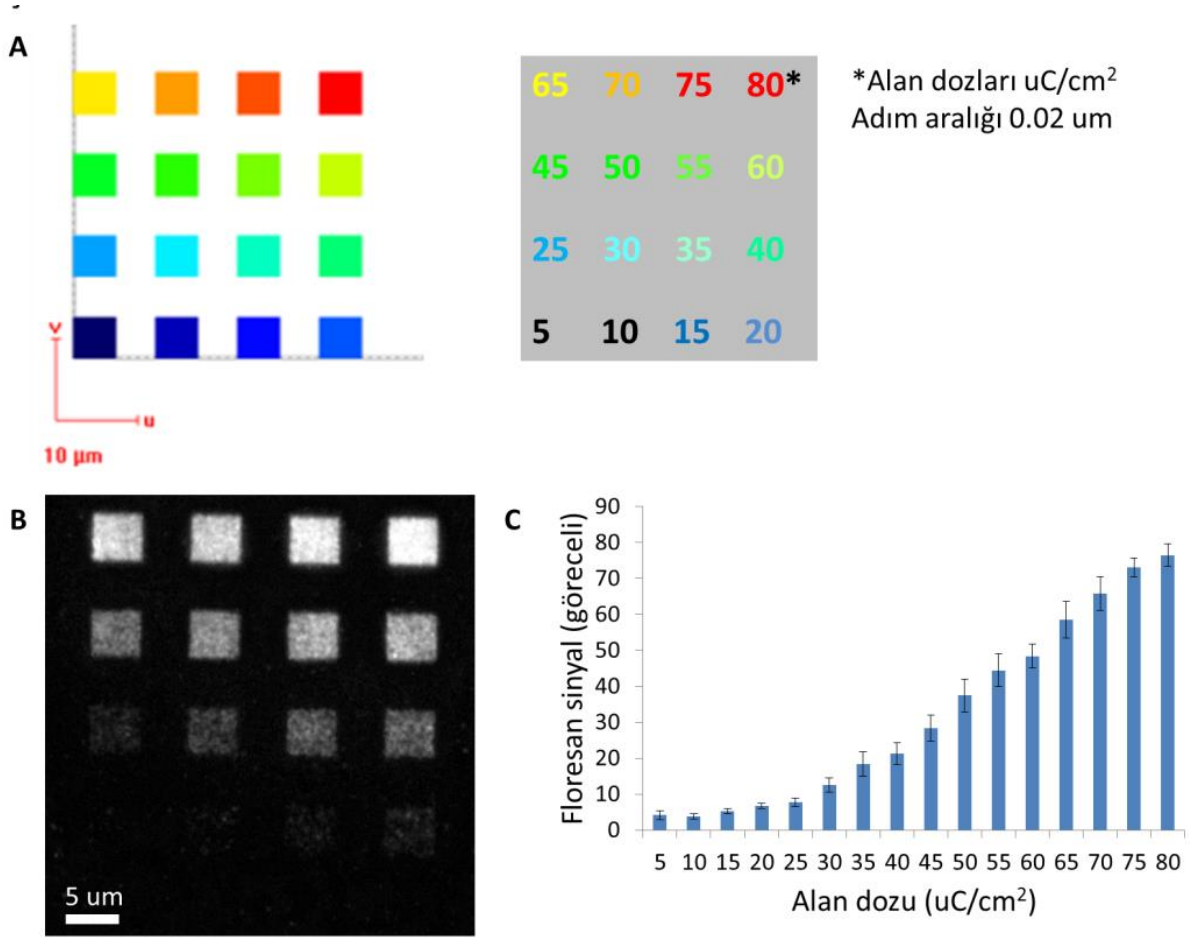
30 µm ise oluşacak desenler 7.5 µm açıklıktan daha büyük olacaktır. Deneylerde 5 kV ve 10 kV voltaj, 7.5 µm ve 30 µm açıklık kullanıldı; nanometre ölçeğinde desenler için ilk değerlere ağırlık verildi.

EDL'de çizgiler noktalardan oluşturulur; ama eğer adım aralığı büyük olursa, çizgi yerine noktalar oluşabilir. Eğer EDL'nin nokta ile yazma seçeneği kullanılırsa, elektron ışını her noktada durur, bu da yazma süresini uzatır. Burada EDL'nin çizgi ile yazma seçeneği, büyük adım aralığıyla kullanılarak hem nanonoktalar oluşturmak hem de yazma süresini azaltmak için test edildi. Aynı mantık ile aralıkları sabit olacak nanonoktalar için alan ile yazma seçeneğinde de yazma süresi azaltıldı.

EDL sonrası yüzeyler 0,1 mg/ml fibronektin çözeltisi ile oda sıcaklığında üç saat ya da +4°C de onaltı saat bekletildi. UB ve ardından iyonsuz su ile durulanan yüzeyler kurutuldu. Bu şekilde sonuçlanan desenleme deneylerinin sonuçlarının belirlenmesi için fibronektini tanıyan tavşanda üretilmiş antikor ve tavşanda üretilen antikoru tanıyan floresan boyalı (Alexa-555) antikorlar ile boyama yapıldı.

Her iki antikor da 1:200 oranında PBS içinde ve bir saat bekleme süreleri ile kullanıldı. Örnekler floresan mikroskopta (Olympus epifluorescence microscope) incelendi. Görüntüler, mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinesi ile çekildi. Bu çekimlerde süre ve dijital ISO ayarları için yapılan testle sinyalin gürültüye oranının en yüksek olduğu (2 saniye ISO auto ~10/2=5; 10 saniye ISO auto~20/5=4; 2 saniye ISO 800 ~40/4=10; 4 saniye ISO 800 ~80/10=8) iki saniye ve 800 ISO değerleri belirlendi. Ayrıca floresan sinyali homojen örneklerle görüntülerin orta kısmında homojen olduğu belirlendi ve analizler içinde sadece bu bölgedeki veriler kullanıldı. Analizlerin tümü ImageJ programı ile yapıldı. Arka plan sinyalini çıkarmak için ImageJ'de "*subtract background – rolling ball – sliding paraboloid*" seçeneği kullanıldı.

İTO-cam ve K-kazein kullanılarak EDL yöntemiyle olumlu sonuçlar alındı. Önce İTO-cam üzerinde APTES kimyası ile kaplanan K-kazein için alan desenlemesi gerçekleştirildi. İTO-cam yüzeyi üzerinde K-kazein-EDL- Fibronektin desenlemesi doz belirleme sonuçları bulgular kısmında Şekil 6'da bulunmaktadır.



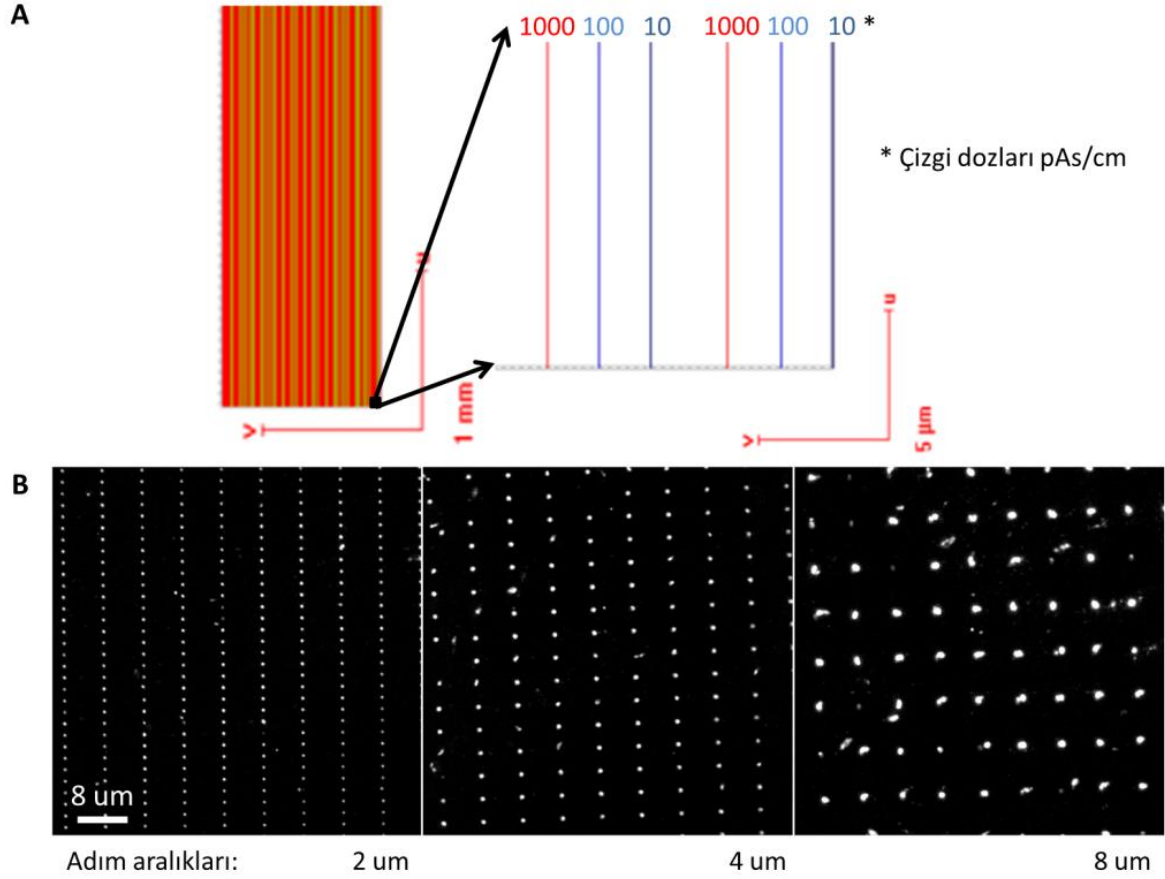
Şekil 6. İTO-cam-APTES-K-kazein-EDL-Fibronektin alan desenlenmesi.

[EDL (5 kV;  $30 \mu\text{m}$ )] (A) EDL desen tasarımı farklı dozlarda  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ 'lik kare alanlar. Desendeki doz farkını görebilmek için alanlar dozlarına göre (küçükten büyüğe : lacivertten kırmızıya) renklendirildi. (B) Örnek floresan görüntüsü. Doz soldan sağa aşağıdan yukarıya arttıkça fibronektin boyamasının floresan sinyali artıyor. (C) Floresan sinyal doz ile artıyor. Her doz için 4 örnek alanın sinyal ortalaması alındı, ortalama ve standart hata gösteriliyor.

### 3.1.5 İTO-cam yüzeylerde Elektron Demeti Litografisi uygulamasında nanonokta desenleme

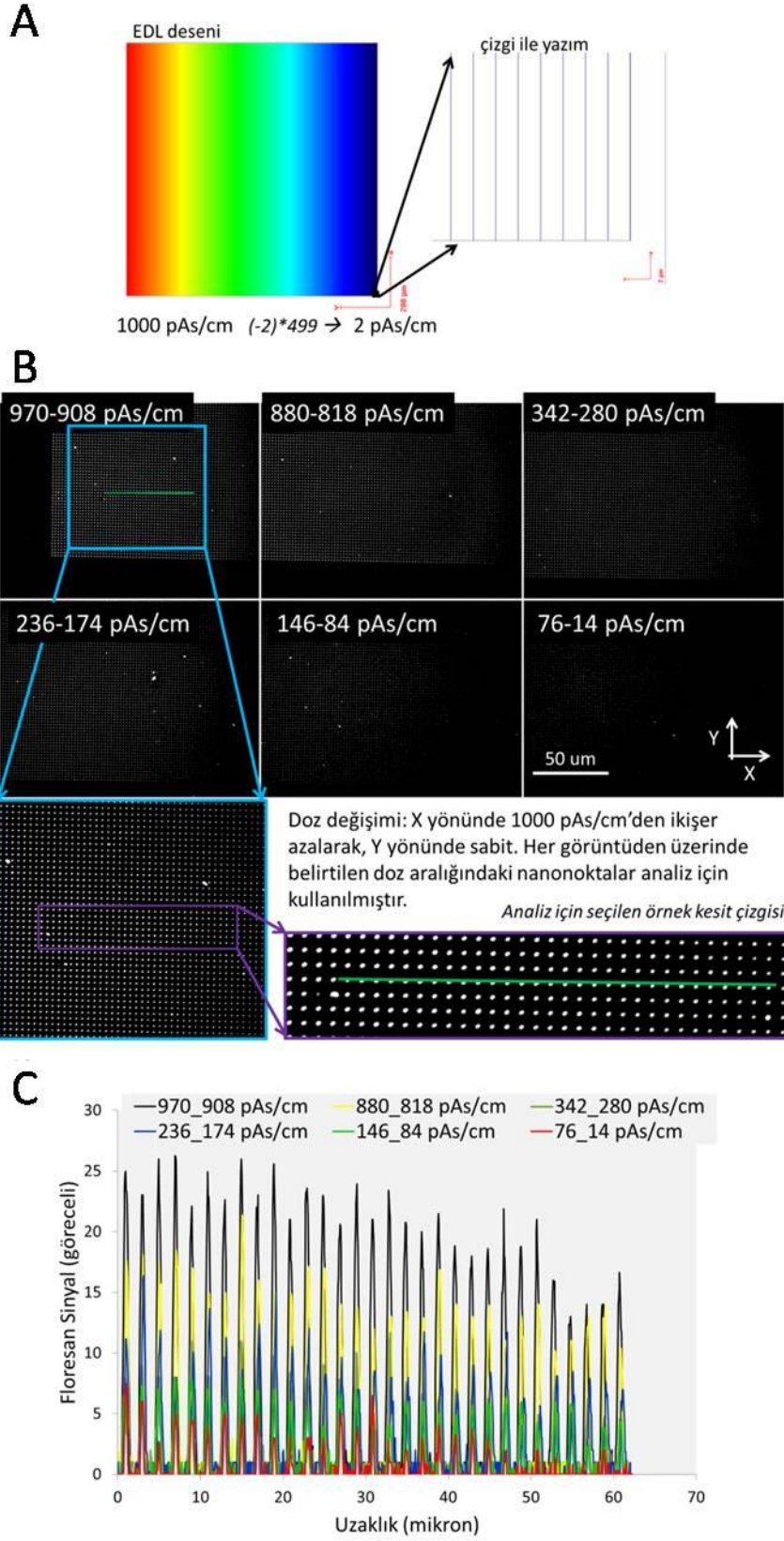
İTO-cam-APTES-K-kazein-EDL-Fibronektin alan desenlenmesinin gerçekleşmesi İTO-cam yüzeyin EDL yöntemiyle çalışabileceğini işaret etti. Bunun üzerine nanonokta oluşumu gerçekleştirildi. Bulgular kısmı Şekil 7'de görüldüğü gibi yazım süresini kısaltmak için EDL desenleri çizgilerle tasarlandı. İstenilen büyüklükte nanonoktalar oluşturabilmek için uygun dozlar belirlendi. Bulgular kısmı Şekil 8'de görüldüğü gibi, bunun için geniş kapsamlı (2 – 1000 pAs/cm) çizgi dozları test edildi.

İTO-cam-K-kazein-EDL-Fibronektin desenlemesi örnekleri, önerilen atomik kuvvet mikroskopundan daha pratik olan taramalı elektron mikroskopunda görüntülenerek, nanonoktaların elektron dozuna bağlı büyüklüklerini bulgular Şekil 9'da gösterildiği gibi belirlendi.



Şekil 7. Büyük adım aralıklı çizgilerle İTO-cam-APTES-K-kazein-EDL-Fibronektin nanonokta desenlenmesi.

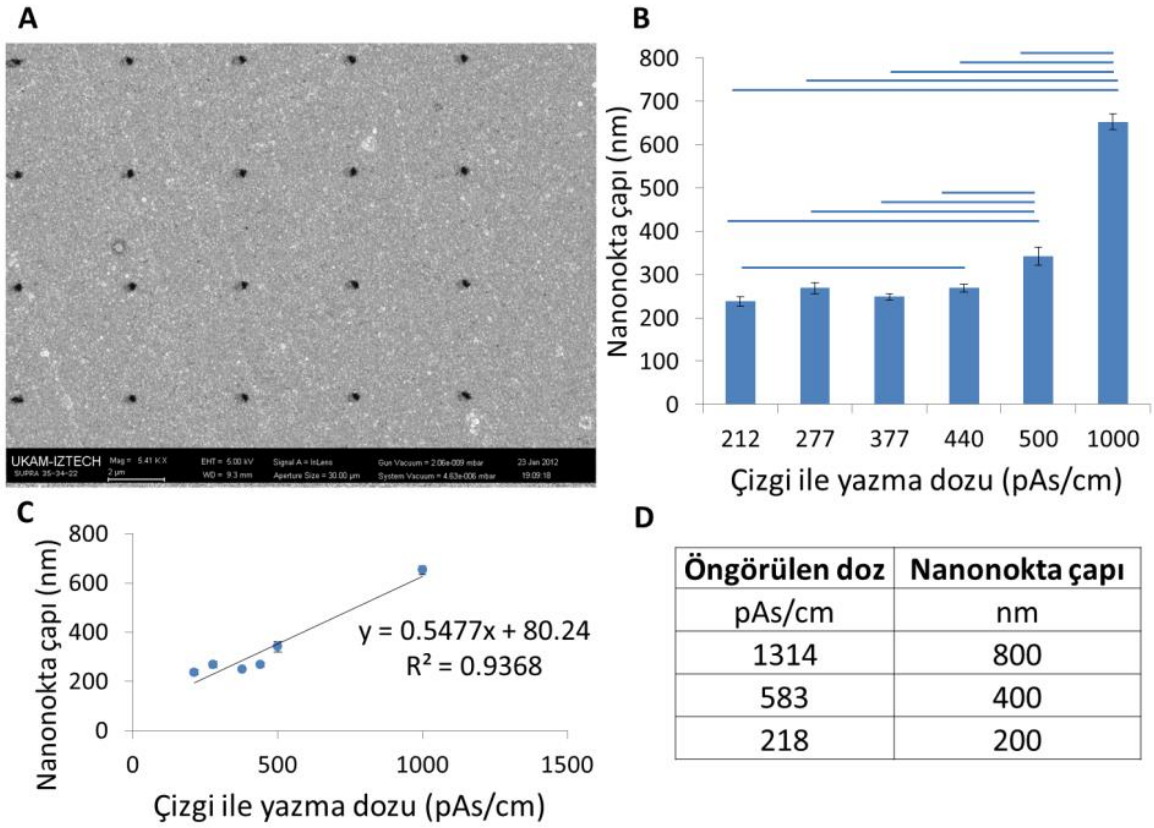
[EDL (5 kV; 30 µm)] (A) EDL desen tasarımı: farklı dozlarda çizgiler. Desendeki doz farkını görebilmek için çizgiler dozlarına göre (küçükten büyüğe : lacivertten kırmızıya) renklendirildi. (B) Örnek floresan görüntüleri. Burada sadece 1000 pAs/cm dozu için fibronektin kaplaması gerçekleştirilebildi. 10 ve 100 pAs/cm dozları yeterli gelmedi. EDL deseni çizgi olmasına rağmen adım aralığı büyük tutulduğu için nanonoktalar yazılabildi. Adım aralığı değiştikçe (2, 4 ve 8 µm) nanonoktaların birbirlerinden uzaklıkları da (2, 4 ve 8 µm) değişti.



Şekil 8. İTO-cam-K-kazein-EDL-Fibronektin desenlemesi.



[EDL (5 kV; 7.5 µm)] (A) EDL desen tasarımı (B) Floresan mikroskobu görüntüleri (C) Doza bağlı floresan sinyal değişimi. Kesitler x ekseninde alındığı için, doz (böylece floresan sinyal) her kesit için farklı olduğu gibi, her kesitte de değişmektedir (her kesitte doz sağa doğru azalmaktadır). EDL desenindeki çizgiler adım aralığını 2 mikron alarak yazıldığında, 2 mikron aralıklı nanonoktalar oluşturuldu. Her çizginin dozu diğerinden farklı olduğu için desenin floresan görüntülerinde y ekseninde (aynı desen çizgisi üzerinde) oluşan fibronektin nanonoktalar aynı, fakat x ekseninde farklı parlaklıklarda görülmektedir. Floresan görüntülerde x ekseninde kesitler alınarak, doz azaldıkça floresan sinyalin azaldığı belirlendi. İTO-cam-K-kazein-EDL-Fibronektin desenlemesinde çizgi yazımı için eşik doz değerini floresan görüntülerin kalitesine dayanarak 200 pAs/cm olarak belirlendi.



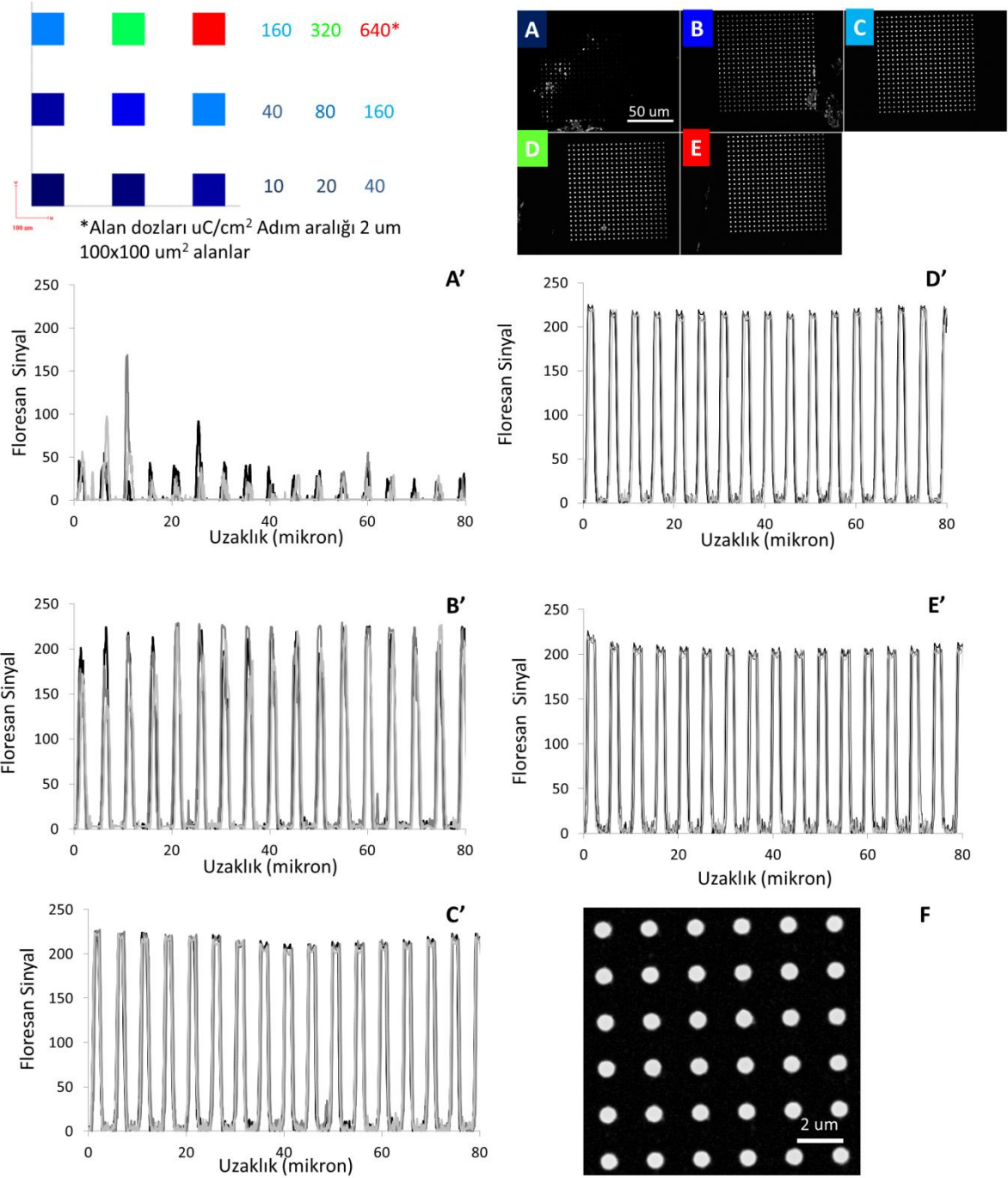
Şekil 9. İTO-cam-APTES-K-kazein-EDL-Fibronektin desenlenmesi.

[EDL (5 kV; 7.5 µm)] (A) Örnek taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (B) Nanonokta çapının elektron dozuna göre değişimi. Her doz için 4 – 20 adet nanonokta ölçüldü, grafikte ortalama ve standart hata gösteriliyor. Birbirinden t-testi ile  $P < 0.05$  ile farklı bulunan nanonokta çapları yatay çizgilerle belirtildi. (C) Nanonokta çapının elektron dozuna göre değişimi ve uyan basit doğrusal denklem. (D) C'deki ilişkiye bağlı olarak hedeflenen nanonokta çapları için öngörülen dozlar.

EDL'de çizgi desenleri adım aralığını büyük tutarak yazdığında birbirlerine uzaklıkları adım aralığı kadar olan nanonoktalar yazalabildiği gibi alan desenlerini büyük adım aralıkları ile yazıldığında da nanonoktalar oluşturabileceği görüldü (bulgular kısmı Şekil 10). Bu deneylerde K-kazein İTO-cam üzerine poli-L-lizin ve glutaraldehit ile kaplandı. Bu da EDL'ye uygun protein kaplamaları için APTES'ten farklı bir yüzey kimyası kullanabileceğine işaret ediyor.

Silikon ve K-kazein kullanarak EDL yöntemiyle bulgular kısmı Şekil 11'de görüldüğü gibi olumlu sonuçlar alındı. İTO-cam-APTES-K-kazein-EDL-Fibronektin desenlemelerinde dozu belirlemek için kullanılan değerler (2-1000 pAs/cm) floresan ölçümlerini kolaylaştırmak için sıklığı azaltılarak test edildi.

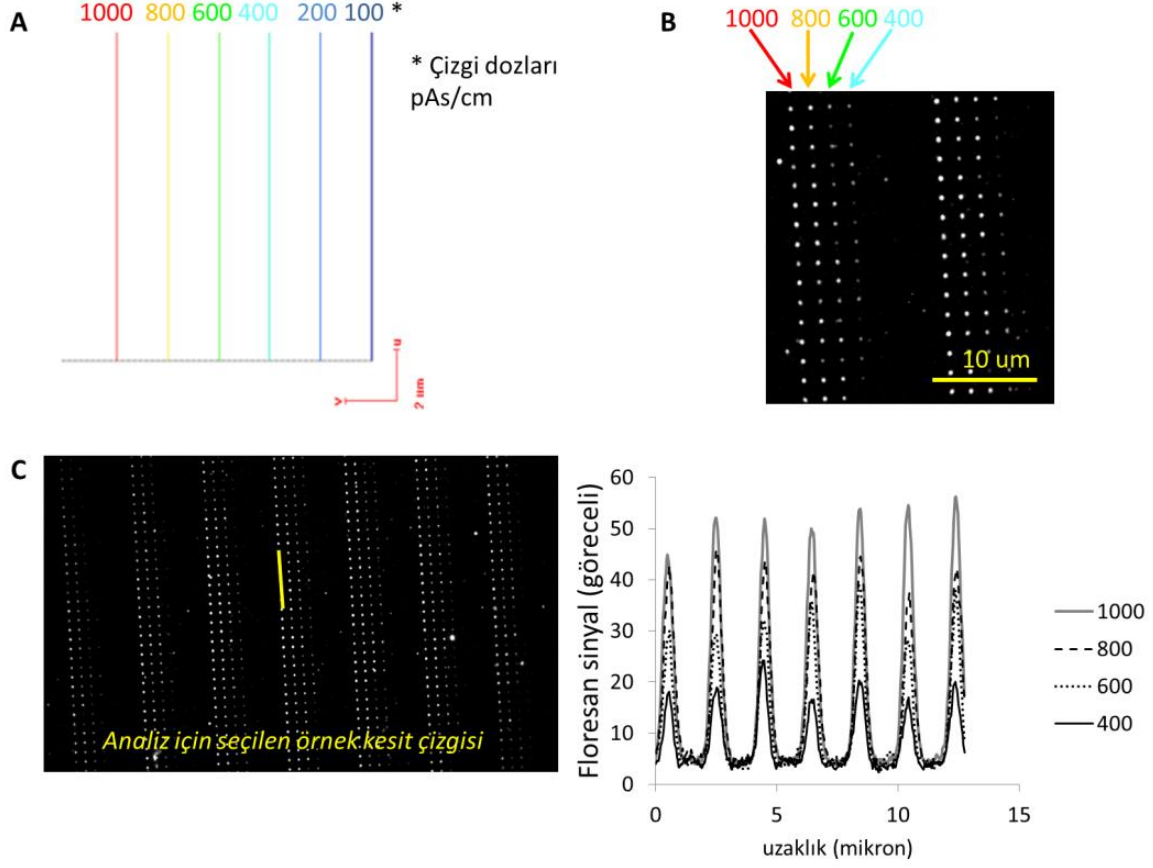




Şekil 10. Farklı alan dozlarında tasarlanmış EDL deseni.

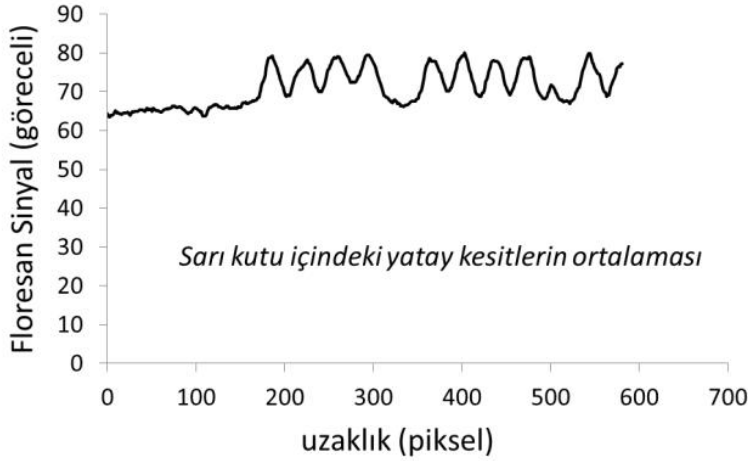
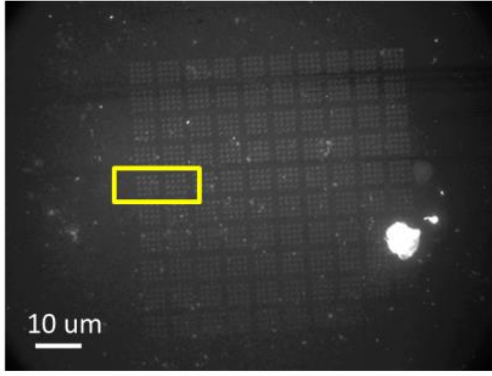
[EDL (10 kV; 30  $\mu\text{m}$ )]. İTO-cam-poli-L-lizin-glutaraldehit-K-kazein-EDL-fibronektin deseni 2 mikron adım aralığı ile yazıldı Floresan mikroskobu görüntüleri. Alan dozu 40  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ 'nin altında iken sinyal görülmedi. Diğer bir deyişle, alan yazımı için eşik doz değeri 40  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ 'dir. Alan dozları sırasıyla 40  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ , 80  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ , 160  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ , 320  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ , 640  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ ; (A), (B), (C), (D), (E); bunlara karşılık gelen floresan sinyal kesitleri (A'), (B'), (C'), (D'), (E'). Her doz için 3 kesit (siyah, koyu gri, açık gri) grafiklerde kullanıldı. Beklenildiği üzere her doza ait grafikler çakişmaktadır. (A) 40  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$  dozunda desen çok zayıf sinyal verdi. (A') kesitindeki yüksek

değerler örnekteki istenmeyen artıklardan kaynaklanmaktadır. Floresan sinyal  $80 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ ,  $160 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ ,  $320 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ ,  $640 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  alan dozları arasında belirgin farklılıklar göstermemektedir. (F)  $640 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  dozu ile yazılan alandan büyütülmüş görüntü.



Şekil 11. Silikon-APTES-K-kazein-EDL-fibronektin desenlemesi.

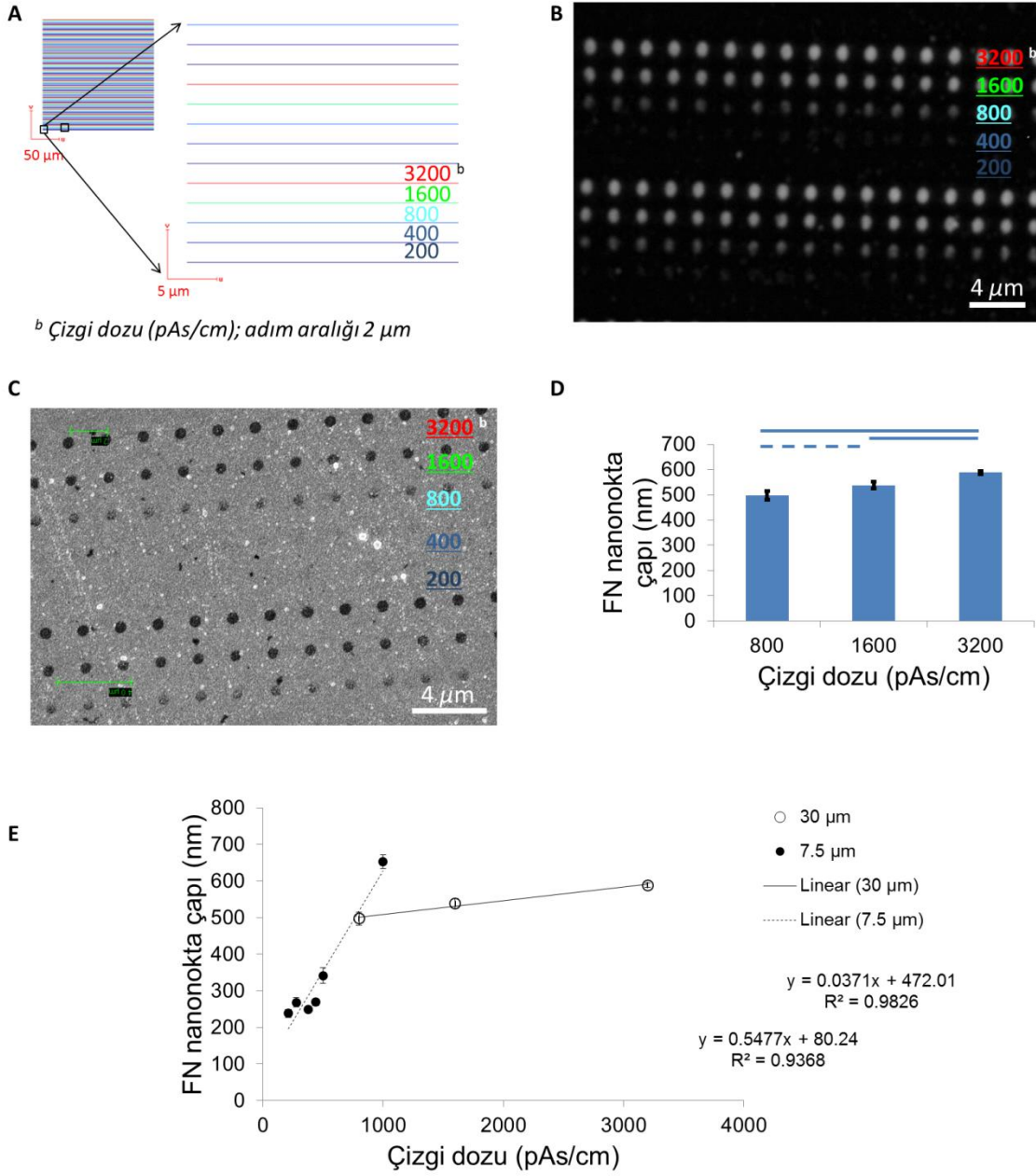
[EDL (5 kV;  $7.5 \mu\text{m}$ )]. (A) EDL desen tasarımı: farklı dozlarda çizgiler. Desendeki doz farkını görebilmek için çizgiler dozlarına göre (küçükten büyüğe : lacivertten kırmızıya) renklendirilmiştir. (B) Örnek floresan görüntüsü. Burada sadece  $400 \text{ pAs}/\text{cm}$  dozu ve üzeri için fibronektin kaplaması gerçekleştirilebildi. Diğer bir deyişle, çizgi yazımı için eşik doz değeri  $400 \text{ pAs}/\text{cm}$ 'dir. EDL deseni çizgi olmasına rağmen adım aralığı büyük tutulduğu için ( $2 \mu\text{m}$ ) nanonoktalar yazılabildi. (C) Floresan sinyal kesitleri. Her doz için 9 adet kesit alındı ve ortalamaları grafikte gösterildi.



Şekil 12. İTO-cam-TMCS-pluronik-EDL-fibronektin desenlemesi.

[EDL (5 kV; 30 μm)]. 5 x 5 mikronluk alanlar iki mikron adım aralıklarıyla ve soldan sağa aşağıdan yukarıya artan alan dozlarıyla (1x – 100x) yazıldı. Farklı alanlarda denenen dozlar 2 – 200; 4 -400; 8 – 800 uC/cm<sup>2</sup> arasındadır. Üst panel: Floresan mikroskop görüntüsü. Arka plan çıkarıldığında sinyal kayboduğu için ham verinin parlaklık ayarı değiştirilmiş olarak görünümüne yer verildi. Alt panel: Floresan sinyal değişimi. Desen sinyali ile arkaplan sinyali arasındaki oran çok düşüktür (~80/60=1,3). En düşük ve en yüksek doz arasında floresan sinyal için az da olsa bir fark gözlenmektedir.

Hücreler önceki deneylerde 200 nm çaplı FN nanonoktalarına değil daha büyük olan (400 ve 800 nm çaplı) nanonoktalara yapıştıkları için 7.5 μm açıklık (aperture) yerine 30 μm kullanılması denendi, çünkü 30 μm açıklıkta gelen elektron akımı daha yüksekti. Böylece yazma zamanları azaltılabilir; ayrıca 30 μm açıklıkta istenilen büyüklükte nanonoktalar oluşturulabilirdi. Daha önce 7.5 μm açıklıkta 2-1000 pAs/cm aralıklarında test edilen çizgi dozu, 30 μm açıklıkta 200,400,800,1600 ve 3200 pAs/cm dozlarında ve adım aralığı 2 μm olacak şekilde de test edildi ve sonuçlar bulgular kısmı Şekil 13'teki gibi grafik haline getirildi.



Şekil 13. 30  $\mu\text{m}$  açıklıkta desenleme.

(A) Adım aralığı 2  $\mu\text{m}$  olacak şekilde farklı çizgi dozlarında (200,400,800,1600 ve 3200 pAs/cm) EDL yöntemiyle yüzeye işlenecek desenin tasarımı. Desendeki doz farkını görebilmek için çizgiler dozlarına göre (küçükten büyüğe : laciveritten kırmızıya) renklendirildi. Desenin bir köşesi çizgilerin tek tek görülebilmesi için büyütüldü. (B) EDL uygulanmasından sonra FN ile kaplanan yüzeyin floresan mikroskop görüntüsü. (C) Aynı örneğin taramalı elektron mikroskobu ile alınan görüntüsü. (D) Çizgi dozuna bağlı olarak değişen FN nanonokta çapını gösteren grafik; yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$

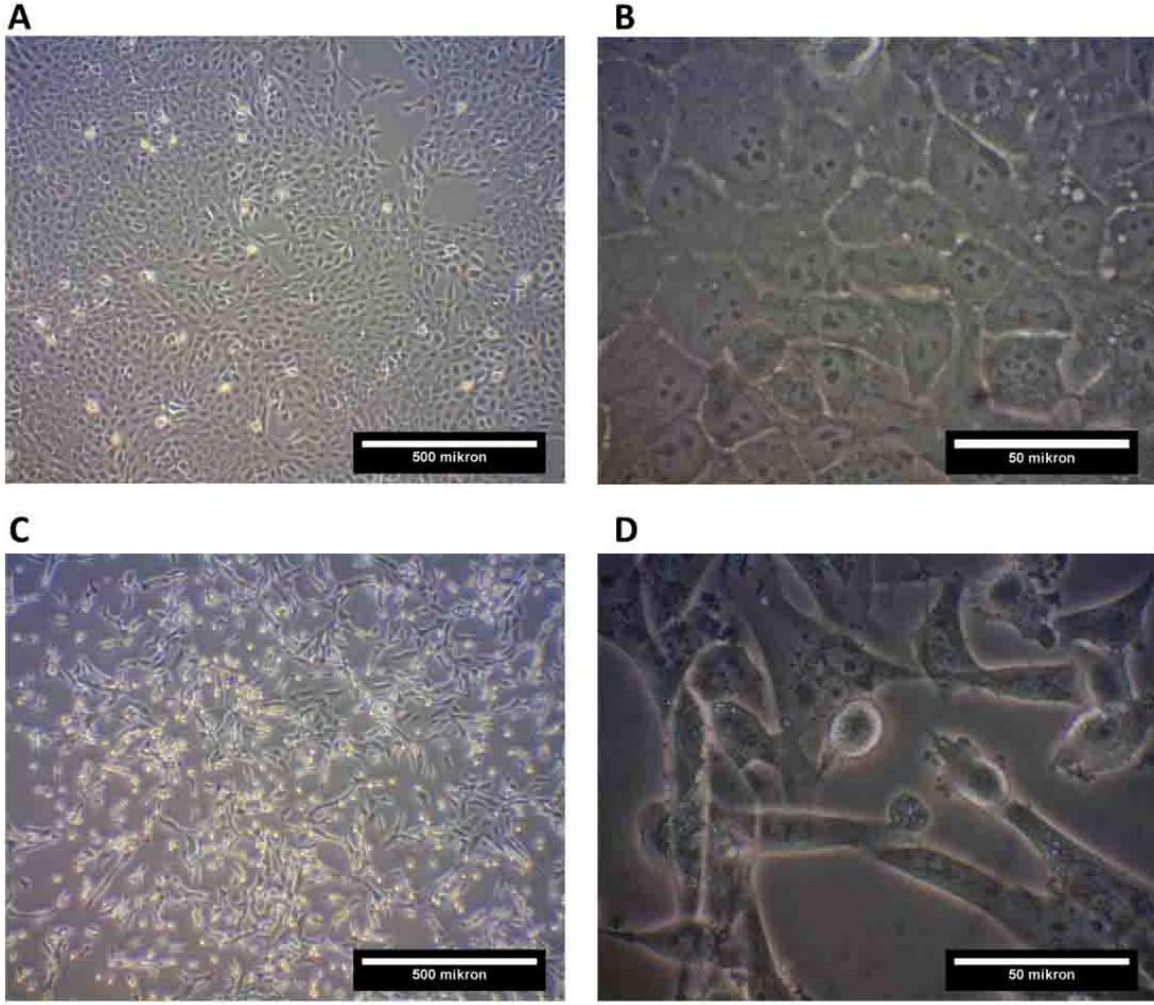
seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesine istatistiksel fark olduğunu gösteriyor. (E) Elektronların geçebileceği farklı açıklık değerlerinde, 30  $\mu\text{m}$  ve 7.5  $\mu\text{m}$ , çizgi dozuna bağlı değişen FN nanonokta çapını gösteren grafik ve her iki değer için de grafikten elde edilen çizgi dozu-nanonokta çapı denklemi.

Çizgi dozu 800 pAs/cm üzerindeyken oluşturulan 400 nm üzeri çapta nanonoktalar yüzeyde bu noktalara yeter yoğunlukta FN bağlanmasına olanak sağladı ve floresan ışık altında nanonoktalar gözlemlenebildi. Kullanılan 30  $\mu\text{m}$  açıklık 7.5  $\mu\text{m}$  açıklık ile karşılaştırıldığında yine istenilen çapta nanonokta oluşumunun daha kısa zamanda sağlanabildiği sonucuna varıldı. Bu yüzden desenleme için 30  $\mu\text{m}$  açıklık kullanılması uygun görüldü.

### **3.1.6 MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin test yüzeylerde uygulamaları**

MCF10A hücreleri için karmaşık bir besiyeri (DMEM/F-12, at serumu, insulin, EGF, kolera toksin, hidrokortison, penisilin, streptomisin, L-glutamine) kullanılırken, MDA-MB-231 hücreleri için daha basit bir besi yeri (DMEM, dana serumu, penisilin, streptomisin, L-glutamine) kullanılır. Her iki hücre tipini hücre kültürü petrilerinden ayırmak için tripsin-EDTA enzimatik çözeltisi kullanılır. MDA-MB-231 hücreleri, MCF10A hücrelerine göre hücre kültürü petrilerinden daha kolay ayrılırlar (15 – 20 dakikaya karşılık 3 – 5 dakika). Bu hücreler iki boyutlu normal hücre kültürü petrilerinde yetiştirildikleri zaman şekil olarak birbirlerinden farklıdırlar. Bulgular Şekil 14'te gösterildiği gibi; MCF10A hücreleri oldukça simetrikler ve hücre öbekleri oluştururlar; MDA-MB-231 ise asimetrikler ve tek tek hücreler olarak görünürler.





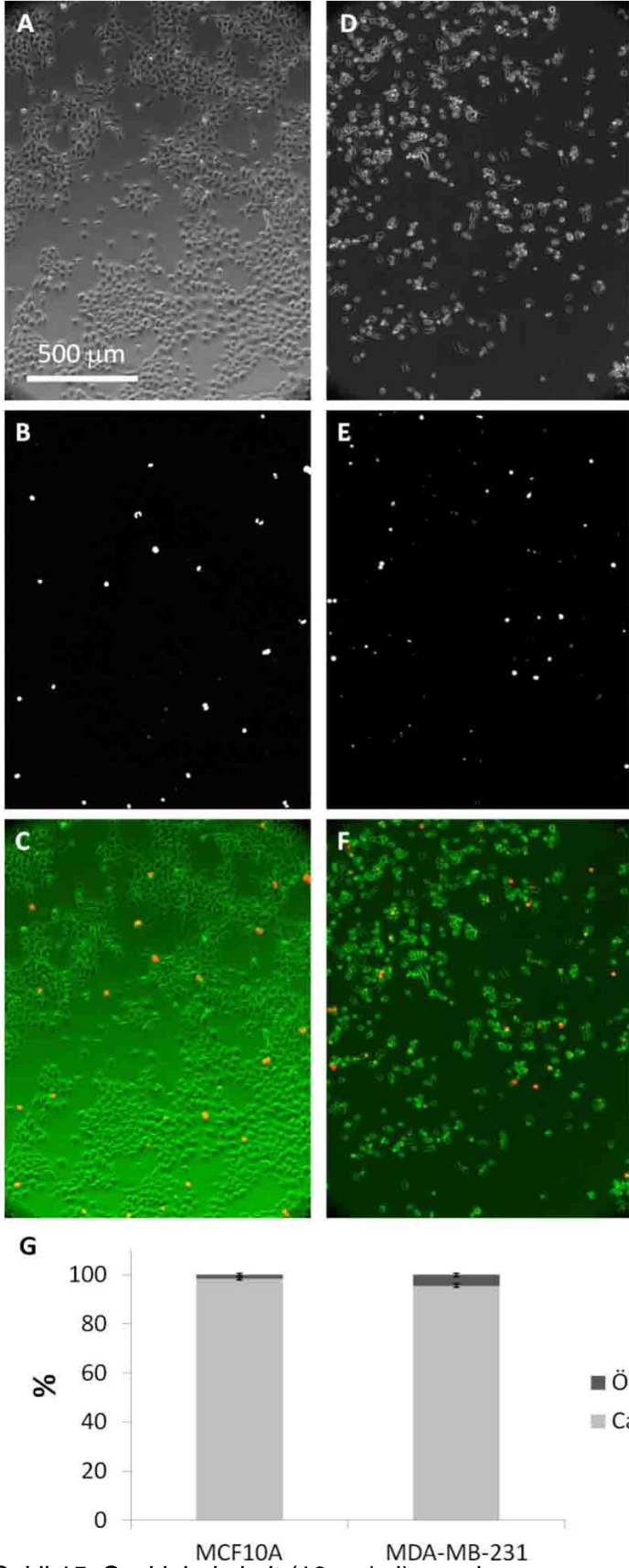
Şekil 14. Kullanılan hücre hatları.

(A), (B) Normal meme epiteli hücreleri olan MCF10A hücrelerinin faz-kontrast görüntüleri. (C), (D) Meme kanseri hücreleri olan MDA-MB-231 hücrelerinin faz-kontrast görüntüleri.

### 3.1.6.1 Saykloheksimit uygulaması

Hücreler yüzeye desenlenen fibronektin proteinini kendileri de üretebildikleri için protein sentezinin cycloheximide (saykloheksimit) ile durdurulması denendi. Bunun için önce kullanılan konsantrasyon ve süre optimize edildi. Literatürde konsantrasyon için 10 – 100 µg/ml gibi geniş bir aralık kullanıldığı, süre olarak 24 saate kadar çıktığı belirlendi.

Bu deneylerin sonucunda her bir hücre hattı için hücre ölümünün en az seviyede olduğu en yüksek konsantrasyon olarak 10 µg/ml saykloheksimit seçildi. Hücre ölüm oranları bulgular kısmında Şekil 15'de gösterildiği gibidir.

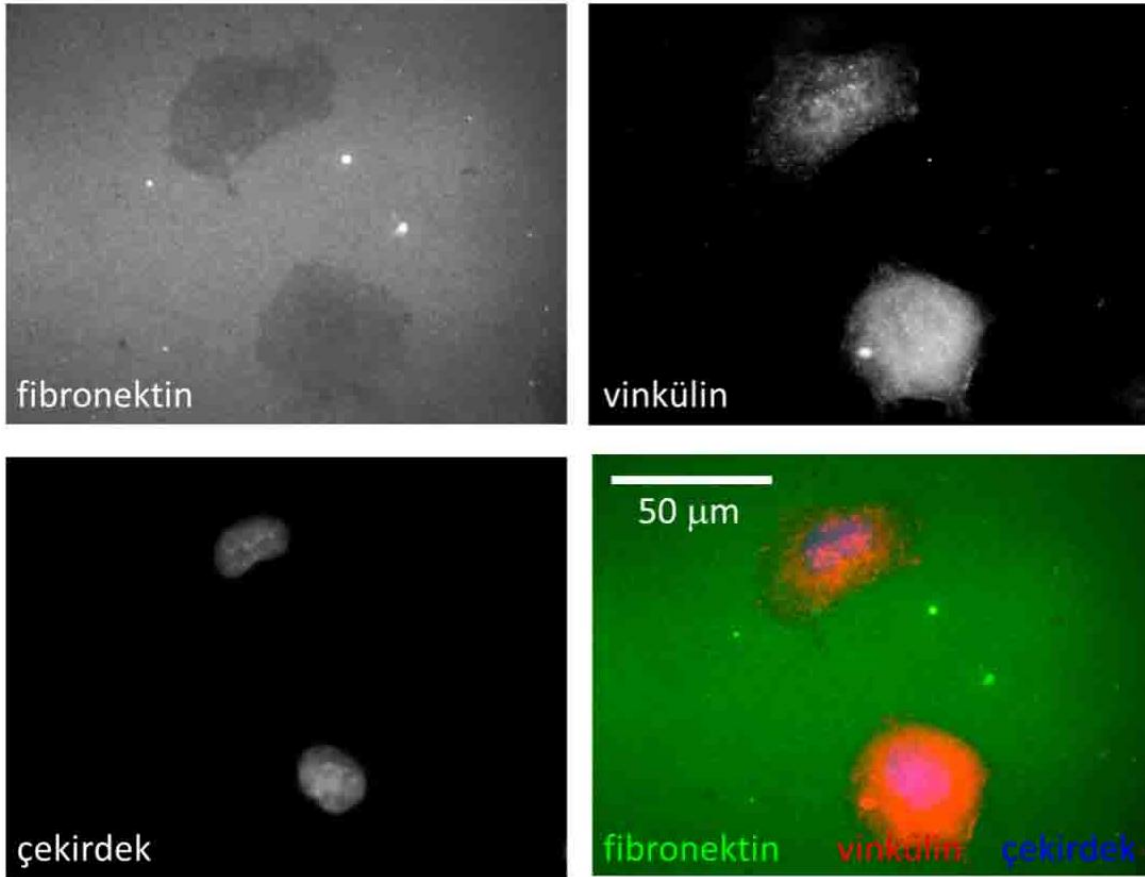


Şekil 15. Saykloheksimit (10 µg/ml) uygulaması.



(A), (B), (C) MCF10A hücreleri; (D), (E), (F) MDA-MB-231 hücreleri. (A), (D) faz kontrast görüntüleri. (B), (E) Aynı alanlarda ölü hücreleri boyayan DAPI için floresan görüntüleri. (C), (F) Faz kontrast (yeşil) ve DAPI (kırmızı) birleştirilmiş görüntüleri. (G) Toplam ve DAPI ile boyalı hücreleri sayarak ölü hücre oranını MCF10A için %  $2 \pm 0,5$  ve MDA-MB-231 için %  $5 \pm 0,7$  olarak belirlendi.

Fakat hücreler saykloheksimit uygulamasından sonra test yüzeylerine yapışmakta zorlandıkları görüldü. Bulgular kısmı Şekil 16'da gösterildiği gibi, Fibronektin yüzeylerde hücreler yapışıp yayıldılar; fakat odaksal yapışma oluşturmadılar. Bunun yanında, K-kazein yüzeylerde neredeyse hiç hücre görülmüdü.

