



**MEME HÜCRE HATLARINDA GGT1, GGT5 VE GGT7 GENLERİNİN
SUSTURULMASININ GAMA GLUTAMİL TRANSFERAZ ENZİMİNİN
FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Sümeyye RAMAZANOĞLU

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA (ECZ) ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEMMUZ 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Sümeyye RAMAZANOĞLU

06/07/2022

MEME HÜCRE HATLARINDA GGT1, GGT5 VE GGT7 GENLERİNİN
SUSTURULMASININ GAMA GLUTAMİL TRANSFERAZ ENZİMİNİN
FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ
(Doktora Tezi)

Sümeyye RAMAZANOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz 2022

ÖZET

Kanser dünya genelinde, ikinci ölüm nedenidir. Meme kanserinde GGT enzim aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. GGT ailesinde GGT1'e nükleotit veya amino asit dizisi benzerliği olan olası aktif genlerin GGT5 ve GGT7 olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın amacı siRNA uygulanan MCF 10A ve MDA-MB-231 hücre hatlarında gen susturmasının takiben GGT1, GGT5 ve GGT7'nin mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin sırasıyla qRT-PCR ve RAMAN spektroskopisi ile ölçülmesi; elde edilen sonuçları GGT aktivitesi, GSH ve LTD4 seviyeleri arasındaki ilişkileri araştırmaktır. Her iki hücre hatlarında kontrole kıyasla si-GGT1 ile transfekte edilen hücrelerde tripan mavisi testi ile canlılık oranı anlamlı bir azalma saptanırken, MTT testi kullanıldığında anlamlı bir fark elde edilmemiştir. mRNA sonuçları ile benzer bir şekilde siRNA ile transfekte edilen hücrelerde protein miktarları transfekte edilmemiş hücrelere göre belirgin bir şekilde azalmıştır. Her iki hücre hatlarında da si-GGT1 ve si-GGT5 ile transfeksiyonu takiben GGT aktivitesinde azalma olmadığı ve GSH seviyesinin değişmediği gösterilmiştir. si-GGT7 ile transfekte edilen hücre hatlarında ise GGT aktivitesinin arttığı belirlenmiş, MCF 10A hücre hattında GSH seviyesinin arttığı; MDA-MB-231 hücre hattında GSH seviyesinin azaldığı saptanmıştır. si-GGT5 ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücre hattında LTD4 seviyesinin azaldığı görülmüştür, fakat MCF 10A normal hücrelerdeki LTD4 seviyesi MDA-MB-231 kanserli hücrelerindeki ile kıyaslandığında daha düşük olup susturma etkisi görülmemiştir. Parametreler arasındaki ilişki incelendiğinde, MCF 10A hücre hattında GGT aktivitesi ile tripan mavisi ile elde edilen canlılık oranları ve GGT aktivitesi ile LTD4 seviyesi arasında pozitif yönde orta düzeyde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon olduğu, MDA-MB-231 hücre hattında ise GSH seviyesi ve LTD4 seviyesi, negatif yönde orta düzeyde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon olduğu, LTD4 seviyesi ve tripan mavisi ile elde edilen canlılık oranları, pozitif yönde orta düzeyde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, GGT5 ve GGT-7 hücre metabolizmasında önemli rol aldıklarını düşünülmektedir.

Bilim Kodu : 10103.11
Anahtar Kelimeler : GGT1, GGT5, GGT7, Gen susturulması, GGT aktivitesi, LTD4, GSH
Sayfa Adedi : 84
Danışman : Prof. Dr. Sevgi AKAYDIN

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SILENCING OF GGT1, GGT5 AND GGT7
GENES ON THE FUNCTIONS OF GAMMA GLUTAMYL TRANSFERASE ENZYME
IN BREAST CELL LINES.