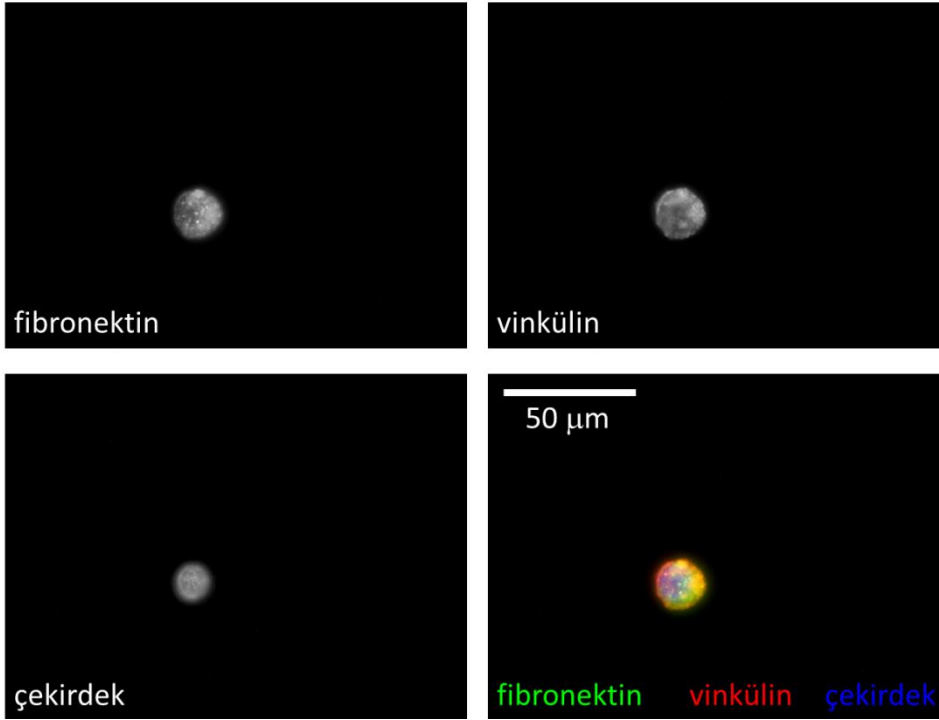


Şekil 16. MCF10A hücre hattında iki saat 10 µg/ml saykloheksimit uygulamasından sonra fibronektin kontrol ITO-cam yüzeyler üzerinde dört saatlik kültürün ardından sabitlenip yapılan floresan boyamaları.

(yüzey başına  $0.37 \times 10^6$  hücre)

Görülen tek tük hücreler ise ne yayıldılar ne de odaksal yapışma oluşturdular (bulgular kısmı Şekil 17). Fibronektin proteini (yüzeyde ve hücre içinde) kendisine özgü antikoları (F3648-Sigma) ve ikincil floresan antikoları (rabbit488, rabbit 350-Invitrogen); odaksal yapışmaları

vinkülin proteini özgül antikorları (V9131-Sigma) ve ikincil floresan antikorları (mouse555-Invitrogen) kullanılarak; hücre çekirdeği ise floresan DAPI kullanılarak boyandı.



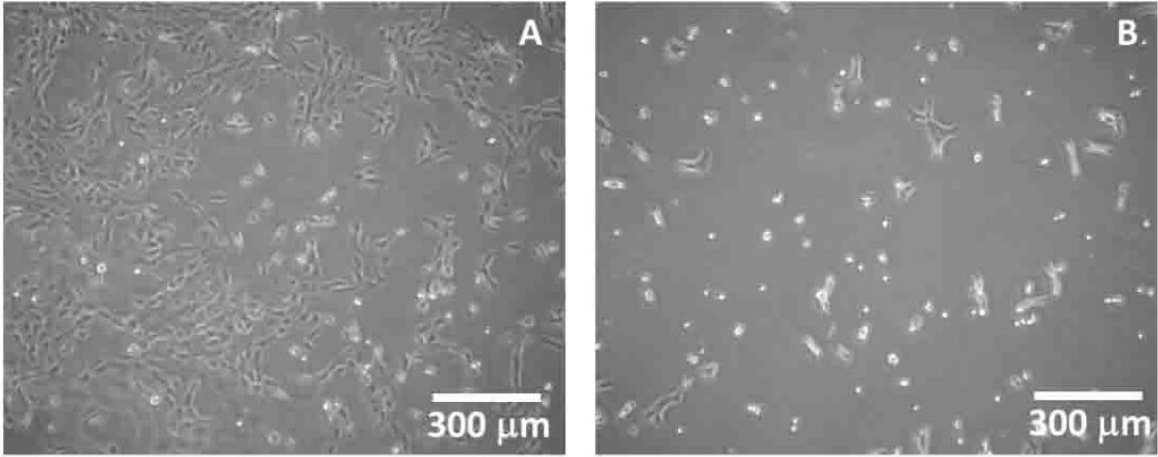
Şekil 17. MCF10A hücrelerini iki saat 10 µg/ml saykloheksimit uygulamasından sonra K-kazein kontrol İTO-cam yüzeyler üzerinde dört saatlik kültürün ardından sabitlenip yapılan floresan boyamaları.

(yüzey başına  $0.37 \times 10^6$  hücre)

### 3.1.6.2 Hücrelerin aç bırakılması uygulaması

Saykloheksimit uygulaması test yüzeylerde hücrelere ağır geldiği için, hücreleri belli sürelerde (2 – 4 saat) serumsuz (aç) bırakılarak hem protein sentezini azaltılması hem de hücre topluluğunu senkronize edilmesi denendi. Hücrelerin test yüzeylere aktarılması için normal hücre kültürü petrilerinden ayırma işleminden sonra serumsuz bırakılması veya serumsuz bırakıldıktan sonra hücrelerin petri yüzeyinden ayrılması denendi. İkinci işlemde hücreler daha sağlıklı idi. Hücreleri test yüzeyleri üzerine koymadan önce serumsuz ortamda bekletmenin ardından, yüzeyler üzerinde serumsuz ve normal ortamda ekimi test edildi.

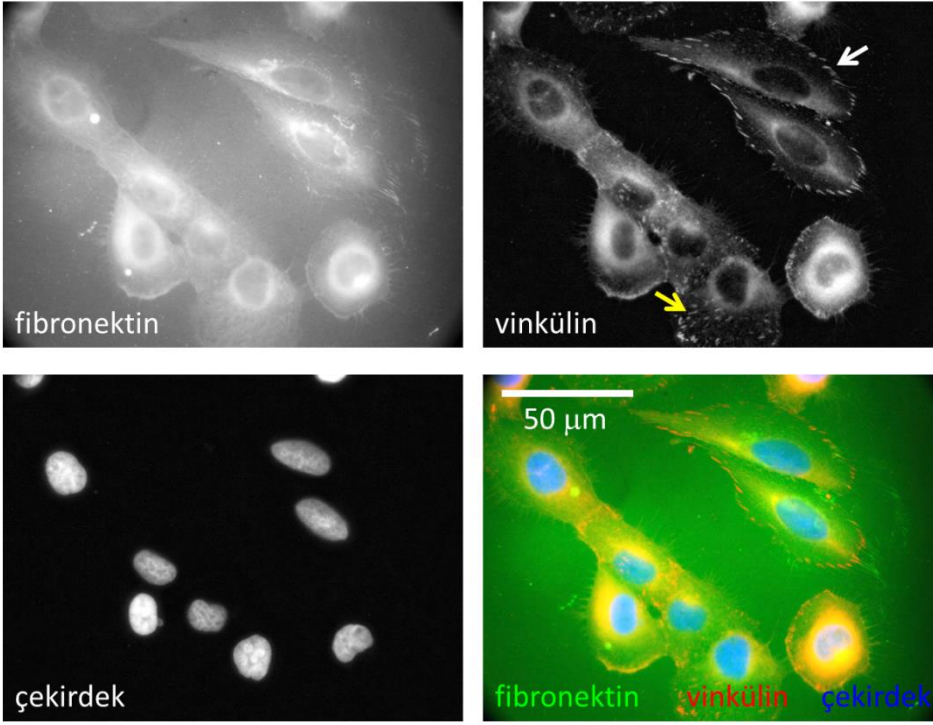
Hücreler serumsuz bırakılıp tripsin-EDTA ile normal petriden ayrıldıktan sonra test yüzeyleri üzerinde normal ortamda kültüre bırakıldıklarında daha sağlıklı oldukları gözlemlendi.



Şekil 18. MDA-MB-231 hücrelerinin İTO-cam yüzeylerde rasgele alanlarda çekilen faz-kontrast resimlerinden temsili birer örnek.

İTO-cam hem iletken hem de saydam olduğu için hem elektron demetiyle litografiye hem ışık mikroskobu uygulamalarına izin vermektedir. Hücreleri iki saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra tripsin-EDTA ile petrilere ayırıldı ve kontrol yüzeylere ekildi (yüzey başına  $0.66 \times 10^6$  hücre). (A) Fibronectin yüzey üzerinde 18 saat normal ortamda büyüyen hücreler. (B) K-kazein yüzey üzerinde 18 saat normal ortamda büyüyen hücreler. Beklenildiği üzere fibronectin hücre yapışmasını ve yayılmasını desteklerken K-kazein buna engel olmaktadır.

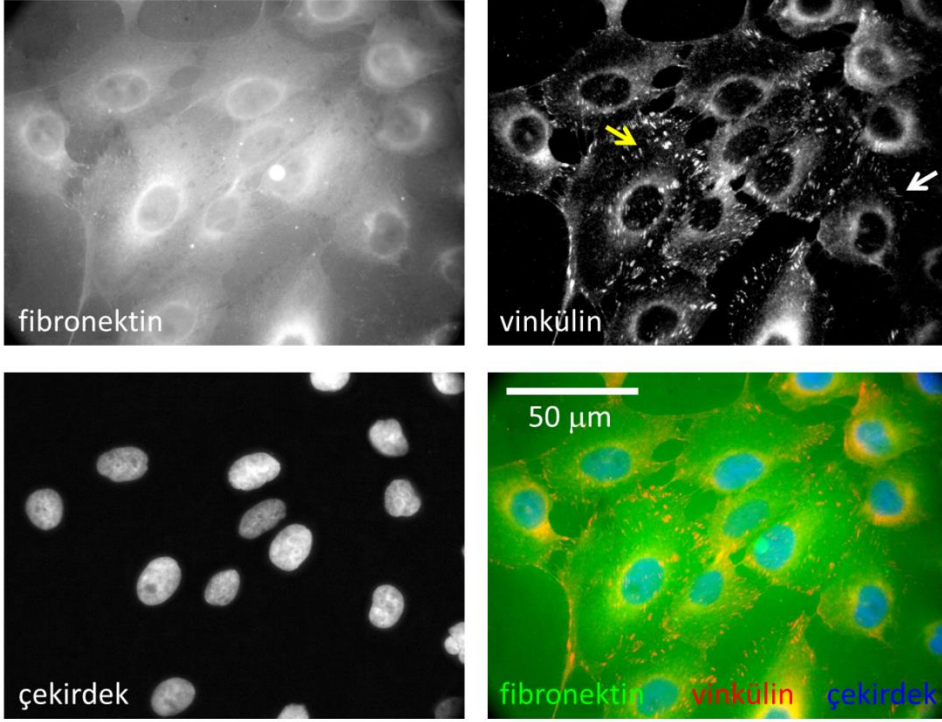
Odaksal yapışmaların tümü hücrenin alt kısmı ile yüzey arasında oluşan protein yapılarıdır. Bu odaksal yapışmalar hücrenin yüzeye kuvvet uyguladığı hücre sınırlarında daha yoğun olmakla beraber hücrenin daha iç bölgelerinde de görülür. Şu ana kadar yapılan deneylerde MDA-MB-231 hücrelerinde odaksal yapışmaların daha çok hücre çevresinde, MCF10A hücrelerinde ise hem hücre çevresinde hem iç bölgelerde olduğu gözlemlendi. Yüzey Fibronectin kaplandığı için parlaktır, hücrelerde de kendi ürettikleri fibronectin sinyal vermektedir. Hem fibronectin hem de vinculin için hücre çekirdeği yanındaki alanlarda görülen sinyaller protein sentez ve işleme merkezlerine (endoplasmik retikulum ve golgi) denk gelmektedir.



Şekil 19. MCF10A hücrelerini iki saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra tripsin-EDTA ile petrilere ayırıldı ve Fibronektin kontrol yüzeylerine ekildi.

(yüzey başına  $0.66 \times 10^6$  hücre)

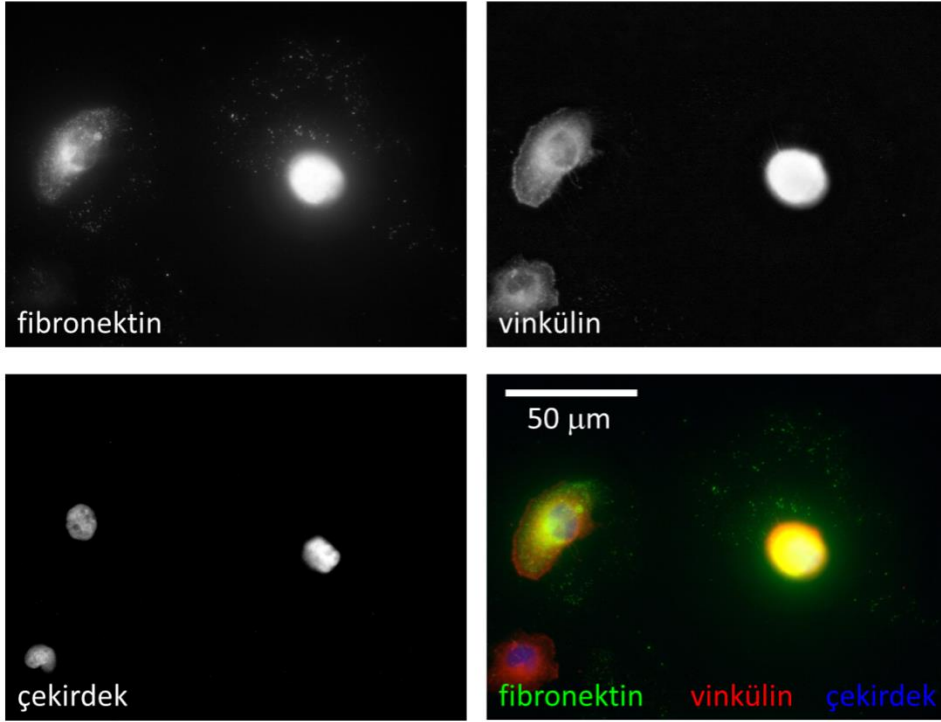
Yüzeylerin üzerinde normal ortamda on sekiz saatlik kültürün ardından sabitlenip floresan boyamalarını yapıldı. Örnek fibronektin, vinculin ve DAPI boyamaları ve karşılık gelen birleştirilmiş görüntü. Beyaz oklar hücre çevresinde oluşan, sarı oklar hücrenin daha iç bölgelerinde oluşan odaksal yapışmalara işaret ediyor.



Şekil 20.MCF10A hücrelerini iki saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra tripsin-EDTA ile petrilere ayırıldı ve fibronektin kontrol yüzeylerine ekildi.

(yüzey başına  $0.66 \times 10^6$  hücre)

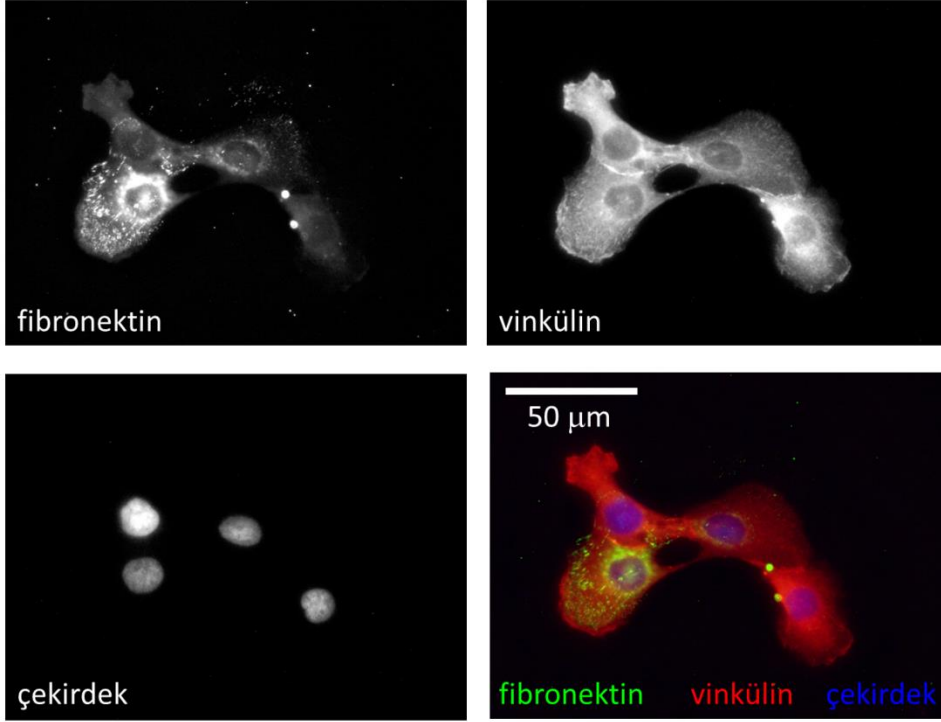
Yüzeylerin üzerinde normal ortamda on sekiz saatlik kültürün ardından sabitlenip floresan boyamaları yapıldı. Örnek fibronektin, vinculin ve DAPI boyamaları ve karşılık gelen birleştirilmiş görüntü. Beyaz oklar hücre çevresinde oluşan, sarı oklar hücrenin daha iç bölgelerinde oluşan odaksal yapışmalara işaret ediyor.



Şekil 21. MCF10A hücrelerini iki saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra tripsin-EDTA ile petrilere ayırıldı ve K-kazein kontrol yüzeylerine ekildi.

(yüzey başına  $0.66 \times 10^6$  hücre)

Yüzeylerin üzerinde normal ortamda on sekiz saatlik kültürün ardından sabitlenip floresan boyamaları yapıldı. Örnek fibronektin, vinculin ve DAPI boyamaları ve karşılık gelen birleştirilmiş görüntü.

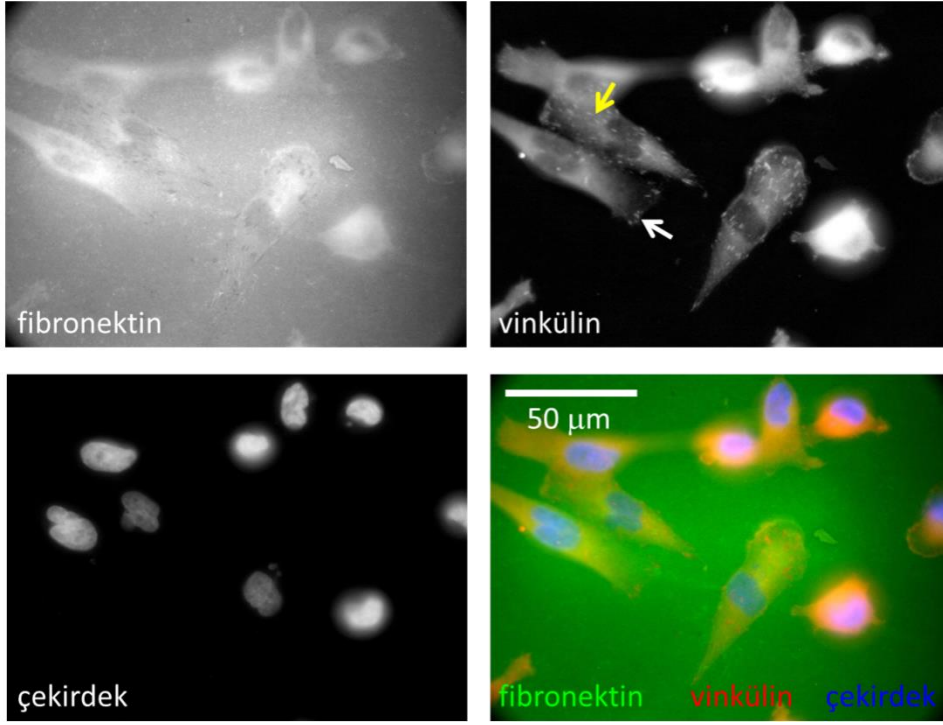


Şekil 22. MCF10A hücrelerini iki saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra tripsin-EDTA ile petrilerden ayrıldı ve K-kazein kontrol yüzeylerine ekildi.

(yüzey başına  $0.66 \times 10^6$  hücre)

Yüzeylerin üzerinde normal ortamda on sekiz saatlik kültürün ardından sabitlenip floresan boyamaları yapıldı. Örnek fibronektin, vinculin ve DAPI boyamaları ve karşılık gelen birleştirilmiş görüntü.

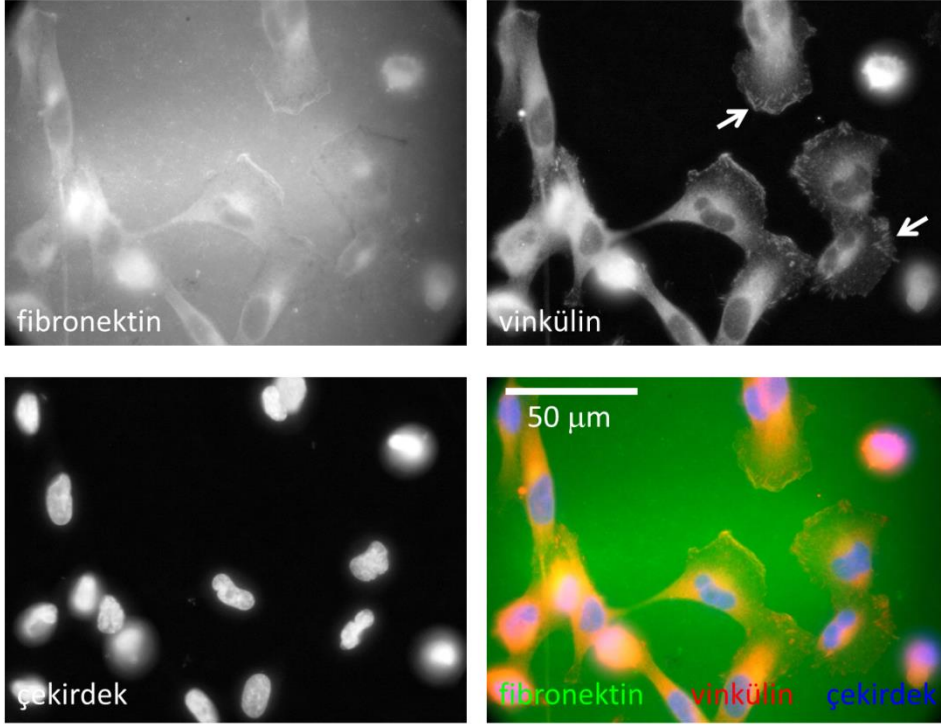




Şekil 23. MDA-MB-231 hücrelerini iki saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra tripsin-EDTA ile petrilerden ayırıldı ve fibronektin kontrol yüzeylerine ekildi.

(yüzey başına  $0.66 \times 10^6$  hücre)

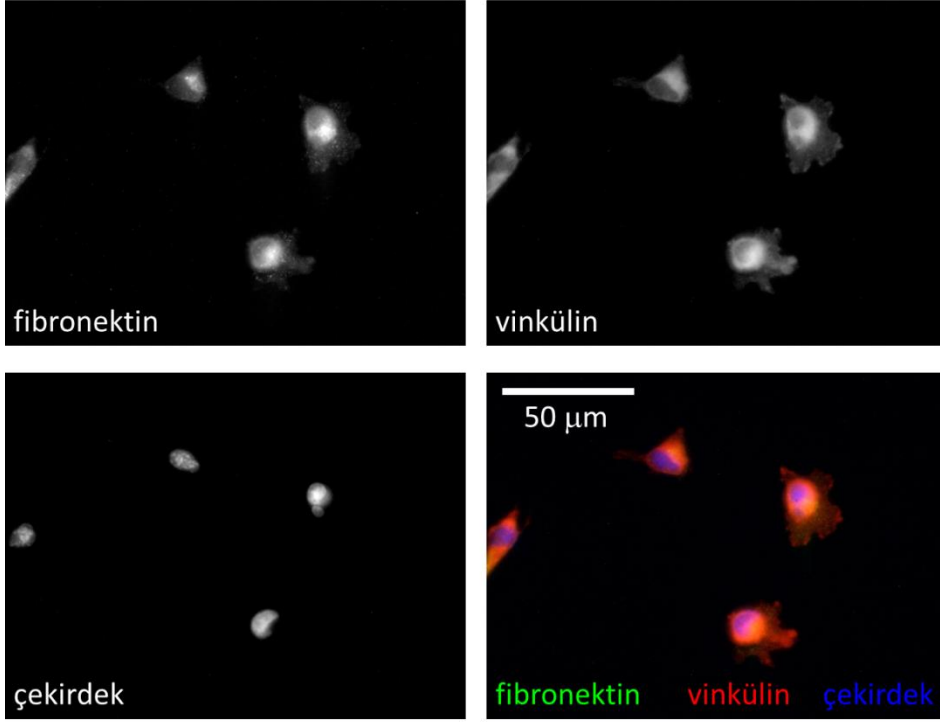
Yüzeylerin üzerinde normal ortamda on sekiz saatlik kültürün ardından sabitlenip floresan boyamaları yapıldı. Örnek fibronektin, vinculin ve DAPI boyamaları ve karşılık gelen birleştirilmiş görüntü. Beyaz oklar hücre çevresinde oluşan, sarı oklar hücrenin daha iç bölgelerinde oluşan odaksal yapışmalara işaret ediyor.



Şekil 24. MDA-MB-231 hücrelerini iki saat serumsuz ortamda bıraktıktan sonra tripsin-EDTA ile petrilere ayırdı ve fibronektin kontrol yüzeylerine ekildi.

(yüzey başına  $0.66 \times 10^6$  hücre)

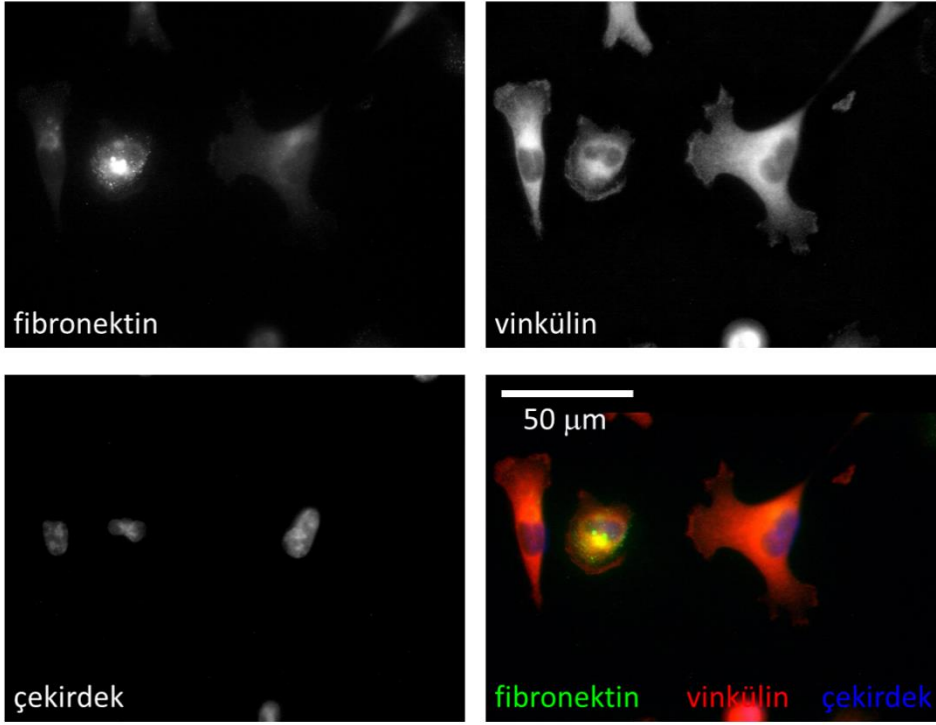
Yüzeylerin üzerinde normal ortamda on sekiz saatlik kültürün ardından sabitlenip floresan boyamaları yapıldı. Örnek fibronektin, vinculin ve DAPI boyamaları ve karşılık gelen birleştirilmiş görüntü. Beyaz oklar hücre çevresinde oluşan odaksal yapışmalara işaret ediyor.



Şekil 25. MDA-MB-231 hücrelerini iki saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra tripsin-EDTA ile petrilerden ayırıldı ve K-kazein kontrol yüzeylerine ekildi.

(yüzey başına  $0.66 \times 10^6$  hücre)

Yüzeylerin üzerinde normal ortamda on sekiz saatlik kültürün ardından sabitlenip floresan boyamalarını yapıldı. Örnek fibronectin, vinculin ve DAPI boyamaları ve karşılık gelen birleştirilmiş görüntü.



Şekil 26. MDA-MB-231 hücrelerini iki saat serumsuz ortamda bırakıldıktan sonra tripsin-EDTA ile petrilerden ayırıldı ve K-kazein kontrol yüzeylerine ekildi.

(yüzey başına  $0.66 \times 10^6$  hücre)

Yüzeylerin üzerinde normal ortamda on sekiz saatlik kültürün ardından sabitlenip floresan boyamaları yapıldı. Örnek fibronektin, vinculin ve DAPI boyamaları ve karşılık gelen birleştirilmiş görüntü.

### 3.1.6.3 Test yüzeylere ekilecek hücre sayısının belirlenmesi

Hücre sayısı düşük iken ( $0.025 \times 10^6$ ) yüzeye yapışan hücre sayısı çok azdı ve yayılan hücre sayısı ise sıfıra yakındı. Hücre sayısı yüksek olduğunda ise ( $8.00 \times 10^6$ ), hücreler birbirlerine yapışmaktaydı. Bu yüzden yüzeyden gelen bilginin test edilmesi ve tek tek hücrelerin incelenmesi mümkün olmamaktaydı. Bu deneyler sonucunda 6 cm petri içindeki  $\sim 20 \times 25$  mm lik İTO-cam yüzeyler için  $0.66 \times 10^6$  hücrenin en uygun sayı olduğu belirlendi.

### 3.2 MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin K-kazein üzerine Fibronektin (Tek aktif) desenlenmesinden elde edilen sonuçlar

Hücreler, 200 nm çaplı fibronektin nanodesenleri üzerinde aralık ne olursa olsun odaksal yapışma oluşturmazlar. Bu durumda odaksal yapışma oluşması için bir alt limit belirlenmiş oldu. Bu limit farklı hücrelerle yapılan önceki çalışmalarla da uyumludur (Pesen ve Haviland,

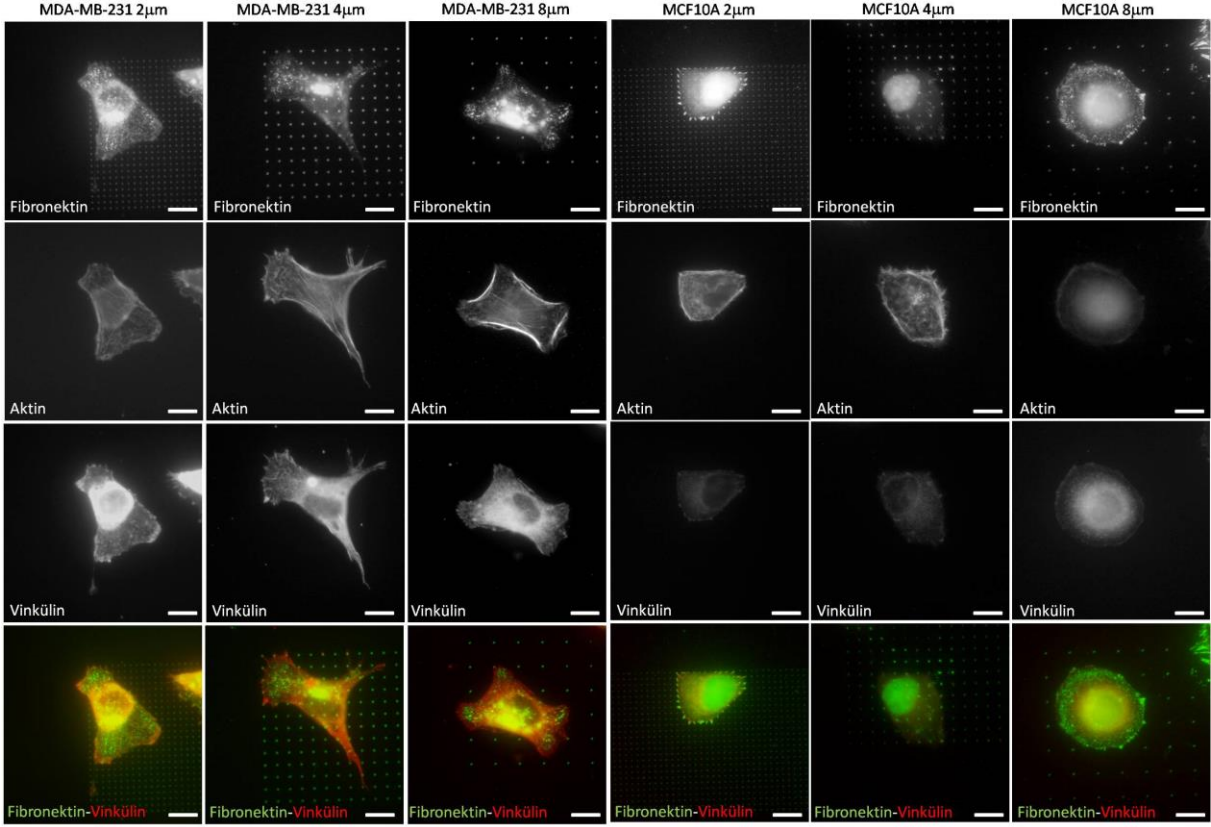
2009). 400 veya 800 nm çaplı desenler üzerinde ise hücreler 2 µm, 4µm ve 8 µm aralıklı desenlerde yapışma gösterdiler. Bu yapışmaların ayrıntılı incelenmesi aşağıdadır.

### 3.2.1 Hücrelerin Fibronektin ve K-kazein yüzeylerde test edilmesi

Serumsuz bırakılarak yapılan deneyler sonrası hücreler K-kazein kaplı yüzeylere bir kaç saat içinde yapışmadılar. Tüm çip üzerinde en fazla bir kaç hücre gözlenebildi. Fibronektin kaplı yüzeyler ise hücre yapışmasını ve yayılmasını destekledi. Hücreler, normal besiyerleri içinde iken 18 saat kültür sonunda K-kazein kaplı yüzeylere tek tük yapıştılar; nadiren yayıldılar; fakat odaksal yapışmalar oluşturmazdılar. Fibronektin kaplı yüzeylerde ise çok sayıda hücre yapıştı, yayıldı ve en olgun şekillerinde (ipliksi) odaksal yapışmalar oluşturdular. Normal besi kullanıldığı için ortamda serum bulunmaktadır. Serum içinde pek çok protein vardır ve bunlardan biri de fibronektindir. Bu serum kaynaklı fibronektin, hücrelerin kendi ürettikleri fibronektin ile beraber K-kazein yüzeylerde hücre yapışmasına destek olmaktadır. Bu uzun süreli ve normal besi yeri ile yapılan deneyler hücre yapışmasında üst limitlerin belirlenmesini sağladı. Kültürlenmiş hücre görüntüleri bulgular kısmındaki Şekil 19, Şekil 20, Şekil 21, Şekil 22, Şekil 23, Şekil 24, Şekil 25 ve Şekil 26'da gösterildi.

### 3.2.2 Tek aktif desende MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin niteliksel olarak karşılaştırılması

4 µm aralıklı desen üzerine düşen MCF10A hücrelerinde aktin organizasyonunda yerel farklılıklar görüldü. Hücre kenarlarında daha yoğun ve kesişen aktin iplikçiklerinin, hücre ortasında daha paralel şekilde düzenlendiği gözlemlendi. MDA-MB-231 hücrelerinde ise aktin iplikçiklerinin daha çok kesişmeli bir şekilde düzenlendiği gözlemlendi. Ayrıca MDA-MB-231 hücrelerinde aktinin yoğun olduğu noktalar (*actin puncta*) gözlemlendi. Bunlar kanserli hücrelerde görülen öncü işgalci-ayakları göstermektedir (Oser vd., 2009). Diğer yandan her iki hücre tipi için de, FN nanonoktaları dörtgenlerin köşeleri olarak düşünülürse, aktin iplikçiklerinin bu dörtgen alanların kenarları yönünde değil köşegenleri yönünde olduğu gözlemlendi. Bu durum hücrede yük ve kuvvet dağılımı için daha uygundur (Thery vd., 2006).

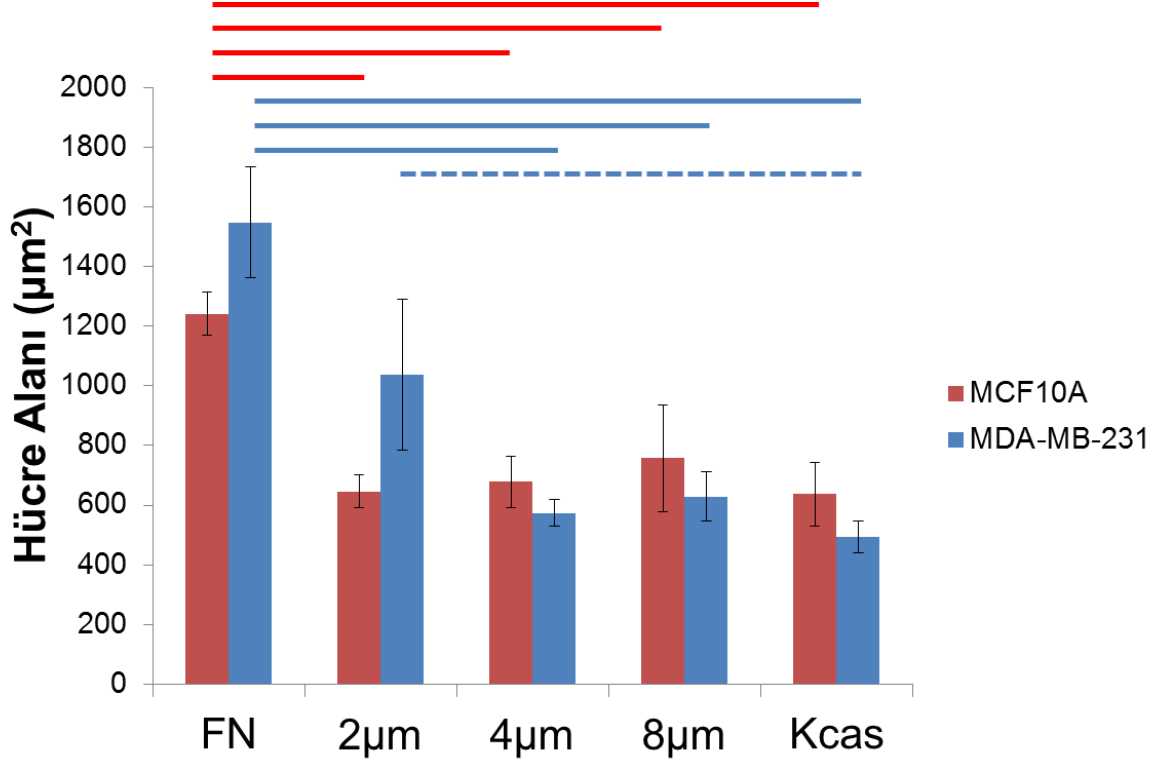


Şekil 27.MDA-MB-231 ve MCF10A hatlarına ait hücrelerin 2,4,8 mikrometre aralıklı tek aktif nanodesen üzerindeki fotoğrafları.

Örnekler K-kazein kaplama EDL Fibronectin kaplama sırasıyla hazırlanmış olup, K-kazein üzerine Fibronectin örnekleridir. Üstten alta sıralanacak olursa Fibronectin, aktin ve vinkülin fotoğrafları verilmiş olup son sırada bu dört protein üstüste konmuştur. Ölçek çubuğu 8 mikrometreyi göstermektedir.

### 3.2.3 Tek aktif desende MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin hücre alanı ve uzun eksen/kısa eksen oranları karşılaştırılması

MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin 2, 4 ve 8 µm aralıklı FN nanonoktaları içeren desenler üzerinde ve FN ile K-kazein kontrol yüzeylerinde hücre alanları ve uzun eksen/kısa eksen oranları incelendi.

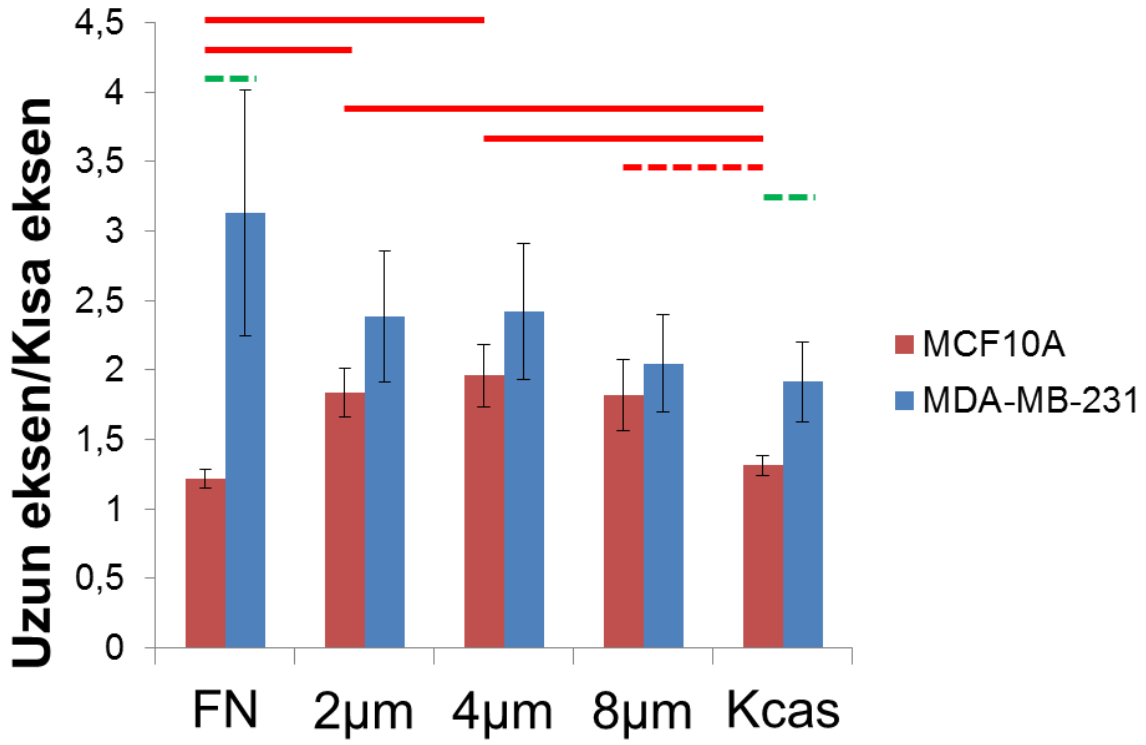


Şekil 28. Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre alanlarının dağılımları.

Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

Hücrelerin alanlarını gösteren grafikte de görüldüğü gibi MDA-MB-231 hücreleri FN kontrol yüzeyde ve 2 µm aralıklı FN nanonokta desenli yüzeyde benzer büyüklükte alanlara yayıldıkları, FN nanonokta aralıkları arttıkça hücrelerin alanlarının azaldığı görülüyor. MCF10A hücrelerinin ise FN kontrol yüzeyde büyük alanlara yayılırken aralıkları farklı olsa da tüm nanodesenli yüzeylerde ve K-kazein kontrol yüzeyinde benzer ve FN kontrol yüzeyden daha küçük alanlara yayıldıkları görülüyor.





Şekil 29. Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre simetri oranlarının dağılımları.

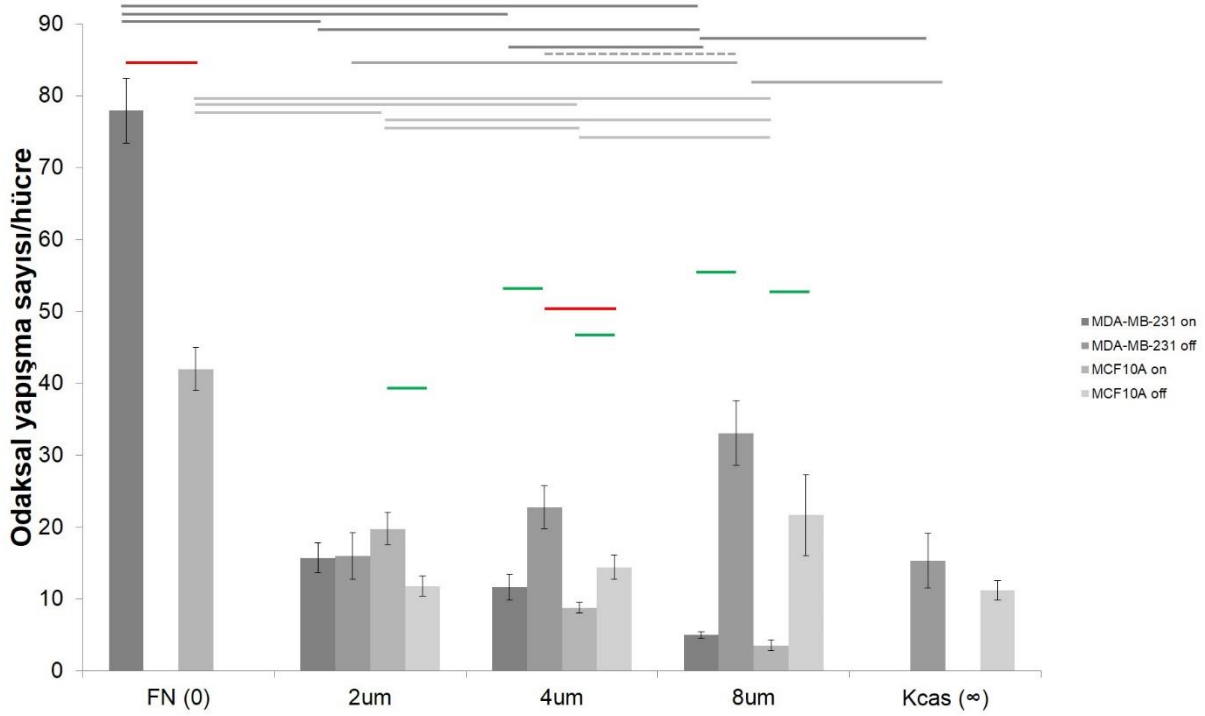
Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

Hücrelerin uzun eksen/kısa eksen oranlarını gösteren grafikte de görüldüğü gibi MDA-MB-231 hücreleri bütün yüzeyler (FN-2 µm-4 µm-8 µm-Kcas) üzerinde birbirine benzer ve dairesellikten uzak bir morfolojiye sahiptirler. MCF10A hücreleri ise FN kontrol ve K-kazein kontrol yüzeylerde daha dairesel iken farklı aralıklı FN nanonokta desenleri içeren yüzeylerde birbirine benzer ama dairesellikten uzak bir morfolojiye sahiptirler. İki hücre tipi karşılaştırıldığında ise FN kontrol ve K-kazein kontrol yüzeylerinde MDA-MB-231 hücrelerinin MCF10A hücrelerinden daha asimetric (daha az dairesel) olduğu görülür.

### 3.2.4 Tek aktif desende MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin odaksal yapışmalarının karşılaştırılması

Farklı (fibronektin kontrol, K-kazein kontrol, K-kazein üzerinde fibronektin nanodesenli) yüzeylerde kültürlenmiş hücre görüntülerinin analizi sonucunda odaksal yapışmaların alanları, hücre başına düşen sayıları, nanonokta üzerinde olup olmadıklarını incelendi. Her farklı yüzey için  $n = 9 - 70$  adet hücre incelendi. Analiz işlemleri ImageJ üzerinden yapıldı, iki farklı metot kullanıldı ve her iki metot ile aynı eğilimin yakalandığı tespit edildi. Birinci metodun basamakları

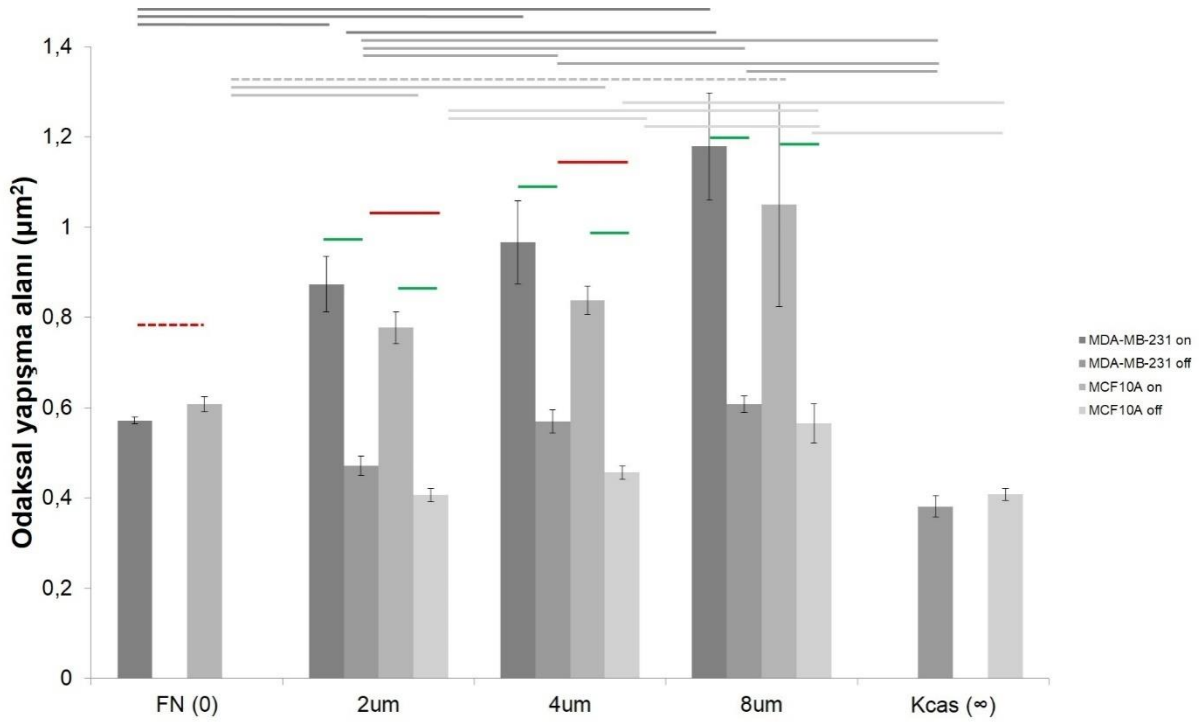
ve kullanılan değerler sırasıyla şu şekildedir: SUBTRACT BACKGROUND-rolling ball radius 500.0 piksel-sliding paraboloid, BRIGHTNESS&CONTRAST-auto, MATH>SUBTRACT (mode value), LOG3D sigma X=4 sigma Y=4, THRESHOLD-auto ve ANALYZE PARTICLES, ikinci metodun analiz basamakları ise şöyledir: SUBTRACT BACKGROUND-rolling ball radius 50.0 piksel-sliding paraboloid, CLAHE, MATH>EXP, BRIGHTNESS&CONTRAST-auto, LOG3D sigma X=5 sigma Y=5, THRESHOLD-auto ve ANALYZE PARTICLES. Aynı eğilimin yakalanıyor olmasına rağmen ikinci metod CLAHE (Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization) basamağı ile farklı pozlanma zamanlarına sahip resimlerin eşitlenebilmesine olanak sağlayıp istenilen objelerin, odaksal yapışmaların, büyüklüklerine göre kendini adapte edebilmesiyle daha iyi bir tercih oldu.



Şekil 30. Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre başına düşen odaksal yapışma sayısının dağılımı.

MDA-MB-231 on kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MDA-MB-231 off kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MCF10A on normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MCF10A off normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma sayısını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

Her iki hücre tipi için de nanonoktalar üzerindeki odaksal yapışma sayıları nokta aralığı arttıkça azalmaktadır. Homojen fibronektin yüzey üzerinde MDA-MB-231 hücreleri MCF10A hücrelerine kıyasla sayıca fazla odaksal yapışmaları ile farklılaşmaktadırlar. Ayrıca 4 mikrometre aralıklı fibronektin nanonoktalar içeren desen üzerinde noktalar üzerinde olmayan odaksal yapışmaların sayısı yine bu iki hücre tipinde istatistiksel olarak farklıdır.

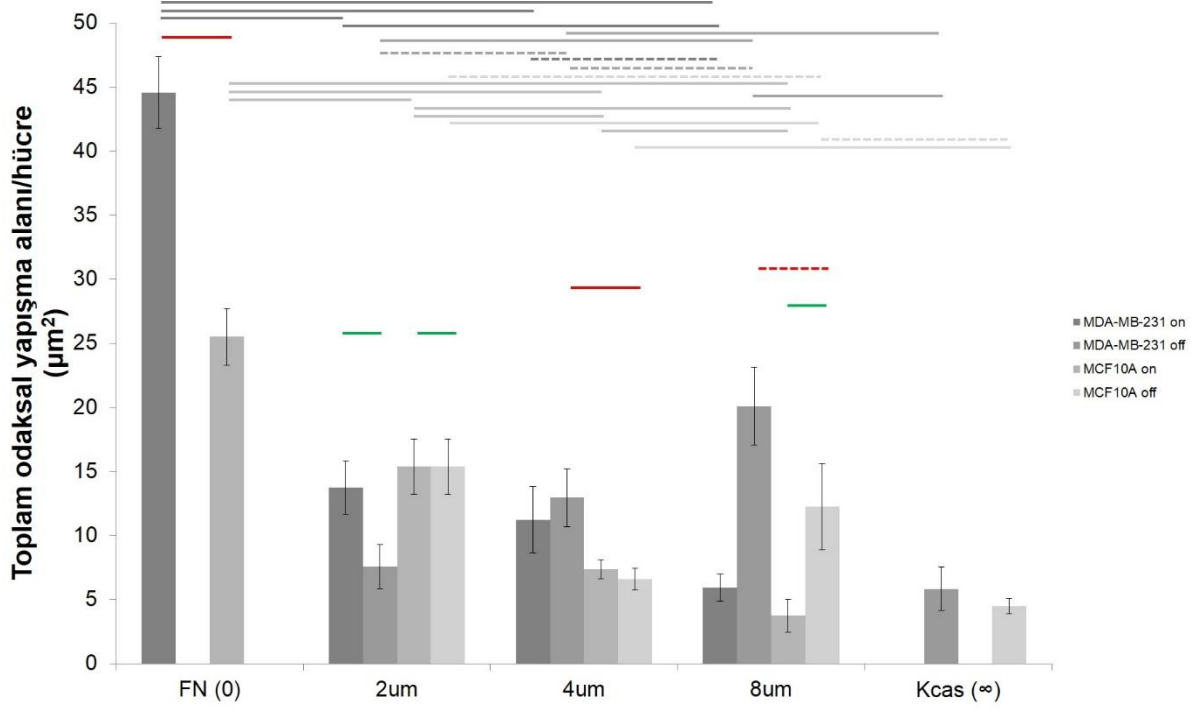


Şekil 31. Fibronektin ve Kkazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde odaksal yapışma alanlarının dağılımı.

MDA-MB-231 on kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanını, MDA-MB-231 off kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanını, MCF10A on normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanını, MCF10A off normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

Odaksal yapışma alanlarının farklı yüzeylerde dağılım grafiğinde hem MDA-MB-231 hücrelerinin hem de MCF10A hücrelerinin desen aralığı arttıkça desen üzerindeki odaksal yapışma alanlarının arttığı görüldü. Her iki hücre tipi de oturdukları yüzeyde fibronektin nanonoktaların azalmasına bağlı olarak kurdukları odaksal yapışmaları kuvvetlendirmekte ve

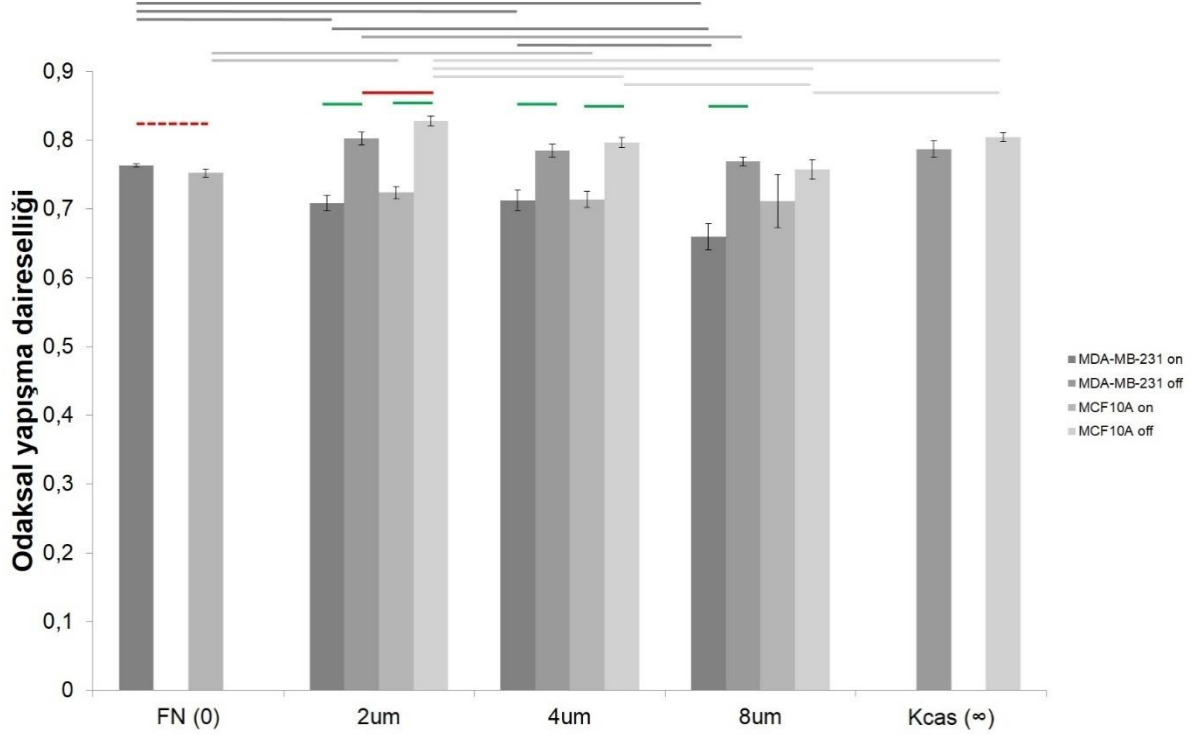
odaksal yapışma alanlarını arttırmaktadırlar. 2 mikrometre ve 4 mikrometre aralıklı desenlerler arasında yapılan odaksal yapışmalarının alanları her iki hücre tipi için farklılık göstermektedir.



Şekil 32. Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre başına düşen odaksal yapışma alan toplamının dağılımı.

MDA-MB-231 on kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları toplam odaksal yapışma alanı, MDA-MB-231 off kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları toplam odaksal yapışma alanı, MCF10A on normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerindeki toplam yaptıkları odaksal yapışma alanı, MCF10A off normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları toplam odaksal yapışma alanını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

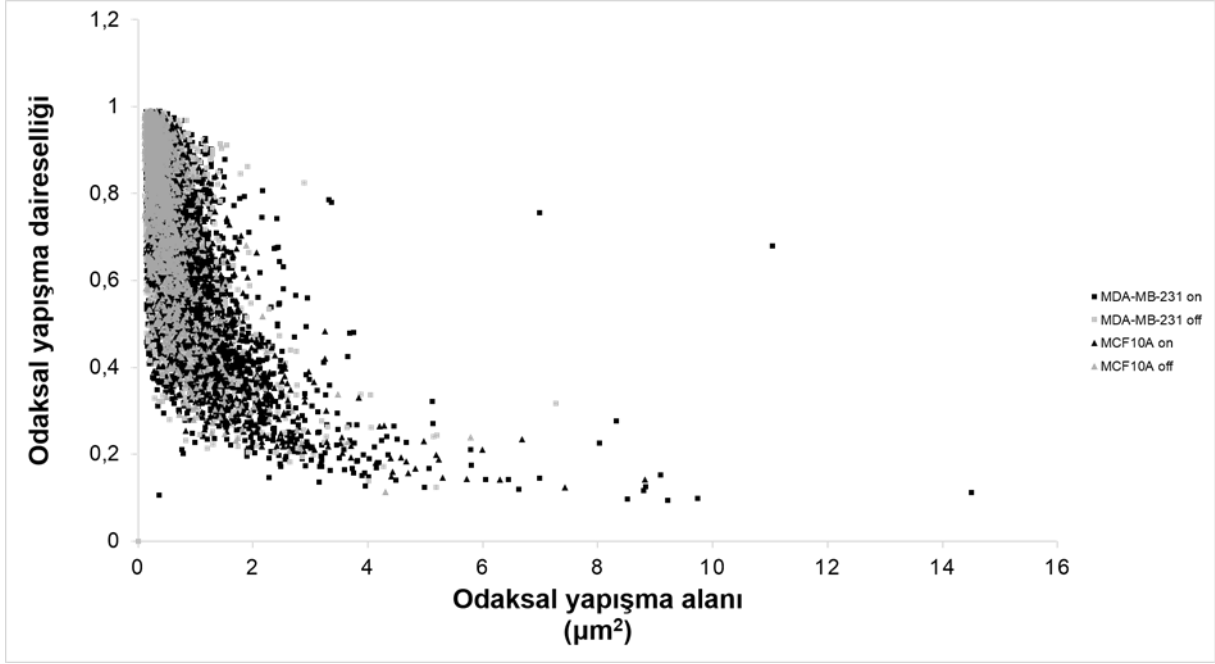
Hücre başına düşen odaksal yapışma alan toplamının farklı yüzeylerde dağılımı grafiğinde kanser ve normal epitel hücrelerinin desen aralığı arttıkça yaptıkları odaksal yapışma alanlarının toplamının azaldığı görüldü. 4 mikrometre aralıklı fibronektin nanonoktalar içeren yüzeylerde kanser ve normal epitel hücrelerinin nanonoktalar arasında yaptıkları toplam odaksal yapışma alanlarının farklılık göstermesi her iki hücre tipinin yüzey üzerindeki davranışlarının farklılaştığını göstermektedir.



Şekil 33. Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde odaksal yapışma daireselliğinin dağılımı.

MDA-MB-231 on kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma daireselliği, MDA-MB-231 off kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma daireselliği, MCF10A on normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma daireselliği, MCF10A off normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma daireselliğini göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

Odaksal yapışma daireselliğinin farklı yüzeylerde dağılımını gösteren grafikte her iki hücre tipinin de fibronektin nanonokta üzerinde yaptıkları odaksal yapışmalarının daireselliğinin nanonoktalar arasında yaptıkları odaksal yapışmalarının daireselliğinden farklı olduğu görüldü. Hücreler nanonokta desenler üzerinde odaksal yapışmalarını dairesellikten uzaklaştırarak çizgisel hale getirmektedirler.



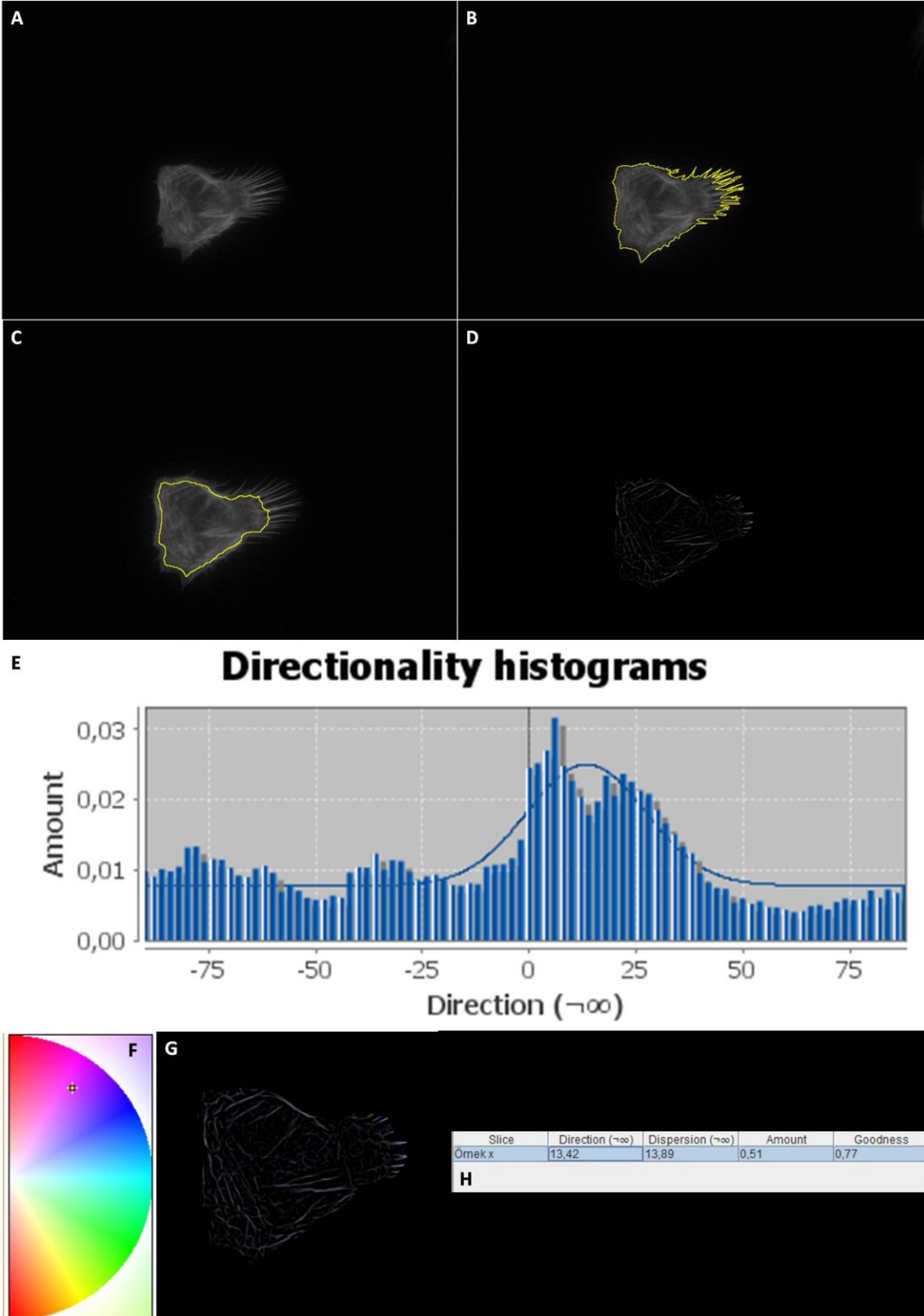
Şekil 34. Tek aktif nanodesen üzerinde odaksal yapışma alanlarının odaksal yapışma daireselliğine bağlı dağılımı.

MDA-MB-231 on kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini, MDA-MB-231 off kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini, MCF10A on normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini, MCF10A off normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini göstermektedir.

Odaksal yapışma alanlarının odaksal yapışma daireselliğine bağlı dağılımını gösteren grafikte hücrelerin odaksal yapışma alanlarının artmasıyla odaksal yapışmaların dairesellikten çıkıp doğrusallaştığı gözlemleniyor.

### 3.2.5 Tek aktif desende MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin morfolojik karşılaştırması için aktin iskeleti analizi

MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin odaksal yapışmalar bakımından incelenmesinin ardından bu iki hücre tipinin aktin organizasyonlarının da incelenmesi, odaksal yapışmalar ile etkileşen aktin iplikçiklerinin hücre iskeletinde genel bir farklılaşmaya sebep olup olmadığına, kullanılan analiz yöntemiyle bakılmaya çalışıldı.

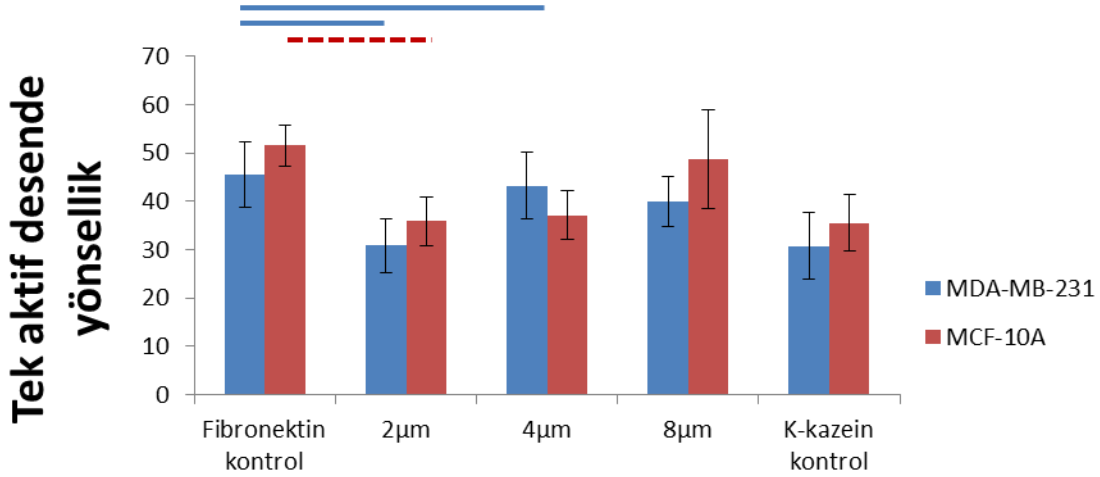


Şekil 35. Hücrelerin aktin iskeletlerinin analiz aşamaları.

A)Hücrenin işlenmemiş fotoğrafı. B) Hücre çevresinin çizilmiş fotoğrafı. C)Hücre çevresinden merkeze doğru 30 piksel azaltılmış fotoğrafı. D) Hücrenin *tubuneness* işleminden sonraki



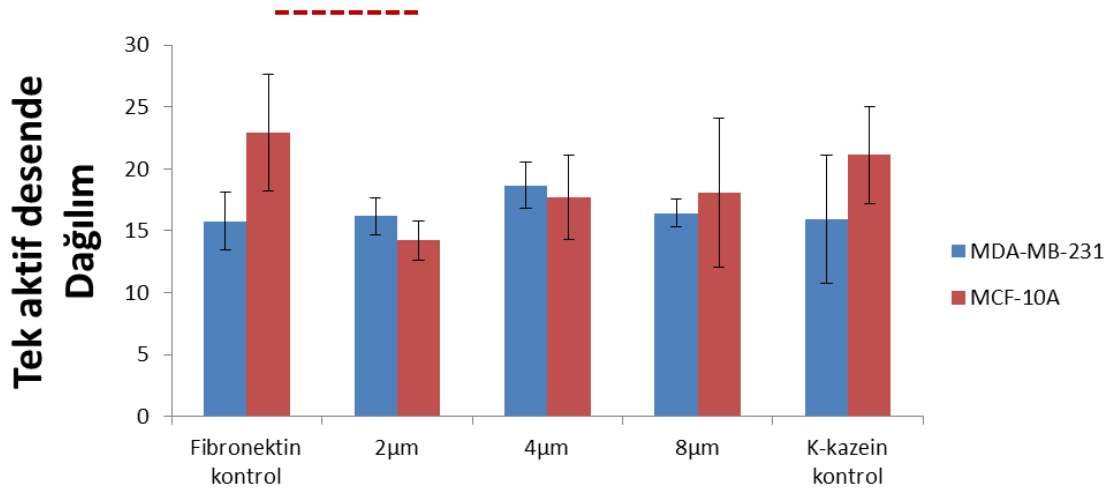
fotoğrafi. E) *Directionality* işleminden gelen histogram çıktısı. F)Yöne bağlı olarak ağı yapıların renklerini gösteren renk tekerleği H) *Directionality* işleminden gelen verilerin tablo halinde gösterimi.



Şekil 36. MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin Fibronectin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ve nanonoktalar üzerinde açıları-Yönsellik grafiği.

MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin hücre içindeki aktin organizasyonlarına bakılmak üzere ImageJ programının versiyonu olan Fiji programında *Plugins* sekmesinde bulunan *Tubeness* ve *Analyze* sekmesinde bulunan *Directionality* seçeneğiyle hücre içindeki aktin analiz edildi. MDA-MB-231 hücre hattında Fibronectin ile karşılaştırıldığında 2 ve 4 mikrometre aralıklı nanodesen de anlamlı bir fark bulunmaktadır.

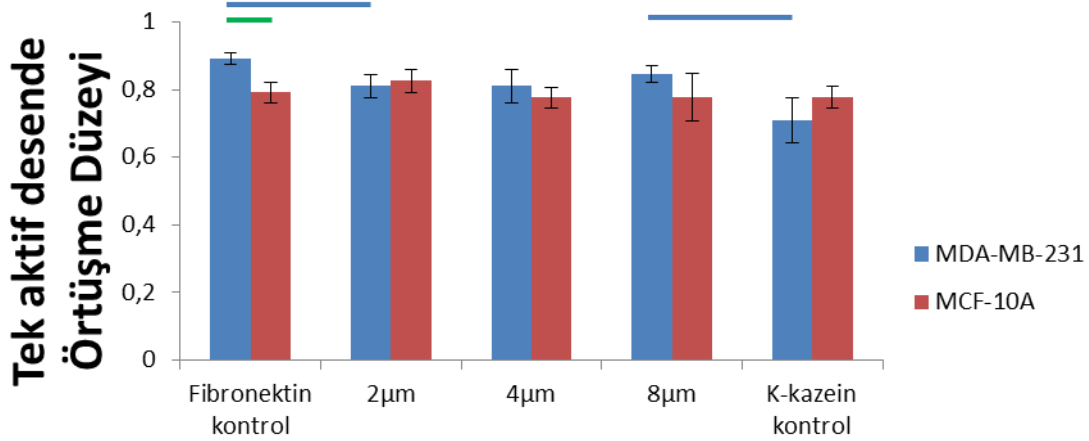
Fibronectin kontrol örneklerinde hücre tüm alanda Fibronectin proteiniyle etkileşime girebildiği için doksan derece içinde yapılan analizde ortalama değer kırk beş ve çevresi şeklindedir. İki ve dört mikrometre aralıkta hücre daha küçük açılarda aktin ağlar oluşturarak Fibronectin proteiniyle etkileşim oluşturabilirler. Aynı durum MCF10A hücrelerinin iki mikrometre aralıklı K-kazein üzerine Fibronectin örneklerinde de görülmektedir. Nanonoktalar sadece kırkbeş dereceyle değil hücrenin orta noktasına göre düşünüldüğünde daha küçük açılarla daha çok noktaya ulaşmış olurlar.



Şekil 37. Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde aktin iskeletindeki iplikçiklerin kartezyen koordinatlarındaki açıların dağılımları.

Yüksek bir rakam daha geniş bir dağılıma karşılık gelir. Sadece MCF10A hücre hattında Fibronektin ile iki mikrometre aralıklı nanodesen üzerinde anlamlı bir fark vardır. MDA-MB-231 hücre hattının her koşulda ortama uyum sağlamak için aktin iskeletini düzenlediği görülmektedir.

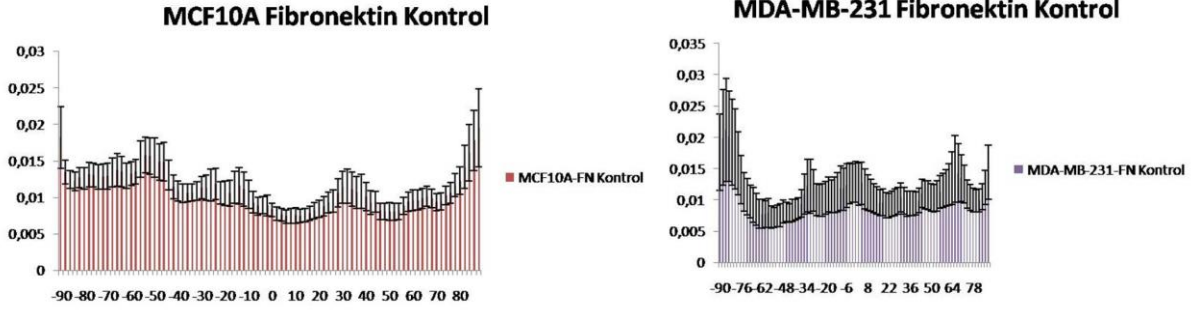
MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin aktin iskeletlerindeki açı dağılımları benzer özellikte bulundu. Burada nanodesenlerin aktin iskeletinde bir yönlendirme yaptığı söylenebilir.



Şekil 38. Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre içindeki aktin iskeletin hücre içi dağılımındaki uyumu.

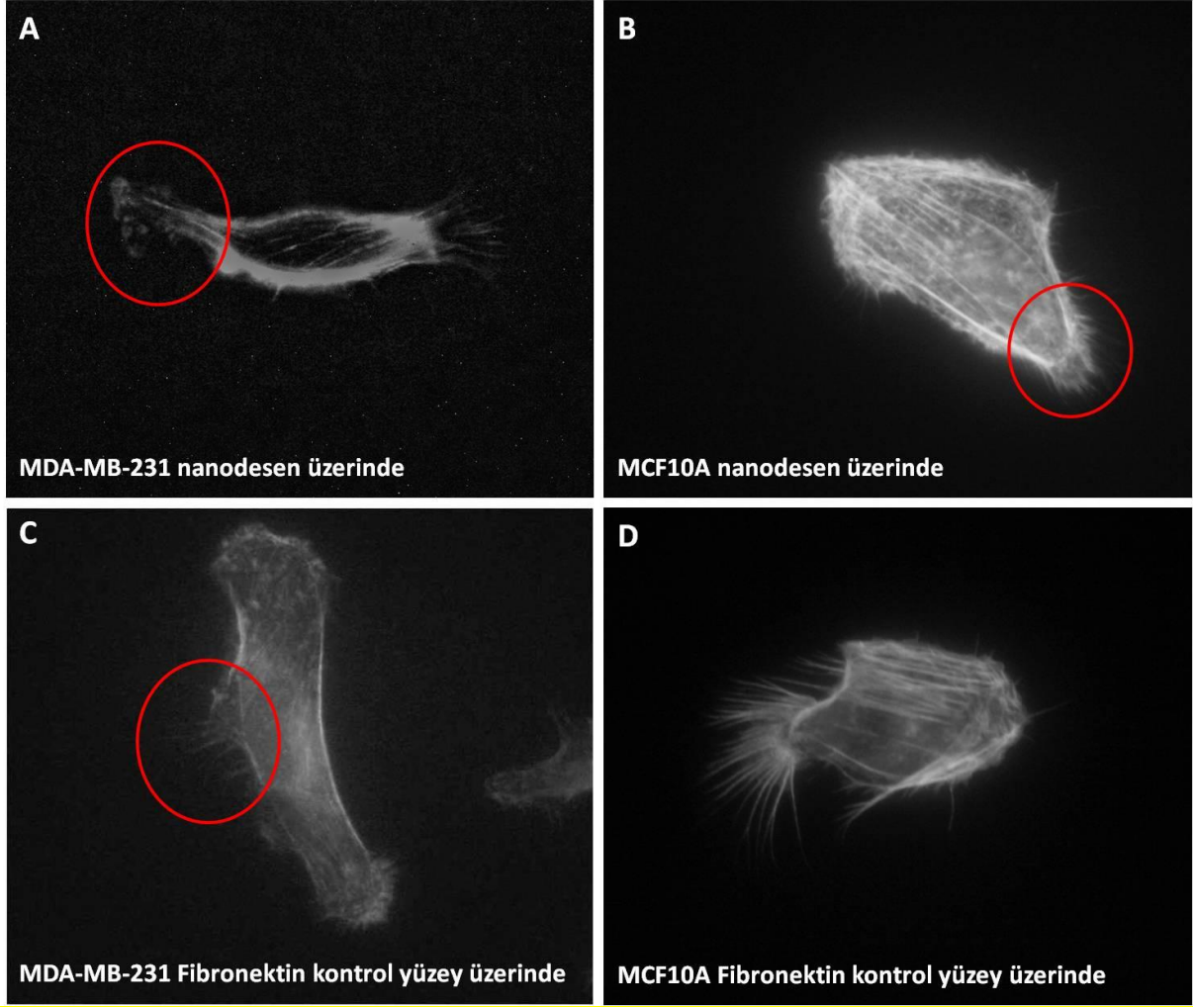
Kullanılan *Directionality* aracı bize aktin iskeletinin hücre içindeki dağılımını vermektedir. İki hücre hattında da, FN kontrol, 2 mikrometre, 4 mikrometre, 8 mikrometre aralıklı nanonoktalar üzerinde hücre içi dağılımın tekdüze olduğu ve bu durumun hücre içinde %80 olduğu

görülmektedir. İki hücre arasında sadece Fibronektin kontrol yüzeyde anlamlı fark vardır. Bu bilgi daha sonraki bilgilerde Fibronektin proteinin iki hücre tipi arasında fark yaratabilecek, ve dolayısıyla seçici olarak kullanılabilir bir yüzey olabileceğini öngörür.



Şekil 39. Fibronektin kontrol yüzeyi üzerinde aktin ortalama dağılım grafiği.

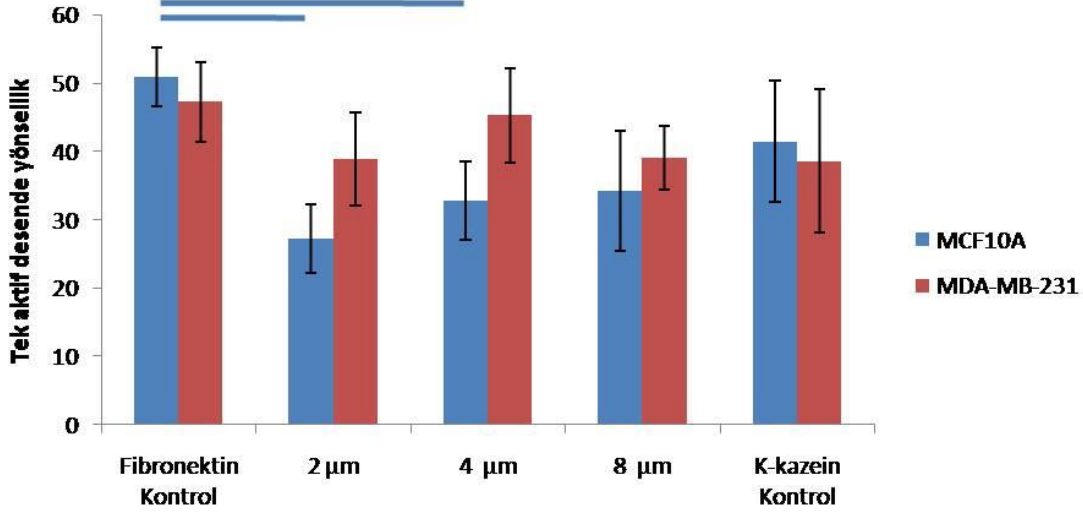
İki hücre hattına baktığımızda tek farkın örtüşme düzeyinde ve Fibronektin kontrol yüzeyinde olduğunu gördük. Daha önceki aktin grafikleri her hücrenin kendi içinde dağılımının ortalama değerleri alınarak hazırlandı. Aktin ortalama dağılım grafiği daha detaylı çözümlmek için 180 derecelik skalada hücrelerin her açı değeri için ortalama dağılımlarının değerleri ile oluşturuldu. Her iki hücre hattında da dağılımda fark görülmedi.



Şekil 40. MDA-MB-231 hücrelerinin Fibronektin yüzeyde MCF10A hücrelerinin oluşturduğu hücre çeper kısmındaki çıkıntılara benzer yapılar oluşturması.

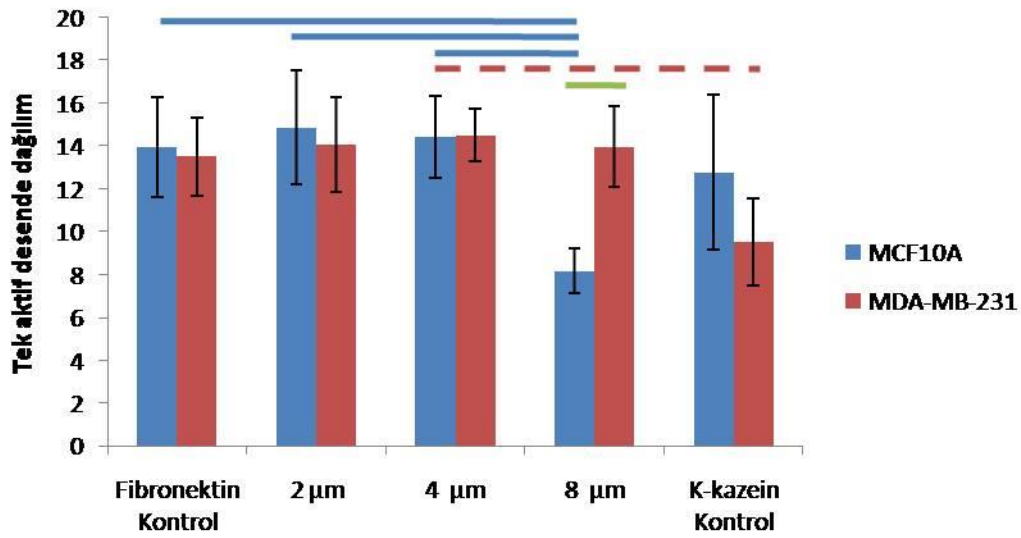
MDA-MB-231 hücreleri hücre şekli olarak çeşitli olmakla birlikte çoğu hücrenin iki uç bölgelerinde(A) *raffle* adı verilen kanser hücrelerine özgü yapılar görülmektedir. Bu bölgelerde aktin iskeleti dağınık halde bulunmakta uzun fiberler bulunmamaktadır. MCF10A hücreleriyle karşılaştırıldığında ise MCF10A hücreleri daha yuvarlak forma sahiptir. Bu hücre hattı *raffle* yapısının aksine hücre çevresine uzanmış uzun aktin iplikçikleri bulunmaktadır (B). MCF10A hücrelerinde görülen hücre çevresine uzanmış aktin iplikçikleri MDA-MB-231 hücrelerinin Fibronektin kontrol yüzeyleri üzerinde de gözlenmiştir (C, D).

Hücrenin en dış kısmında oluşan farklı çıkıntıları analiz etmek üzere hücrenin en dış kısmından 30 piksel band kesiti alınarak aktin analizi basamakları uygulandı.



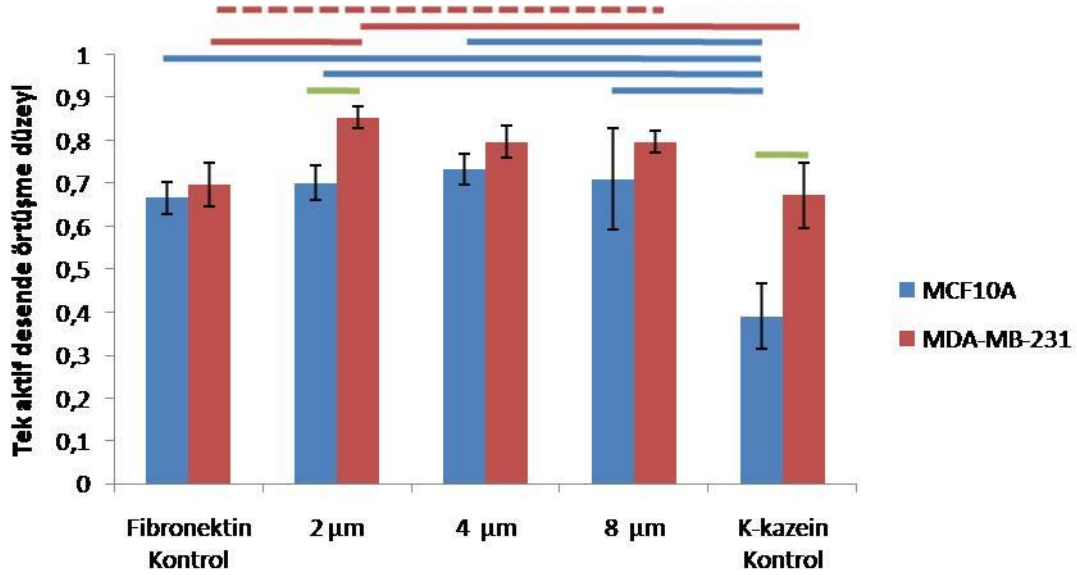
Şekil 41. Tek aktif desen üzerinde hücrenin en dışında bulunan aktin bandı yönselliği.

Şekil 40'ta hücre fotoğraflarında görüldüğü gibi hücrenin en dış bölgesinde özellikle MCF10A hücre hattında görülen çekilmelerle oluşan çıkıntılar gözlemlendi. Fibronectin kontrol yüzeyinde hücreler 40-50 derece arasını tercih ettiler. Bunun nedeni hücreler her alanda Fibronectin proteinine ulaşabildiler ve her her açı değerinde uzantılar oluşturdular, böylece ortalama değer yaklaşık olarak 45 derece olmuş oldu. Desenlerde ise hücreler tren olarak daha küçük açılar tercih etti, çünkü daha küçük açılarla daha çok fibronectin noktasına ulaştılar. Hücre en dış band ile hücrenin ortasında bulunan aktin iskeletinin değerleri yaklaşık olarak aynıdır.



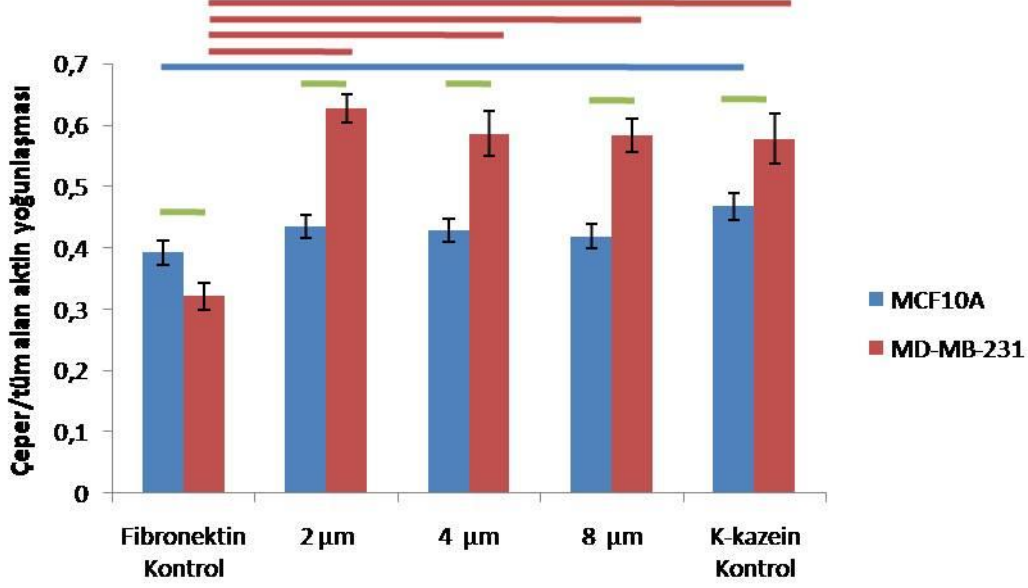
Şekil 42. Tek aktif desen üzerinde hücrenin en dışında bulunan aktin bandı dağılımı.

Yüksek bir rakam daha geniş bir dağılıma karşılık gelir. MCF10A hücre hattı 8 mikrometre aralıklı desen üzerinde Fibronektin kontrol yüzeyi, 2 mikrometre ve 4 mikrometre aralıklı desenden istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü. Ayrıca iki hücre hattı 8 mikrometre aralıklı nanodesen üzerinde farklı dağılım göstermiştir.



Şekil 43. Tek aktif desen üzerinde hücrenin en dışında bulunan aktin bandı örtüşme düzeyi.

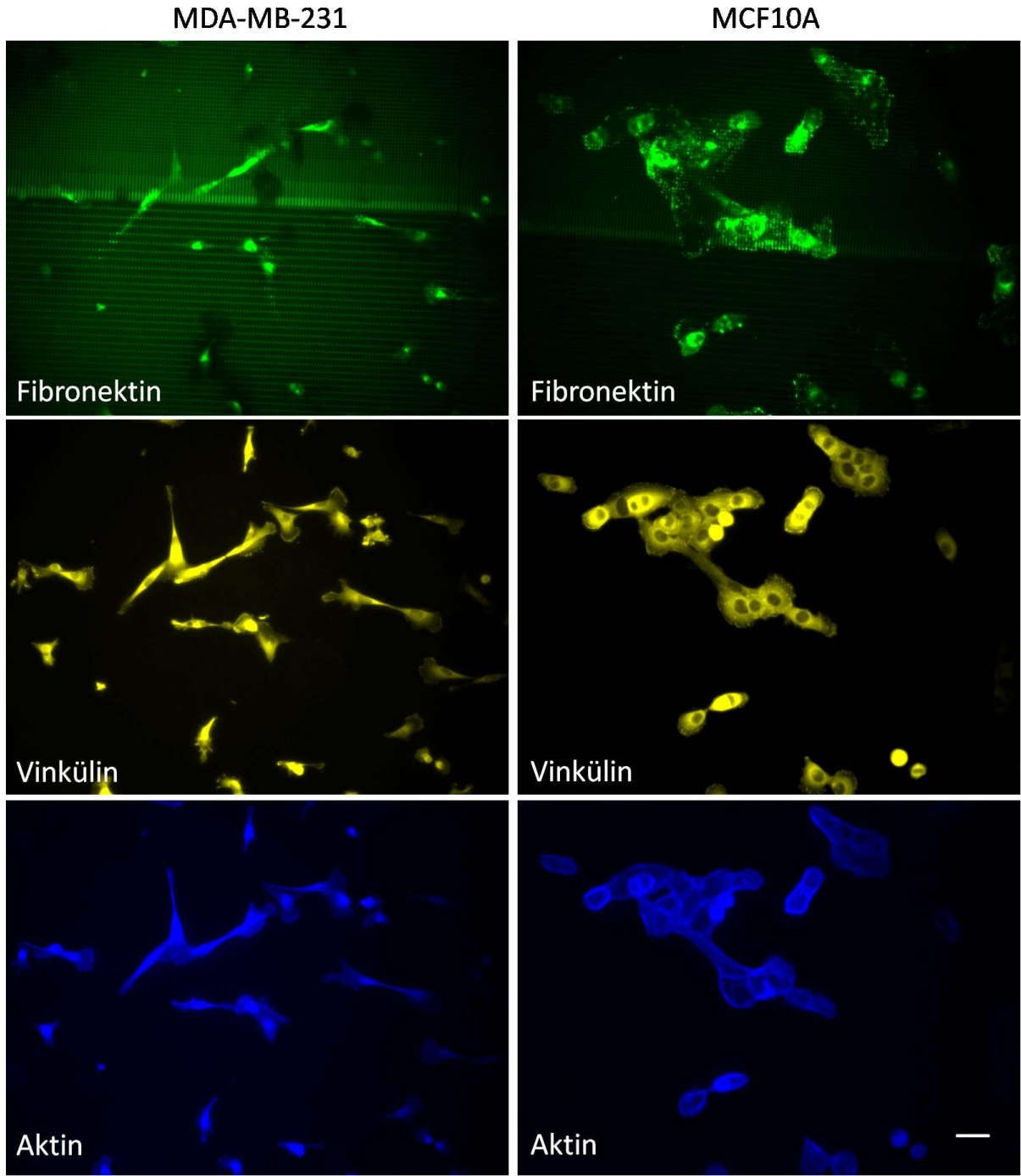
Grafikte görüldüğü gibi K-kazein üzerinde MCF10A aktin bandı diğer yüzeylere göre istatistiksel olarak farklıdır. Hücre ortasında sadece fibronektin kontrolde farklı olan iki hücre hattı çepere bakıldığında 2 mikrometre desende ve K-kazein yüzeyde birbirinden farklıdır. MCF10A hücre hattı K-kazein yüzeyi dışındaki yüzeylerde uyumlu bir tutum sergilerken, MDA-MB-231 hücre hattı fibronektin kontrol yüzeyi ve 2 mikrometrede istatistiksel olarak farklıdır. Ayrıca MDA-MB-231 hücre hattı 2 mikrometre ve K-kazein yüzeylerinde de istatistiksel olarak farklıdır. Hücrelerin fibronektin yüzeyinde düşük örtüşme düzeyi göstermesinin sebebi sadece dış banda bakılmasıdır. Fibronektin kontrol yüzeylerde her iki hücre hattı hücre boyunca ortalama bir aktin dağılımı göstermektedir.



Şekil 44. Tek aktif desen üzerinde hücrenin en dışında bulunan aktin/tüm aktin yoğunlaşması.

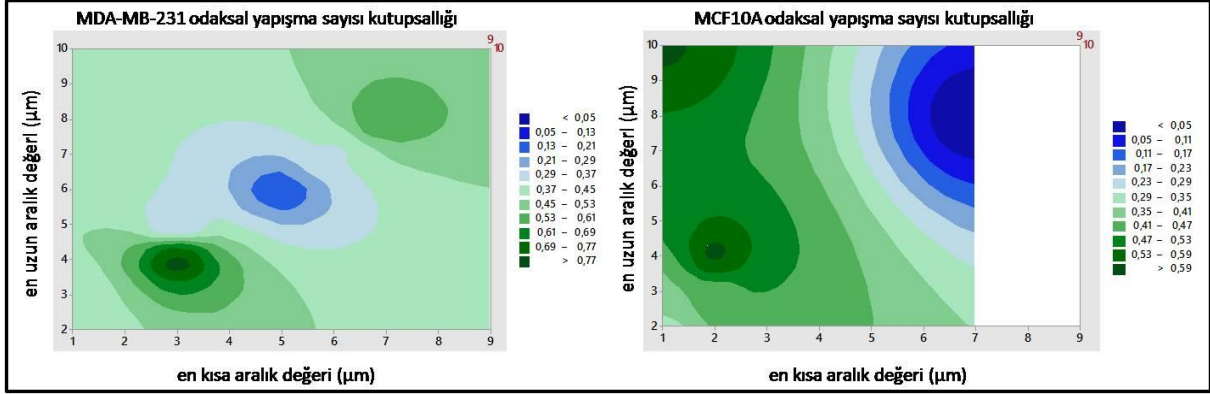
Hücrelerin çeperinde oluşan aktin bandını sayısal değerlere aktarmak ve farkı göstermek amacıyla, en dış aktin bandı (30 pixel) ile tüm hücrenin aktin yoğunlaşması oranlandı. Sonuçlar niteliksel olarak belirtilen veriyi niceliksel olarak gösterdi. Tüm yüzeylerde MCF10A hücre hattı MDA-MB-231 hücre hattından istatistiksel olarak farklıdır. Fibronectin yüzeyinde MDA-MB-231 hücrelerinin aktin iskeleti tekdüze iken, diğer yüzeylerde çeperde yoğunudur ve aktin bandını oluşturmuştur. MCF10A hücre hattı ise MDA-MB-231 hücre hattına göre çeperde daha çok fibrilleşmeye yönelmiş ve kalın bir aktin bandı oluşturmamıştır.





Şekil 45. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradient fotoğrafları.

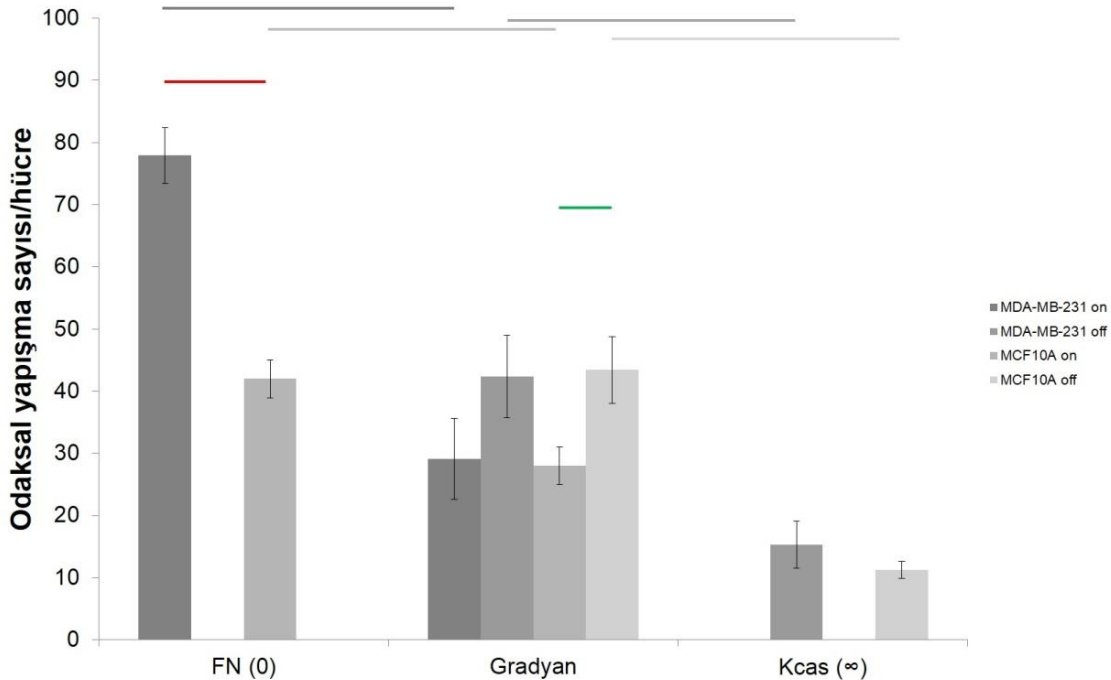
MDA-MB-231 hücreleri genelde tek, desene göre çapraz ilerlerken, MCF10A hücreleri birkaç hücrenin biraraya gelmesiyle desenlere yapıştılar. Desenin dolayısıyla Fibronektin proteininin sık olduğu yerlerde daha fazla hücre olduğu görüldü.



Şekil 46. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapılaşma sayısı kutupsallığı grafikleri.

İzohips gösterimde 0,5 değeri kutupsallık olmadığını, 0,5 – 1,0 arası değerler gradyan yönünde kutupsallığı, 0,0 – 0,5 arası değerler gradyan tersi yönünde kutupsallığı göstermektedir.

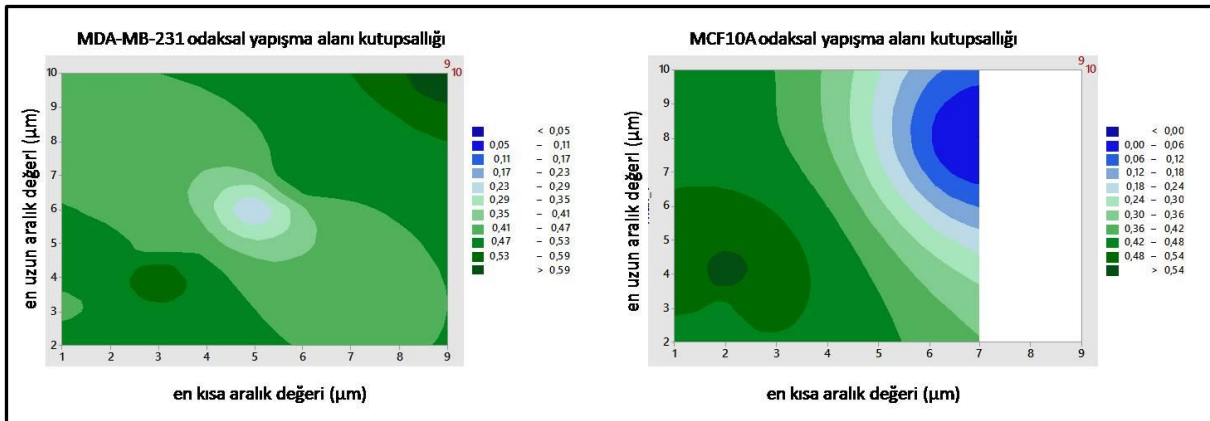
Şekil 46 incelendiğinde MDA-MB-231 hücrelerinin odaksal yapılaşma sayısı bakımından gradyan uzun aralık 4 µm - kısa aralık 3 µm yüzey üzerinde yüksek kutupsallığa ulaştığını ve diğer gradyan bölgelerinde geniş eş yükselti alanlarıyla yüksek eküdistanslı bir dağılım gösterdikleri görülmektedir. MCF10A hücrelerinin odaksal yapılaşma sayılarının kutupsallığını gösteren izohips harita grafiğinde görülen daha düşük eküdistans değeri bu hücrelerin kutupsallık dağılımlarının yüzeye çok daha fazla ilişkili olduğunu göstermektedir. MCF10A hücreleri dar aralıklı gradyan bölgelerinde gradyan yönünde kutupsallık gösterirken geniş aralıklı gradyan bölgelerinde gradyan yönünün tersine güçlü kutupsallık göstermiştir.



Şekil 47. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma sayısı dağılımı.

MDA-MB-231 on kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MDA-MB-231 off kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MCF10A on normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MCF10A off normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma sayısını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

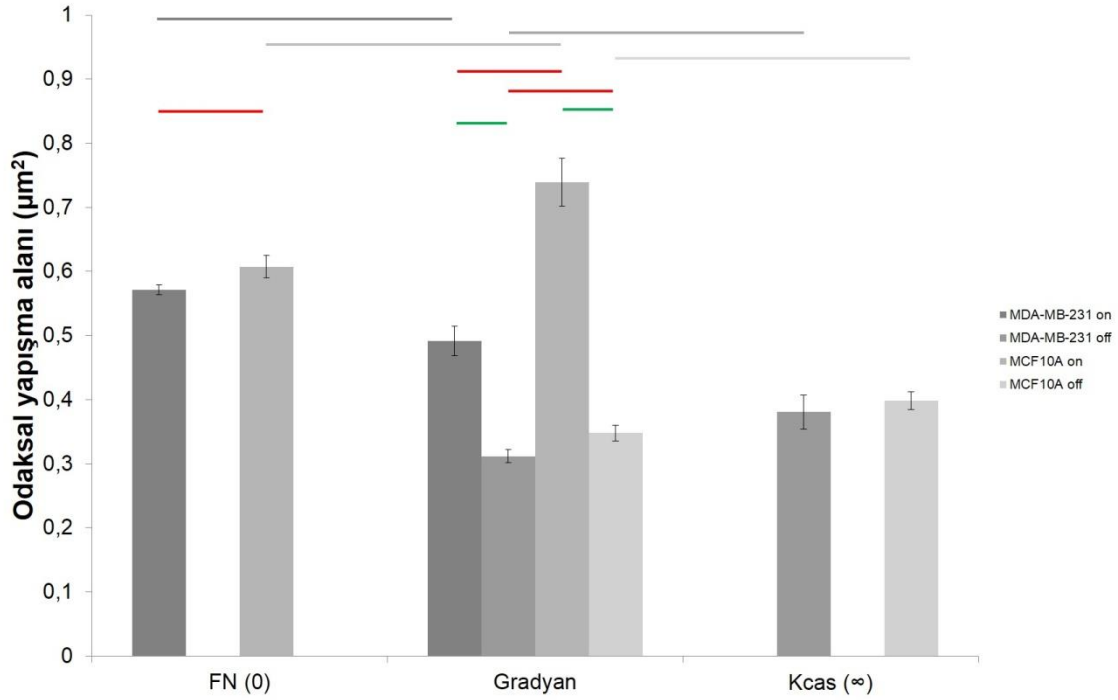
Şekil 47 her iki hücre tipi için de tüm gradyan gruplarının odaksal yapışma sayılarının fibronektin nanodesen noktalar üzerinde olup olmama durumuna göre değerlendirilmesidir. Sonuç olarak her iki hücre tipi de gradyan üzerinde fibronektin kontrol yüzeye kıyasla daha az ve kazein kontrol yüzeye kıyasla daha fazla odaksal yapışma sayısına sahiptir.



Şekil 48. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma alanı kutupsallığı grafikleri.

İzohips gösterimde 0,5 değeri kutupsallık olmadığını, 0,5 – 1,0 arası değerler gradyan yönünde kutupsallığı, 0,0 – 0,5 arası değerler gradyan tersi yönünde kutupsallığı göstermektedir.

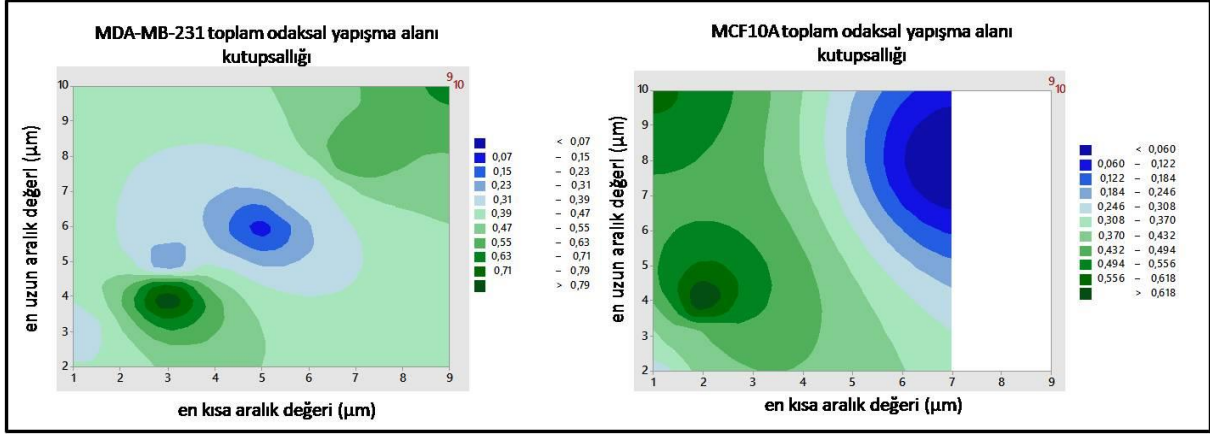
Şekil 48 incelendiğinde MDA-MB-231 hücrelerinin ve MCF10A hücrelerinin odaksal yapışma alanı kutupsallığınının eşit eküdistansta dağıldığını ve MCF10A hücrelerinin kutupsallık yönünün, yine, gradyan aralık durumuna göre değiştiği gözlemlendi. Dar aralıklı gradyan bölgelerinde gradyan yönünde kutupsallaşan MCF10A hücreleri geniş aralıklı gradyan bölgelerinde gradyan yönünün tersine kutupsallık göstermektedirler. MDA-MB-231 hücrelerinin ise genel olarak gradyan yönünde kutupsallığa sahip olduğu görüldü.



Şekil 49. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma alanlarının dağılımı.

MDA-MB-231 on kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanını, MDA-MB-231 off kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanını, MCF10A on normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanını, MCF10A off normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

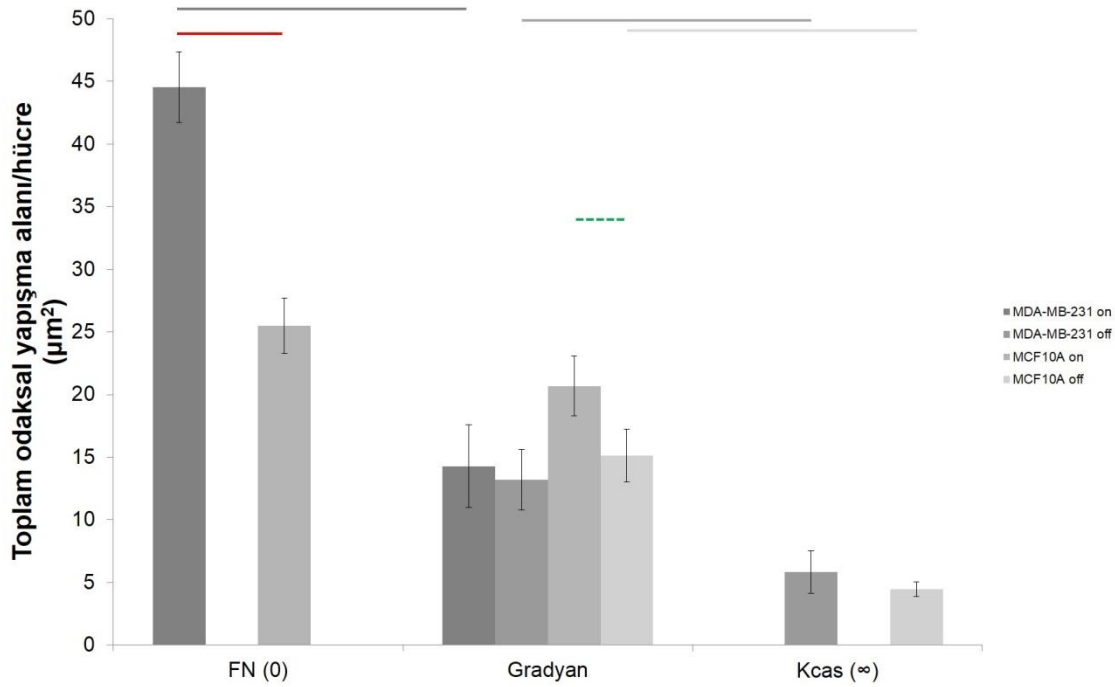
Odaksal yapışma alan dağılımlarını gösteren grafiğe bakıldığında gradyan üzerinde her iki hücrenin de on-off durumuna bağlı odaksal yapışma alanlarının istatistiksel olarak kendi içlerinde ve aralarında farklılık gösterdiğini görüyoruz. Tek aktif çalışmalarında kullanılan diğer desen aralıklarında da; 2,4 ve 8  $\mu\text{m}$ ; aynı durum gözlenmektedir.



Şekil 50. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde toplam odaksal yapışma alanı kutupsallığı grafikleri.

İzohips gösterimde 0,5 değeri kutupsallık olmadığını, 0,5 – 1,0 arası değerler gradyan yönünde kutupsallığı, 0,0 – 0,5 arası değerler gradyan tersi yönünde kutupsallığı göstermektedir.

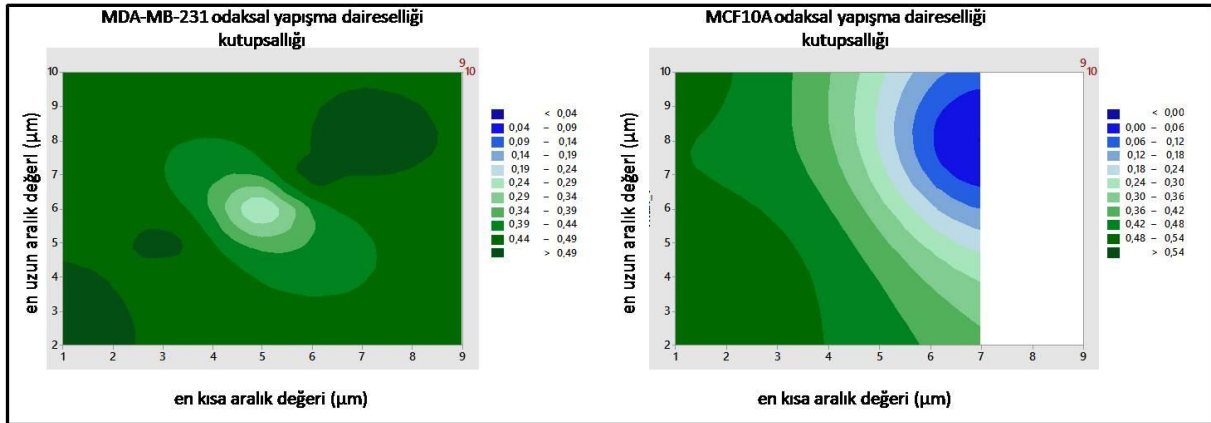
Toplam odaksal yapışma alanı kutupsallığını gösteren izohips harita grafiklerine bakıldığında her iki hücre tipinin odaksal yapışma sayısı ve odaksal yapışma alanına benzer bir eğimin belirdiği görülmektedir. İlaveten MDA-MB-231 hücrelerinin orta aralıklı gradyan bölgelerinde kutupsallığının belirginleşmesi göze çarparken, MCF10A hücreleri yine dar aralıklı gradyan bölgelerinde gradyan yönünde ve geniş aralıklı gradyan bölgelerinde gradyan yönünün tersine kutupsallık göstermektedir.



Şekil 51. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde toplam odaksal yapışma alanlarının hücre başına düşen dağılımı.

MDA-MB-231 on kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanını, MDA-MB-231 off kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanını, MCF10A on normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanını, MCF10A off normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

Hücre başına düşen odaksal yapışma alan toplamının farklı yüzeylerde dağılımı grafiğinde kanser ve normal epitel hücrelerinin gradyan üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanlarının toplamının fibronektin kontrol yüzeylerden az ve kazein kontrol yüzeylerden fazla olduğu görüldü.

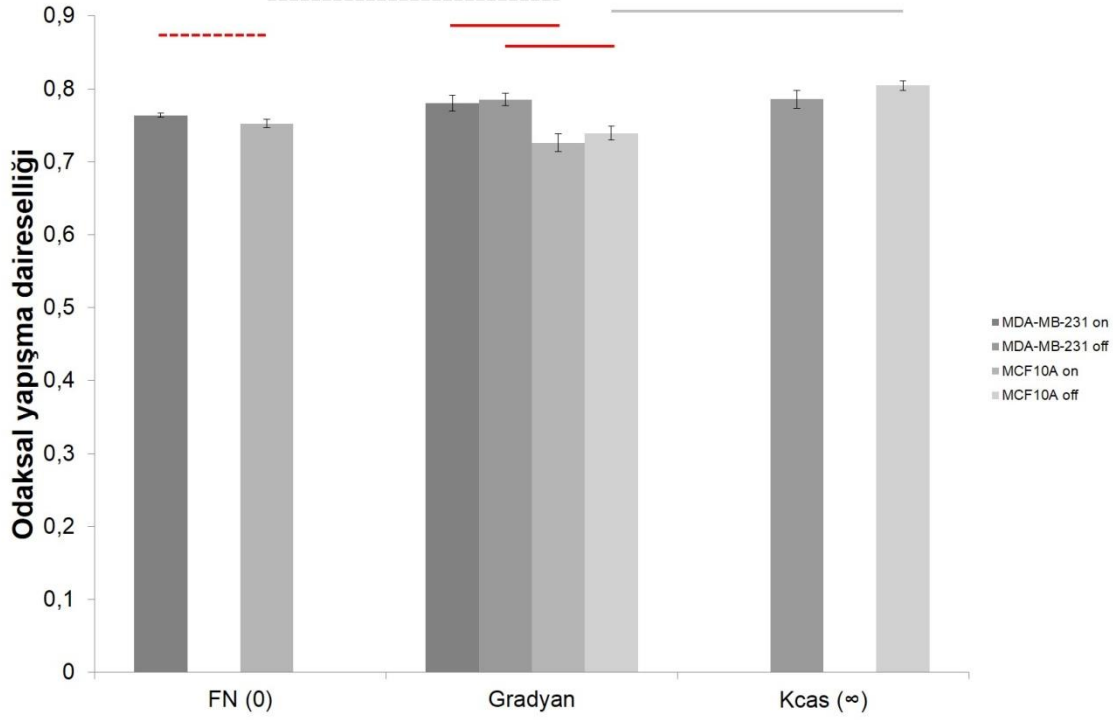


Şekil 52. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma daireselliği kutupsallığı grafikleri.

İzohips gösterimde 0,5 değeri kutupsallık olmadığını, 0,5 – 1,0 arası değerler gradyan yönünde kutupsallığı, 0,0 – 0,5 arası değerler gradyan tersi yönünde kutupsallığı göstermektedir.

Odaksal yapışma daireselliği kutupsallıklarını gösteren izohips harita grafiklerine baktığımızda her iki hücre tipinin de gradyan yönünde kutupsallık gösterdiği yani desen aralığının daha sık olduğu gradyan yönünde bulunan odaksal yapışmaların daha çizgisel olduğu görüldü. MCF10A hücrelerinin kutupsallığının MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla daha yüksek değerlerde dağılımlara da sahip olduğu ve MDA-MB-231 hücrelerinin orta aralıklı gradyan bölgelerinde en yüksek kutupsallık değerlerine sahip olduğu görüldü.



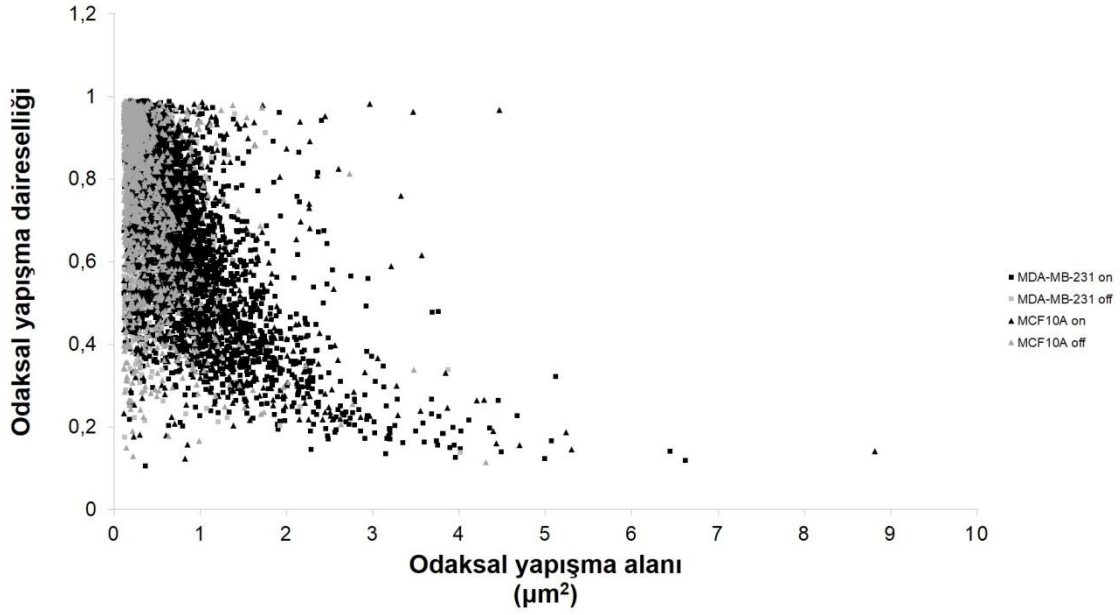


Şekil 53. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma daireselliklerinin dağılımı.

MDA-MB-231 on kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanını, MDA-MB-231 off kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanını, MCF10A on normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanını, MCF10A off normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

Odaksal yapışma daireselliklerinin gradyan yüzeyler üzerindeki durumu incelendiğinde her iki hücre tipinin on-off vaziyetlerindeki odaksal yapışma daireselliklerinin kendi içlerinde farklılık göstermediği ancak iki hücre tipi kıyaslandığında MCF10A hücrelerinin yaptığı yapışmaların MDA-MB-231 hücrelerinin odaksal yapışmalarına kıyasla daha çizgisel olduğu görülmektedir.

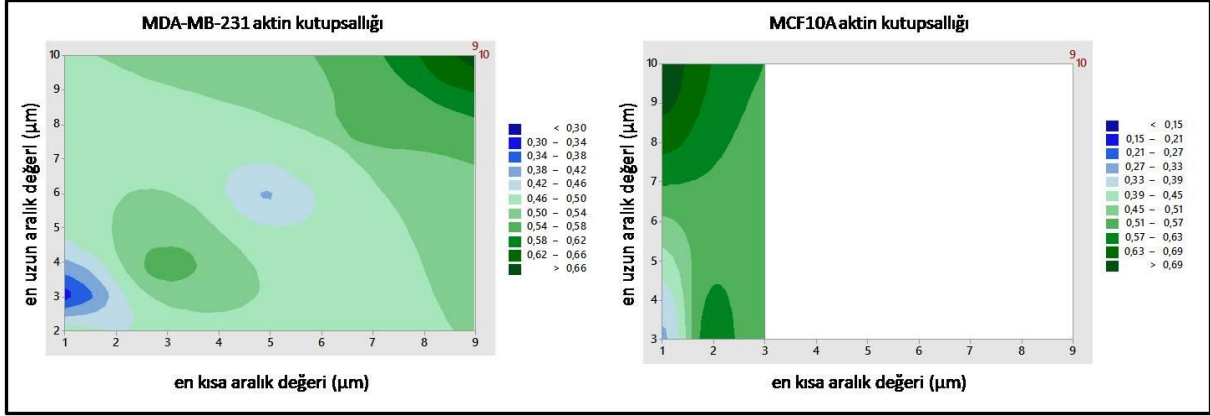




Şekil 54. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma daireselliklerinin odaksal yapışma alanına bağlı dağılımı

MDA-MB-231 on kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini, MDA-MB-231 off kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini, MCF10A on normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini, MCF10A off normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini göstermektedir.

Odaksal yapışma alanlarının odaksal yapışma daireselliğine bağlı dağılımını gösteren grafikte hücrelerin odaksal yapışma alanlarının artmasıyla odaksal yapışmaların dairesellikten çıkıp doğrusallaştığı gözlemlendi. Tek aktif desen çalışmalarında kullanılan diğer aralıklara (2, 4 ve 8  $\mu\text{m}$ ) kıyasla gradyan üzerinde alan-dairesellik eşleşmelerinin daha fazla saçılmış gözüküyor olmasının gradyan aralıklarının 1  $\mu\text{m}$ 'den 10  $\mu\text{m}$ 'ye kadar değişiyor olmasına bağlı olduğu düşünüldü.



Şekil 55. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde aktin kutupsallığı.

İzohips gösterimde 0,5 değeri kutupsallık olmadığını, 0,5 – 1,0 arası değerler gradyan yönünde kutupsallığı, 0,0 – 0,5 arası değerler gradyan tersi yönünde kutupsallığı göstermektedir.

Gradyan yüzey üzerinde aktin kutupsallıkları incelendiğinde MDA-MB-231 hücrelerinin dar aralıklı gradyan bölgelerinde gradyan yönünün tersine aktin kutupsallığı gösterdiği ve aynı dar aralıklı gradyan bölgelerinde MCF10A hücrelerinin aktin bakımından kutupsallık gösterme eğiliminde olmadığını farkediliyor.

### 3.3 MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin Laminin üzerine Fibronektin (Çift aktif) desenlenmesinden elde edilen sonuçları

#### 3.3.1 Çift aktif desenleme

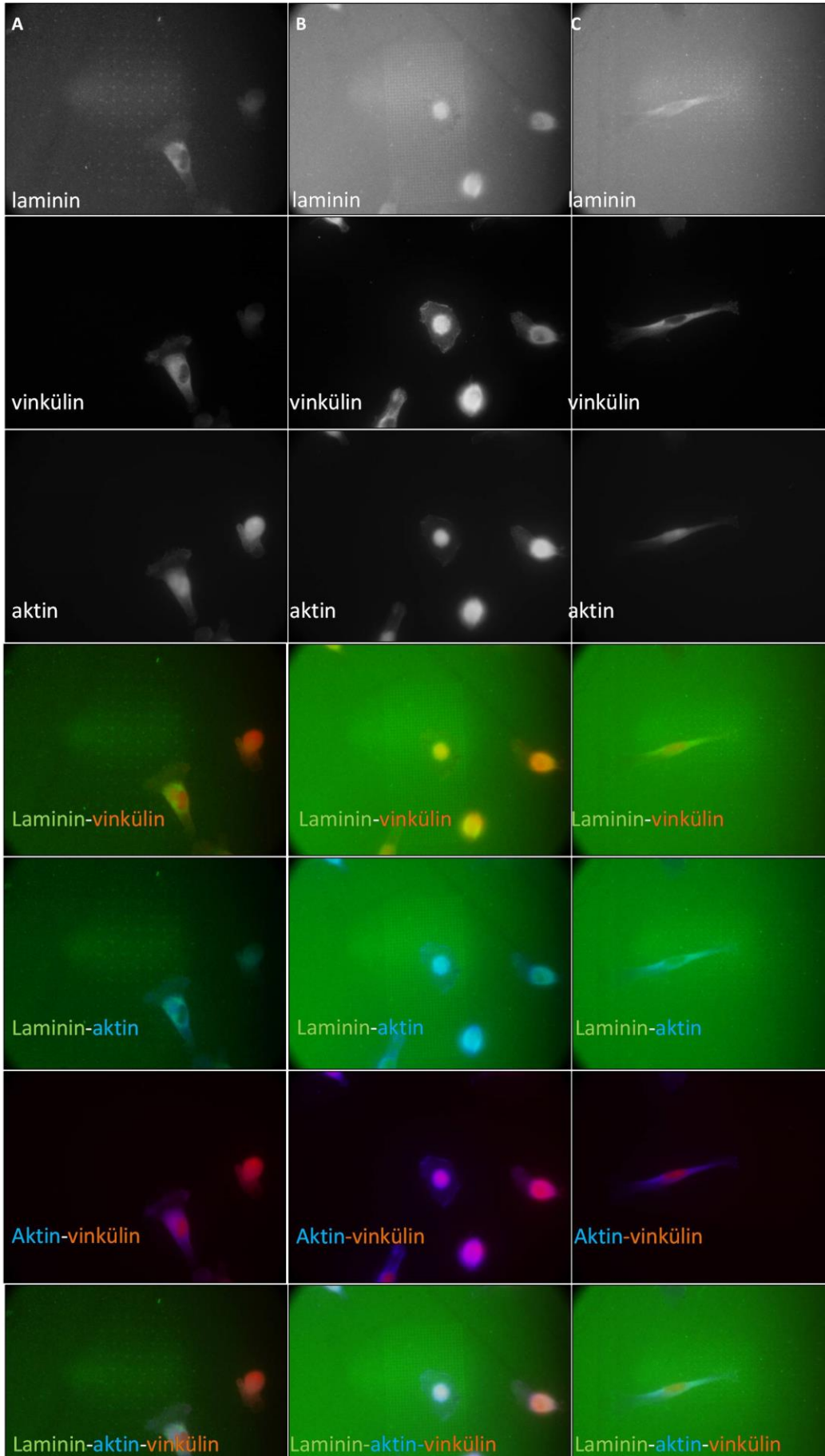
Çift aktif desenleme denemelerinde kaplama proteini Fibronektin olacak, EDL den sonraki protein Laminin olacak şekilde ve de kaplama proteini Laminin olacak EDL den sonraki protein Fibronektin olacak şekilde denendi.

##### 3.3.1.1 İTO yüzey üzerinde Fibronektin kaplama

Fibronektin(F2006 Sigma) kaplama: Petri kabın alt yüzeyi parafilm ile kaplanmıştır. Fibronektin alikotları (1 mg/ml olacak şekilde) kullanılmadan yaklaşık yarım saat önce -80°C'den +4°C'ye çıkarılmıştır. Alikot 1X UB ile 1 ml'ye tamamlanmıştır ve pipetleme yapmadan parafilm üzerine bırakılmıştır. İTO-cam kaplanmış yüzeyi protein solüsyonuna degecek şekilde 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. 2 saat sonra İTO-cam 3 kez 1X UB ile ardından 3 kez ultra saf su ile çalkalanıp, hava nitrojenle kurutulmuştur. Daha sonra kullanılmak üzere vakum altında saklanmıştır. Yaklaşık 2 hafta içinde kullanılmıştır.

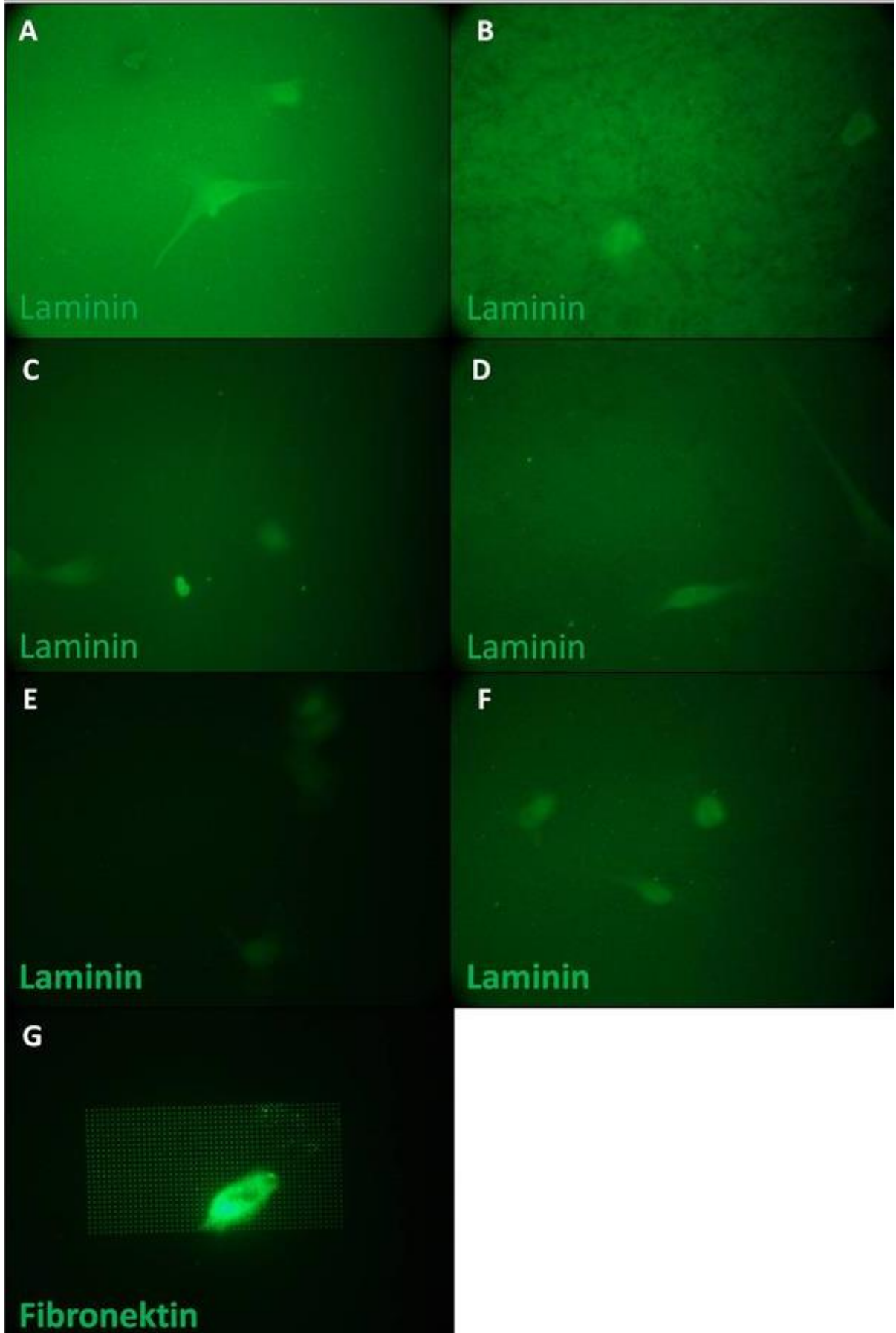
### 3.3.1.2 İTO yüzey üzerinde Fibronektin kaplaması üzerine Laminin kaplama

Laminin (L2020-Sigma):kaplama Petri kabın alt yüzeyi parafilm ile kaplanmıştır. Laminin alikotları (1 mg/ml olacak şekilde) kullanılmadan yaklaşık yarım saat önce -20°C'den +4°C'ye çıkarılmıştır. Alikot 1X UB ile 1 ml'ye tamamlanmıştır ve pipetleme yapmadan parafilm üzerine bırakılmıştır. İTO-cam kaplanmış yüzeyi protein solüsyonuna değecek şekilde 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. 2 saat sonra İTO-cam 3 kez 1X UB ile ardından 3 kez ultra saf su ile çalkalanıp, hava nitrojenle kurutulmuştur. Daha sonra kullanılmak üzere vakum altında saklanmıştır. Bir hafta içinde kullanılmıştır.



Şekil 56. Çift aktif desen oluşturma denemeleri-Laminin kaplamada arka plandan kurtulma.

İTO kaplı cam yüzey üzerine Fibronektin proteini kaplandıktan sonra nano desenler elde etmek üzere EBL uygulaması yapıldı, ve aktifleşen protein bölgelerini kaplamak amacıyla Laminin ile protein kaplama yapıldı. Laminin kaplamaları %0,05 olarak yapıldı. A sütununda gösterilen örnekte Laminin kaplama basamağından sonra bir işlem geçirmeden kullanıldı. B sütununda gösterilen örnekte kaplamadan sonraki yıkamalarda 10 saniye sonikasyon uygulanırken C sütununda 30 saniye sonikasyon uygulandı. MDA-MB-231 hücreleri tek aktif bileşenli desenlerde olduğu gibi deneyde kullanıldı ve 18 saat inkübasyondan sonra hücreler çip üzerinde sabitlendi. Bundan sonra; Laminin, Laminini tanıyan birincil antikor ve birincil antikor tanıyan ikincil florasan antikorla, vinkülin proteini vinkülini tanıyan birincil antikor ve birincil antikor tanıyan ikincil florasan antikorla, aktin proteini direk olarak aktine bağlanan falloidin antikoruyla boyandı ve örnek florasan mikroskop altında incelendi. Her üç örnekte de Laminin proteininden kaynaklı bir arka plan olduğu görüldü. Tüm fotoğraflar hiçbir işleme tabi tutulmadan (*raw data*) gösterilmektedir.



Şekil 57. Çift aktif desen oluşturma denemeleri-Laminin konsantrasyonu.

İTO kaplı cam yüzey üzerine Fibronektin proteini kaplandıktan sonra nano desenler elde etmek üzere EBL uygulaması yapıldı, ve aktifleşen protein bölgelerini kaplamak amacıyla Laminin ile kaplama yapıldı. Laminin kaplamalar sırasıyla %0,05(A), %0,025 (B), %0,0125(C), %0,025(D), %0,05 Laminin kaplama sonrası evrensel tampon çözeltisi içinde 60 saniye sonikasyon(E), %0,05 sonikasyon evrensel tampon çözeltisi içinde 60 saniye ek olarak saf su içinde 60 saniye sonikasyon (F) uygulandı. MDA-MB-231 hücreleri tek aktif bileşenli desenlerde olduğu gibi deneyde kullanıldı ve 18 saat inkübasyondan sonra hücreler çip üzerinde sabitlendi. Bundan sonra; Laminin, Laminini tanıyan birincil antikor ve birincil antikorunu tanıyan ikincil florasan antikorla, vinkülin proteini vinkülini tanıyan birincil antikor ve birincil antikorunu tanıyan ikincil florasan antikorla, aktin proteini direk olarak aktine bağlanan falloidin antikoruyla boyandı ve örnek florasan mikroskop altında incelendi. A, B, C, D, F fotoğraflarında görüldüğü gibi Laminin kaplaması tam olarak gerçekleşmemiştir. E’de görülen kaplama diğerlerine göre daha istenene daha yakındır. Bu örneklerde Laminin kaplamasının her bölgede aynı olmadığı bazı bölgelerde Laminin proteininin daha yoğun olduğu görüldü. Laminin kaplamasında istenen görüntü K-kazein üzerine Fibronektin kaplamasında görüldüğü gibi(G) arka planın siyah, sadece nanonoktaların ikincil antikor renginde olması beklenmektedir. Tüm fotoğraflar hiçbir işleme tabi tutulmadan (*raw data*) gösterilmektedir.

İTO kaplı camların fibronektin proteiniyle kaplanıp EDL aşamasının ardından oluşan desenlerin laminin proteiniyle kaplanması çift aktif çalışmalarında kullanılacak yüzeylerin hazırlanmasına olanak sağlamamıştır. Laminin proteininin desen kaplamasında kullanılması proteinin fiziksel özelliklerinin getirdiği, örneğin kolay iplikçiklenme, ve fibronektine kıyasla yaklaşık iki katı büyüklükte bir molekül olmasının da sonucu olarak işlevsel değildir. Sonuç olarak İTO yüzeyin laminin ile kaplanması ve EDL sonrası desenlerin fibronektin ile kaplanması uygun bulunmuştur.

### 3.3.1.2 İTO yüzey üzerinde Laminin kaplama

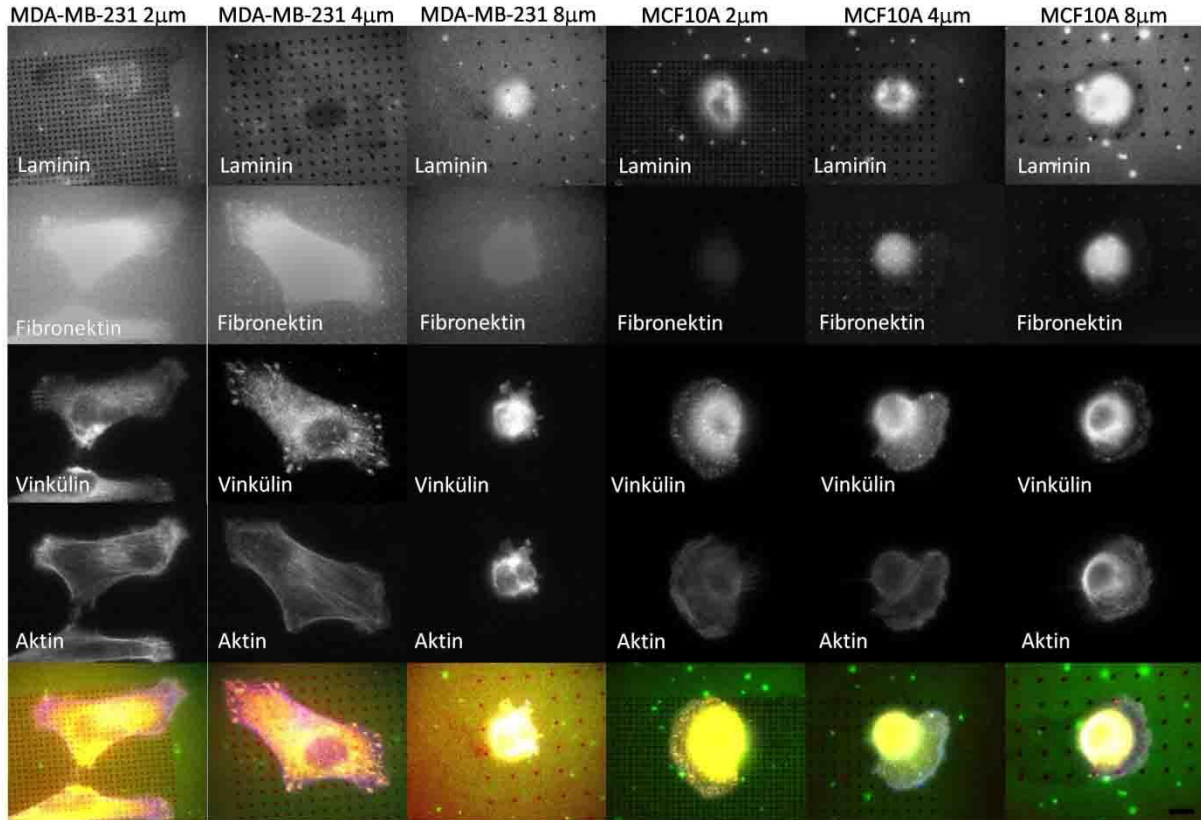
Laminin (L2020-Sigma) kaplama: Petri kabın alt yüzeyi parafilm ile kaplandı. Laminin alikotları (1 mg/ml olacak şekilde) kullanılmadan yaklaşık yarım saat önce -20°C’den +4°C’ye çıkarıldı. Alikot 1X UB ile 1 ml’ye tamamlanmıştır ve pipetleme yapmadan parafilm üzerine bırakıldı. İTO-cam kaplanmış yüzeyi protein solüsyonuna geçecek şekilde 2 saat inkübasyona bırakıldı. 2 saat sonra İTO-cam 3 kez 1X UB ile ardından 3 kez ultra saf su ile çalkalanıp, hava nitrojenle kurutuldu. Daha sonra kullanılmak üzere vakum altında saklandı. Bir hafta içinde kullanıldı.



### 3.3.1.3 İTO yüzey üzerinde Laminin kaplaması üzerine Fibronektin kaplama

Fibronektin(F2006 Sigma) kaplama: Petri kabın alt yüzeyi parafilm ile kaplandı. Fibronektin alikotları (1 mg/ml olacak şekilde) kullanılmadan yaklaşık yarım saat önce -80°C'den +4°C'ye çıkarıldı. Alikot 1X UB ile 1 ml ye tamamlandı ve pipetleme yapmadan parafilm üzerine bırakıldı. İTO-cam kaplanmış yüzeyi protein solüsyonuna değecek şekilde 2 saat inkübasyona bırakıldı. 2 saat sonra İTO-cam 3 kez 1X UB ile ardından 3 kez ultra saf su ile çalkalanıp, hava nitrojenle kurutuldu. Daha sonra kullanılmak üzere vakum altında saklandı. Yaklaşık 2 hafta içinde kullanıldı.

Fibronektin ve Laminin birincil antikorlar aynı organizmadan olduğu için Fibronektin proteini dylight boya ile etiketlendi, böylece bu proteine özgü immuno boyama zorunluluğu ortadan kalktı. Fibronektin proteini dylight 650 ve dylight 350 ile etiketlendi, dylight 350 Fibronektin proteininin daha kullanışlı olduğu belirlenmiş ve deneylere dylight 350 Fibronektin proteini ile devam edildi.

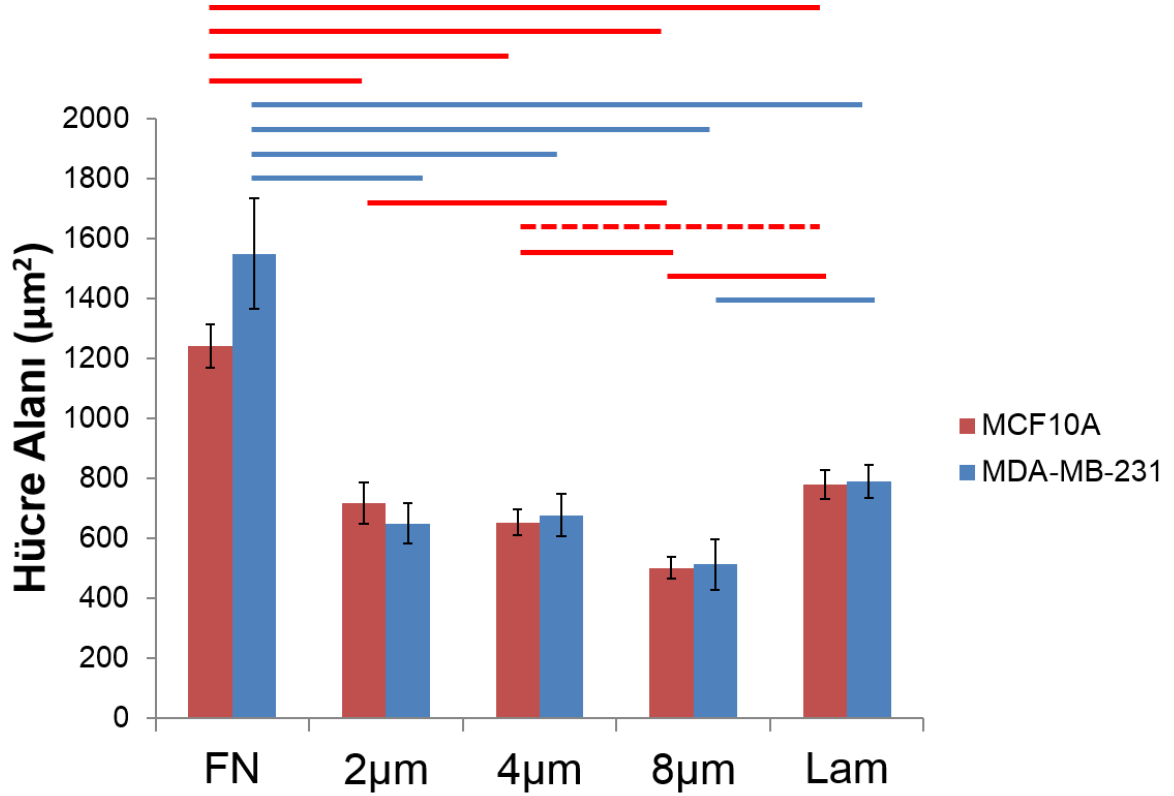


Şekil 58. MDA-MB-231 ve MCF10A hatlarına ait hücrelerin 2,4,8 mikrometre aralıklı çift aktif nanodesen üzerindeki fotoğraları.

Örnekler laminin kaplama EDL Fibronektin kaplama sırasıyla hazırlanmış olup, Laminin üzerine Fibronektin örnekleridir. Üstten alta sıralanacak olursa Laminin, Fibronektin, aktin ve

vinkülün fotoğrafları olup son sıra bu dört protein üstüste konulmuş halidir. Yeşil:Laminin, Kırmızı:Fibronektin, Sarı:Vinkülün, Mavi:Aktin. Son karede gösterilen ölçek çubuğu 8 mikrometreyi göstermektedir ve tüm fotoğraflar için geçerlidir.

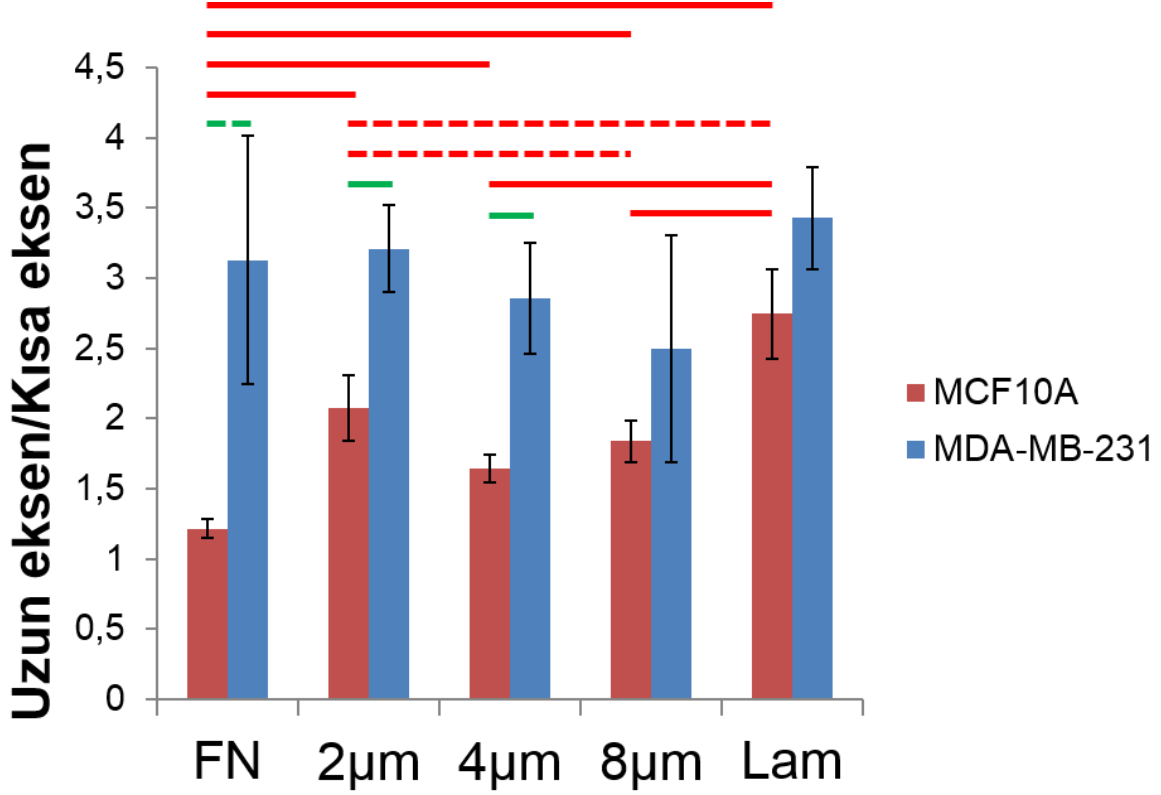
### 3.3.2 Çift aktif desende MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin hücre alanı ve uzun eksen/kısa eksen oranları karşılaştırılması



Şekil 59. Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre alanlarının dağılımları.

Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

Hücre alanının farklı yüzeylerde dağılımına bakıldığında hücrelerin Fibronektin yüzeylerde geniş alanlara yayıldıkları, MCF10A hücrelerinin desen aralığına bağlı olarak hücre alanlarının değiştiği, aralık arttıkça alan azaldığı, MDA-MB-231 hücrelerinin ise geniş ölçekte bakıldığında desen aralığından bağımsız olarak yüzeyde yayıldıkları görüldü. Her iki hücrede Fibronektin kontrol yüzeyde Laminin kontrol yüzeye göre anlamlı olarak daha fazla yayıldığı görüldü.



Şekil 60. Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre simetri oranlarının dağılımları.

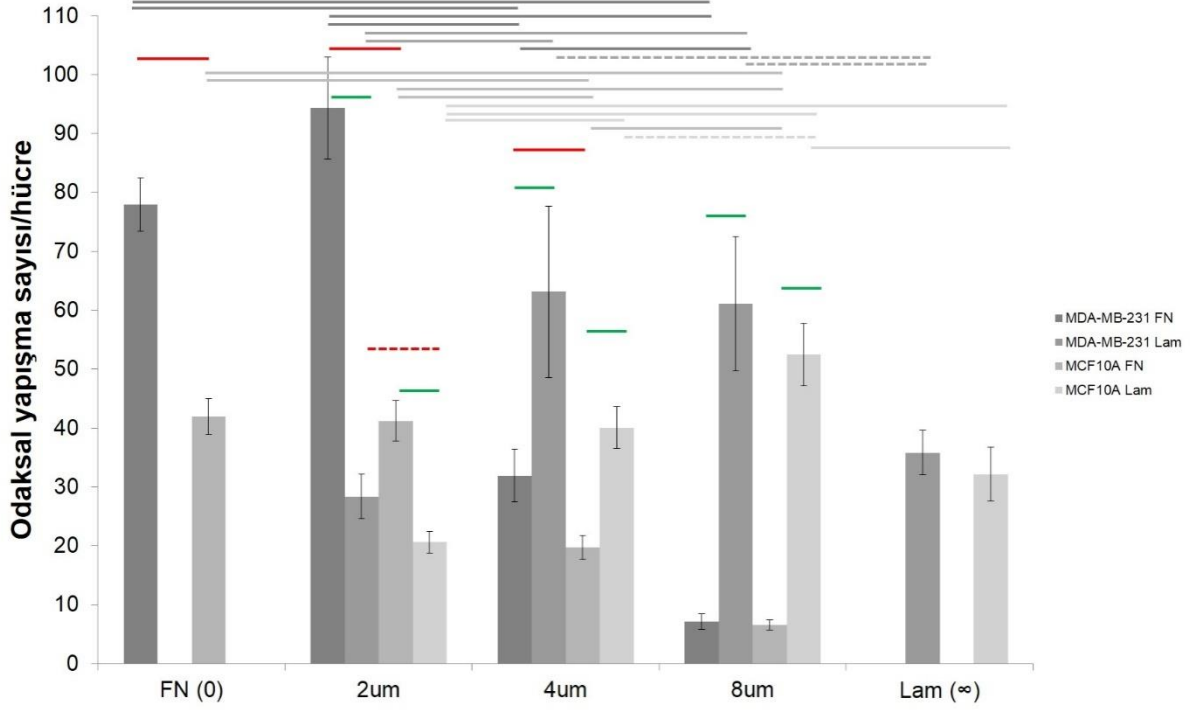
Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

Hücrelerin eksen oranlarının yüzeylerde dağılımında MCF10A hücrelerinin desen aralığının artmasına bağlı olarak bir ekseninde genişlemesi söz konusuysen, MDA-MB-231 hücreleri için eksen oranının yüzeye bağlı değişimi söz konusu değildir. Ayrıca iki hücre tipi eksen oranları bakımından sade fibronektin kaplı yüzey ile 2 mikrometre aralıklı ve 4 mikrometre aralıklı yüzeylerde farklılaşmaktadır.

### 3.3.3 Çift aktif desende MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin odaksal yapışmalarının karşılaştırılması

Laminin kaplı çip yüzeyleri üzerine 2, 4 ve 8 mikrometre aralıklı EDL desenlemesi sonrası yapılan fibronektin kaplaması ile çip yüzeyleri hücreler arası madde proteinlerinin kombinasyonu ile kaplanarak *in vivo* karaktere tek aktif çiplerine kıyasla çok daha yakın yüzeyler sağlandı. Farklı (fibronektin kontrol, K-kazein kontrol, laminin üzerinde fibronektin nanodesenli) yüzeylerde kültürlediğimiz hücre görüntülerinin analizi sonucunda odaksal

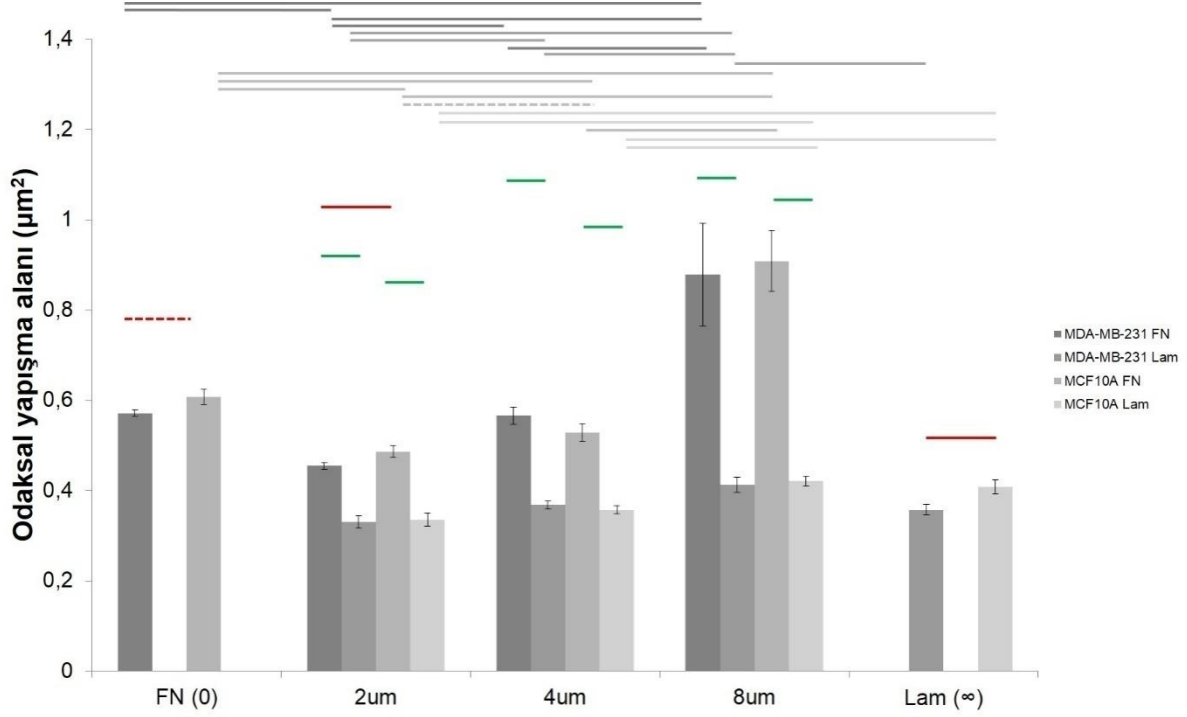
yapışmaların alanlarını, hücre başına düşen sayılarını, nanonokta üzerinde olup olmadıklarını incelendi. Her farklı yüzey için n= 19 -31 adet hücre incelendi.



Şekil 61. Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre başına düşen odaksal yapışma sayısının dağılımı.

MDA-MB-231 FN kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MDA-MB-231 Lam kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MCF10A FN normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MCF10A Lam normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma sayısını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

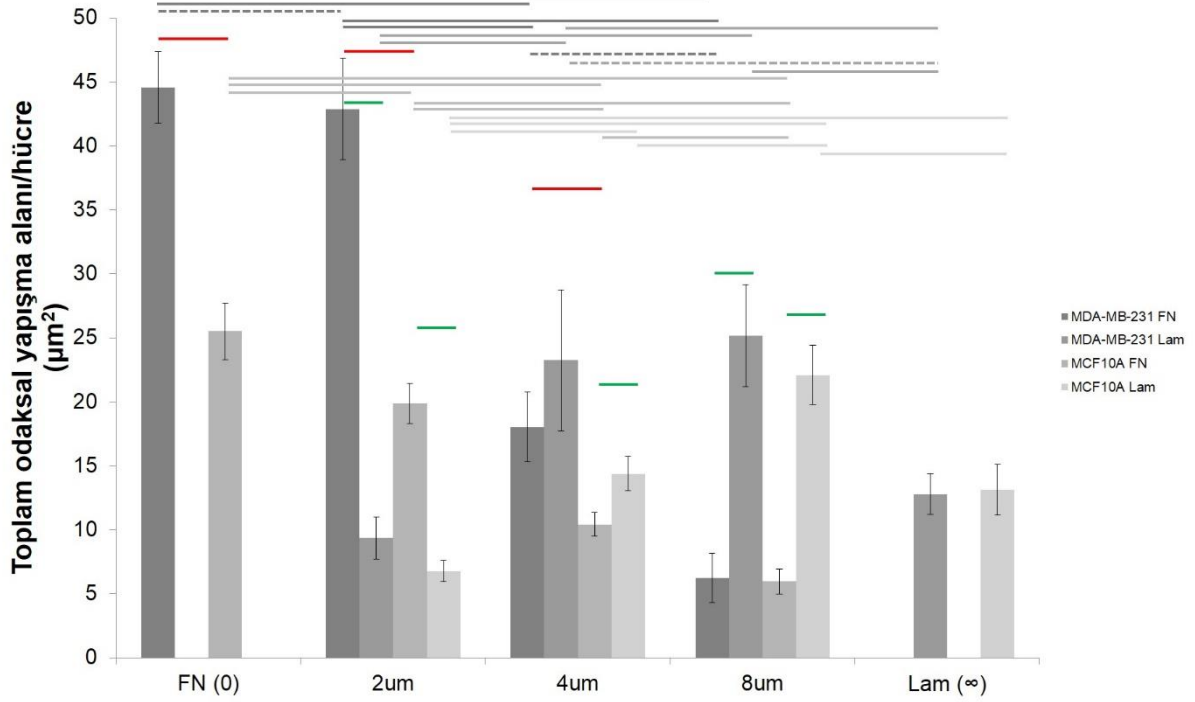
Hücre başına düşen odaksal yapışma sayılarını gösteren grafiğe bakıldığında odaksal yapışma sayısı her iki hücre tipi için de fibronektin nanonokta aralığı arttıkça azalmaktadır. Sade fibronektin kaplı yüzey ile 2 mikrometre aralıklı ve 4 mikrometre aralıklı fibronektin nanonoktalar içeren yüzeylerde fibronektine bağlı kurulan odaksal yapışma sayıları her iki hücre tipini farklılaştırmaktadır.



Şekil 62. Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde odaksal yapışma alanlarının dağılımı.

MDA-MB-231 FN kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanını, MDA-MB-231 Lam kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanını, MCF10A FN normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanını, MCF10A Lam normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

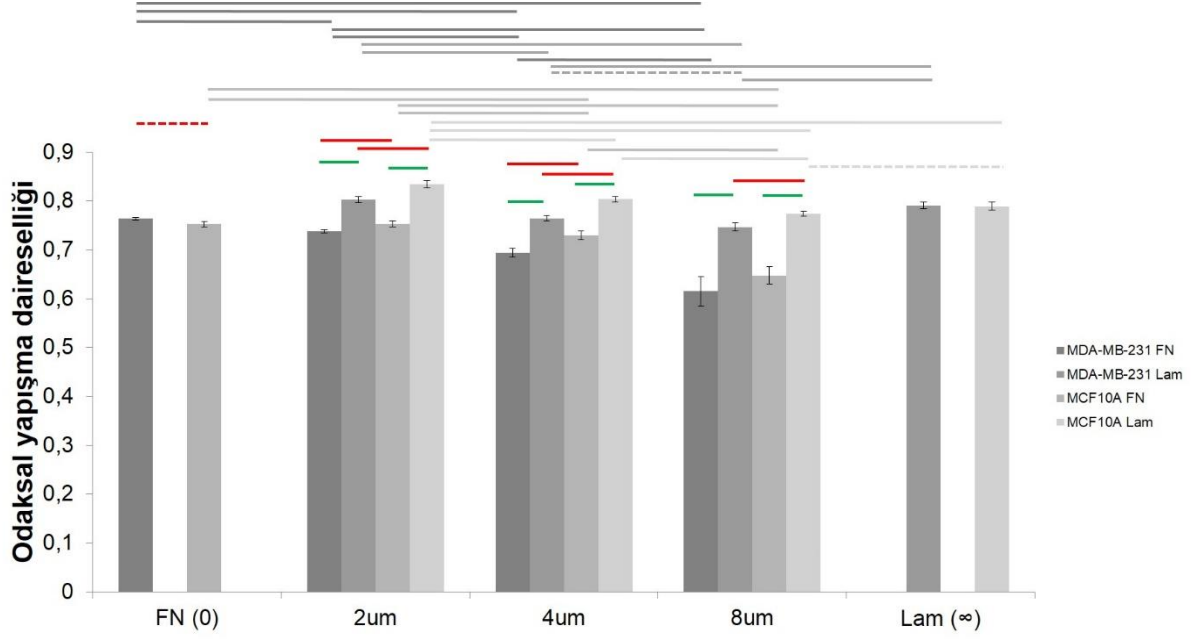
Şekil 62’de görüldüğü üzere fibronektin nanonokta aralığı arttıkça odaksal yapışma alanı artmaktadır. Hücreler homojen yüzeylerde yani sade laminin veya sade fibronektin kaplı yüzeylerde hücre tipine bağlı farklı odaksal yapışma alanlarına sahipken, desen içeren yüzeylerde fibronektin nanonoktalar arası uzaklık arttıkça odaksal yapışma alanlarını tek aktif desende de olduğu gibi arttırmaktadırlar. Hücrelerin yattıkları alanda bulunan fibronektin nanonokta sayısının azalmasıyla yani desen aralığının artmasıyla hücreler az sayıdaki fibronektin nanonoktalar üzerinde sağladıkları odaksal yapışmaları güçlendirmektedirler. Fakat çift aktif desende yapışma alan değeri tek aktif desene göre daha düşüktür. Her iki hücre hattında da FN odaksal yapışma alanı her aralıkta Lam değerlere göre anlamlı olarak farklıdır ve Lam olan odaksal yapışma alanı değerlerinde tüm desen aralıkları da yaklaşık aynı değerdedir.



Şekil 63. Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre başına düşen odaksal yapışma alan toplamının dağılımı.

MDA-MB-231 FN kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları toplam odaksal yapışma alanı, MDA-MB-231 Lam kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları toplam odaksal yapışma alanı, MCF10A FN normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanı, MCF10A Lam normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları toplam odaksal yapışma alanını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

Hücre başına düşen toplam odaksal yapışma alanı nanonokta aralığı arttıkça azalmaktadır. Yine hücre başına düşen odaksal yapışma sayısının dağılımındaki gibi sade fibronektin kaplı yüzey ile 2 mikrometre aralıklı ve 4 mikrometre aralıklı fibronektin nanonoktalar içeren yüzeylerde fibronektine bağlı kurulan odaksal yapışmaların toplam alanları her iki hücre tipini farklılaştırmaktadır.

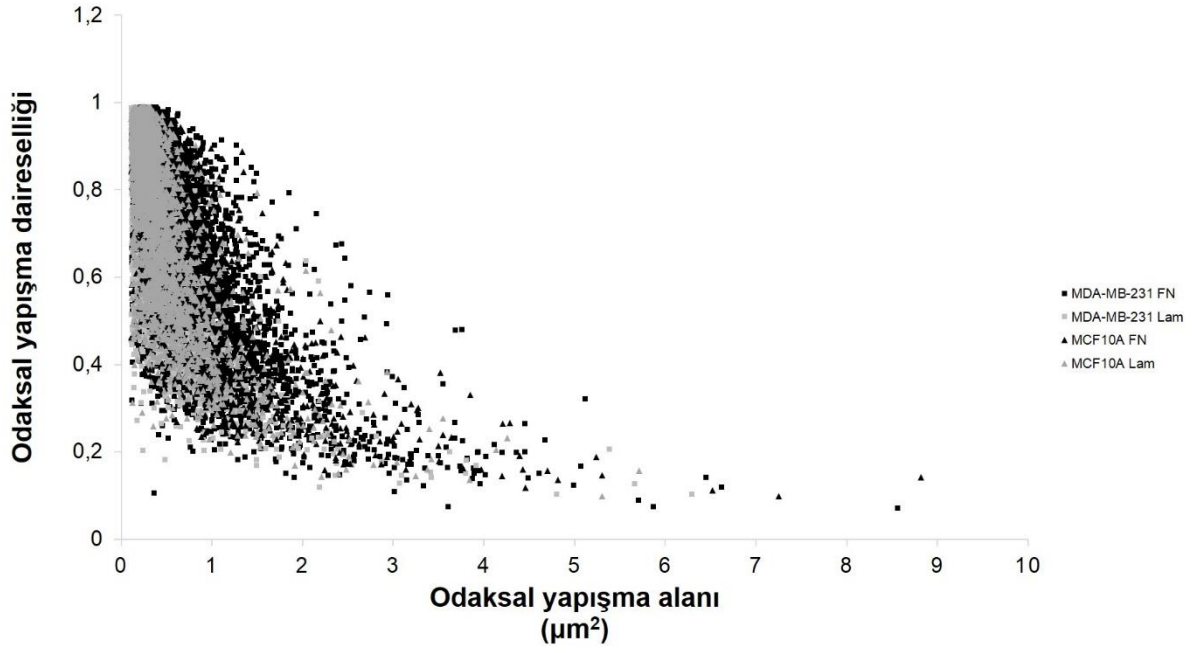


Şekil 64. Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde odaksal yapışma daireselliğinin dağılımı.

MDA-MB-231 FN kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma daireselliği, MDA-MB-231 Lam kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma daireselliği, MCF10A FN normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma daireselliği, MCF10A Lam normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma daireselliğini göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

Odaksal yapışma daireselliğinin yüzeylerdeki değişimlerine bakıldığında desen aralığının artmasıyla fibronektin nanonokta üzerinde oluşan odaksal yapışmaların dairesellikten uzaklaşıp çizgiselleştiğini görüyoruz. Bununla beraber her iki hücrenin odaksal yapışma daireselliğinin desenlerde farklılaştığını ve her iki hücrenin de nanokta üzerinde olan ve olmayan odaksal yapışmalarında farklı dairesellikler sergiledikleri de görülüyor. Fibronektin nanonoktalar üzerindeki odaksal yapışmalar olmayanlara kıyasla daha çizgiseldirler.



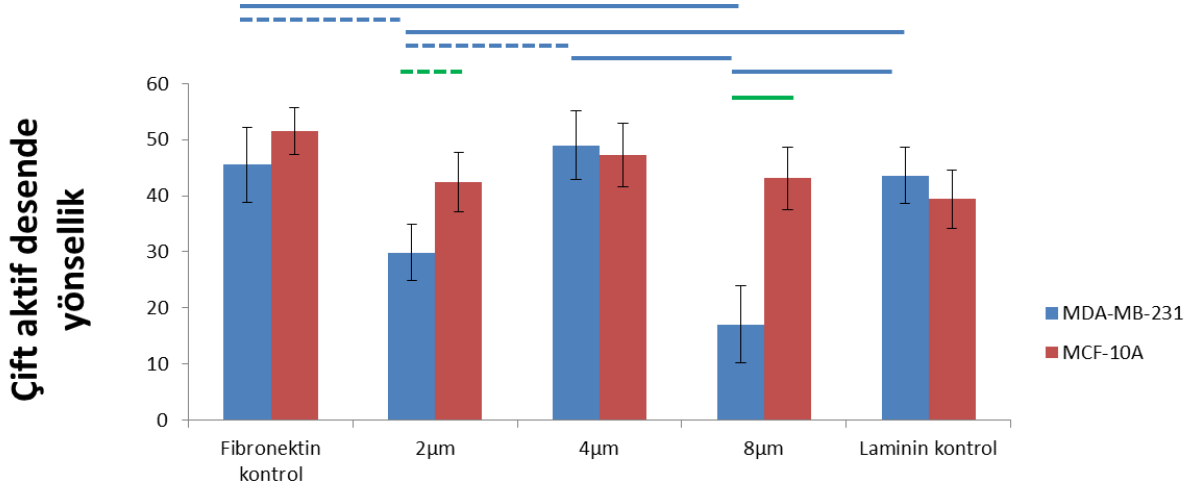


Şekil 65. Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde odaksal yapışma alanlarının odaksal yapışma daireselliğine bağlı dağılımı.

MDA-MB-231 FN kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini, MDA-MB-231 Lam kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini, MCF10A FN normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini, MCF10A Lam normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini göstermektedir.

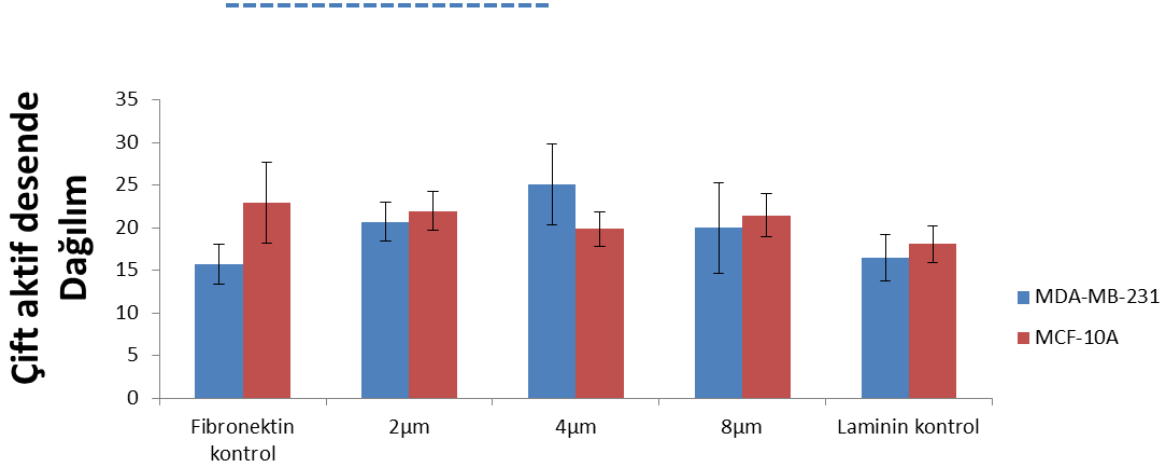
Odaksal yapışma alanlarının odaksal yapışma daireselliğine bağlı dağılımını gösteren grafikte hücrelerin odaksal yapışma alanlarının artmasıyla odaksal yapışmaların dairesellikten çıkıp doğrusallaştığı gözlemlendi.

### 3.3.4 Çift aktif desende MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin morfolojik karşılaştırması için aktin iskeleti analizi



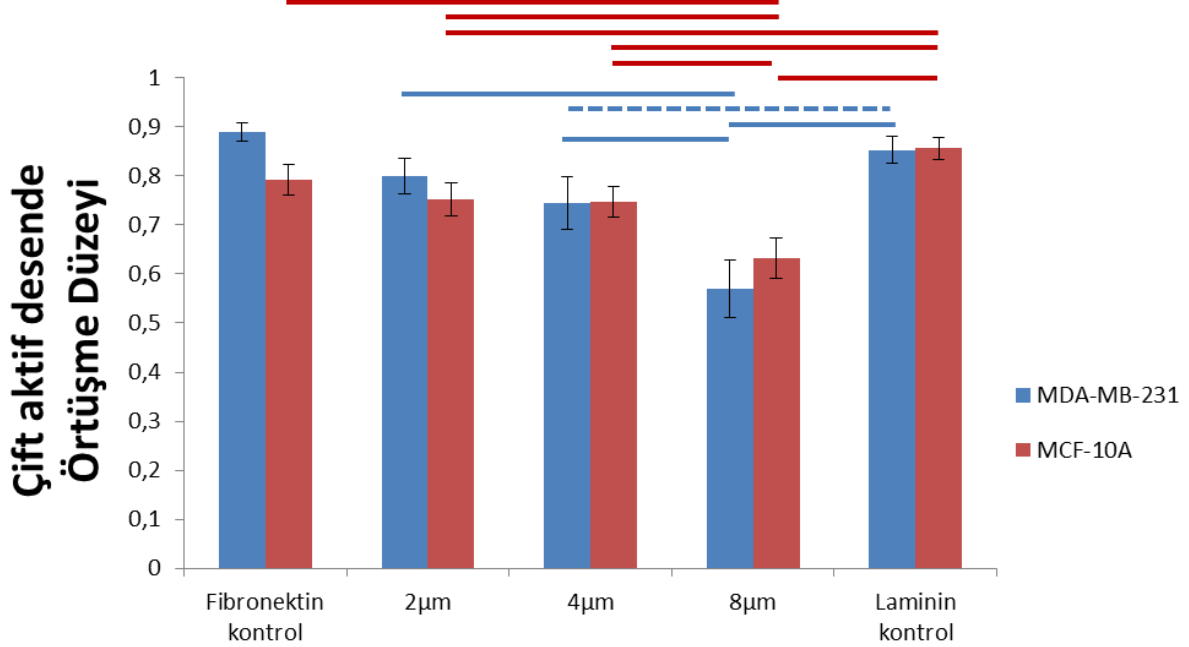
Şekil 66. Çift aktif desende MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin Fibronectin ve Laminin kontrol yüzeyleri ve nanonoktalar üzerinde açıları-Yönsellik grafiği.

MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin hücre içindeki aktin organizasyonlarına bakılmak üzere ImageJ programının versiyonu olan Fiji programında *Plugins* sekmesinde bulunan *Tubuness* ve *Analyze* sekmesinde bulunan *Directionality* seçeneğiyle hücre içindeki aktin analiz edildi. Kontrol yüzeylerde yönelim açısı 90 derece içinde yaklaşık 45 derece olduğu görülmüştür. 45 derece değeri hücrenin 0-90 derece içinde homojen açı değerlerine sahip olduğunu gösterir. İki mikrometre aralıkta, nano-nokta yoğunluğu yüksek olduğu için, hücre daha küçük açılarda aktin ağlar oluşturarak Fibronectin proteiniyle etkileşim oluşturabilirler. 4 mikrometrelik aralıklarda ise hücre kontrol yüzeylerde olduğu gibi yaklaşık 45 dereceli tercih etmiştir, çünkü hücre bu açığı kullanarak daha çok Fibronectin nano-noktasına ulaşabilir. 8 mikrometre aralıklı desende ise MDA-MB-231 hücreleri küçük açıları tercih etmiştir. Bunun nedeni hücre alanına düşen nano-noktanın azlığı olabilir. Hücre en yakın nanonoktaları aramış ve bulamamıştır, kendine yetecek minimum aktin yapısını oluşturmuştur. MCF10A hücrelerinin desen üzerinde kontrol yüzeylerinde olduğu gibi yaklaşık 45 derecelik açıyı sabit tutmuştur.



Şekil 67. Çift aktif desende aktin iskeletindeki iplikçiklerin kartezyen koordinatlarındaki açılarının dağılımları.

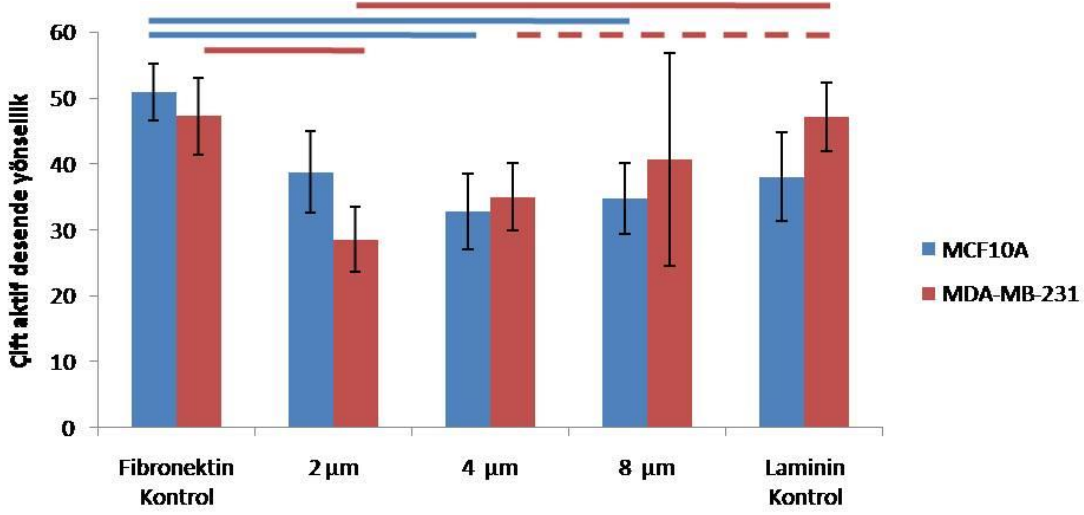
Yüksek bir rakam daha geniş bir dağılıma karşılık gelir. Sadece MDA-MB-231 hücre hattında Fibronectin ile dört mikrometre aralıklı nanodesen üzerinde anlamlı bir fark vardır. MDA-MB-231 hücre hattının her koşulda ortama uyum sağlamak için aktin iskeletini düzenlediği görülmektedir.



Şekil 68. Çift aktif desende hücre içindeki aktin iskeletinin hücre içi dağılımındaki uyumu.

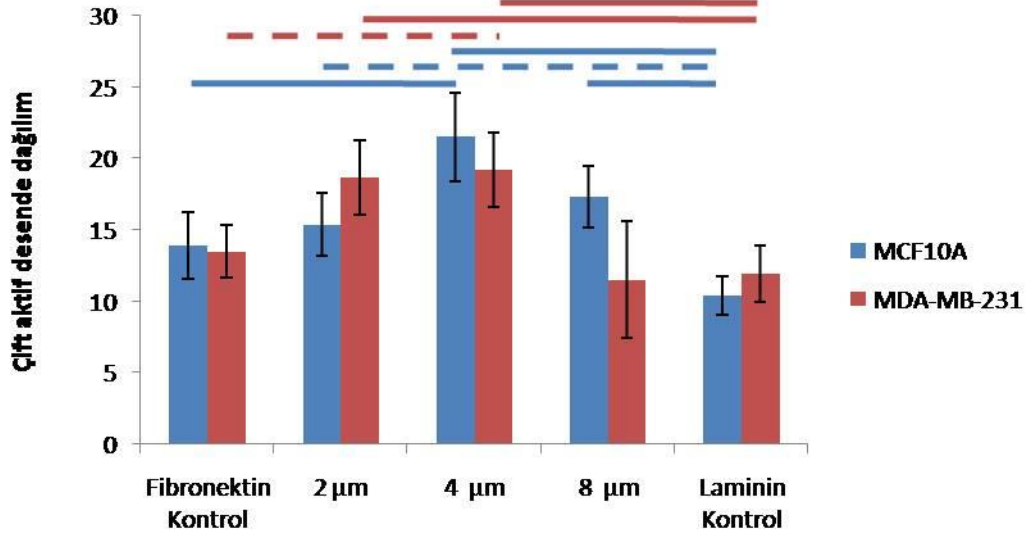
Kullanılan *Directionality* aracı aktin iskeletinin hücre içindeki dağılımını vermektedir. Her iki hücre hattında dağılım uyumunun 8 mikrometre aralıklı desende daha az olduğu, Laminin kontrol yüzeyde uyumun Fibronectin kontrol ve 2 mikrometre aralıklı desene benzerliği olduğu

görüldü. Hücreler desen aralığı arttıkça hücre içindeki aktin organizasyonu tutarlılığı azaldı. Özellikle 8 mikrometre aralıklı desenlerde hücreler aktin iskeletini hücrenin dış kısmında yoğunlaştığı ve hücre içindeki ağı yapısını kaybettiği görüldü.



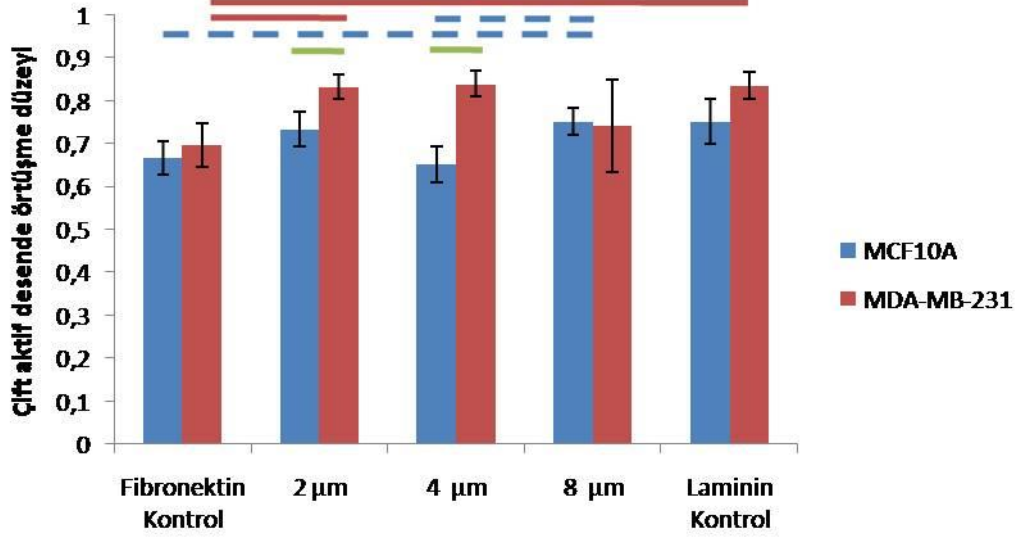
Şekil 69. Çift aktif desende Fibronectin ve Laminin kontrol yüzeyleri ve nanonoktalar üzerinde MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin en dış bantta aktin açıları-Yönsellik grafiği.

Fibronectin kontrol yüzeyinde hücrelerin çeper kısmında bulunan aktin yönsellikleri 40-50 derece arasında bulunmaktadır. Hücreler 2 ve 4 mikrometre aralıklı desende ise daha çok Fibronectin noktasına ulaşmak üzere 45 dereceden daha küçük açıları tercih etmişlerdir. 8 mikrometre aralıklı desende, iki hücre hattında küçük açıları tercih ettiği görülürken, MDA-MB-231 hücre hattında standard sapmanın tek aktif desen üzerindeki sapmadan yüksek olduğu görüldü. Bunun nedeni MDA-MB-231 hücrelerinin Fibronectin nanonoktasına bağlanma eğilimiyle, çift aktif desende laminin üzerinde K-kazeine göre daha rahat hareket etmiş olabileceği düşünüldü.



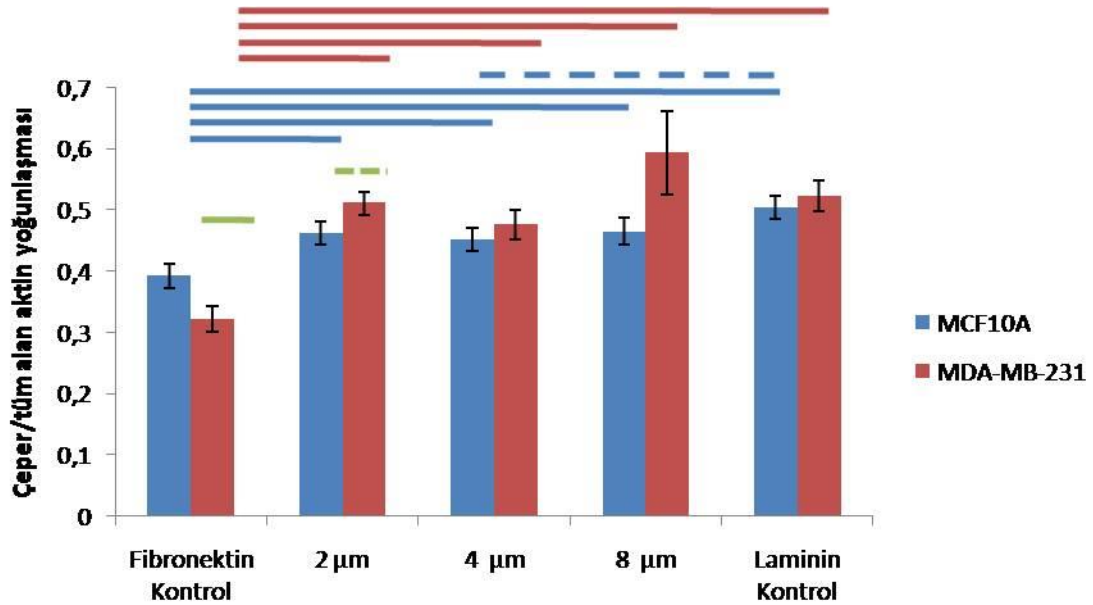
Şekil 70. Çift aktif desende Fibronectin ve Laminin kontrol yüzeyleri ve nanonoktalar üzerinde MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin en dış bantta aktin açlıları dağılımı.

Yüksek bir rakam daha geniş bir dağılıma karşılık gelir. İki hücre hattında tüm yüzeylerde istatistiksel bir fark bulunmamaktadır. Her iki hücre hattında en yüksek dağılımı 4 mikrometre aralıklı desen üzerinde, en düşük dağılımı kontrol yüzeylerde oluşturdular. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hatlarının her koşulda ortama uyum sağlamak için aktin iskeletlerini düzenledikleri görüldü. MCF10A hücreleri laminin kontrol yüzeylerde dış bantta daha düşük dağılım gösterdi ve istatistiksel olarak 2, 4, 8 mikrometre aralıklı desen sonuçlarından farklı çıktı. MDA-MB-231 hücreleri de laminin kontrol yüzeylerde dış bantta 2 ve 4 mikrometre aralıklı desen sonuçlarında farklı çıktı. Her iki hücre hattında fibronectin kontrol yüzey 4 mikrometre aralıklı desenden istatistiksel olarak farklı çıktı, dağılım 4 mikrometre aralıklı desende daha yüksek gözlemlendi.



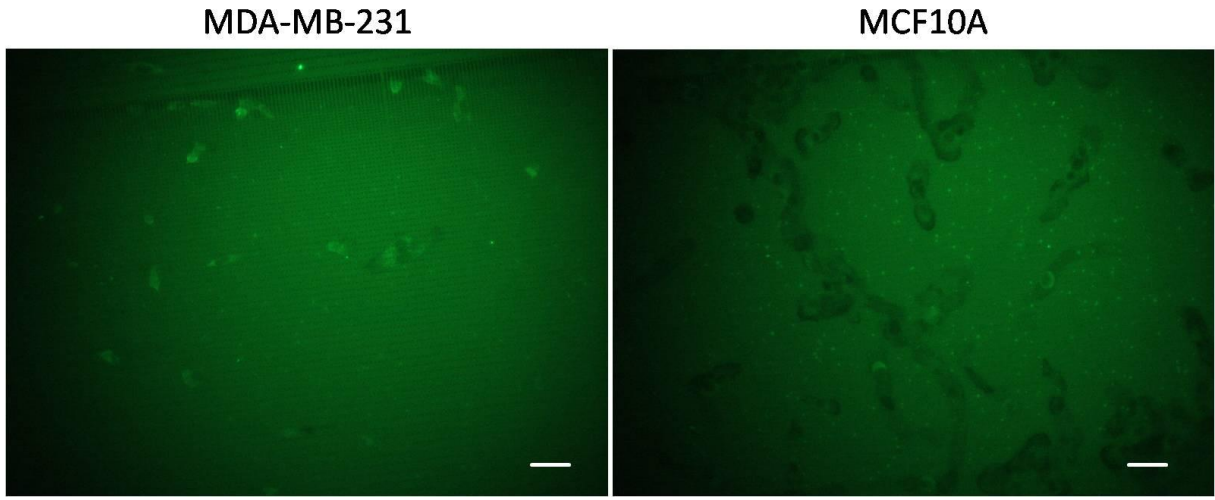
Şekil 71. Çift aktif desende Fibronectin ve Laminin kontrol yüzeyleri ve nanonoktalar üzerinde MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin en dış banda aktin açlıları örtüşme düzeyi.

İki hücre hattı arasında 2 mikrometre ve 4 mikrometre aralıklı desen üzerinde istatistiksel fark olduğu görüldü. MCF10A hücresi aktin en dış banda 8 mikrometre dışında aynı tutumu sergilerken, MDA-MB-231 hücre hattı Fibronectin kontrol yüzeyi ile 2, 4 ve laminin kontrol yüzeyden istatistiksel olarak farklı çıktı. Bunun nedeni MDA-MB-231 hücreleri Fibronectin kontrol yüzeyde aktin bandı oluşturmamasıdır.



Şekil 72. Çift aktif desen üzerinde hücrenin en dışında bulunan aktin/tüm aktin yoğunlaşması.

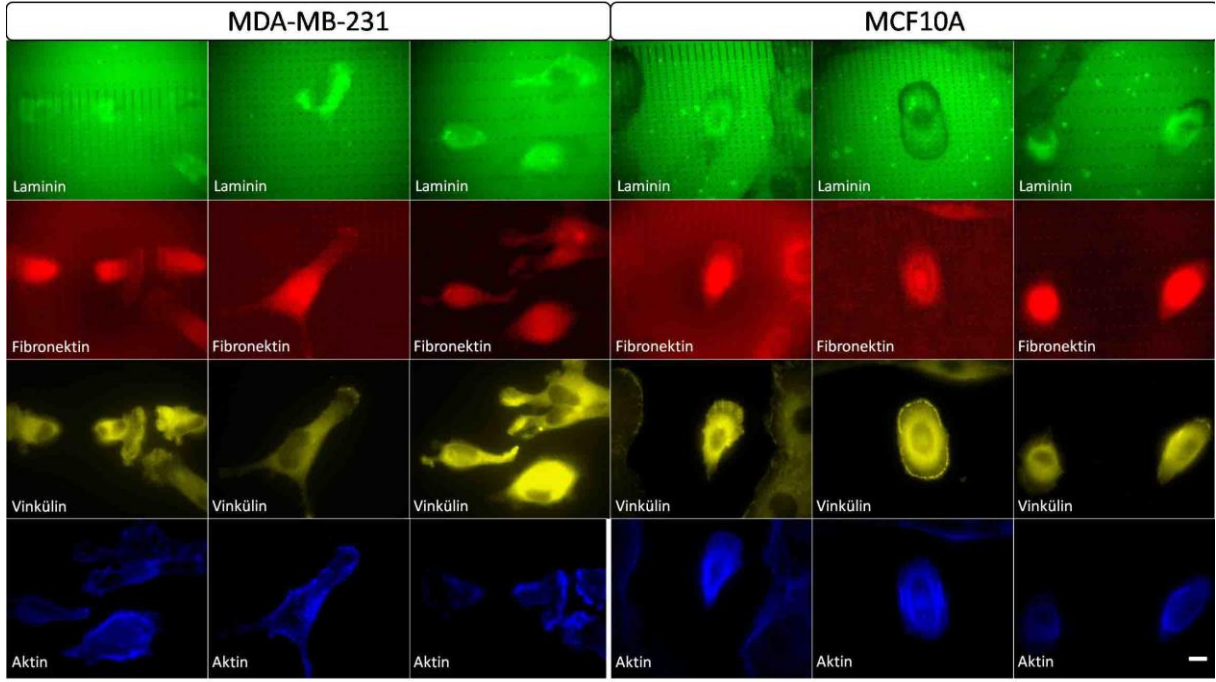
Hücrelerin çeperinde oluşan aktin bandını sayısal değerlere aktarmak ve farkı göstermek amacıyla, en dış aktin bandı (30 pixel) ile tüm hücrenin aktin yoğunlaşması oranlandı. Tek aktif desende tüm yüzeyler fark olmasına karşın, çift aktif desen üzerinde sadece fibronekin kontrol yüzey ve 2 mikrometre aralıklı desende istatistiksel fark görüldü. Ayrıca her iki hücre hattında fibronktin kontrol yüzeyi diğer yüzeylerinden istatistiksel olarak farklı çıktı. MDA-MB-231 hücresi tek aktif ve çift aktif desen karşılaştırıldığında yoğunlaşmanın çift aktif desende değer olarak daha düşük olduğu görüldü. MDA-MB-231 hücrelerinin tek aktif desende daha kalın bir aktin bandı oluşturmasının nedeni zor şartlar altında kanser hücresinin uyum sağlamaya yönelik olduğu düşünüldü.



Şekil 73. Çift aktif desende MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin adım aralığı değişken çift aktif desenleme üzerindeki genel dağılımları.

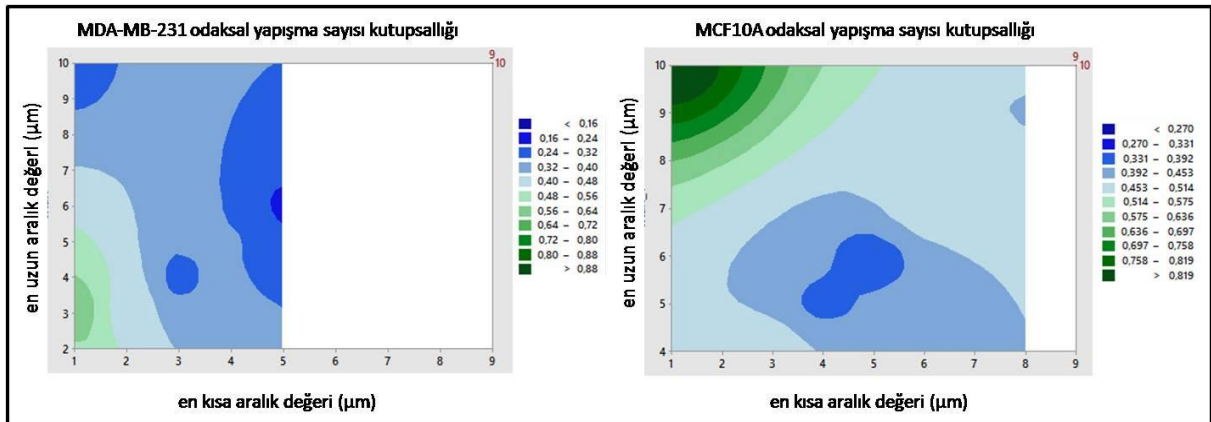
Şekilde görüldüğü gibi, ekilen hücre sayısı aynı olmasına rağmen MCF10A hücrelerinin adım aralığı değişken desene daha fazla yapışmıştır. MCF10A hücreleri toplu hücre grupları yapma eğilimindedir fakat MDA-MB-231 hücreleri tek yapışmayı tercih ederler. Her iki hücre hattında da, desenin en sık Fibronektin bulundurduğu bölgede kümeleşmeler olmuştur. MDA-MB-231 hücreleri orta sıklıktaki desene çapraz, en uzak aralıktaki nano-noktalar arası ya da üzeri paralel olarak yayılmayı tercih ederken, MCF10A hücreleri genel olarak çapraz yayılmayı tercih ederler. Böylece MDA-MB-231 hücreleri daha çok Fibronektin nanonoktasına tutunabilecektir. Öte yandan MCF10A hücreleri, MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin Fibronektin ve Laminin kontrol yüzeyleri ve nanonoktalar üzerinde açıları-Yönsellik grafiğinde görüldüğü gibi yüzey proteinine bağlı olarak yönselliğini değiştirmemektedir.





Şekil 74. Çift aktif gradient desen üzerinde MDA-MB-231 ve MCF10A hücreleri için örnek fotoğraflar.

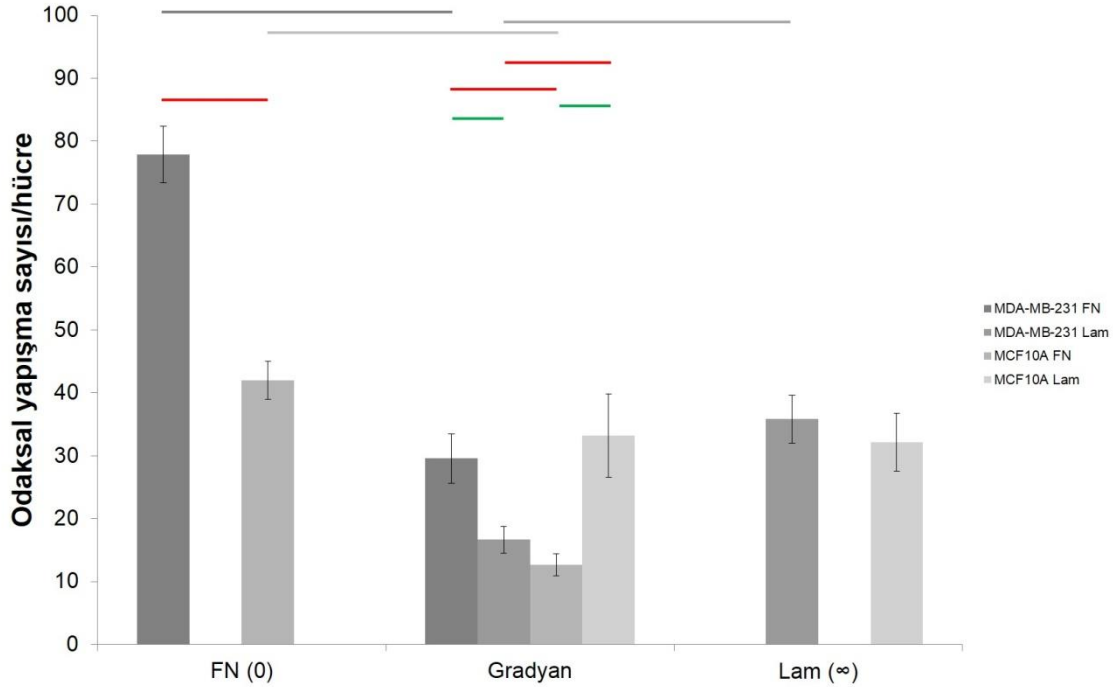
Çift aktif desenleme üzerinde adım aralığı değişken nanonoktaların MDA-MB-231 hücreleri üzerinde etkisi görülürken, MCF10A hücreleri nanonoktaların sıklığına bağlı olmaksızın yayılmışlardır. MDA-MB-231 hücreleri nanonoktaların sık olduğu bölgede yığılma eğilimi gösterirken, orta sıklıkta nanonoktalara çapraz olacak şekilde yayıldılar. Nanonoktaların en geniş aralıkta olduğu desenlemede ise nanonoktalar üzerinde paralel yayılma gösterdiler. Görülüyorki MDA-MB-231 hücreleri daha çok Fibronectin nanonoktalara tutunmak için hücre şeklini desene bağlı olarak düzenliyor.



Şekil 75. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında Laminin üzerine Fibronectin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma sayısı kutupsallığı grafikleri.

İzohips gösterimde 0,5 değeri kutupsallık olmadığını, 0,5 – 1,0 arası değerler gradyan yönünde kutupsallığı, 0,0 – 0,5 arası değerler gradyan tersi yönünde kutupsallığı göstermektedir.

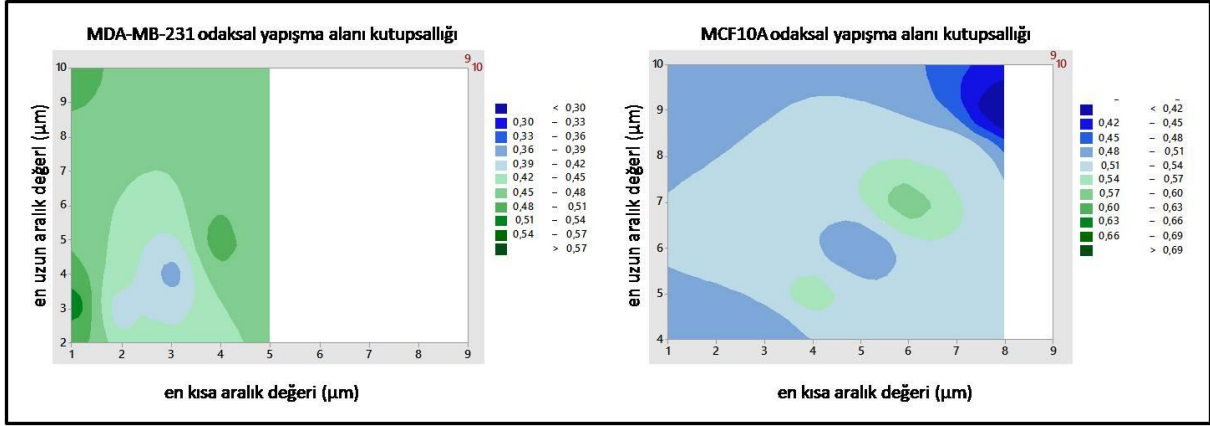
Odaksal yapışma sayısı kutupsallığı verilerini yansıtan izohips harita grafiklerine bakıldığında, MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin orta aralıklı gradyan bölgelerinde gradyan yönünün tersine kutupsallaştığı görüldü. MDA-MB-231 hücreleri için tek aktif gradyan üzerinde gözlemlenen 3-4  $\mu\text{m}$  gradyan bölgesi gradyan yönü kutupsallığı çift aktif çalışmalarında 1-2-3  $\mu\text{m}$  aralıklı gradyan bölgelerine doğru kaymış görüldü. Benzer biçimde MCF10A hücrelerinin de tek aktifte gösterdikleri dar aralıklı gradyan bölgesi gradyan yönünde kutupsallığı çift aktif gradyan üzerinde kaybettiği, tek aktif geniş aralıklı gradyan üzerinde gösterdiği gradyan tersi kutupsallığı çift aktif gradyanda orta aralıklara taşımış olduğu görüldü.



Şekil 76. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında Laminin üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma sayısı dağılımı.

MDA-MB-231 FN kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MDA-MB-231 Lam kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MCF10A FN normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MCF10A Lam normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma sayısını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

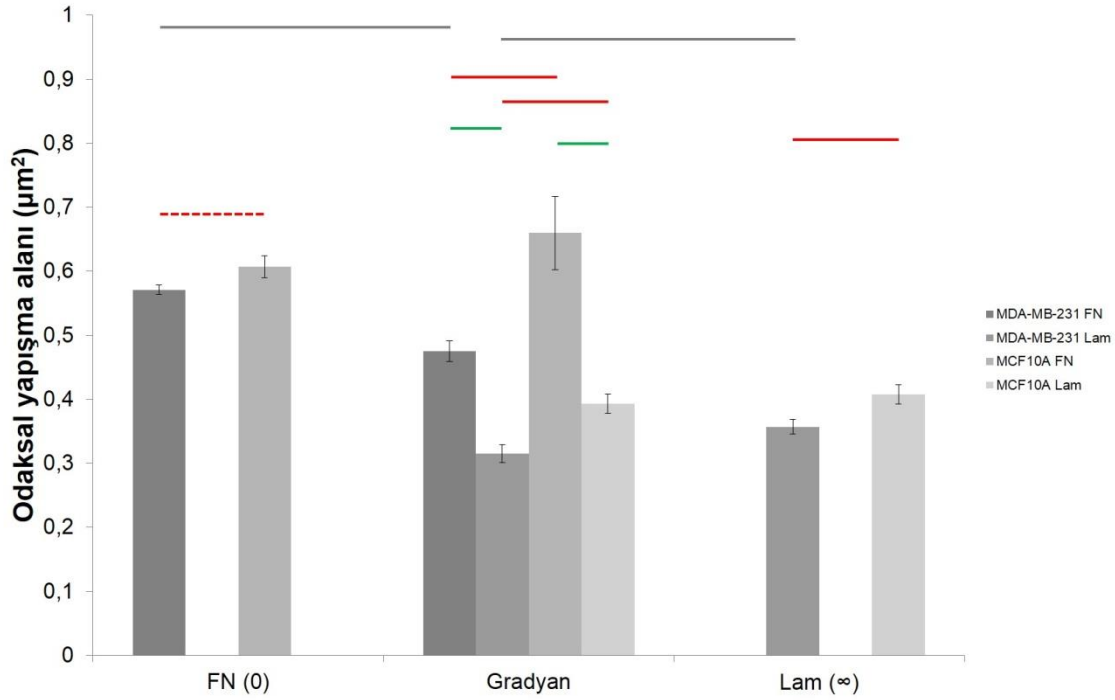
Odaksal yapışma sayıları bakımından hücreler gradyan fibronektin nanonoktaları üzerinde fibronektin kontrol yüzeye kıyasla daha az sayıda odaksal yapışma yapmışlardır. Gradyan yüzeylerde fibronektin nanonokta üzerinde olan ve olmayan odaksal yapışma sayıları her iki hücre grubu için kendi içinde ve birbirleri arasında farklılık göstermektedir.



Şekil 77. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında Laminin üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma alanı kutupsallığı grafikleri.

İzohips gösterimde 0,5 değeri kutupsallık olmadığını, 0,5 – 1,0 arası değerler gradyan yönünde kutupsallığı, 0,0 – 0,5 arası değerler gradyan tersi yönünde kutupsallığı göstermektedir.

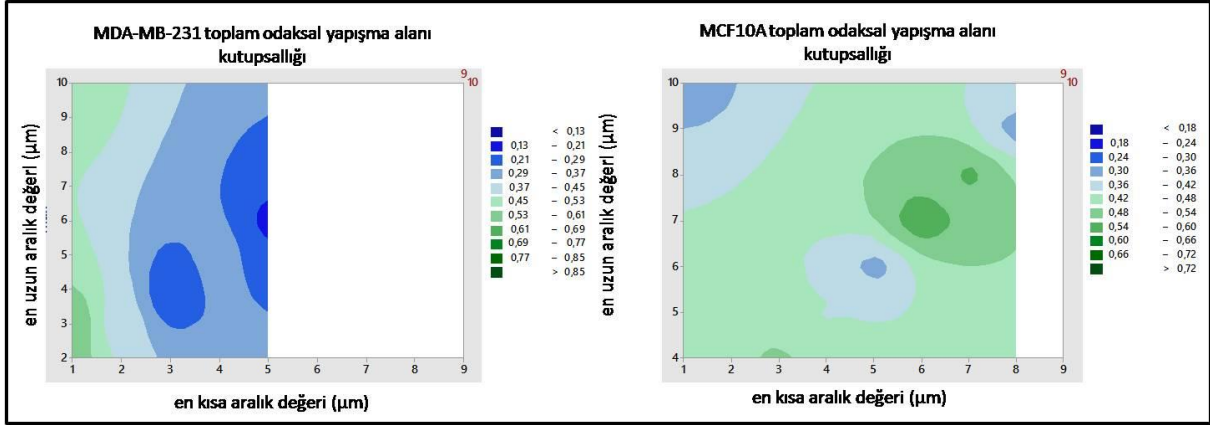
Şekil 77 incelendiğinde odaksal yapışma alanı kutupsallığını gösteren izohips haritalarında alan çizgilerinin eşit ve düşük eküdistansa sahip oldukları görüldü, bu durumda laminin üzerine fibronektin yüzeylerde her iki hücre de kazein üzerine fibronektin yüzeylere kıyasla daha yüzeye tepkili yahut bağımlı olmaktadır. Buna rağmen MDA-MB-231 hücreleri laminin üzerine fibronektin nanodesenli yüzeylerde dahi MCF10A hücrelerine kıyasla daha bağımsız davranabilmektedir, bu durum aynı aralık değerlerinde gradyan yüzeyler için kutupsallıklar kıyaslandığında MDA-MB-231 hücrelerinin, kutupsallığın olmadığı 0,5 değerine yakın değerlerde seyretmesinden anlaşılabilir.



Şekil 78. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında Laminin üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma alanlarının dağılımı.

MDA-MB-231 FN kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanını, MDA-MB-231 Lam kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanını, MCF10A FN normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanını, MCF10A Lam normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

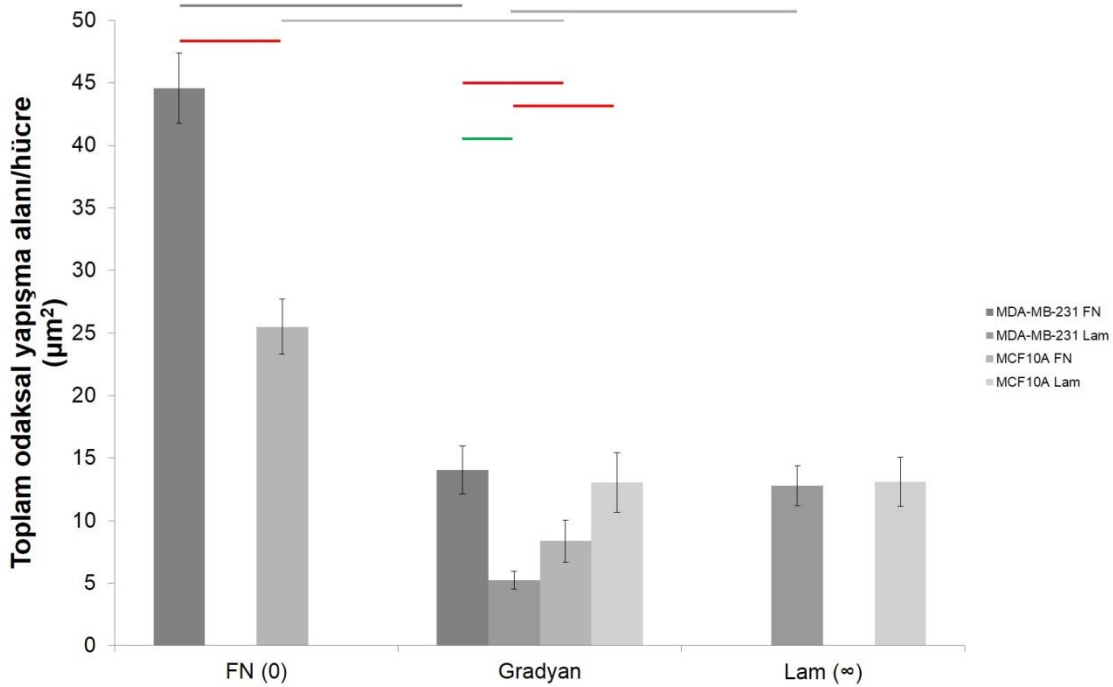
Odaksal yapışma alanı fibronektin ve laminin kontrol yüzeyleri de dahil gradyan üzerinde de belirgin bir şekilde her iki hücre tipi için farklılaşmaktadır. MCF10A hücreleri bütün yüzeylerde daha büyük odaksal yapışmalar yapma eğilimindedirler. Aynı durum tek aktif gradyan grafiğinde de görülmektedir.



Şekil 79. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında Laminin üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde toplam odaksal yapışma alanı kutupsallığı grafikleri.

İzohips gösterimde 0,5 değeri kutupsallık olmadığını, 0,5 – 1,0 arası değerler gradyan yönünde kutupsallığı, 0,0 – 0,5 arası değerler gradyan tersi yönünde kutupsallığı göstermektedir.

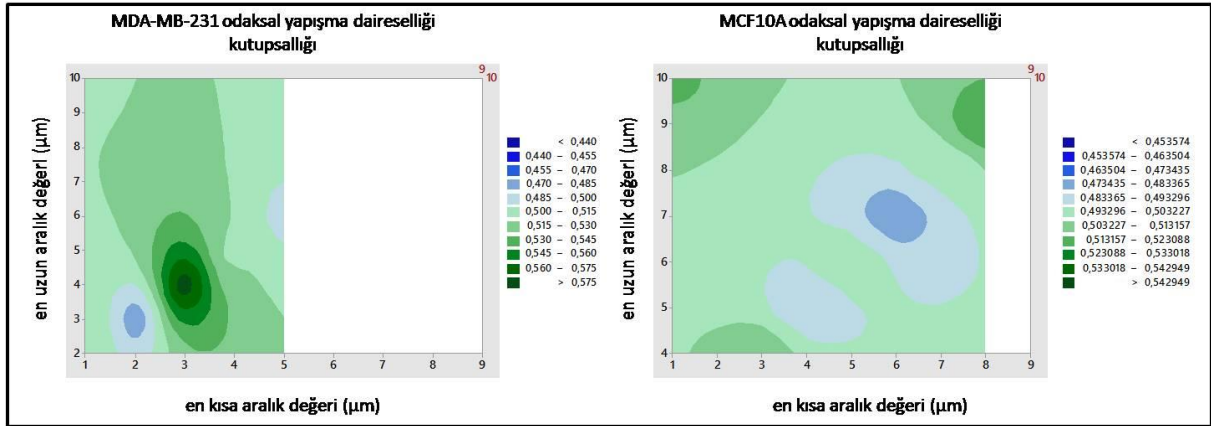
Toplam odaksal yapışma alanı kutupsallığını gösteren izohips harita grafiklerine bakıldığında MDA-MB-231 hücrelerinin orta aralıklı gradyan yüzeylerde gradyan tersi yönde kutupsallaşma gösterdiği görülürken, MCF10A hücrelerinin genel olarak minimum kutupsallık gösterdiği gözlemlendi ancak MCF10A hücrelerinin düşük eküdistans değeri bu hücrelerin gradyan yüzeyde kutupsallık farklılaşmasının gradyan aralığına bağlı daha hassas değişim gösterdiğini yansıtmaktadır.



Şekil 80. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında Laminin üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde toplam odaksal yapışma alanlarının hücre başına düşen dağılımı.

MDA-MB-231 FN kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanını, MDA-MB-231 Lam kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanını, MCF10A FN normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanını, MCF10A Lam normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

Çift aktif gradyan üzerinde bulunan hücreler tek aktif gradyan üzerinde bulunan hücrelere kıyasla birbirlerinden toplam odaksal yapışma alanları bakımından ayrılmaktadırlar. MDA-MB-231 hücreleri laminin üzerinde bulunan fibronektin nanonoktaları üzerinde sayıca ve alanca daha fazla odaksal yapışma oluşturmaktadırlar yani fibronektin lamininin varlığına rağmen hala daha cazip bir tercihtir. Bu durum MCF10A hücreleri için değişmektedir, odaksal yapışma oluşturmak maksadıyla laminin üzerinde fibronektin nanonoktaları aramaktansa hücreler arası proteinlerden birisi üzerinde odaksal yapışmanın kurulabilir olacağı görülmektedir.

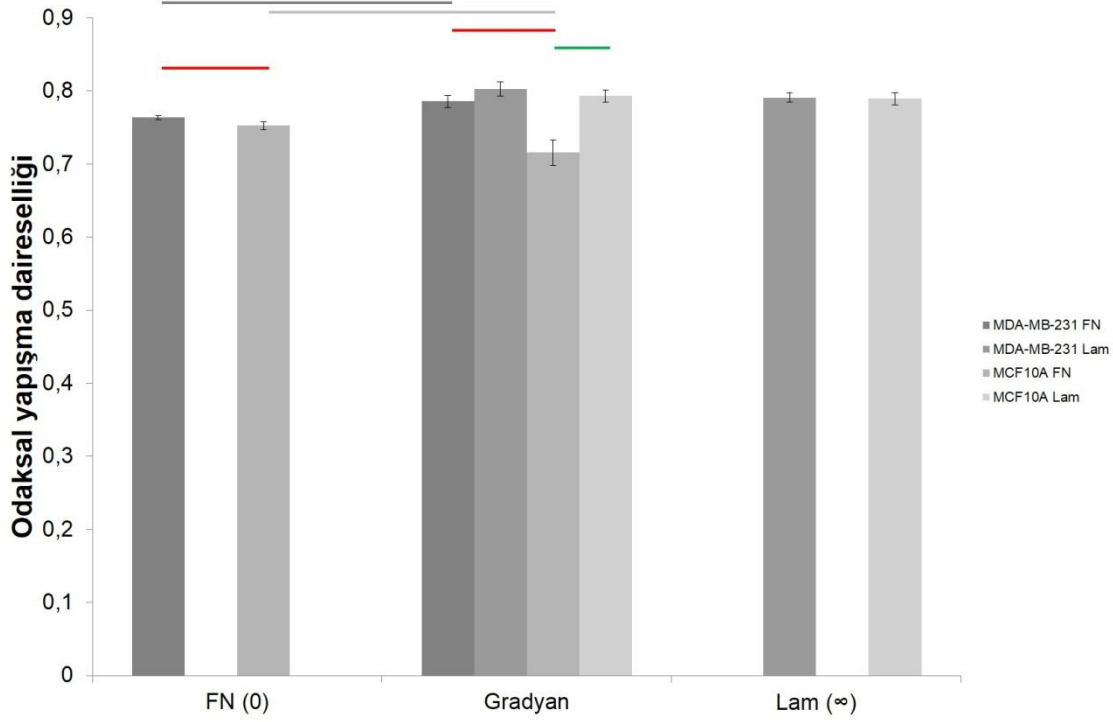


Şekil 81. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma daireselliği kutupsallığı grafikleri.

İzohips gösterimde 0,5 değeri kutupsallık olmadığını, 0,5 – 1,0 arası değerler gradyan yönünde kutupsallığı, 0,0 – 0,5 arası değerler gradyan tersi yönünde kutupsallığı göstermektedir.

Odaksal yapışma daireselliği kutupsallıklarını gösteren şekil 81 incelendiğinde MDA-MB-231 hücrelerinin gradyan 3-4  $\mu\text{m}$  aralıkta belirgin bir gradyan yönünde kutupsallık gösterdiği görülüyor, bu bölgede gradyan yönünde olan odaksal yapışmaların daha dairesel olduğu

sonucu çıkarılıyor. MCF10A hücreleri için ise genel olarak belirgin bir kutupsallık görülmemektedir.

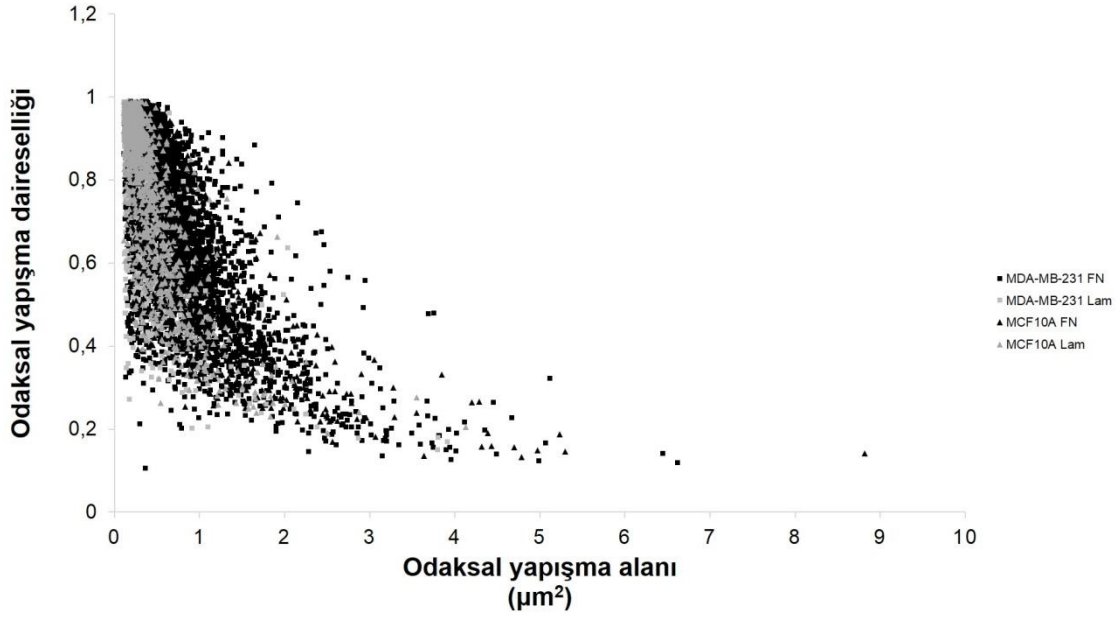


Şekil 82. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında Laminin üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma daireselliklerinin dağılımı.

MDA-MB-231 FN kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışmaların daireselliğini, MDA-MB-231 Lam kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışmaların daireselliğini, MCF10A FN normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışmaların daireselliğini, MCF10A Lam normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışmaların daireselliğini göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

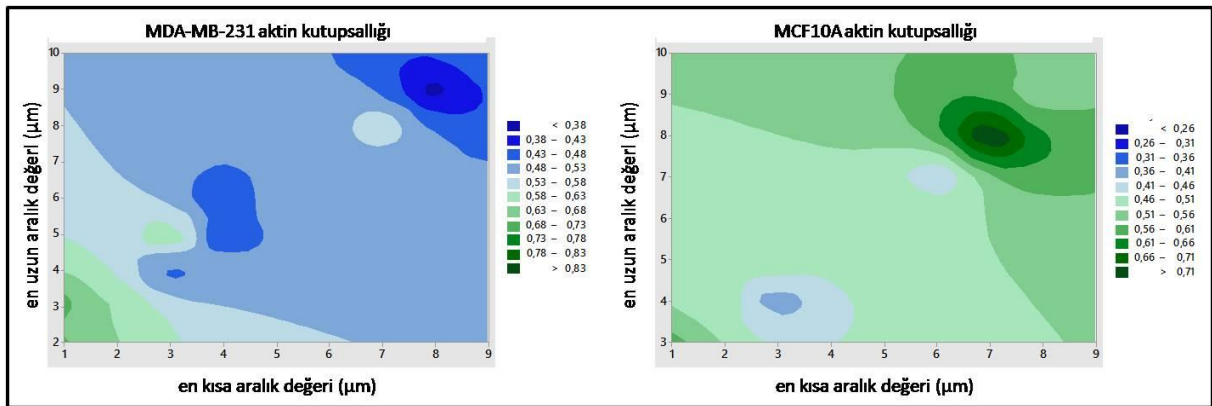
Odaksal yapışma daireselliklerinin fibronektin nanonoktalar üzerinde ve arasında yani laminin üzerinde olması durumu incelendiğinde fibronektin üzerinde hem kontrol grupları için hem de gradyan grupları için farklı dairesellik kazanmış odaksal yapışmalarla iki hücre tipinin birbirinden farklılaştığını görüyoruz. Tek aktif gradyan için olduğu gibi MCF10A hücreleri çift aktif gradyan üzerinde de MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla daha çizgisel odaksal yapışmalara sahiptirler.





Şekil 83. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında K-kazein üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde odaksal yapışma daireselliklerinin odaksal yapışma alanına bağlı dağılımı.

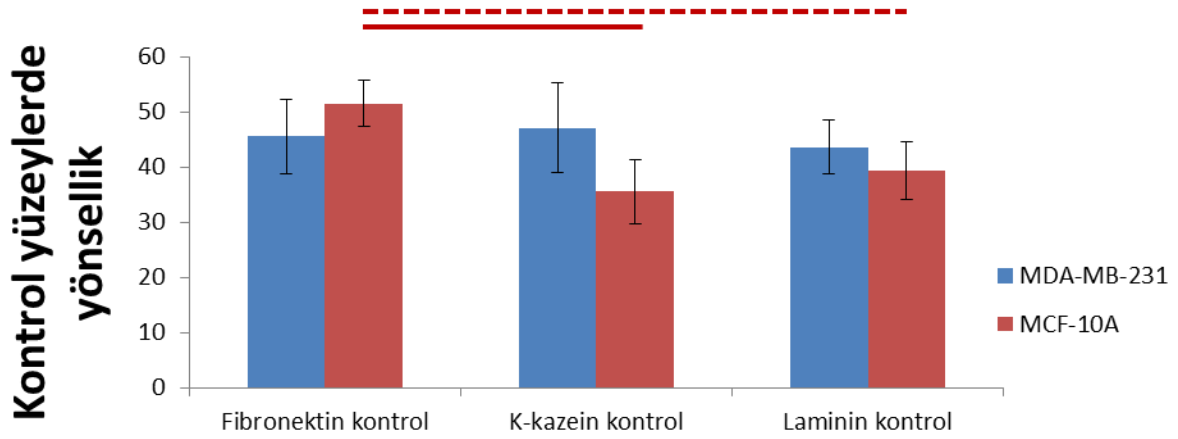
MDA-MB-231 FN kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini, MDA-MB-231 Lam kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini, MCF10A FN normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini, MCF10A Lam normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini göstermektedir.



Şekil 84. MDA-MB-231 ve MCF10A hücre hattında Laminin üzerine Fibronektin gradyan nanonoktaları üzerinde aktin kutupsallığı.

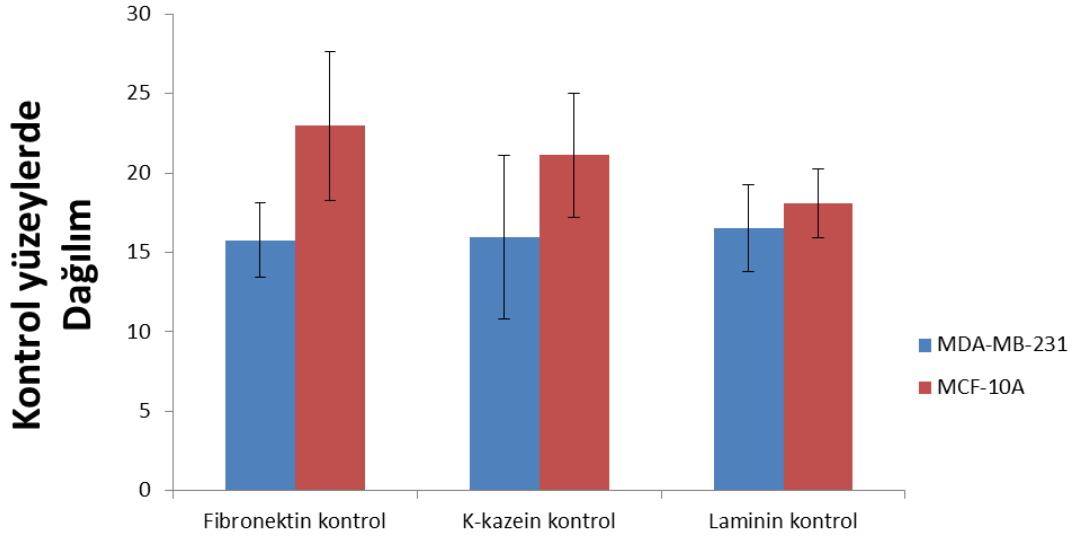
İzohips gösterimde 0,5 değeri kutupsallık olmadığını, 0,5 – 1,0 arası değerler gradyan yönünde kutupsallığı, 0,0 – 0,5 arası değerler gradyan tersi yönünde kutupsallığı göstermektedir.

Aktin hücre iskeletinin kutupsallığını gösteren izohips harita grafiklerine bakıldığında MDA-MB-231 hücrelerinin geniş ve orta aralıklı gradyan bölgelerinde gradyan yönünün tersine olan kutupsallığı dar aralıklı (1-2-3  $\mu\text{m}$ ) gradyan bölgelerinde gradyan yönünde olan değerlerde seyretmektedir; MCF10A hücreleri ise genel olarak çok düşük kutupsallık değerlerine sahip olup geniş aralıklı gradyan bölgesinde gradyan yönünde kutupsallık göstermektedir.



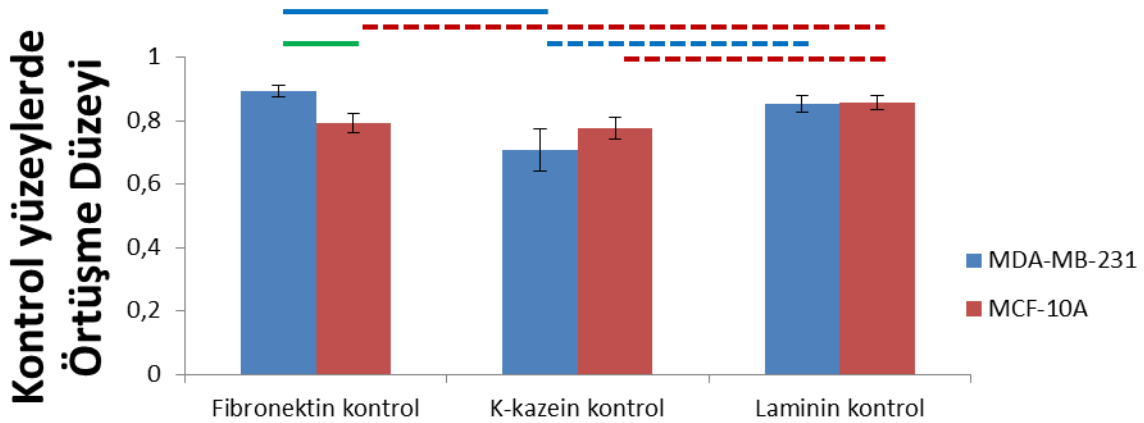
Şekil 85. MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin Fibronectin, K-kazein ve Laminin kontrol yüzeyleri üzerinde açıları-Yönsellik grafiği.

MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin hücre içindeki aktin organizasyonlarına bakılmak üzere ImageJ programının versiyonu olan Fiji programında *Plugins* sekmesinde bulunan *Tubeness* ve *Analyze* sekmesinde bulunan *Directionality* seçeneğiyle hücre içindeki aktin analiz edildi. MDA-MB-231 hücrelerinde tüm kontrol yüzeylerde yönelim açısı 90 derece içinde yaklaşık 45 derece olduğu görülmüştür. 45 derece değeri hücrenin 0-90 derece içinde homojen açı değerlerine sahip olduğunu gösterir. MCF10A hücrelerinde ise Fibronectin kontrolde yönelim açısı yaklaşık 50 derece iken, K-kazein yüzeyde 35 derece, Laminin yüzeyde 40 derecedir. MCF10A hücreleri homojen olarak Fibronectin yüzeyde aktin iskeletini oluştururlar.



Şekil 86. Aktin iskeletindeki iplikçiklerin kartezyen koordinatlarındaki açılarının dağılımları.

Yüksek bir rakam daha geniş bir dağılıma karşılık gelir. Kontrol yüzeylerinde dağılımda her hücre hattı için anlamlı bir fark yoktur.



Şekil 87. Hücre içindeki aktin iskeletin hücre içi dağılımındaki uyumu.

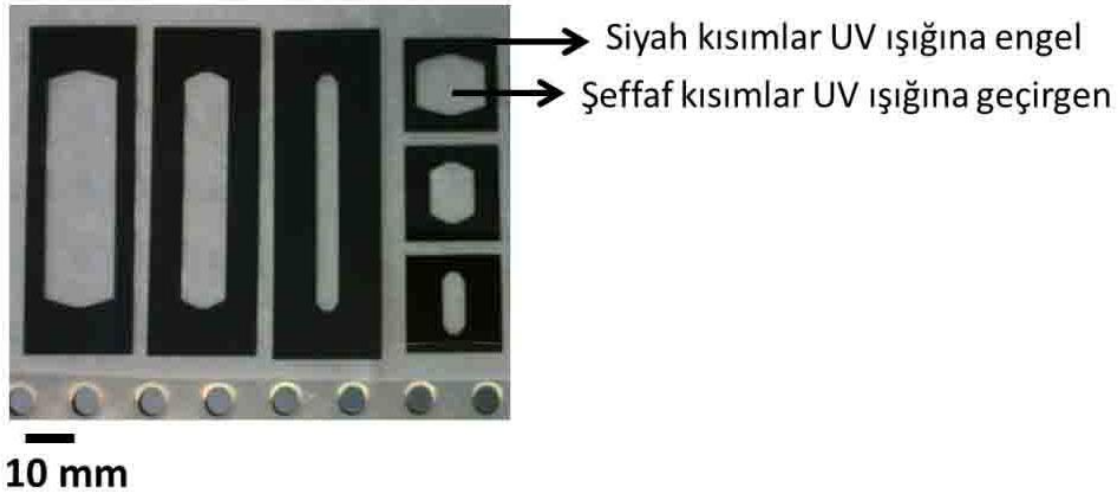
Kullanılan *Directionality* aracı aktin iskeletinin hücre içindeki dağılımını vermektedir. MDA-MB-231 hücrelerinde Fibronektin ve Laminin yüzeylerde uyum yaklaşık olurken Fibronektin-K-kazein ve K-kazein-Laminin kontrollerinde anlamlı fark vardır. MCF10A hücrelerinde ise Fibronektin ve K-kazein yüzeylerde uyum yaklaşık olurken Fibronektin-Laminin ve K-kazein-Laminin kontrollerinde anlamlı fark vardır. İki hücre tipi arasında kontrol yüzeylerde sadece Fibronektin ayırt edicidir.

### 3.4 Akış deneyleri

Fotolitografi yöntemini kullanarak yapılması amaçlanan mikroçevre, kalınlığı 240 ile 300 mikrometre arasında değişen farklı şekillerdeki kanallardan oluşmaktadır. Deneyde kullanılan fotorezist SU-8 2075'dir ve litografi basamakları uygulamaya konulmadan önce optimize edilmek için belirli koşullar denenmiştir. SU-8 negatif fotorezistdir ve polimerleşir. Bu polimer ısıya karşı çok duyarlı bir madde olup polimerleşmesi ısı uygulandığında çapraz bağlar oluşturmasıyla meydana gelir. Bu basamaklar ön pişirme (soft lithografi) ve son pişirme (post lithografi)'dir. Fotolitografide amaç yüzeyde boşluk, dalgalanma ve baloncuk bulunmayacak şekilde; yüzeyi bir maske ile şekillendirerek kalıp oluşturmaktır. İlk denemeler lam üzerinde yapıldı, buradan örneğin temizliğinin ve yüzeyin eğiminin önemi görülmüştür. Bu doğrultuda pişirme, spin ve UV görme sürelerinde uygulanacak aralık belirlenmiştir. Ayrıca baloncuk oluşumu ve yüzeyi kaplamada ortaya çıkan sorunlarının genellikle dökme basamağından kaynaklandığı görülmüştür.

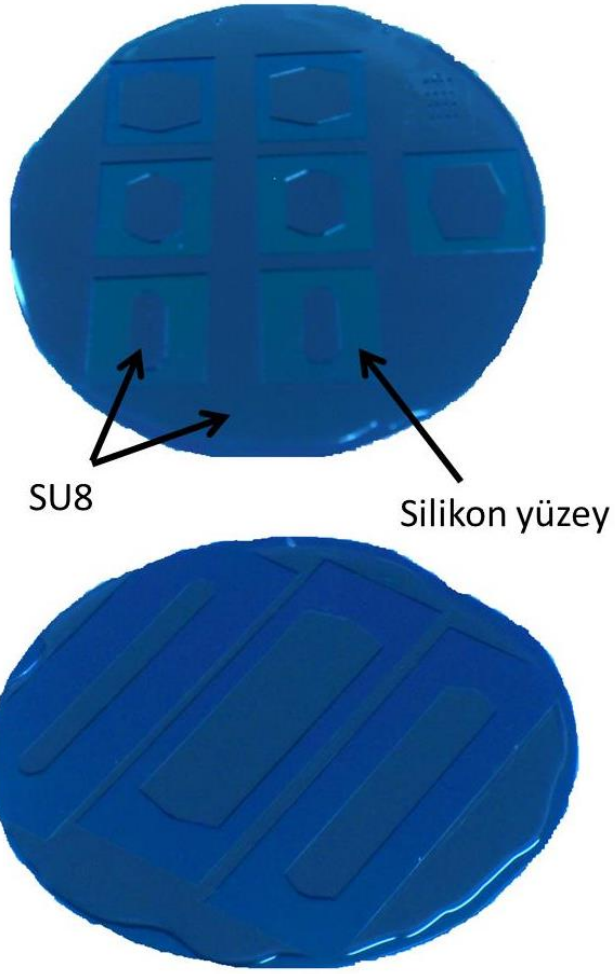
#### 3.4.1 Akış deneylerinde kullanılmak üzere oluşturulan kanal desenleri

MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin akış altında farklı yüzeylerde incelenebilmeleri için kullanılacak kanallar laminar akışı destekleyip kullanılan ITO-kaplı camların boyutlarıyla uyumlu olacak şekilde tasarlandı.

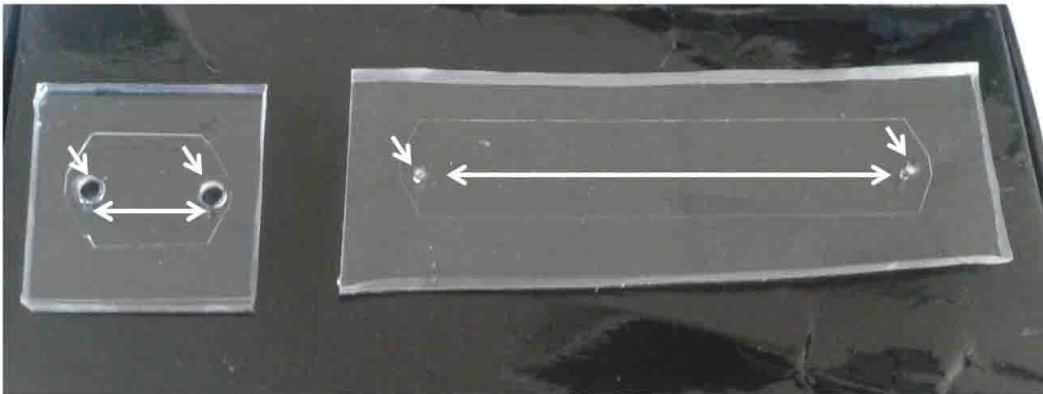


Şekil 88. Beyaz peçete üzerine yerleştirilmiş maskelerin fotoğrafı.

UV ışığına maruz kalan yerlerdeki fotorezist (SU-8) polimerleşir; UV ışığından korunan yerlerdeki SU-8 çözünür. SU-8 kalıp üzerinde oluşturulan PDMS kalıpların duvarları maskelerdeki siyah yerlere, sıvı akışının geçeceği kanallar da maskelerdeki şeffaf alanlara denk gelirler.

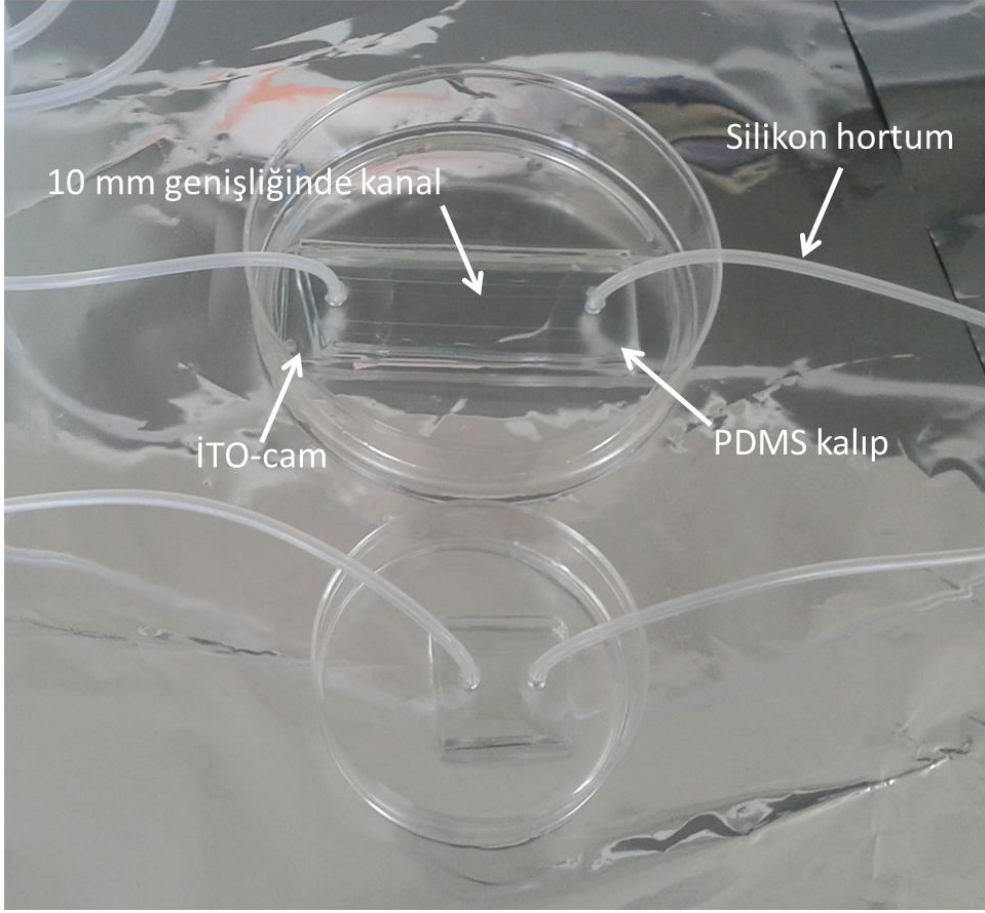


Şekil 89. Silikon yüzeylerde oluşturulan SU8 kalıplar. 5, 10 ve 15 mm genişliğinde kısa ve uzun kanalların kalıpları.



Şekil 90. PDMS kanallar.

Kısa oklar akış için açılan giriş ve çıkış deliklerini gösteriyor. Uzun oklu çizgiler kanalların boylarına paralel çizilmiştir.



Şekil 91. Lab-on-a-chip. SU-8 kalıp üzerinde oluşturulan PDMS kalıpların yüzeyi K-kazein veya FN kaplı İTO-camlar ile birleştirilmiş ve kanalların giriş ve çıkışlarına silikon hortumlar bağlanmış, akış için hazır durumdaki görüntüleri.

### 3.4.2 Tek aktif desende MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin akış gerilimine maruz bırakılmasından elde edilen bulgular

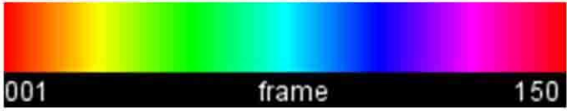
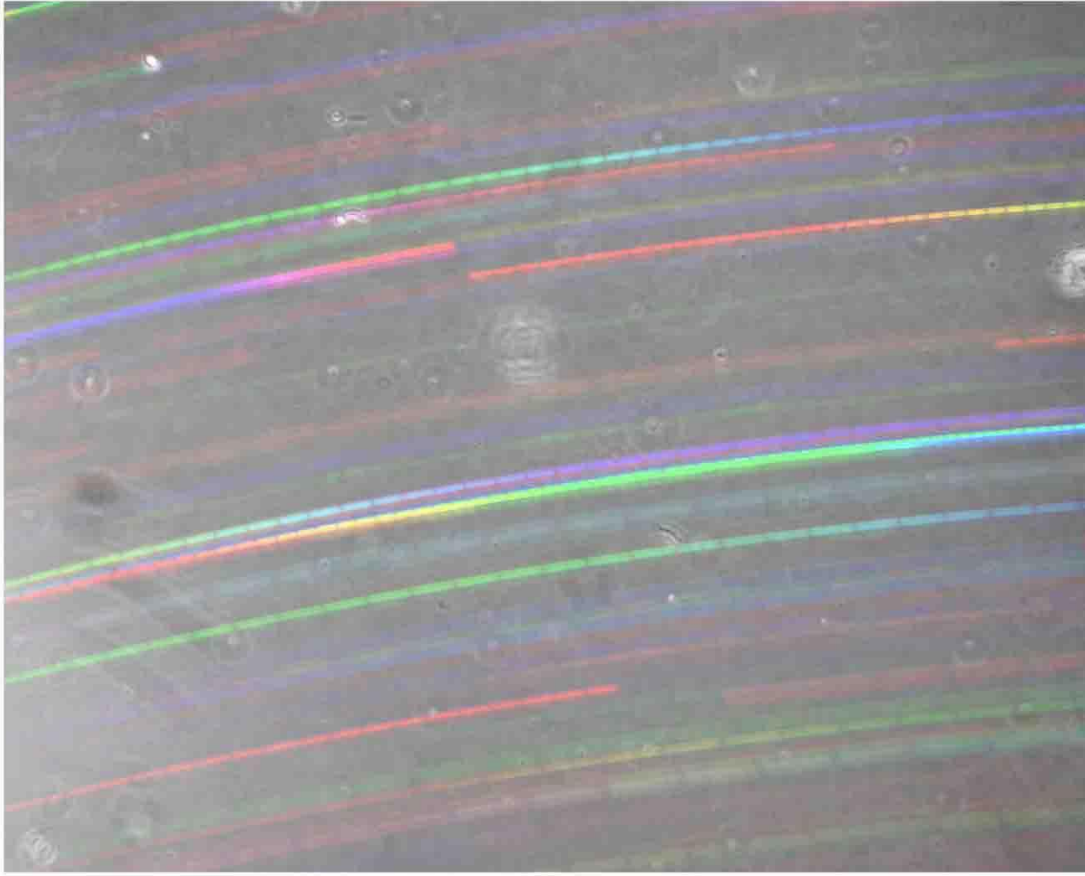
Tablo 3. Poiseuille denklemine göre hesaplanan akış gerilimleri ve hızları.

Akış Gerilimi (dyn/cm <sup>2</sup> )	Yükseklik 2h (um)	Genişlik 2b (um)	Akışkanlık (dyn.s/cm <sup>2</sup> )	Akış Hızı (ml/dak)
4	165	10000	0,01	1,078
2	165	10000	0,01	0,539
1	165	10000	0,01	0,269
0,5	165	10000	0,01	0,135
0,25	165	10000	0,01	0,067
0,125	165	10000	0,01	0,034
4	197	10000	0,01	1,534
2	197	10000	0,01	0,767
1	197	10000	0,01	0,384
0,5	197	10000	0,01	0,192
0,25	197	10000	0,01	0,096
0,125	197	10000	0,01	0,048
4	381	10000	0,01	5,667
2	381	10000	0,01	2,835
1	381	10000	0,01	1,418
0,5	381	10000	0,01	0,709
0,25	381	10000	0,01	0,354
0,125	381	10000	0,01	0,177

Tablodaki değerlere göre akış gerilimi 4 dyn/cm<sup>2</sup>'ye denk düşen akış hızlarının hücrelerin yüzeyde tutunmasına olanak vermeyeceği gözlemlendi, bundan dolayı akış gerilimi üst limiti 2 dyn/cm<sup>2</sup> olarak belirlendi. FN ve K-kazein kaplı yüzeyler üzerinden PDMS ile oluşturulmuş kanal aracılığıyla 2, 1, 0.5 ve 0.25 dyne/cm<sup>2</sup> akış gerilimleri altında her bir gerilim şiddeti için yaklaşık olarak 2 ml ve 0.125 dyne/cm<sup>2</sup> akış gerilimi için 6 mililitreye kadar örnek akıtıldı. Akış için MDA-MB-231 ve MCF10A hücreleri kullanıldı. Öncü deneylerde hücreler akış altında K-kazein kontrol yüzeylere yapışmadılar. MCF10A hücrelerinin aşağıda belirtilen koşullarda FN kontrol yüzeye yapıştığı gözlemlendi (Şekil 94).

Akış içindeki hücrelerin videosu ImageJ programında düzenlendiğinde akan hücreleri zaman içinde farklı renklerde gözlemlenmek mümkün oldu (Şekil 93, Şekil 94). Görüntüler 15 fps alındığında hücrelerin izleri devamlı iken (Şekil 93), 1 fps videolar için hücre izleri kesikli idi (Şekil 94). Yüzeye yapışan hücreler yer değiştirmedikleri için beyaz göründüler (Şekil 94 beyaz oklar).

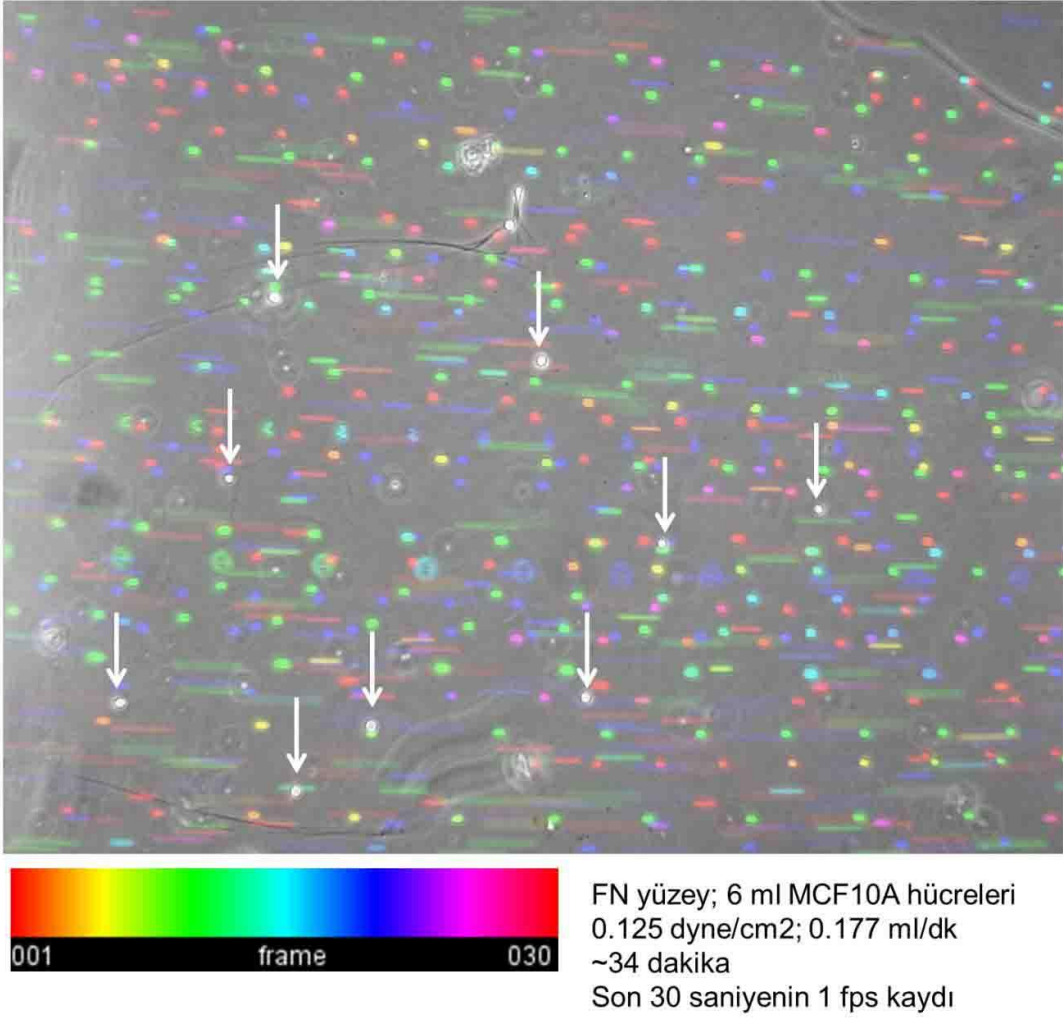




FN yüzey; MDA-MB-231 hücreleri  
0.125 dyne/cm<sup>2</sup>; 0.177 ml/dk  
Akış başlangıcı  
10 saniyenin 15 fps kaydı

Şekil 92. 0.125 dyne/cm<sup>2</sup> akış gerilimi ve 0.177 ml/dk akış hızı ile 381 mikrometre yüksekliğe ve 1000 mikrometre genişliğe sahip zemini FN kaplı kanaldan geçirilen MDA-MB-231 hücrelerinin akış başlangıcında zıt-evre mikroskobuna bağlı kamerayla saniyede 15 fotoğraf karesiyle kaydedilen görüntülerinden 10 saniyenin tek bir fotoğraf karesine yansıtılmasıyla elde edilen görüntü.

Hücrelerin kameranın kadrajına ne zaman girdiğini, ne zaman çıktığını ve hangi sürelerde kadrajda kaldığını gösteren fotoğraf karesi (*frame*) sırasına bağlı renk tonu çubuğu sol alt köşede görülmektedir.

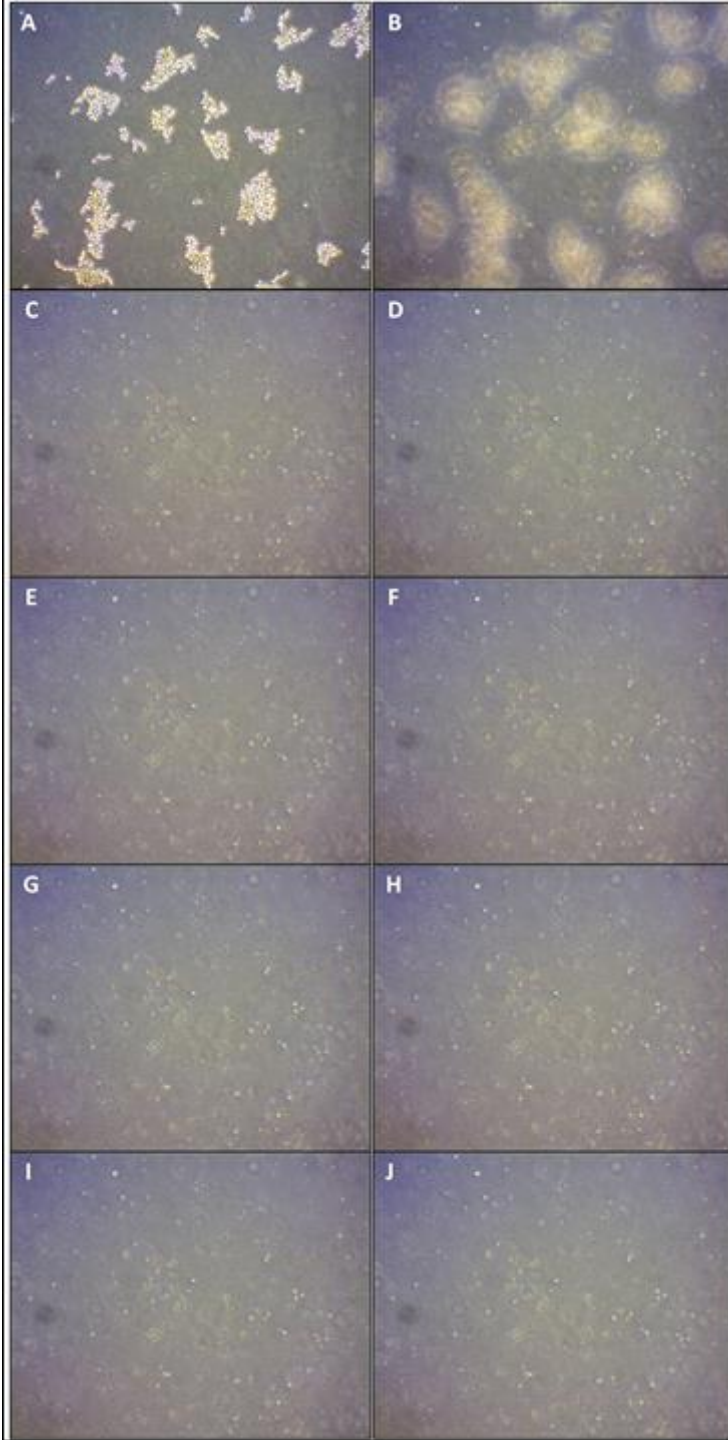


Şekil 93. 0.125 dyne/cm<sup>2</sup> akış gerilimi ve 0.177 ml/dk akış hızı ile 381 mikrometre yüksekliğe ve 1000 mikrometre genişliğe sahip zemini FN kaplı kanaldan yaklaşık 34 dakika boyunca geçirilen 6 ml MCF10A hücrelerinin yaklaşık 34 dakika sonunda zıt-evre mikroskobuna bağlı kamerayla saniyede 1 fotoğraf karesiyle 30 saniye boyunca kaydedilen görüntülerinin tek bir fotoğraf karesine yansıtılmasıyla elde edilen görüntü.

Beyaz oklar FN yüzeye yapışmış hücreleri göstermektedir. Hücrelerin kameranın kadrajına ne zaman girdiğini, ne zaman çıktığını ve hangi sürelerde kadrajda kaldığını gösteren fotoğraf karesi (*frame*) sırasına bağlı renk tonu çubuğu sol alt köşede görülmektedir.

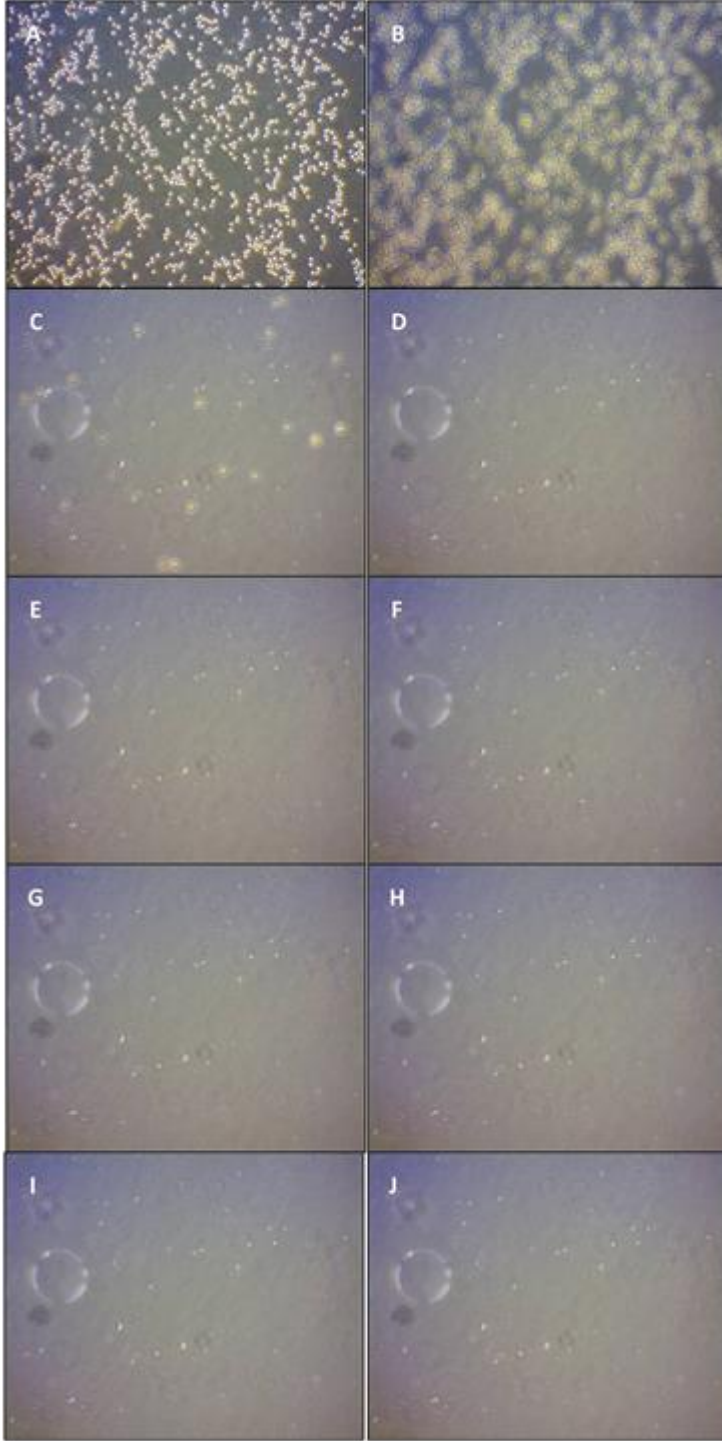
Uygulanan minimum akış gerilimine (0.125 dyne/cm<sup>2</sup>) denk düşen akış hızlarında hücrelerin FN kaplı yüzeylere yapışabildiği görüldü. Akış hızı arttıkça hücrelerin yüzeye yapışmaları zorlaşacağından kanalda uzun süre ve düşük hızda akış sağlamak ya da önceden kanalda bırakılıp yüzeye yapışan hücrelere sonradan akış gerilimi uygulamak, akış deneyleri için uygulanabilecek iki farklı yöntem olarak öngörüldü.

Öngörülen yöntemlerden ilk olarak denenen önceden yapışan hücelere sonradan akış gerilimi uygulamak oldu. MDA-MB-231 hücreleri kanallar içersine yüklenip yüzeye yapışmalarına olanak sağlayacak bir saatlik süreyle bekletildiler ve akış bir saat sonunda uygulandı.



Şekil 94. Akış gerilimi altında Fibronektin kaplı İTO-cam yüzey üzerindeki MDA-MB-231 hücreleri.

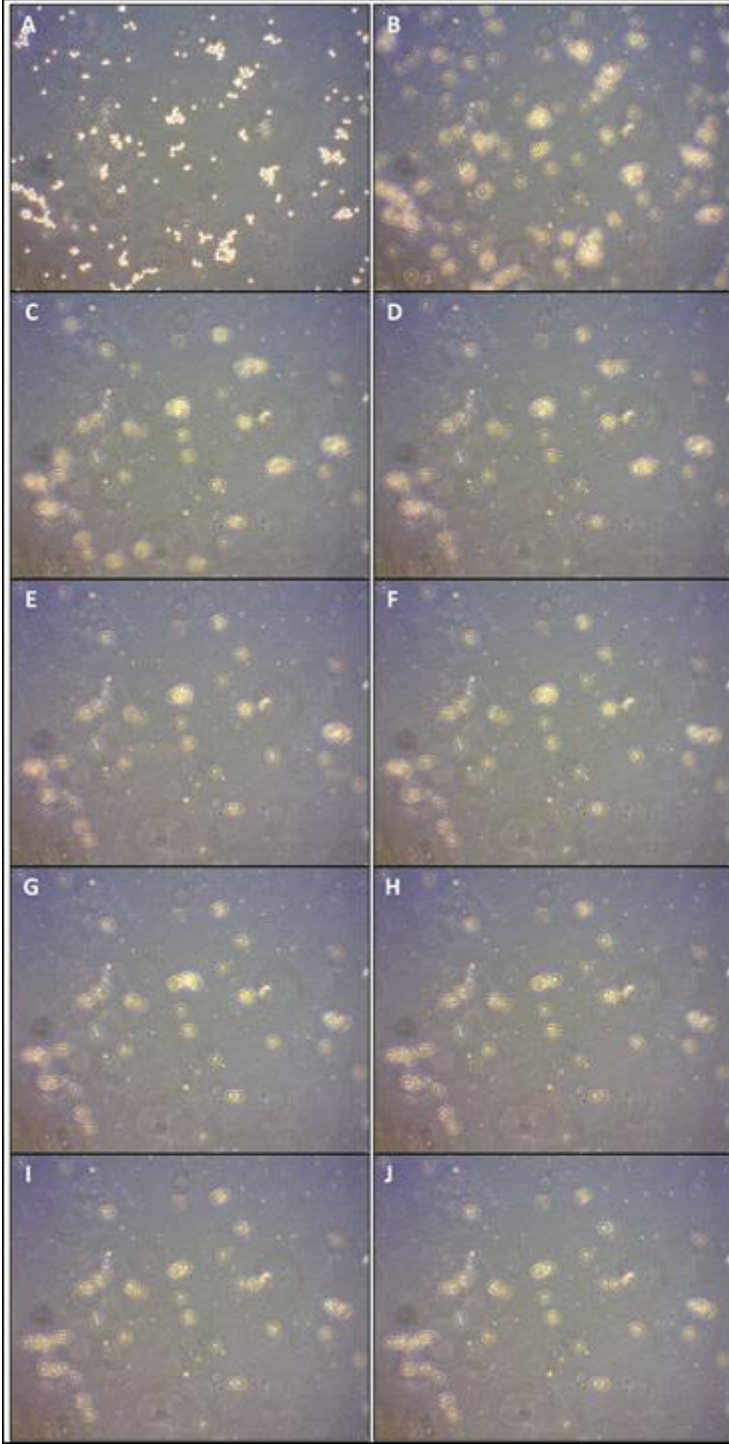
Akış hücrelerinin sisteme yüklenmesinden bir saat sonra başlatıldı. Sırasıyla 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00 dyn/cm<sup>2</sup> beşer dakika olarak uygulandı. Akış başlamadan önce yüzen (A) ve yüzeye yapışan (B) hücreler. C, D, E, F, G, H, I, J sırasıyla 5'er dakika akış sonlarında çekilmiş fotoğraflar.



Şekil 95. Akış gerilimi altında K-kazein kaplı İTO-cam yüzey üzerindeki MDA-MB-231 hücreleri.



Akış hücrelerinin sisteme yüklenmesinden bir saat sonra başlatıldı. Sırasıyla 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00 dyn/cm<sup>2</sup> beşer dakika olarak uygulandı. Akış başlamadan önce yüzen (A) ve yüzeye yapışan (B) hücreler. C, D, E, F, G, H, I, J sırasıyla 5'er dakika akış sonlarında çekilmiş fotoğraflar.



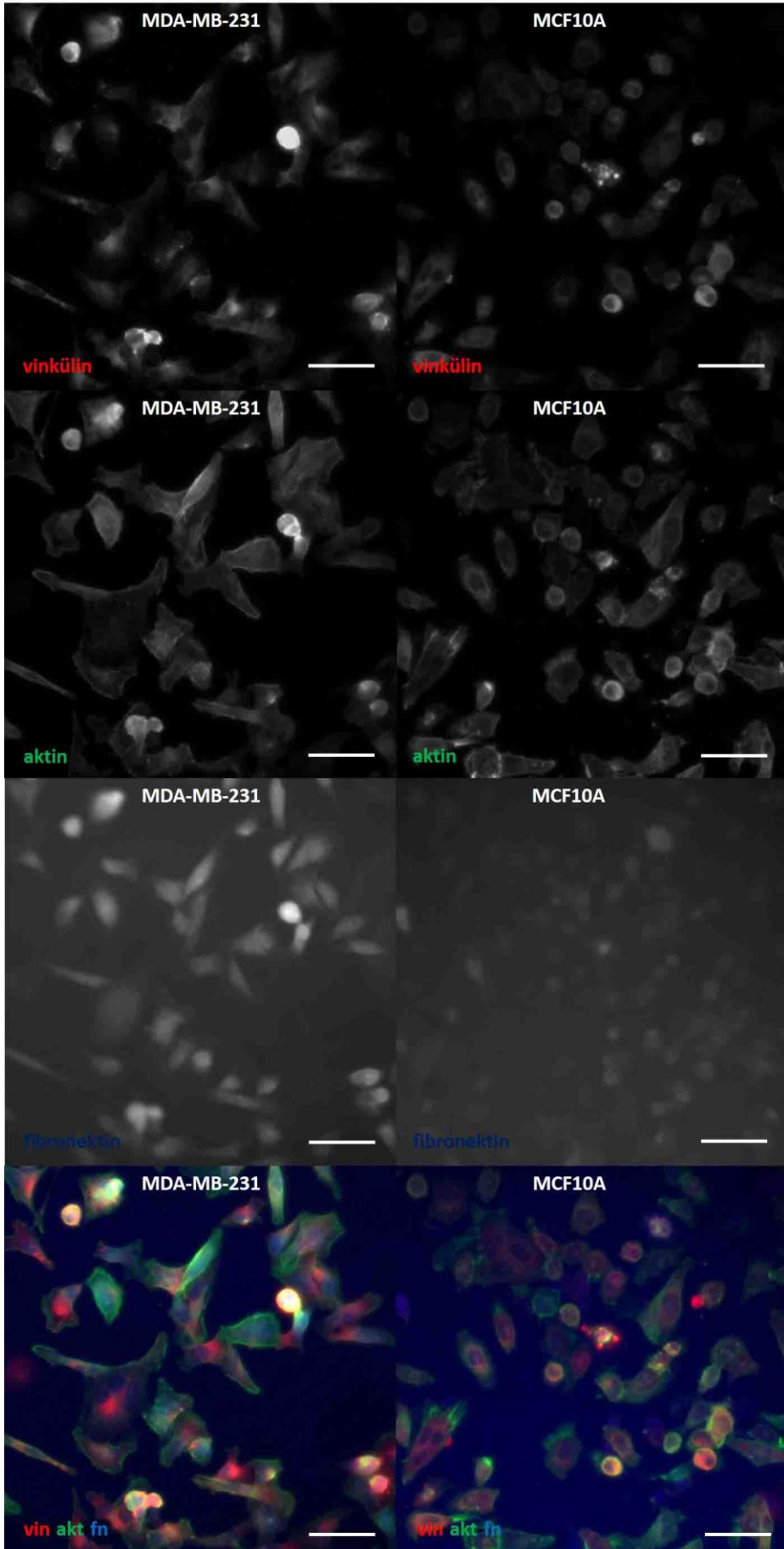
Şekil 96. Akış gerilimi altında K-kazein üzerine Fibronektin nano noktalarla kaplı İTO-cam yüzey üzerindeki MDA-MB-231 hücreleri.

Akış hücrelerinin sisteme yüklenmesinden bir saat sonra başlatıldı. Sırasıyla 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00 dyn/cm<sup>2</sup> beşer dakika olarak uygulandı. Akış başlamadan önce yüzen (A) ve yüzeye yapışan (B) hücreler. C, D, E, F, G, H, I, J sırasıyla 5'er dakika akış sonlarında çekilmiş fotoğraflar.

Yüzeye yapışan hücrelere uygulanan akış gerilimi bu hücreleri yüzeyden ayırmak için yeterli olmadı, ilaveten bir saatlik süre içinde yapışan hücrelerin sayıca azlığı hücrelerin yüzeye yapışmaları için tanınacak sürenin uzatılmasıyla çözülebilecek olsa da yine uygulanacak akış gerilimiyle hücreleri kaldırmak mümkün olmayacaktı. Burada akış gerilimini arttırmak hücreleri yüzeyden ayırabilmeyi sağlayabilirdi ancak akış geriliminin artmasıyla kullanılacak besiyer miktarının da artıyor olması ve akış süresine bağlı olarak büyük hacimlerde ihtiyaç duyulabileceği bu yöntemin dezavantajı olarak belirmektedir.

#### **3.4.2.1 Akış altında tek aktif desende MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin odaksal yapışmalarının karşılaştırılması**

Öngörülen yöntemlerden bir diğeri kanalda uzun süre ve düşük hızda akış sağlamaktı. Hücreler akışla kanala girecek ve düşük akış hızıyla yüzeye yapışabileceklerdi. Peristaltik pompanın rol aldığı bir akış sisteminin kurulmasıyla hücrelerin kanal içinden geçip tekrar hücre havuzuna dönebilmeleri sağlandı. Ayrıca hücre havuzu yani besiyerin içindeki hücreler ve kanallar 37° C sabit sıcaklıkta muhafaza edildiler. Akış 24 saat gerçekleştirildi ve 0,02 dyn/cm<sup>2</sup> akış gerilim değerinde sürdürüldü.

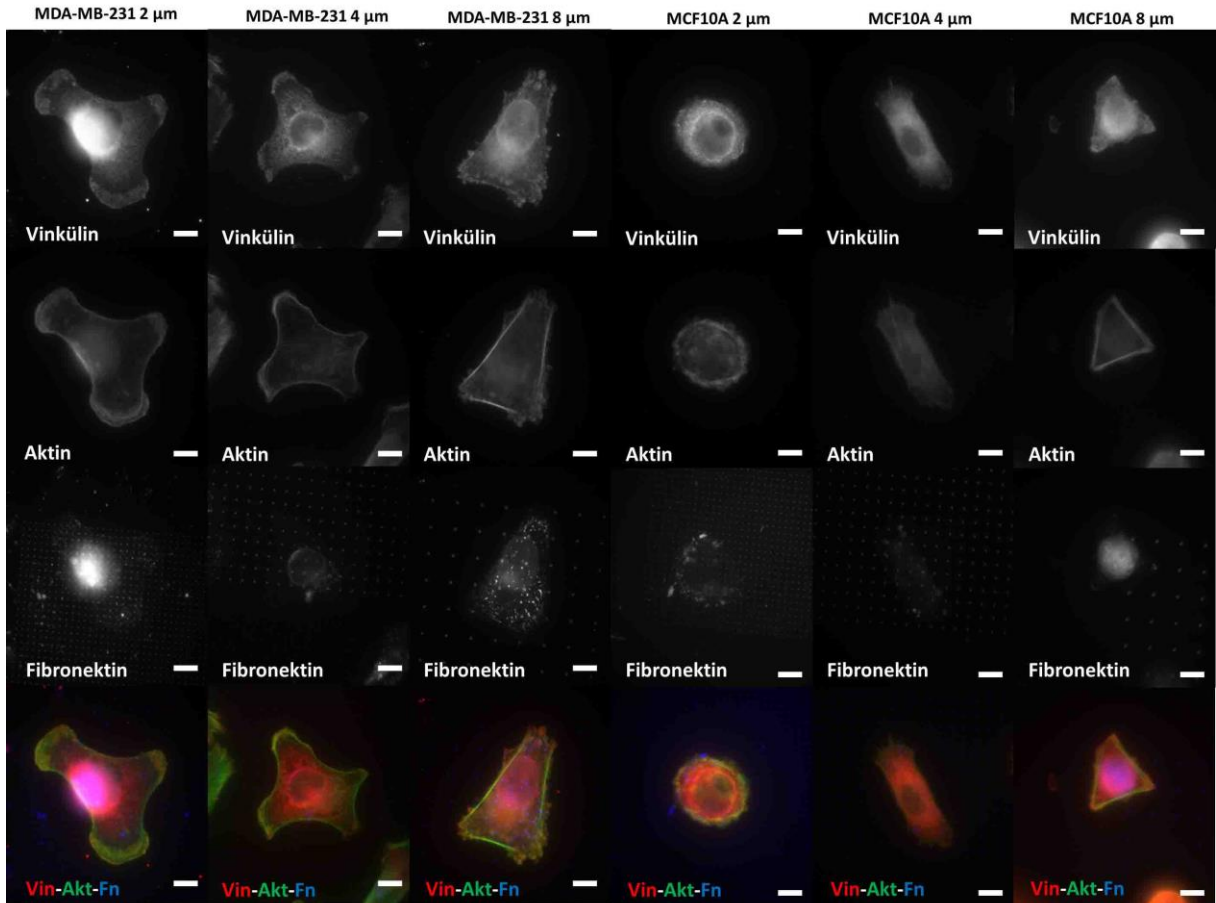




Şekil 97. Akış gerilimi altında MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin fibronektin kaplı yüzeydeki görüntüleri.

Hücreler yüzeye akış altındayken yapıştı. Vinkülin, aktin ve fibronektin fotoğraflarını takiben en altta bu üç kanalın birleştirilmiş görüntüsü verilmiştir. Akış süresi 24 saattir. Ölçek çubuğu 100 mikrometreyi göstermektedir.

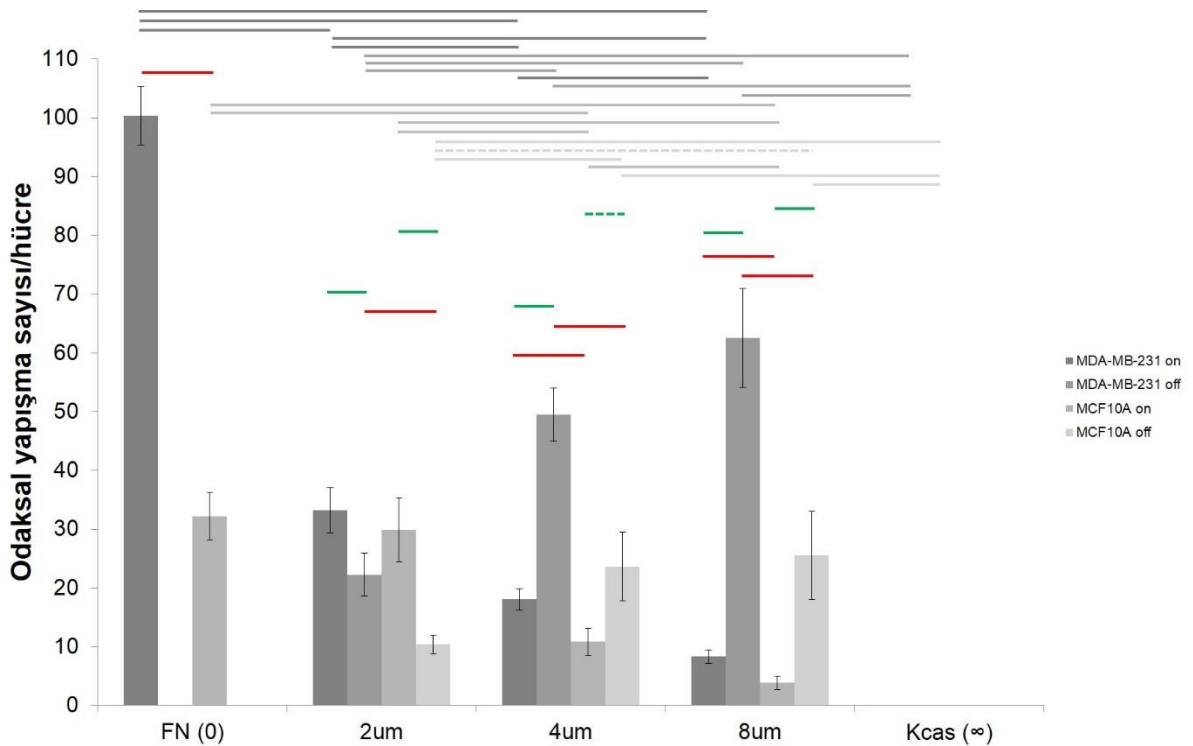
Fibronektin kaplı yüzeylerde her iki hücre tipi de akış altında tutunabilmekte ve yapışmayı sağlayabilmektedirler. Yüzeyin homojen bir şekilde fibronektin ile kaplanmış olması hücrelerin akış altında hareketliken yüzeye kurdukları her temasta hücre yüzeyinde bulunan integrinler aracılığıyla fibronektinlerle etkileşim kurabilmelerine olanak sağlamaktadır. Öte yandan yüzeye yapışmış her bir hücre akışla gelen başka bir hücrenin yüzeye tutunmasını kolaylaştırmaktadır, dolayısıyla hücre sayısının artırılmasıyla 24 saatlik akış sonunda fibronektin yüzeyin tamamen hücreler ile kaplandığı ve hücrelerin üstüste yığıldıkları da görülmüştür.



Şekil 98. Akış gerilimi altında K-kazein üzerine desenlenmiş fibronektin nanonoktalar içeren yüzeylere yapışmış MDA-MB-231 ve MCF10A hücreleri.

Vinkülin, aktin ve fibronektin kanallarının fotoğraflarına ilaveten bu üç kanalın birleştirilmiş şekillerini gösteren resimleri yukarıdan aşağıya sırasıyla verilmiştir. Hücreler yüzeye akış altındayken yapıştı. Akış süresi 24 saattir. Ölçek çubuğu 8 mikrometreyi göstermektedir. Akış yönü resimlerin üst kısmından alt kısmına doğrudur.

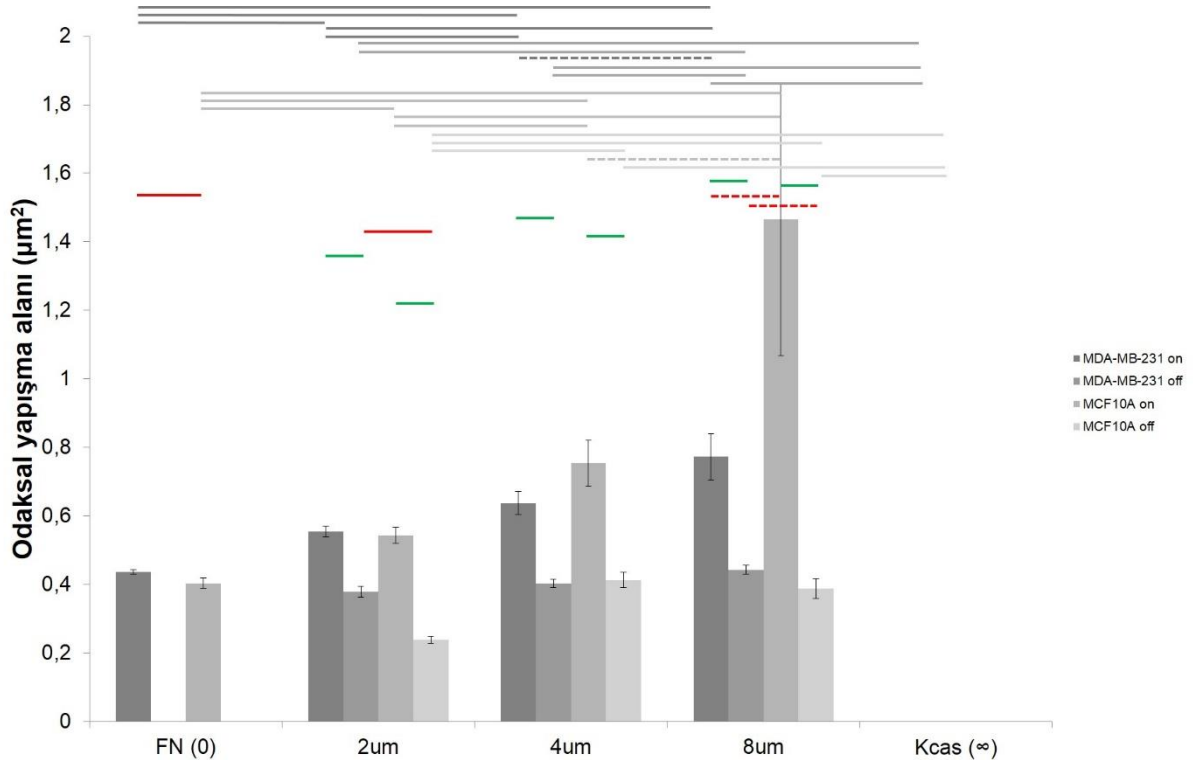
Hücrelerin akış sırasında yüzeylere yapışmalarının incelenmesi özellikle kanser hücrelerinin göçü sırasında maruz kaldıkları akış gerilimlerine bağlı mikroçevreyle olan etkileşimlerindeki değişimin belirlenmesinde önem arz etmektedir. Kullanılan akış hızına karşılık gelen akış gerilim değeri  $0,02 \text{ dyn/cm}^2$  ve bu değer kullandığımız ekipmanlarla yakalayabildiğimiz minimum değerdir. Sade kasein ve sade lamininin kaplı yüzeylerde uygulanan akış altında her iki hücre tipi de yapışma göstermemiştir. Desenlenmiş yüzeylerde nanonoktalar olarak bulunan fibronektin, hücrelerin akış altındayken tutunabilmelerine yeterince olanak vermemektedir, örneğin kasein üzerine fibronektin nanonokta desenli yüzeylerde yüzey alanın büyük çoğunluğu kaseindir. Şekil 98'de K-kazein kaplı yüzeyde fibronektin nanonoktalarıyla desenlenmiş çiplerle yapılan birçok deneme sonucunda elde edilmiş desen üzerinde yapışmış hücreler arasından seçilmiş örnekler görülmektedir. Bu hücreler maruz kaldıkları akış gerilimi sebebiyle aktin organizasyonlarında farklılaşmışlardır ve belirgin şekilde görülen hücre kenarlarında yoğunlaşmış aktin demetlerinin varlığıdır ancak kutupsallık bakımından incelendiğinde belirgin bir kutupsallaşma genel olarak görülmemektedir. Desen üzerine yapışan hücre sayısının yetersiz oluşu dolayısıyla hem aktin hem de odaksal yapışma analizlerini yapma imkanı oldukça zor sağlanmıştır.



Şekil 99. Akış altında Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile K-kazein yüzeyde desenlenmiş fibronektin nanonoktalar üzerinde hücre başına düşen odaksal yapışma sayılarının dağılımı.

MDA-MB-231 on kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MDA-MB-231 off kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MCF10A on normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MCF10A off normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma sayısını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

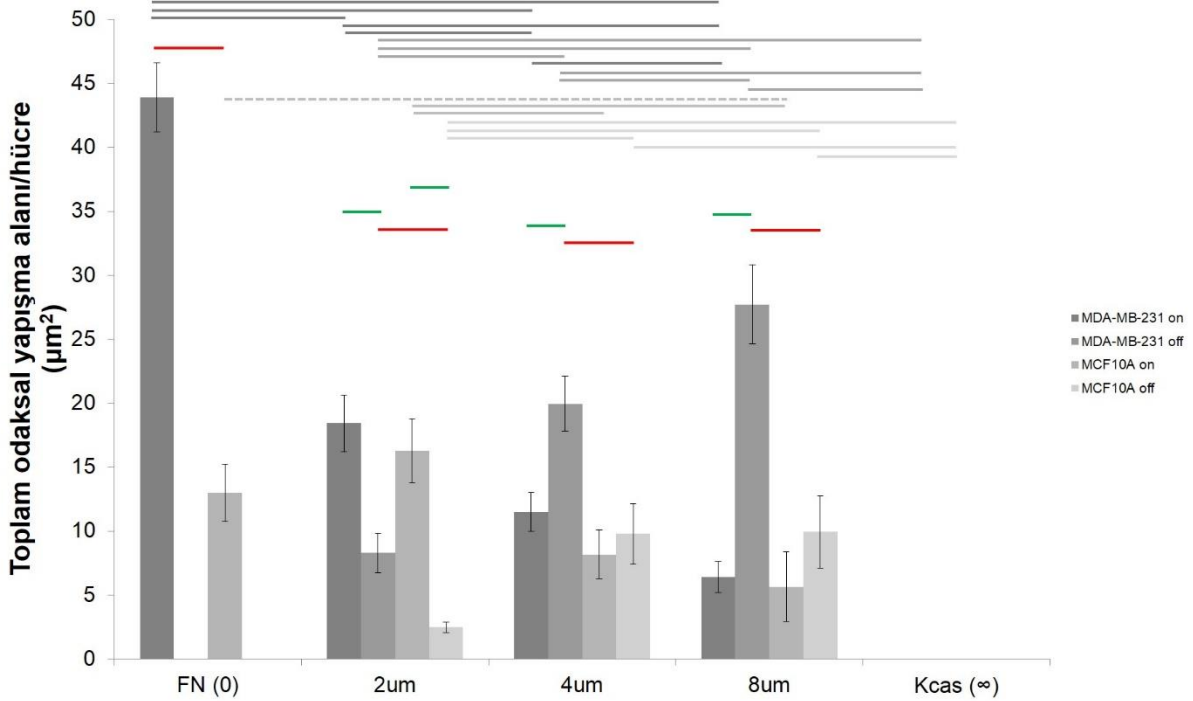
Her iki hücre tipi için de nanonoktalar üzerindeki odaksal yapışma sayıları nokta aralığı arttıkça azalmaktadır. Homojen fibronektin yüzey üzerinde MDA-MB-231 hücreleri MCF10A hücrelerine kıyasla sayıca fazla odaksal yapışmaları ile farklılaşmaktadırlar. MDA-MB-231 hücrelerinin uygulanan  $0,02 \text{ dyn/cm}^2$  akış gerilim değerinde fibronektin kaplı ve desenli yüzeylerde tutunmasını devamlı kılacak odaksal yapışma sayısını MCF10A hücrelerine kıyasla daha fazla tuttuğu görülmektedir. MCF10A hücreleri  $4 \mu\text{m}$  ve  $8 \mu\text{m}$  aralıklı fibronektin nanonokta desenli yüzeylerde kalıcı olmakta zorlanmıştır, bu durumun fibronektin nanonokta üzerinde yapılan odaksal yapışma sayısının ve nanonoktalar arasında yapılan odaksal yapışma sayısının MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla az olmasından kaynaklandığı öngörülmektedir. K-kazein kontrol yüzeylerinde akış altında yapışan hücre olmamıştır.



Şekil 100. Akış altında Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile K-kazein yüzeyde desenlenmiş Fibronektin nanonoktalar üzerinde odaksal yapışma alanı dağılımı.

MDA-MB-231 on kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MDA-MB-231 off kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MCF10A on normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MCF10A off normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma sayısını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

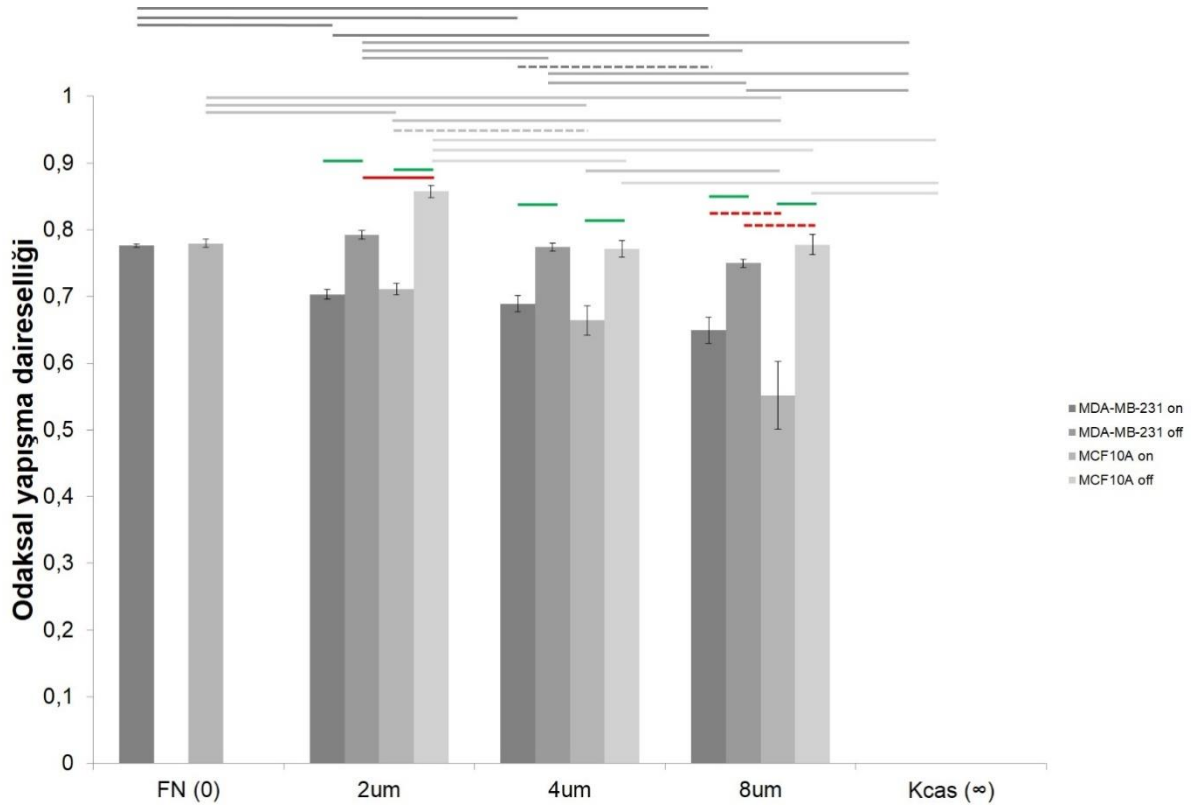
Odaksal yapışma alanlarının farklı yüzeylerde dağılım grafiğinde hem MDA-MB-231 hücrelerinin hem de MCF10A hücrelerinin desen aralığı arttıkça desen üzerindeki odaksal yapışma alanlarının arttığı görüldü. Her iki hücre tipi de oturdukları yüzeyde fibronektin nanonoktaların azalmasına bağlı olarak kurdukları odaksal yapışmaları kuvvetlendirmekte ve odaksal yapışma alanlarını arttırmaktadırlar. 2 mikrometre ve 8 mikrometre aralıklı desenler arasında yapılan odaksal yapışmalarının alanları her iki hücre tipi için farklılık göstermektedir.



Şekil 101. Akış altında Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile K-kazein üzerine desenlenmiş Fibronektin nanonoktalar içeren yüzeyler üzerinde hücre başına düşen odaksal yapışma alan toplamının dağılımı.

MDA-MB-231 on kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları toplam odaksal yapışma alanı, MDA-MB-231 off kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları toplam odaksal yapışma alanı, MCF10A on normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerindeki toplam yaptıkları odaksal yapışma alanı, MCF10A off normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları toplam odaksal yapışma alanını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

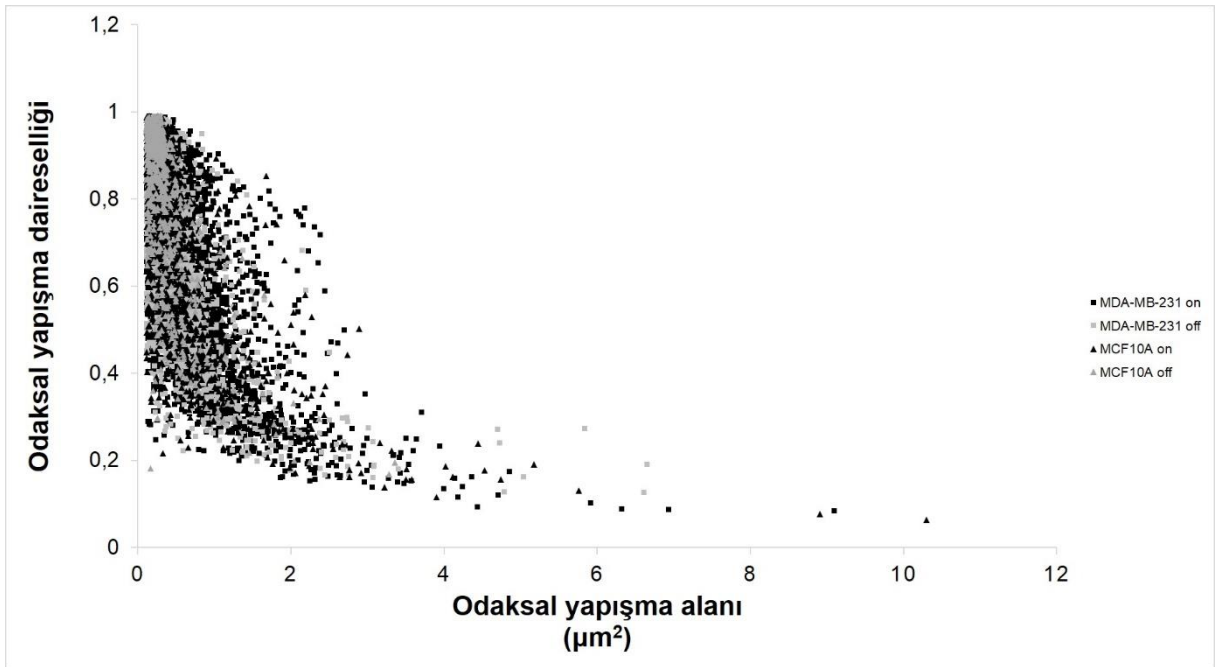
Hücre başına düşen odaksal yapışma alan toplamının farklı yüzeylerde dağılımı grafiğinde kanser ve normal epitel hücrelerinin desen aralığı arttıkça yaptıkları odaksal yapışma alanlarının toplamının azaldığını görüldü. 2, 4 ve 8 mikrometre aralıklı fibronektin nanonoktalar içeren yüzeylerde kanser ve normal epitel hücrelerinin nanonoktalar arasında yaptıkları toplam odaksal yapışma alanlarının farklılık göstermesi her iki hücre tipinin bu yüzeyler üzerindeki davranışlarının farklılaştığını göstermektedir. K-kazein yüzeye akış altında hücre yapışması olmamıştır.



Şekil 102. Akış altında Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile K-kazein üzerine desenlenmiş Fibronektin nanonoktalar içeren yüzeyler üzerinde odaksal yapışma daireselliğinin dağılımı.

MDA-MB-231 on kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma daireselliği, MDA-MB-231 off kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma daireselliği, MCF10A on normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma daireselliği, MCF10A off normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma daireselliğini göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

Odaksal yapışma daireselliğinin farklı yüzeylerde dağılımını gösteren grafikte her iki hücre tipinin de fibronektin nanonokta üzerinde yaptıkları odaksal yapışmalarının daireselliğinin nanonoktalar arasında yaptıkları odaksal yapışmaların daireselliğinden farklı olduğu görüldü. Hücreler nanonokta desenler üzerinde odaksal yapışmalarını dairesellikten uzaklaşarak çizgisel hale getirmektedirler.



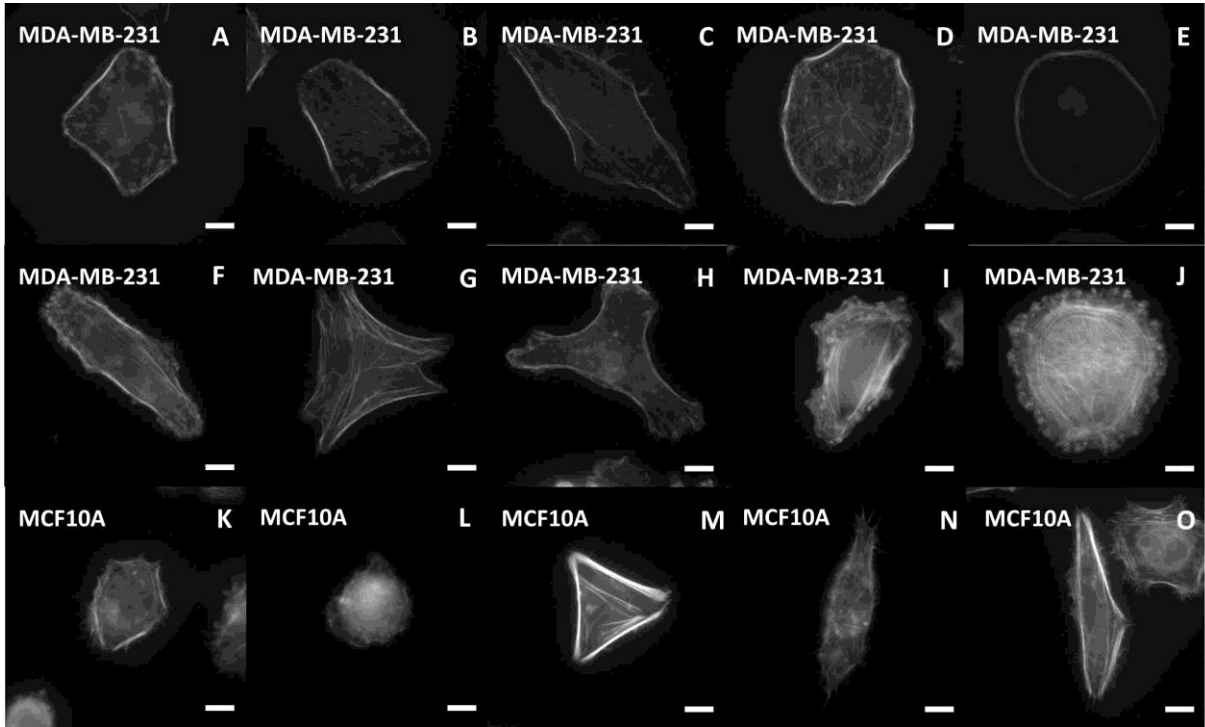
Şekil 103. Akış altında tek aktif yüzeylerde odaksal yapışma alanlarının odaksal yapışma daireselliğine bağlı dağılımı.

MDA-MB-231 on kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini, MDA-MB-231 off kanser epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini, MCF10A on normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar üzerinde yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini, MCF10A off normal epitel hücrelerinin nanodesen noktalar arasında

yaptıkları odaksal yapışma alanlarını ve karşılık gelen odaksal yapışma daireselliğini göstermektedir.

Odaksal yapışma alanlarının odaksal yapışma daireselliğine bağlı dağılımını gösteren grafikte hücrelerin odaksal yapışma alanlarının artmasıyla odaksal yapışmaların dairesellikten çıkıp çizgiselleştiği gözlemleniyor.

### 3.4.2.2 Akış altında tek aktif desende MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin aktin iskeleti analizinden gelen bulgular



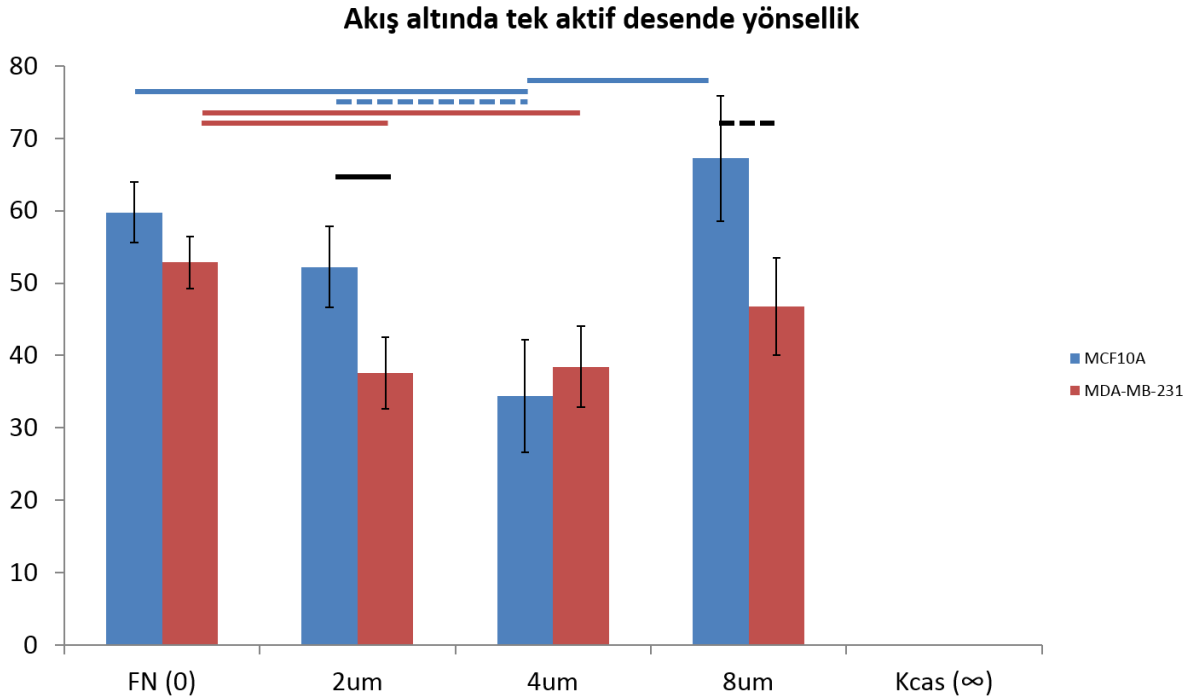
Şekil 104. Akış gerilimi altında fibronektin yüzeye yapışmış MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin aktin organizasyonları.

Hücreler yüzeye akış altındayken yapıştılar. Akış süresi 24 saattir. Ölçek çubuğu 8 mikrometreyi göstermektedir.

MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin akış altında fibronektin yüzeye yapışmaları ve yüzeyde yapıştıkları andan itibaren de akış gerilimine maruz kalmaları hücrelerin aktin organizasyonlarındaki farklılaşmaya yol açmaktadır. MDA-MB-231 hücreleri morfolojik açıdan ve aktin organizasyonunun çeşitliliği bakımından MCF10A hücrelerine kıyasla daha zengindir. Şekil 104 üzerinde MDA-MB-231 hücrelerinin aktin organizasyonlarına bakıldığında A: merkezi bir aktin halatına tutunmuş radyal aktin iplikçikleri ve hücre kenarlarında yoğunlaşmış aktin demetleri, B: aktin noktalarınınca zengin ve kısmen kutupsallaşmış aktin iplikçileriyle hücre

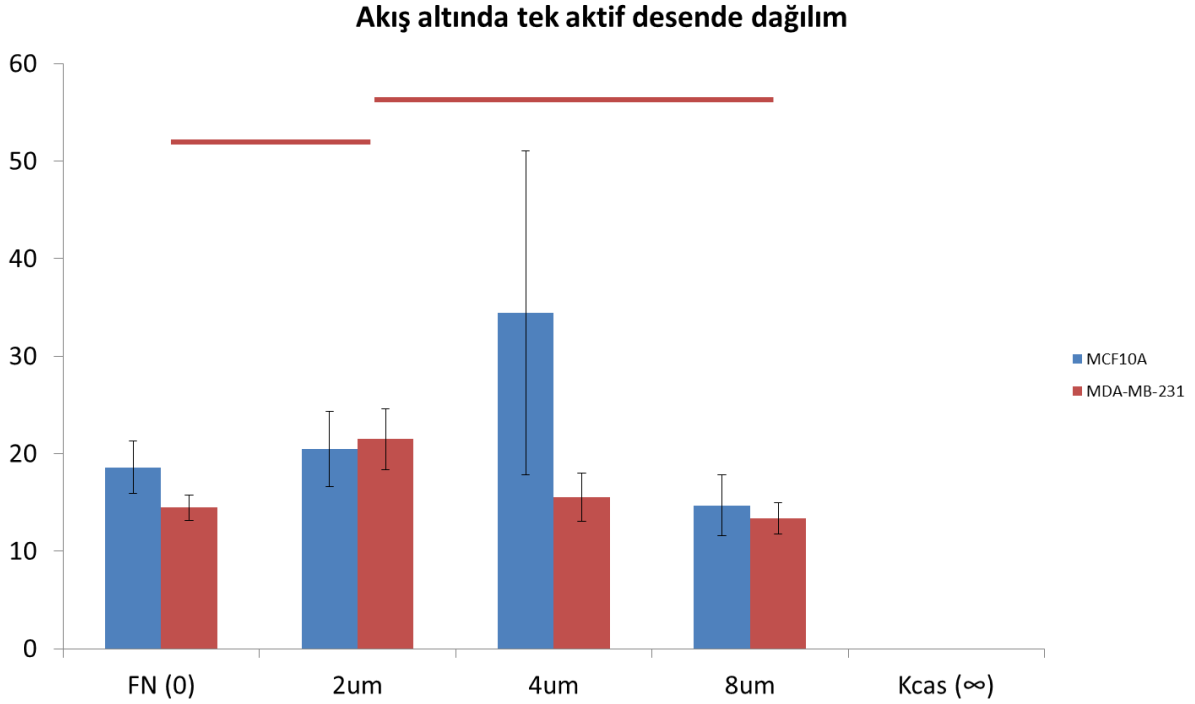


kenarlarında yoğunlaşmış aktin demetleri, C: bölgesel kutupsallıklar ve kesişmeler yansıtan aktin iplikçikleriyle yine hücre kenarlarında bölgesel aktin demetleri, D: radyal organizasyonlu aktin iplikçikleriyle hücre kenarlarında yoğunlaşmış aktin demetleri, E: yalnızca hücre kenarlarında yoğunlaşmış aktin demetleri, F: birbirine paralel organize olmuş aktin iplikçikleriyle hücre bazında kutupsallık ve hücre kenarlarında bölgesel yoğunlaşmış aktin demetleri, G: kesişen aktin iplikçikleriyle hücre kenarlarında yoğunlaşmış demetleri, H: aktin noktalarının zengin ve yalnızca hücre kenarlarında yoğunlaşmış aktin organizasyonları, I: merkezi organizasyonu olmayan hücre kenarlarının yakınında ve hücre kenarlarında organize olmuş aktin demetleri ve J: merkezde kompleks iken hücre kenarlarına kadar içiçe daireler şeklinde organize olmuş aktin iplikçikleri görülüyor. Şekil 104 üzerinde MCF10A hücrelerinin aktin organizasyonlarına bakıldığında ise K: hücre içinde organize olmamış ve hücre kenarlarında bölgesel bazda yoğunlaşmış aktin demetleri, L: hücre içinde organize olmamış hücre kenarlarında yoğunlaşmamış aktin iplikçikleri, M: hücre içinde az sayıda kalın aktin iplikçikleriyle hücre kenarlarında yoğunlaşmış aktin demetleri, N: hücre içinde kesişen ve bölgesel bazda kısmen kutuplaşmış aktin iplikçikleriyle hücre kenarlarında yoğun olmayan aktin organizasyonu, O: hücre içinde organize olmamış ama hücre kenarlarında yoğunlaşmış aktin demetleri görülüyor.



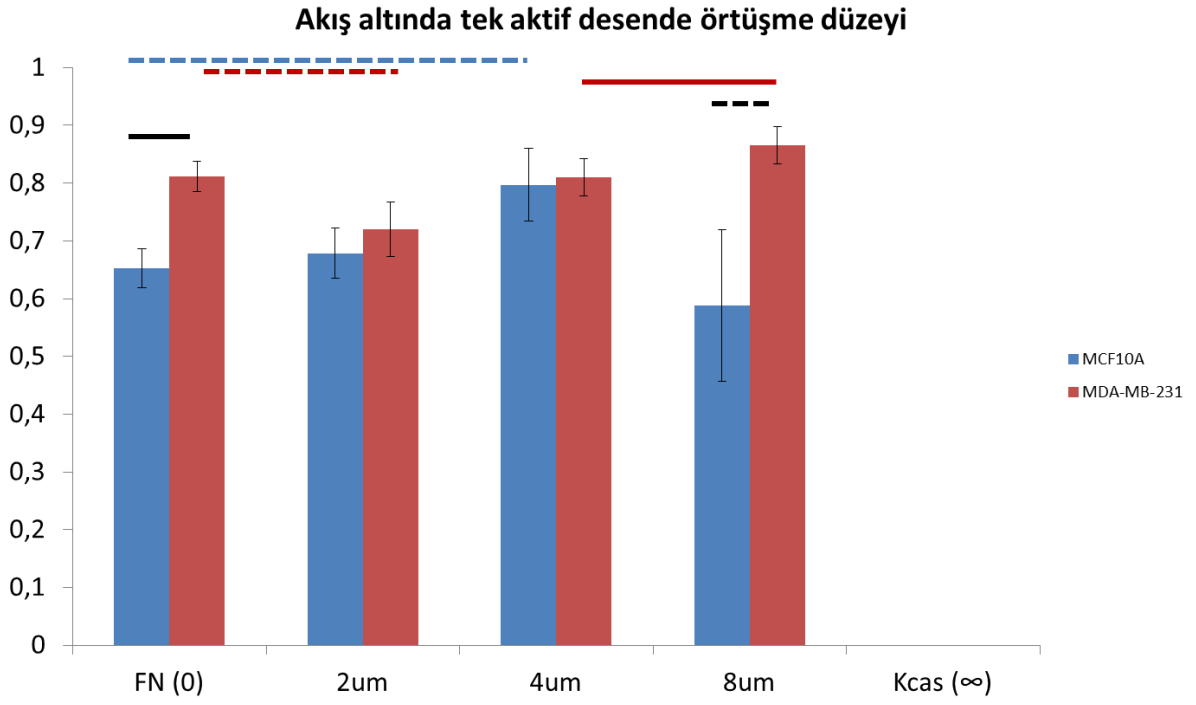
Şekil 105. Akış altında MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ve nanonoktalar üzerinde açıları-Yönsellik grafiği.

Akış altında hücrelerin aktin iskeletlerinin yönselliğini gösteren grafiğe bakıldığında her iki hücre tipinin 2 ve 8  $\mu\text{m}$  aralıklı fibronektin nanonoktalar içeren yüzeyler üzerinde birbirlerinden farklılaştığını görmekteyiz. MCF10A hücreleri 4  $\mu\text{m}$  aralıkta diğer yüzeylerden daha düşük açılı bir yönsellikle farklılaşmıştır.



Şekil 106. Akış altında Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde aktin iskeletindeki iplikçiklerin kartezyen koordinatlarındaki açılarının dağılımları.

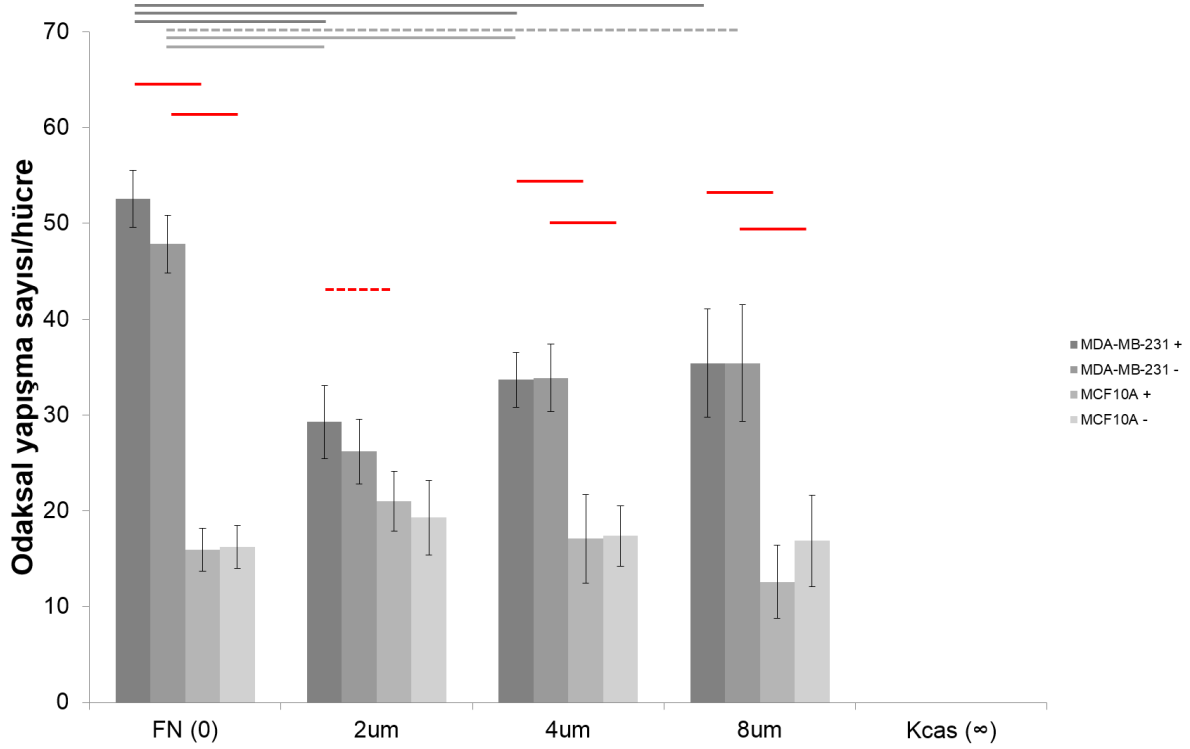
Dağılım grafiğinde görülen MDA-MB-231 hücrelerinin 2  $\mu\text{m}$  aralıklı desenlenmiş yüzey üzerinde fibronektin kontrol ve 8  $\mu\text{m}$  aralıklı desenlenmiş yüzeyden farklılaştığıdır. Yüksek dağılım değeri yönsellikte çeşitliliğin fazla olduğunu göstermektedir, grafikte dağılım değerlerinin düşük değerlerde seyrettiği görülmektedir yani hücreler aktin iskeletlerinin büyük çoğunluğunu belirli bir yönsellikte yahut açıda organize etmektedirler.



Şekil 107. Akış altında Fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile nanonoktalar üzerinde hücre içindeki aktin iskeletin hücre içi dağılımındaki uyumu.

Örtüşme düzeyleri değerlendirildiğinde fibronektin kontrol ve 8 µm aralıklı desenlenmiş yüzeyde iki hücre tipinin birbirinden farklılaştığı ve bu yüzeylerde MCF10A hücrelerinin örtüşme düzeyinin düşük olduğu görülür.

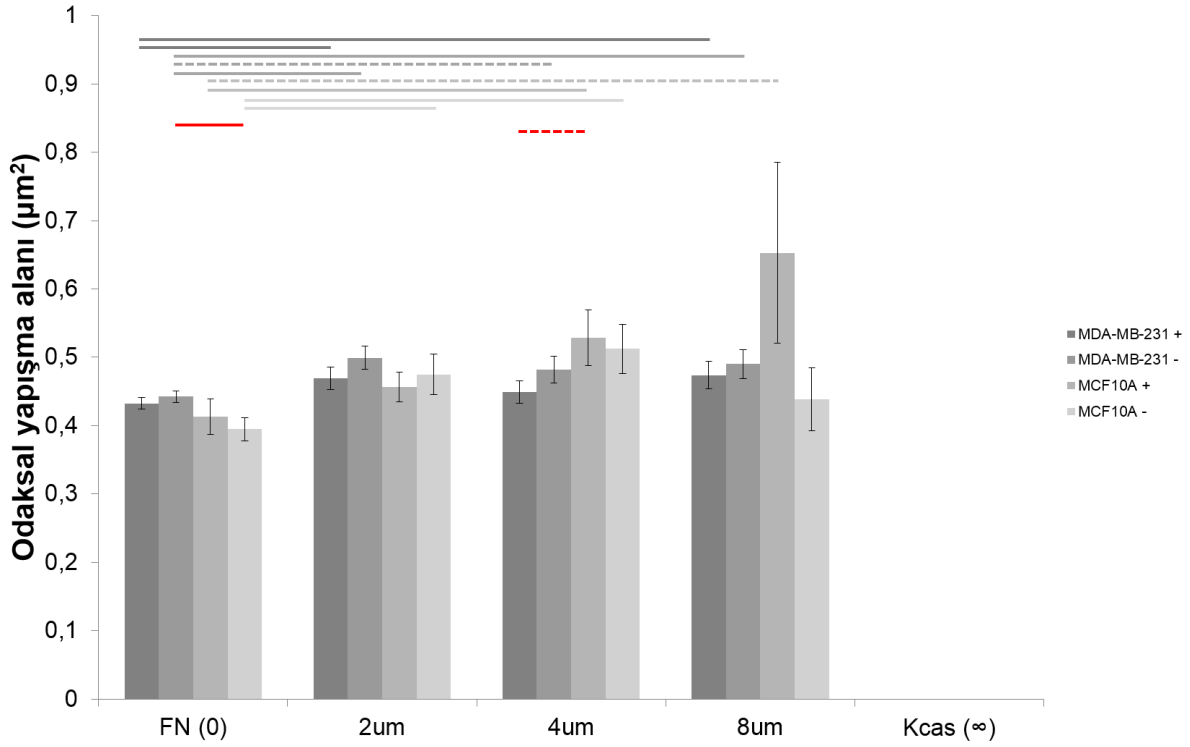
### 3.4.2.3 Akış altında tek aktif desende MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin odaksal yapışmalarının ve aktin iskeletlerinin kutupsallığının karşılaştırılması



Şekil 108. Akış altında MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile K-kazein üzerine desenlenmiş fibronektin nanonoktalar içeren yüzeylerde odaksal yapışma sayılarının dağılımı.

MDA-MB-231 + kanser epitel hücrelerinin akışın geldiği yönde yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MDA-MB-231 -kanser epitel hücrelerinin akışın tersi yönde yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MCF10A + normal epitel hücrelerinin akışın geldiği yönde yaptıkları odaksal yapışma sayısını, MCF10A - normal epitel hücrelerinin akışın tersi yönde yaptıkları odaksal yapışma sayısını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

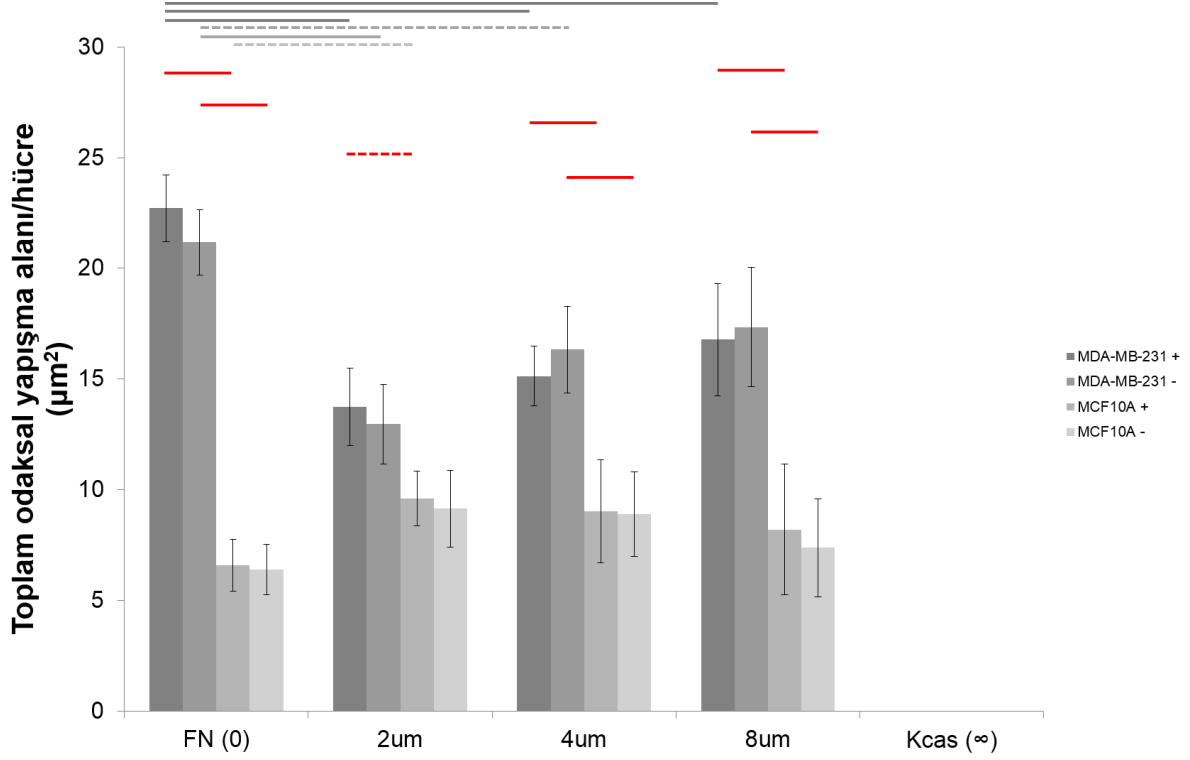
Akış altında odaksal yapışma sayılarını gösteren grafiğe bakıldığında her iki hücrenin de kendi içerisinde kutupsallık göstermediği fakat birbirleri arasında her iki kutup için de farklılaştıklarını görmekteyiz. MDA-MB-231 hücreleri her iki kutuplar derecesinde MCF10A hücrelerine kıyasla sayıca fazla odaksal yapışma oluşturmuştur.



Şekil 109. Akış altında MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile K-kazein üzerine desenlenmiş fibronektin nanonoktalar içeren yüzeylerde odaksal yapışma alanlarının dağılımı.

MDA-MB-231 + kanser epitel hücrelerinin akışın geldiği yönde yaptıkları odaksal yapışma alanını, MDA-MB-231 - kanser epitel hücrelerinin akışın tersi yönde yaptıkları odaksal yapışma alanını, MCF10A + normal epitel hücrelerinin akışın geldiği yönde yaptıkları odaksal yapışma alanını, MCF10A - normal epitel hücrelerinin akışın tersi yönde yaptıkları odaksal yapışma alanını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

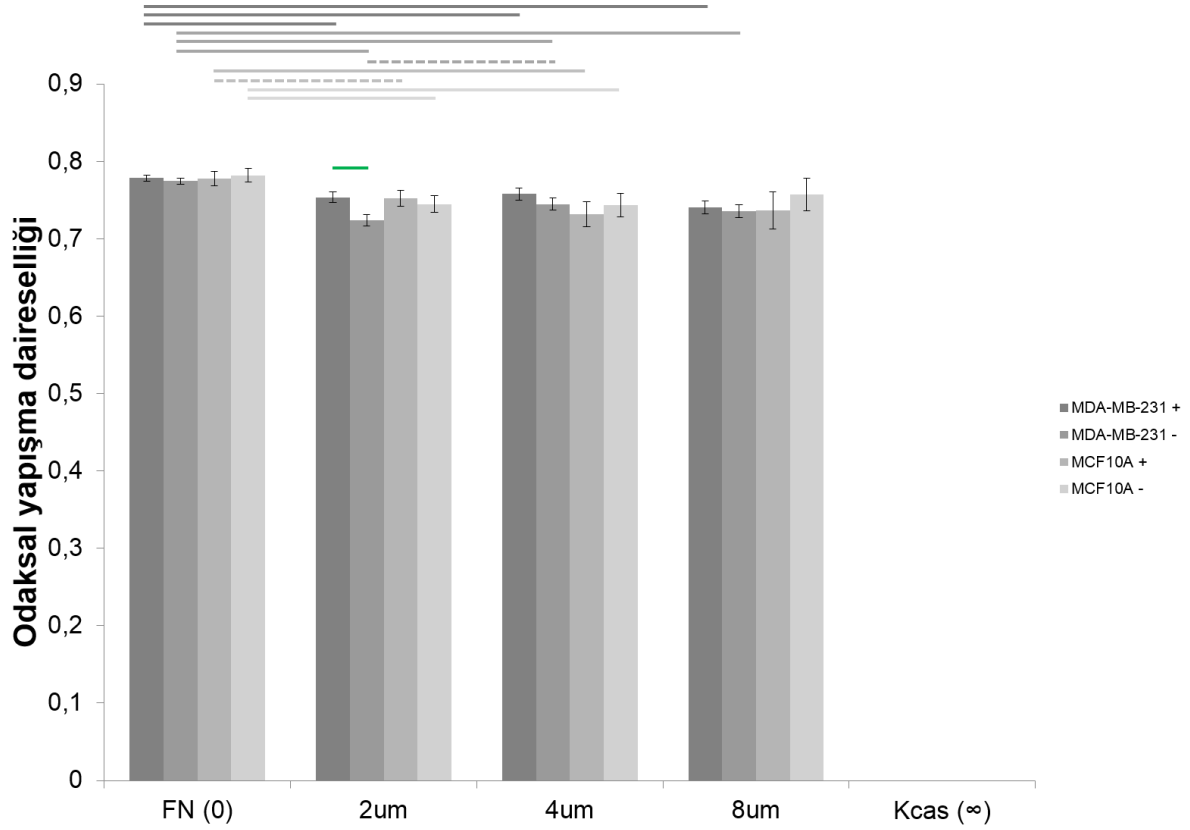
Akış altında her iki hücrenin odaksal yapışma alan büyüklüğü kutuplar için yaklaşık değerlerde seyretmektedir. Fibronektin kontrol yüzeyinde negatif kutuplar ve 4 µm aralıklı desenlenmiş yüzeyinde pozitif kutuplarda her iki hücre tipinin odaksal yapışma alanlarının birbirinden farklılaştığı görülmektedir. Fibronektin kontrol yüzeydeki odaksal yapışma alanı her iki hücre tipi için de desenlenmiş yüzeylere kıyasla daha küçük değerlerdedir.



Şekil 110. Akış altında MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile K-kazein üzerine desenlenmiş fibronektin nanonoktalar içeren yüzeylerde hücre başına düşen toplam odaksal yapışma alanının dağılımı.

MDA-MB-231 + kanser epitel hücrelerinin akışın geldiği yönde yaptıkları toplam odaksal yapışma alanını, MDA-MB-231 - kanser epitel hücrelerinin akışın tersi yönde yaptıkları toplam odaksal yapışma alanını, MCF10A + normal epitel hücrelerinin akışın geldiği yönde yaptıkları toplam odaksal yapışma alanını, MCF10A - normal epitel hücrelerinin akışın tersi yönde yaptıkları toplam odaksal yapışma alanını göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

Akış altında hücre başına düşen odaksal yapışma alan toplamının farklı yüzeylerde dağılımı grafiğinde kanser ve normal epitel hücreleri kendi içlerinde kutupsallık göstermezken birbirlerinden her iki kutup derecesinde farklılaşırlar. MDA-MB-231 hücreleri daha fazla odaksal yapışma alanına sahiptirler. MCF10A hücrelerinin akış geriliminden çok daha fazla etkilendiği ve odaksal yapışma oluşturmada ve güçlendirmekte zorlandığı göz önüne çıkmaktadır.

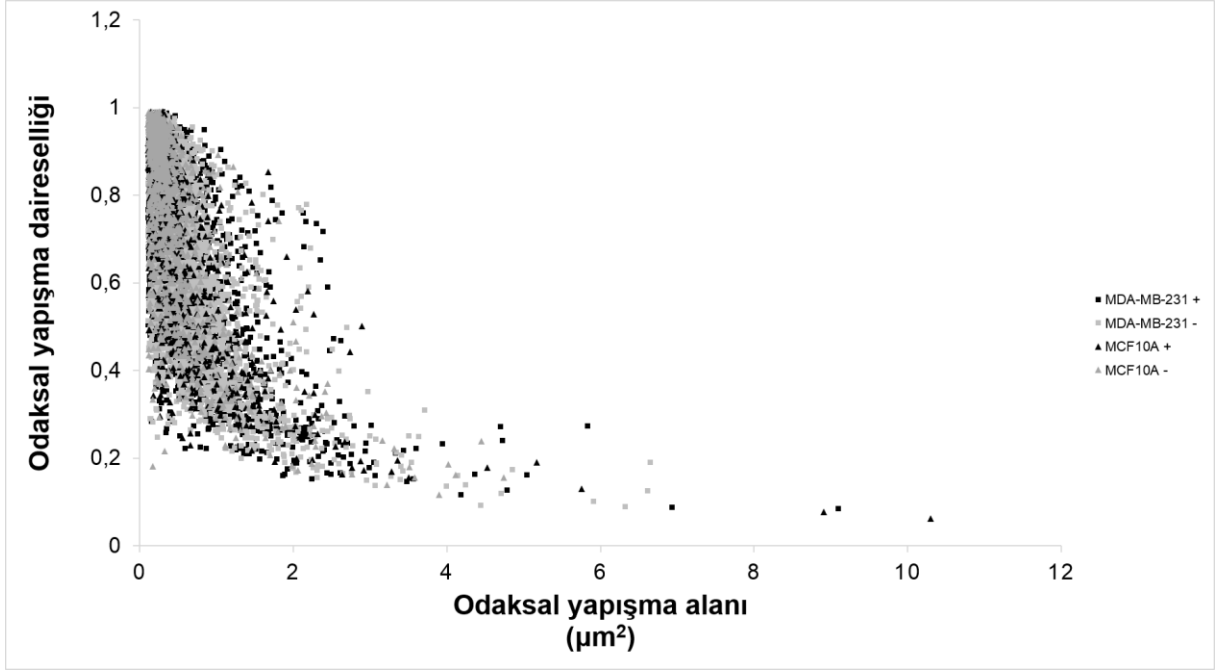


Şekil 111. Akış altında MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin fibronektin ve K-kazein kontrol yüzeyleri ile K-kazein üzerine desenlenmiş fibronektin nanonoktalar içeren yüzeylerde odaksal yapışma daireselliğinin dağılımı.

MDA-MB-231 + kanser epitel hücrelerinin akışın geldiği yönde yaptıkları odaksal yapışma daireselliğini, MDA-MB-231 - kanser epitel hücrelerinin akışın tersi yönde yaptıkları odaksal yapışma daireselliğini, MCF10A + normal epitel hücrelerinin akışın geldiği yönde yaptıkları odaksal yapışma daireselliğini, MCF10A - normal epitel hücrelerinin akışın tersi yönde yaptıkları odaksal yapışma daireselliğini göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

Akış altında odaksal yapışma daireselliğinin farklı yüzeylerde dağılımını gösteren grafikte her iki hücre tipinin de fibronektin kontrol yüzeylerde yaptığı odaksal yapışmaların her iki kutup seviyesinde de diğer desenlenmiş yüzeylere kıyasla daha dairesel olduğu görülmektedir. Desenlenmiş yüzeylerde odaksal yapışma dairesellikleri genel olarak yaklaşık değerlerde seyretmekte olup daha çizgiseldirler. İlaveeten MCF10A hücreleri fibronektin kontrol ve 8 µm aralıklı desenlenmiş yüzeyler üzerinde odaksal yapışma daireselliği bakımından farklılaşmamıştır.

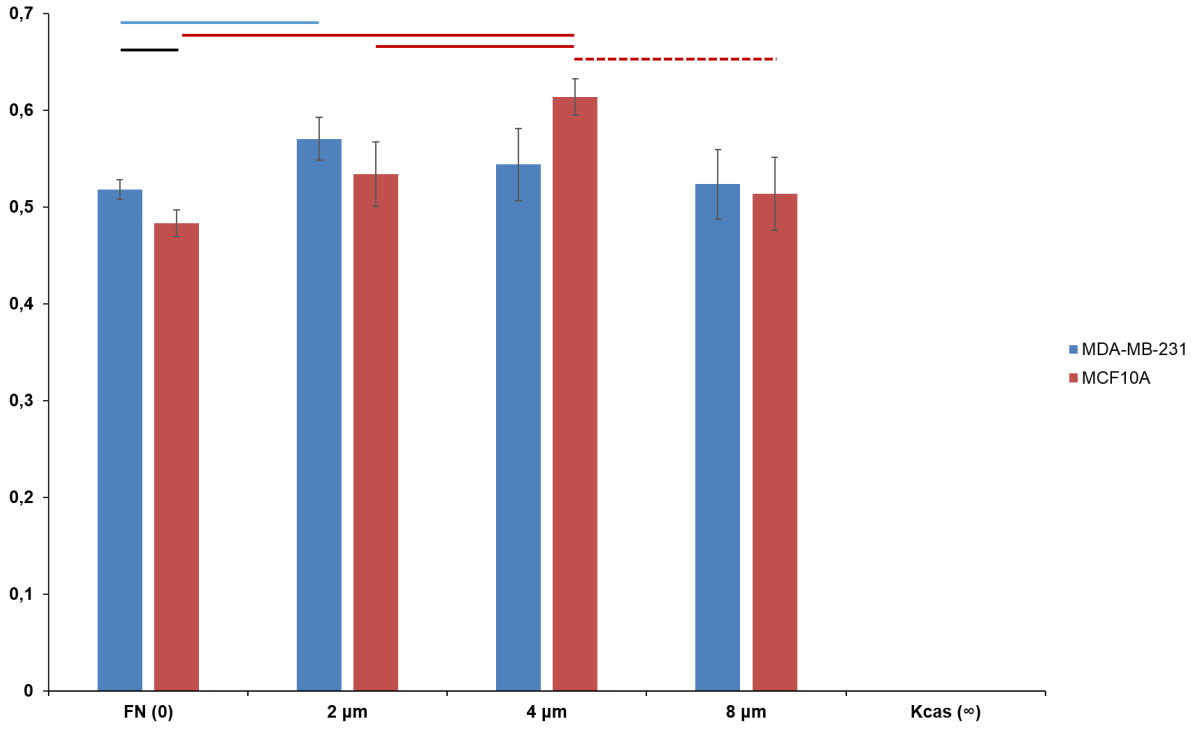




Şekil 112. Akış altında tek aktif nanodesen üzerinde odaksal yapışma alanlarının odaksal yapışma daireliliğine bağlı dağılımı.

MDA-MB-231 + kanser epitel hücrelerinin akışın geldiği yönde yaptıkları odaksal yapışmaların alanına karşılık gelen daireliliği, MDA-MB-231 - kanser epitel hücrelerinin akışın tersi yönde yaptıkları odaksal yapışma alanına karşılık gelen daireliliği, MCF10A + normal epitel hücrelerinin akışın geldiği yönde yaptıkları odaksal yapışma alanına karşılık gelen daireliliği, MCF10A - normal epitel hücrelerinin akışın tersi yönde yaptıkları odaksal yapışma alanına karşılık gelen daireliliği göstermektedir. Yatay tam çizgiler karşılaştırılan iki grup arasında çift kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde, yatay kesikli çizgiler ise tek kuyruklu  $p < 0.05$  seviyesinde istatistiksel fark olduğunu gösteriyor.

Odaksal yapışma alanlarının odaksal yapışma daireliliğine bağlı dağılımını gösteren grafikte hücrelerin odaksal yapışma alanlarının artmasıyla odaksal yapışmaların dairelilikten çıkıp doğrusallaştığı görülmektedir.



Şekil 113. Akış gerilimi altında kazein üzerine desenlenmiş fibronektin nanonoktalar içeren yüzeylere yapışmış MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin aktin kutupsallığı.

Akış altında kontrol yüzeylere ve desenlenmiş yüzeylere yapışan hücrelerin kutupsallık verilerini yansıtan grafiğe bakıldığında  $0,02 \text{ dyn/cm}^2$  akış geriliminin akış yönünde bir kutupsallık yarattığı yani akışın geldiği yönde daha fazla aktin yoğunlaşmasının bulunduğu görülmektedir. Kutupsallık değerlerinin  $0,5$  değerine yakın değerlerde seyretmesi ise varolan kutupsallığın minimum ölçekte değerlendirilebileceğini anlatmaktadır. MCF10A hücrelerinin  $4 \mu\text{m}$  aralıklı fibronektin nanonoktalar içeren desen üzerinde daha belirgin kutupsallık göstermesi bu gruptaki hücrelerin tutunmalarının ardından reotropizm göstermeye başladıklarına dair ipucu vermektedir.

#### 4. TARTIŞMA/SONUÇ/ÖNERİLER

Proje dahilinde gerçekleştiren çalışmalarda MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin hücreler arası madde proteinlerinden fibronektin ve laminin ile olan etkileşimleri hücre mikroçevresinin yüzeylerde taklitlenmesiyle odaksal yapışmalar ve aktin organizasyonları bazında incelenmiştir. Tek aktif çalışmalarında yüzey kapatıcı olarak K-kazein ile kaplanıp desenler fibronektin ile oluşturulurken; çift aktif çalışmalarında yüzey kapatıcı olarak laminin ile kaplanmış ve desenler fibronektin kaplanarak oluşturulmuştur. Her iki çalışmada da saydam ve iletken İTO-kaplı camların kullanılması mikroskop altında yapılan görüntülemelerin sorunsuz yapılabilmesini sağlamıştır. İTO camın protein kaplamasına uygun hale getirilmesi

için kullanılan öncü APTES ve glutaraldehid kaplamaları iyi sonuçlar vermiştir. K-kazein kaplı camlar üzerine yapılan EDL desenlemesinin ardından fibronectin ile oluşan nanonoktaların kaplanması uygun konsantrasyonlarda sorunsuz yürütülürken, çift aktif yüzey sağlamak amacıyla fibronectin kaplı camların EDL desenlemesinden sonra laminin ile kaplanması birçok yolun denenmesine rağmen başarılı olamamıştır, bu yüzden laminin kaplı camlar EDL ile desenlenmiş ve oluşan desenler fibronectin ile kaplanarak sonuca varılmıştır. Laminin proteininin fibronectin ve K-kazein proteinlerine kıyasla daha çabuk bozulduğu ve düzensizleştiği göz önüne alınarak laminin kullanılan yüzeylerin deneyleri vakit geçirilmeden yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda elde edilen hücre alanları ve eksen oranları bulgularına göre tek aktif yüzeyler üzerinde MDA-MB-231 hücrelerinin alanları fibronectin kontrol yüzeyinden itibaren desen aralığı arttıkça azalmakta, MCF10A hücreleri ise fibronectin kontrol yüzeyinde geniş alanlara yayılmışken desen üzerinde ve K-kazein kontrol yüzeyinde yaklaşık aynı alanlara yayılmışlardır; eksen oranlarından gelen bulgulara bakıldığında MDA-MB-231 hücrelerinin bütün yüzeyler (FN- 2 µm - 4 µm - 8 µm – K-kazein) üzerinde birbirine benzer ve dairesellikten uzak bir morfolojiye sahip olduğu, MCF10A hücrelerinin ise FN kontrol ve K-kazein kontrol yüzeylerde daha dairesel iken farklı aralıklı FN nanonokta desenleri içeren yüzeylerde birbirine benzer ama dairesellikten uzak bir morfolojiye sahip oldukları görülüyor. MDA-MB-231 ve MCF10A hücreleri sade fibronectin kaplı veya sade K-kazein kaplı yüzeylerde eksen oranlarına bakılarak tanınabilirler. Tek aktif yüzeylerde odaksal yapışma analizlerinden gelen bulgulara bakıldığında MDA-MB-231 ve MCF10A hücrelerinin oturdukları yüzeylerde fibronectin nanonoktaların azalmasına bağlı olarak kurdukları odaksal yapışmaların kuvvetlendiği ve odaksal yapışma alanlarının arttığı, desen aralığının artmasıyla hücre başına düşen toplam odaksal yapışma alanının azaldığı, fibronectin nanonoktalar üzerinde kurdukları odaksal yapışmaların çizgisel olduğu ve desen aralığının artmasıyla fibronectin nanonoktalar üzerinde kurulan odaksal yapışma sayısının azaldığı sonucuna varılıyor. Tek aktif yüzeylerde yapılan odaksal yapışma analizlerinde her iki hücre tipinin odaksal yapışmalarını desene bağlı olarak kurduğu ve organize ettiği belirlenmiştir. Hücrelerin aralıkları 2, 4 ve 8 mikrometre fibronectin nanonoktali desenlerden özellikle 4 mikrometre aralıklı fibronectin nanonoktalar içeren desenler üzerinde hücre yapışmalarının farklılaştığı açık bir şekilde görülmüştür. Tek aktif yüzeylerde aktin iskeletinin analizinden gelen sonuçlara göre hücrelerin aktin organizasyonlarının desenler üzerinde yönsellik kazandığı sonucuna varılmakta fakat hücrelerin odaksal yapışmalarla ilişkilenecek aktinlerinin analizin berraklığını bozduğu belirlenmiştir. Çift aktif yüzeyler üzerinde alan ve eksen oranı bulgularına bakıldığında hücrelerin fibronectin yüzeylerde geniş alanlara yayıldıkları, MCF10A hücrelerinin desen aralığına bağlı olarak hücre alanlarının değiştiğini, aralık arttıkça alan azalıyor, MDA-MB-231 hücrelerinin ise geniş ölçekte bakıldığında desen aralığından bağımsız olarak yüzeyde

yayıldıkları; eksen oranları bakımından ise MCF10A hücrelerinin desen aralığının artmasına bağlı olarak bir ekseninde genişlemesi söz konusuysen, MDA-MB-231 hücreleri için eksen oranının yüzeye bağlı değişiminin olmadığı sonucuna varılmaktadır. Çift aktif yüzeyler için yapılan odaksal yapışma analizlerinden gelen bulgular değerlendirildiğinde her iki hücre tipinin fibronektin nanonoktalar üzerinde kurdukları odaksal yapışmaların alanının desen aralığının artmasıyla arttığı ve bu yapışmaların çizgisel olduğu, fibronektin nanonoktalar üzerindeki odaksal yapışma sayısının ve hücre başına düşen toplam odaksal yapışma alanının desen aralığı arttıkça azaldığı sonucuna varılmıştır. Çift aktif yüzeylerdeki hücrelerin aktin organizasyonlarının tek aktif yüzeylere kıyasla farklılık içerdiği belirlenmiştir; çift aktif yüzeylerde MCF10A hücreleri desenli ve kontrol yüzeylerinde farklılık göstermezken MDA-MB-231 hücreleri 4 mikrometre aralıklı desen bulunan yüzeyler ile kontrol yüzeylerinde aktin iplikçiklerini 45 derecelik açı civarında tutarlarken 2 ve 8 mikrometrelilik desenlerde yönsellik açıları daha düşük değerlerde seyretmektedir. Çift aktif yüzeylerde yürütülen çalışmalarda hücrelerin odaksal yapışmalarının ve aktin organizasyonlarının yüzeyde oluşturulan desene bağlı değiştiği sonucuna varılmıştır. Yüzeyin laminin ve fibronektin proteinlerini içermesi hücrelerin normalde buldukları mikroçevrelere daha yakın yüzeyler oluşturulmasını sağladığından aktin organizasyonlarının da bu çerçevede farklılaşmaya başladıkları düşünülmektedir öyle ki odaksal yapışmalarla ilişkilenecek aktin iplikçikleri de hücreye özgü organizasyon karakterini bu yüzeylerde ortaya çıkarabilmiştir. Tek aktif ve çift aktif yüzeylerde yapılan gradyan desenlemeyle normal ve kanser hücrelerinin yüzeye bağlı kutupsallaşma eğilimleri odaksal yapışma ve aktin organizasyonu mertebesinde değerlendirilmiştir. Tek aktif gradyan deseni üzerinden elde edilen odaksal yapışma kutupsallığı verilerine göre MDA-MB-231 kanser hücreleri orta aralıklı gradyan bölgelerinde belirgin bir kutupsallığa sahipken MCF10A hücreleri gradyan desen aralıklarına özgü kutupsallaşmışlardır. Çift aktif gradyan desenleme çalışmalarından gelen odaksal yapışma kutupsallığı verilerinde ise MDA-MB-231 hücrelerinin dar aralıklı gradyan bölgelerinde daha fazla kutupsallaştığı MCF10A hücrelerinin ise orta aralıklı gradyan bölgelerinde belirgin kutupsallık değerlerine sahip oldukları görülmüştür. Gradyan desenleme üzerinde aktin kutupsallıkları incelendiğinde MDA-MB-231 hücrelerinin çift aktif desen üzerinde daha fazla kutupsallaştığı, MCF10A hücrelerinin ise kutupsallık yönünün tek aktifte gradyan yönüyle çifte aktifte gradyan yönünün tersine eğimli olduğu ortaya çıkmıştır. Kutupsallık çalışmalarının bir başka evresini de akış deneyleri oluşturmaktadır; bu kez yüzey kaynaklı bir kutupsallıktan çok hücrelere yapılan fiziksel müdahalenin bir sonucu olarak doğacak odaksal yapışma ve aktin kutupsallığı sınırlanmıştır. Akış gerilimi altında hücrelerin incelenmesi uygulanan farklı yöntemlerle sağlanamamış, sabit ve düşük bir akış gerilimi altında hücrelerin aktif yüzeyler üzerinden sirkülasyonunu temel alan bir yöntemin kullanılmasıyla odaksal yapışma ve aktin iskeleti analizlerinin yapılmasını

mümkün kılacak yeterli veri sağlanabilmiştir. Kanal genişliğinin ve yüksekliğinin arttırılmasıyla uygulanabilececek akış gerilim değeri asgari düzeye çekilmiş fakat eldeki ekipmanlarla elde edilebilen en düşük akış gerilim değeri  $0.02 \text{ dyn/cm}^2$  olmuş ve uygulamalarda fibronektin yüzeye yapışmalar görülürken K-kazein ve laminin kaplı yüzeylere yapışmalar olmamıştır. Akış hızının dokular arasında gerçekleşen değer aralığında uygulanması hücrelerin desen içeren yüzeylere yapışmalarını kolaylaştırabilirdi ancak uygulanan değer literatür taramalarında bulunan teorik hesaplamalarla elde edilmiş değerlerin üst sınırına yakın bir değerd. Dokular arası akış hızı değerlerine ulaşabilmek için çok daha hassas pompalara ihtiyaç duyulmakta veya akışın pompaya dayalı olmadan, örneğin osmozla, yapıldığı sistemlerin kurulması gerekmektedir; kanal boyutlarının arttırılması seçeneği kanal içinde akışı düzensizleştirdiği için sınırlayıcıdır. Akış altında hücrelerin aktin organizasyonlarını değiştirdikleri gözlemlenmiştir ancak kutupsallık analizinden gelen sonuçlar belirgin bir kutupsallaşmanın genel olarak oluşmadığını anlatmaktadır. Burada dikkat çeken sonuç MCF10A hücrelerinin  $4 \mu\text{m}$  aralıklı fibronektin nanonoktalar içeren yüzeyler üzerinde reotropik bir hareketlenmelerinin olabileceğidir. Akış gerilimine maruz kalan hücrelerin odaksal yapışma analizlerinden gelen grafiklere baktığımızda ise akış geriliminin normal ve kanser hücrelerinin odaksal yapışma karakterlerini durgun ortama kıyasla gittikçe farklılaştırdığını gördük. Projeden alınan sonuçlar ışığında kanser hücreleriyle normal hücrelerin buldukları mikroçevreye özgü odaksal yapışmalar kurdukları ve hücre biyolojisinin değişimine yönelik önemli işleyişlerin bu mikroçevrenin etkisinde şekillendiği desteklenmiştir. Hücrelerin özellikle  $4 \mu\text{m}$  aralıklı desenler üzerinde davranış farklılıklarını daha belirgin yansıtmaları odaksal yapışmaların ve aktin iskeletinin yapısal olarak hücreye özgü bir karaktere büründüğüne işaret etmekte ve odaksal yapışmaların aktin iplikçikleriyle köprülenebilmesi için uygun bir aralık olarak ön plana çıkmaktadır. Hücreler arası maddenin taklittenmesine ilişkin yürütülecek benzer çalışmalarla, tasarlanmış farklı desenler ve farklı proteinlerin kombinasyonlarıyla, tümör mikroçevresinin anlaşılması ve bu çevreye müdahale edilebilmesine yarayacak etkin yöntemlerin bulunmasının yanı sıra metastas evresine girmiş kanserlerde göç eden hücrelere doğrudan müdahale edilebilme imkanının da sağlanabileceği kanısındayız.

## Referanslar

- Agheli, H., Malmstrom, J., Larsson, E.M., Textor, M. and Sutherland, D.S. 2006. "Large area protein nanopatterning for biological applications", *Nano Lett*, 6, 1165-71.
- Alonso, J.M., Ondarcuhu, T. and Bittner, A.M. 2013. "Integration of plant viruses in electron beam lithography nanostructures", *Nanotechnology*, 24, 105305.

- Alsberg, E., Feinsein, E., Joy, M.P., Prentiss, M. and Ingber, D.E. 2006. "Magnetically-guided self-assembly of fibrin matrices with ordered nano-scale structure for tissue engineering", *Tissue Eng*, 12, 3247-56.
- Aumailley, M. and Smyth, N. 1998. "The role of laminins in basement membrane function", *J Anat*, 193 ( Pt 1), 1-21.
- Beerling, E., Ritsma, L., Vrisekoop, N., Derksen, P.W. and van Rheenen, J. 2011. "Intravital microscopy: new insights into metastasis of tumors", *J Cell Sci*, 124, 299-310.
- Berginski, M.E., Vitriol, E.A., Hahn, K.M. and Gomez, S.M. 2011. "High-resolution quantification of focal adhesion spatiotemporal dynamics in living cells", *PLoS One*, 6, e22025.
- Berrier, A.L. and Yamada, K.M. 2007. "Cell-matrix adhesion", *J Cell Physiol*, 213, 565-73.
- Biggs, M.J., Richards, R.G. and Dalby, M.J. 2010. "Nanotopographical modification: a regulator of cellular function through focal adhesions", *Nanomedicine*, 6, 619-33.
- Blystone, S.D. 2004. "Integrating an integrin: a direct route to actin", *Biochim Biophys Acta*, 1692, 47-54.
- Boudreau, N.J. and Jones, P.L. 1999. "Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come", *Biochem J*, 339 ( Pt 3), 481-8.
- Cavalcanti-Adam, E.A., Volberg, T., Micoulet, A., Kessler, H., Geiger, B. and Spatz, J.P. 2007. "Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands", *Biophys J*, 92, 2964-74.
- Chaffer, C.L. and Weinberg, R.A. 2011. "A perspective on cancer cell metastasis", *Science*, 331, 1559-64.
- Chang, S.F., Chang, C.A., Lee, D.Y., Lee, P.L., Yeh, Y.M., Yeh, C.R., Cheng, C.K., Chien, S. and Chiu, J.J. 2008. "Tumor cell cycle arrest induced by shear stress: Roles of integrins and Smad", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 3927-32.
- Chen, C.S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G.M. and Ingber, D.E. 1997. "Geometric control of cell life and death", *Science*, 276, 1425-8.
- Ciobanasu, C., Faivre, B. and Le Clainche, C. 2013. "Integrating actin dynamics, mechanotransduction and integrin activation: the multiple functions of actin binding proteins in focal adhesions", *Eur J Cell Biol*, 92, 339-48.
- Cramer, L.P., Siebert, M. and Mitchison, T.J. 1997. "Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force", *J Cell Biol*, 136, 1287-305.
- Danen, E.H. and Yamada, K.M. 2001. "Fibronectin, integrins, and growth control", *J Cell Physiol*, 189, 1-13.

- Deeg, J.A., Louban, I., Aydin, D., Selhuber-Unkel, C., Kessler, H. and Spatz, J.P. 2011. "Impact of local versus global ligand density on cellular adhesion", *Nano Lett*, 11, 1469-76.
- Elineni, K.K. and Gallant, N.D. 2011. "Regulation of cell adhesion strength by peripheral focal adhesion distribution", *Biophys J*, 101, 2903-11.
- Fletcher, D.A. and Mullins, R.D. 2010. "Cell mechanics and the cytoskeleton", *Nature*, 463, 485-92.
- Friedl, P. and Wolf, K. 2010. "Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model", *J Cell Biol*, 188, 11-9.
- Gattazzo, F., Urciuolo, A. and Bonaldo, P. 2014. "Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche", *Biochim Biophys Acta*, 1840, 2506-2519.
- Geiger, B., Spatz, J.P. and Bershadsky, A.D. 2009. "Environmental sensing through focal adhesions", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 21-33.
- Gilcrease, M.Z. 2007. "Integrin signaling in epithelial cells", *Cancer Lett*, 247, 1-25.
- Gill, B.J. and West, J.L. 2014. "Modeling the tumor extracellular matrix: Tissue engineering tools repurposed towards new frontiers in cancer biology", *J Biomech*, 47, 1969-78.
- Gingras, J., Rioux, R.M., Cuvelier, D., Geisse, N.A., Lichtman, J.W., Whitesides, G.M., Mahadevan, L. and Sanes, J.R. 2009. "Controlling the orientation and synaptic differentiation of myotubes with micropatterned substrates", *Biophys J*, 97, 2771-9.
- Goode, B.L. and Eck, M.J. 2007. "Mechanism and function of formins in the control of actin assembly", *Annu Rev Biochem*, 76, 593-627.
- Gordon, L.A., Mulligan, K.T., Maxwell-Jones, H., Adams, M., Walker, R.A. and Jones, J.L. 2003. "Breast cell invasive potential relates to the myoepithelial phenotype", *Int J Cancer*, 106, 8-16.
- Groll, J., Lessey, B 2009. "Implantation". *Glob. libr. women's med.*
- Gutierrez, E., Petrich, B.G., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H., Groisman, A. and Kasirer-Friede, A. 2008. "Microfluidic devices for studies of shear-dependent platelet adhesion", *Lab Chip*, 8, 1486-95.
- Harjanto, D. and Zaman, M.H. 2010. "Matrix mechanics and receptor-ligand interactions in cell adhesion", *Org Biomol Chem*, 8, 299-304.
- Helmke, B.P., D., G.R. and F., D.P. 2000. "Rapid Displacement of Vimentin Intermediate Filaments in Living Endothelial Cells Exposed to Flow", *Circulation Research*, 86, 745-752.
- Helmke, B.P., Thakker, D.B., Goldman, R.D. and Davies, P.F. 2001. "Spatiotemporal analysis of flow-induced intermediate filament displacement in living endothelial cells", *Biophys J*, 80, 184-94.



- Hoang, X.D., Martin, M., Jimenez, A., Beauvais, J., Charette, P., Kirk, A. and Tabrizian, M. 2008. "Fabrication and characterization of patterned immobilization of quantum dots on metallic nano-gratings", *Biosens Bioelectron*, 24, 976-81.
- Hoffman, B.D., Grashoff, C. and Schwartz, M.A. 2011. "Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction", *Nature*, 475, 316-23.
- Hollinger, J.O., 2011. *An Introduction to Biomaterials*, Second ed. CRC Press.
- Hood, J.D. and Cheresch, D.A. 2002. "Role of integrins in cell invasion and migration", *Nat Rev Cancer*, 2, 91-100.
- Horzum, U., Ozdil, B. and Pesen-Okvur, D. 2014. "Micrometer scale spacings between fibronectin nanodots regulate cell morphology and focal adhesions", *Materials Research Express*, 1, 025402.
- Hynes, R.O. 2002. "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines", *Cell*, 110, 673-87.
- Hytonen, V.P. and Wehrle-Haller, B. 2014. "Protein conformation as a regulator of cell-matrix adhesion", *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16, 6342-6357.
- Jang, K.J., Cho, H.S., Kang do, H., Bae, W.G., Kwon, T.H. and Suh, K.Y. 2011. "Fluid-shear-stress-induced translocation of aquaporin-2 and reorganization of actin cytoskeleton in renal tubular epithelial cells", *Integr Biol (Camb)*, 3, 134-41.
- JinSeok, P., Hong-Nam, K., Deok-Ho, K., Levchenko, A. and Kahp-Yang, S. 2012. "Quantitative Analysis of the Combined Effect of Substrate Rigidity and Topographic Guidance on Cell Morphology", *NanoBioscience, IEEE Transactions on*, 11, 28-36.
- Kern, A. and Marcantonio, E.E. 1998. "Role of the I-domain in collagen binding specificity and activation of the integrins alpha1beta1 and alpha2beta1", *J Cell Physiol*, 176, 634-41.
- Kim, M.C., Kim, C., Wood, L., Neal, D., Kamm, R.D. and Asada, H.H. 2012. "Integrating focal adhesion dynamics, cytoskeleton remodeling, and actin motor activity for predicting cell migration on 3D curved surfaces of the extracellular matrix", *Integr Biol (Camb)*, 4, 1386-97.
- Kou, S., Pan, L., van Noort, D., Meng, G., Wu, X., Sun, H., Xu, J. and Lee, I. 2011. "A multishear microfluidic device for quantitative analysis of calcium dynamics in osteoblasts", *Biochem Biophys Res Commun*, 408, 350-5.
- Krause, M., Dent, E.W., Bear, J.E., Loureiro, J.J. and Gertler, F.B. 2003. "Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration", *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19, 541-64.
- Lawler, K., O'Sullivan, G., Long, A. and Kenny, D. 2009. "Shear stress induces internalization of E-cadherin and invasiveness in metastatic oesophageal cancer cells by a Src-dependent pathway", *Cancer Sci*, 100, 1082-7.

- Le Clainche, C., Dwivedi, S.P., Didry, D. and Carlier, M.F. 2010. "Vinculin is a dually regulated actin filament barbed end-capping and side-binding protein", *J Biol Chem*, 285, 23420-32.
- Le Devedec, S.E., Yan, K., de Bont, H., Ghotra, V., Truong, H., Danen, E.H., Verbeek, F. and van de Water, B. 2010. "Systems microscopy approaches to understand cancer cell migration and metastasis", *Cell Mol Life Sci*, 67, 3219-40.
- Li, J.R., Shi, L., Deng, Z., Lo, S.H. and Liu, G.Y. 2012. "Nanostructures of designed geometry and functionality enable regulation of cellular signaling processes", *Biochemistry*, 51, 5876-93.
- Lichtner, R.B., Howlett, A.R., Lerch, M., Xuan, J.A., Brink, J., Langton-Webster, B. and Schneider, M.R. 1998. "Negative cooperativity between alpha 3 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins in human mammary carcinoma MDA MB 231 cells", *Exp Cell Res*, 240, 368-76.
- Lu, H., Koo, L.Y., Wang, W.M., Lauffenburger, D.A., Griffith, L.G. and Jensen, K.F. 2004. "Microfluidic shear devices for quantitative analysis of cell adhesion", *Anal Chem*, 76, 5257-64.
- Lussi, J.W., Michel, R., Reviakine, I., Falconnet, D., Goessl, A., Csucs, G., Hubbell, J.A. and Textor, M. 2004. "A novel generic platform for chemical patterning of surfaces", *Progress in Surface Science*, 76, 55-69.
- Lussi, J.W., Tang, C., Kuenzi, P.-A., Staufer, U., Csucs, G., Vörös, J., Danuser, G., Hubbell, J.A. and Textor, M. 2005. "Selective molecular assembly patterning at the nanoscale: a novel platform for producing protein patterns by electron-beam lithography on SiO<sub>2</sub>/indium tin oxide-coated glass substrates", *Nanotechnology*, 16, 1781.
- Lutz, R., Pataky, K., Gadhari, N., Marelli, M., Brugger, J. and Chiquet, M. 2011. "Nano-Stenciled RGD-Gold Patterns That Inhibit Focal Contact Maturation Induce Lamellipodia Formation in Fibroblasts", *PLoS ONE*, 6, e25459.
- Malmstrom, J., Lovmand, J., Kristensen, S., Sundh, M., Duch, M. and Sutherland, D.S. 2011. "Focal complex maturation and bridging on 200 nm vitronectin but not fibronectin patches reveal different mechanisms of focal adhesion formation", *Nano Lett*, 11, 2264-71.
- Matlin, K.S., Haus, B. and Zuk, A. 2003. "Integrins in epithelial cell polarity: using antibodies to analyze adhesive function and morphogenesis", *Methods*, 30, 235-246.
- Mitchell, K., Svenson, K.B., Longmate, W.M., Gkirtzimanaki, K., Sadej, R., Wang, X., Zhao, J., Eliopoulos, A.G., Berdichevski, F. and Dipersio, C.M. 2010. "Suppression of integrin alpha3beta1 in breast cancer cells reduces cyclooxygenase-2 gene expression and

- inhibits tumorigenesis, invasion, and cross-talk to endothelial cells", *Cancer Res*, 70, 6359-67.
- Mitchell, M.J. and King, M.R. 2013. "Fluid shear stress sensitizes cancer cells to receptor-mediated apoptosis via trimeric death receptors", *New Journal of Physics*, 15, 015008.
- Muiznieks, L.D. and Keeley, F.W. 2013. "Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective", *Biochim Biophys Acta*, 1832, 866-75.
- Natali, P.G., Nicotra, M.R., Botti, C., Mottolise, M., Bigotti, A. and Segatto, O. 1992. "Changes in expression of alpha 6/beta 4 integrin heterodimer in primary and metastatic breast cancer", *Br J Cancer*, 66, 318-22.
- Oliva, A.A., Jr., James, C.D., Kingman, C.E., Craighead, H.G. and Banker, G.A. 2003. "Patterning axonal guidance molecules using a novel strategy for microcontact printing", *Neurochem Res*, 28, 1639-48.
- Oser, M., Yamaguchi, H., Mader, C.C., Bravo-Cordero, J.J., Arias, M., Chen, X., Desmarais, V., van Rheenen, J., Koleske, A.J. and Condeelis, J. 2009. "Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation", *J Cell Biol*, 186, 571-87.
- Owen, G.R., Meredith, D.O., ap Gwynn, I. and Richards, R.G. 2005. "Focal adhesion quantification - a new assay of material biocompatibility? Review", *Eur Cell Mater*, 9, 85-96; discussion 85-96.
- Palankar, R., Medvedev, N., Rong, A. and Delcea, M. 2013. "Fabrication of Quantum Dot Microarrays Using Electron Beam Lithography for Applications in Analyte Sensing and Cellular Dynamics", *ACS Nano*, 7, 4617-4628.
- Pesen, D., Erlandsson, A., Ulfendahl, M. and Haveland, D.B. 2007a. "Image reversal for direct electron beam patterning of protein coated surfaces", *Lab Chip*, 7, 1603-6.
- Pesen, D. and Haveland, D.B. 2009. "Modulation of cell adhesion complexes by surface protein patterns", *ACS Appl Mater Interfaces*, 1, 543-8.
- Pesen, D., Heinz, W.F., Werbin, J.L., Hoh, J.H. and Haveland, D.B. 2007b. "Electron beam patterning of fibronectin nanodots that support focal adhesion formation", *Soft Matter*, 3, 1280-1284.
- Piner, R.D., Zhu, J., Xu, F., Hong, S. and Mirkin, C.A. 1999. "'Dip-Pen' nanolithography", *Science*, 283, 661-3.
- Provenzano, P.P., Eliceiri, K.W. and Keely, P.J. 2009. "Multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to monitor metastasis and the tumor microenvironment", *Clin Exp Metastasis*, 26, 357-70.

- Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D. and Carlier, M.F. 2004. "Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis", *Cell*, 119, 419-29.
- Ron, A., Lee, G.H., Amar, L., Ghassemi, S. and Hone, J. 2011. "Adjacent assembly of self-assembled monolayers for the construction of selective bio-platforms", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 159, 75-81.
- Rundqvist, J., Mendoza, B., Werbin, J.L., Heinz, W.F., Lemmon, C., Romer, L.H., Haviland, D.B. and Hoh, J.H. 2007. "High fidelity functional patterns of an extracellular matrix protein by electron beam-based inactivation", *J Am Chem Soc*, 129, 59-67.
- Schwarz, U.S., Erdmann, T. and Bischofs, I.B. 2006. "Focal adhesions as mechanosensors: the two-spring model", *Biosystems*, 83, 225-32.
- Soucy, P.A. and Romer, L.H. 2009. "Endothelial cell adhesion, signaling, and morphogenesis in fibroblast-derived matrix", *Matrix Biol*, 28, 273-83.
- They, M., Pepin, A., Dressaire, E., Chen, Y. and Bornens, M. 2006. "Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment", *Cell Motil Cytoskeleton*, 63, 341-55.
- Thievessen, I., Thompson, P.M., Berlemont, S., Plevock, K.M., Plotnikov, S.V., Zemljic-Harpf, A., Ross, R.S., Davidson, M.W., Danuser, G., Campbell, S.L. and Waterman, C.M. 2013. "Vinculin-actin interaction couples actin retrograde flow to focal adhesions, but is dispensable for focal adhesion growth", *J Cell Biol*, 202, 163-77.
- Tojkander, S., Gateva, G. and Lappalainen, P. 2012. "Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles", *J Cell Sci*, 125, 1855-64.
- Tzima, E., del Pozo, M.A., Shattil, S.J., Chien, S. and Schwartz, M.A. 2001. "Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment", *Embo j*, 20, 4639-47.
- Vallénus, T. 2013. "Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells", *Open Biol*, 3, 130001.
- van Dijk, M., Goransson, S.A. and Stromblad, S. 2013. "Cell to extracellular matrix interactions and their reciprocal nature in cancer", *Exp Cell Res*.
- Wolf, K., Alexander, S., Schacht, V., Coussens, L.M., von Andrian, U.H., van Rheenen, J., Deryugina, E. and Friedl, P. 2009. "Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo", *Semin Cell Dev Biol*, 20, 931-41.
- Wozniak, M.A., Modzelewska, K., Kwong, L. and Keely, P.J. 2004. "Focal adhesion regulation of cell behavior", *Biochim Biophys Acta*, 1692, 103-19.
- Zaidel-Bar, R., Cohen, M., Addadi, L. and Geiger, B. 2004. "Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes", *Biochem Soc Trans*, 32, 416-20.



- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R. and Geiger, B. 2007. "Functional atlas of the integrin adhesome", *Nat Cell Biol*, 9, 858-67.
- Zamir, E. and Geiger, B. 2001. "Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions", *J Cell Sci*, 114, 3583-90.
- Zhao, J. and Guan, J.L. 2009. "Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer", *Cancer Metastasis Rev*, 28, 35-49.
- Zhu, C., Yago, T., Lou, J., Zarnitsyna, V.I. and McEver, R.P. 2008. "Mechanisms for flow-enhanced cell adhesion", *Ann Biomed Eng*, 36, 604-21.
- Zoumi, A., Yeh, A. and Tromberg, B.J. 2002. "Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11014-9.

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. DEVRİM PESEN OKVUR
Proje No:	111T026
Proje Başlığı:	Nanometre Ölçeğinde Yapışma: Göğüs Kanseri Hücreleri ve Normal Epitel Hücreler
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	30
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. FEN F. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/08/2011 - 01/08/2014
Onaylanan Bütçe:	305290.0
Harcanan Bütçe:	261257.45
Öz:	<p>Hücrelerarası matrikse hücre yapışması hem sağlık hem de hastalık durumları için önemli bir süreçtir. Topografik olarak düz ve başka kimyasal, topografik ya da sertlik ile ilgili işlevsellik getirmeyen ve daha önemlisi canlıdaki hücrelerarası matriks düzenlenmesini mimikleyen yüzey protein desenleri arzu edilmektedir. Daha önceki çalışmalar göstermiştir ki vinkülin ve hücre iskeletinin düzenlenmesi yüzey nanodesenlerinin büyüklüğü ve şekli ile değişmektedir. Fakat, protein nanodesenlerinin mikrometre ölçeğindeki aralıklarına bağlı olarak normal ve kanserli hücrelerin morfolojileri ve odaksal yapışmalarının karşılaştırmalı sayısal analizi eksiktir. Burada, elektron demeti litografisi kullanılarak silikondan farklı olarak şeffaf ve böylece birçok mikroskop tekniğine uygun olan indiyum tin oksit (İTO) üzerinde K-kazein arka planında (tek aktif) ve laminin arka planında (çift aktif) mikrometre ölçeğinde aralıklarla fibronektin (FN) nanonoktaları desenlenmiştir. Yazım zamanları mikrometre ölçeğinde adım büyüklükleri ile çizgi yazım modu kullanılarak önemli ölçüde kısaltılmıştır. FN nanonoktalarının mikrometre ölçeğinde 2, 4, 8 mikron ve değişken aralıkları hem meme kanseri hücreleri hem de normal meme epitel hücrelerinde hücre yapışmasını hücre alanı, hücre simetrisi, aktin düzenlenmesi, odaksal yapışma sayısı, alanı ve daireselliği ile hem durgun hem de akış koşullarında değiştirmiştir. Toplamda hücre davranışının görünen eşik değeri olarak 4 mikron aralıkta değiştiği gösterilmiştir. Sonuçlar gösterdi ki hücre yapışması bağlamında meme kanseri hücreleri ile normal meme epitel hücreleri arasında, özellikle çift aktif bileşenli yüzeylerde belirgin farklar bulunmaktadır: Meme kanseri hücreleri normal meme epitel hücrelerinden daha dinamik ve esnek bir yapışma profili sergilemişlerdir. Bu çalışmanın yeniliği ve özgünlüğü aşağıdaki noktalar ile elde edilmiştir:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- İTO yüzeyler üzerinde ilk elektron demeti litografisi ve sadece protein bazlı desenlemenin gerçekleştirilmesi</li><li>- Meme kanseri hücreleri ve normal meme epitel hücrelerinin nanometre ölçeğindeki protein desenleri üzerinde yapışmalarının ilk karşılaştırmalı ve sayısal analizi</li><li>- Laminin arkaplanı üzerinde FN nanonoktaları şeklinde çift aktif yüzey desenleri üzerinde ilk hücre yapışması çalışması</li><li>- Gradyan aralıklı nanometre ölçeğinde protein desenleri üzerinde ilk hücre yapışması çalışması</li><li>- Nanometre ölçeğinde protein desenleri üzerinde durgun ve akış koşullarında hücre yapışmasının ilk karşılaştırmalı çalışması</li></ul>
Anahtar Kelimeler:	Elektron demeti litografisi, indiyum tin oksit, Hücrelerarası madde, Odaksal yapışma, Meme kanseri
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

Projenin Yapılan Yayınlar:	<ol style="list-style-type: none"><li>1- Nanometer Scale Patterning of Proteins with Electron Beam Lithography (Bildiri),</li><li>2- Electron beam lithography based patterning of proteins (Bildiri)1- Cell Adhesion on Nanometer Scale Protein Patterns with Micrometer Scale Spacings (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</li><li>2- Electron beam lithography based patterning of proteins (Bildiri - Ulusal Konferans - Davetli Konuşmacı),</li><li>3- Nanometer Scale Patterning of Proteins with Electron Beam Lithography (Bildiri - Ulusal Bildiri - Poster Sunum),</li><li>4- Nanometer Scale Surface Protein Patterns for Spatially Controlled Cell Adhesion (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</li><li>5- Modulation of Breast Cancer Cell Adhesion on Nanometer Scale Protein Patterns with Micrometer Scale Spacing on ITO-glass (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</li><li>6- Cell adhesion on nanometer scale protein patterns (Bildiri - Ulusal Bildiri - Sözlü Sunum),</li><li>7- Differential Changes in Cell Shape on Nanopatterned Surfaces for Normal and Cancer Cells (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</li><li>8- Micrometer Scale Spacings between Fibronectin Nanodots Regulate Cell Morphology and Focal Adhesions (Makale - Diğer Hakemli Makale),</li><li>9- Step-by-step quantitative analysis of focal adhesions (Makale - Diğer Hakemli Makale),</li></ol>
----------------------------	--

TÜBİTAK