(Ph. D. Thesis)

Sümeyye RAMAZANOĞLU

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

July 2022

ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death worldwide. GGT enzyme activity has been shown to be increased in breast cancer. Possible active genes with nucleotide or amino acid sequence similarity to GGT1 in the GGT family were identified as GGT5 and GGT7. The aim of this study was to measure mRNA expression levels of GGT1, GGT5 and GGT7 by qRT-PCR and protein expression levels by RAMAN method after gene silencing using siRNA in MCF 10A and MDA-MB-231 lines and examines the effects of silencing on the GGT activity, GSH and LTD4 levels. There was a significant decrease in viability in cells transfected with si-GGT1 compared to the control when using trypan blue test in both cell lines, but no significant difference was detected when using MTT test. Similar to the mRNA results, the protein levels were significantly reduced in cells transfected with siRNA compared to untransfected cells. It was shown that there was no decrease in GGT activity and GSH level did not change in both cell lines transfected with si-GGT1 and si-GGT5. It was observed that GGT activity increased in both cell lines transfected with si-GGT7 and the GSH level increased in the MCF 10A cell line, while the GSH level in the MDA-MB-231 cell line decreased. The level of LTD4 in MDA-MB-231 cell line transfected with si-GGT5 was decreased, but the level of LTD4 in MCF 10A normal cells was lower compared to that in cancer cells and no silencing effect was observed. When relationship between the parameters was examined, a moderately statistically significant positive correlation was found between GGT activity and viability when using trypan blue and between GGT activity and LTD4 level in MCF 10A cell line, a moderately statistically significant negative correlation was found between GSH level and LTD4 level and a positive correlation was found between LTD4 level and viability when using trypan blue in MDA-MB-231 cell line. In conclusion, GGT5 and GGT-7 are thought to play an important role in cell metabolism.

Science Code : 10103.11

Key Words : GGT1, GGT5, GGT7, Gene silencing, GGT activity, LTD4, GSH

Page Number : 84

Supervisor : Prof. Dr. Sevgi AKAYDIN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında bana destek veren, akademik bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren, sevgisini esirgemeyen, kendileri ile çalışmaktan gurur duyduğum tez danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Sevgi AKAYDIN'a;

Doktora yolumu başarıyla tamamlamama yardımcı olan Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalında görevli tüm hocalarıma,

Tez çalışmamın her aşamasında bana destek veren, bilgi ve deneyimleri benimle paylaşan Arş.Gör. Dr. Ece SALİHOĞLU'na, Laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan doktora öğrencileri Mualla Pınar ELÇİ ve Elif ÇALIK KAYIŞ'a

Eğitim süresinde beni yalnız bırakmayan her daim yanımda olduğunu his ettiğim arkadaşım Öğr. Üyesi. Dr.Tuba TAŞKAN'a

Bana burslu okuma imkanı sunan Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser Epidemiyolojisi.....	3
2.1.1. Kanser etyolojisi.....	3
2.2. Meme Kanseri Sınıflandırması.....	4
2.2.1. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması.....	6
2.3. Gamma-Glutamil Transferaz (GGT).....	9
2.3.1. GGT'nin yapısı.....	11
2.3.2. GGT gen yapısı.....	12
2.3.3. GGT'nin fonksiyonları.....	13
2.4. Glutasyon (GSH).....	14
2.4.1. Glutasyon fonksiyonları.....	14
2.5. Lökotrienler.....	17
2.6. GGT ile Kanser.....	19

2.7. GGT İndüksiyon Yolları.....	19
2.8. RNA Susturma ile Gen Düzenlenmesi.....	20
2.8.1. RNAi mekanizması.....	20
2.8.2. siRNA temelli gen terapisi.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	25
3.2. Kullanılan Kimyasallar.....	25
3.3. Hücre Kültürü.....	26
3.3.1. Kullanılan hücre dizileri.....	26
3.3.2. Hücrelerin kültüre edilmesi.....	27
3.4. siRNA Transfeksiyonu ile Gen Susturma Deneyleri.....	27
3.4.1. Transfeksiyon şartlarının optimize edilmesi.....	28
3.4.2. siRNA transfeksiyonunun uygulanması.....	29
3.5. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Tespiti.....	30
3.6. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Tespiti.....	30
3.7. RNA İzolasyonu.....	31
3.8. cDNA Sentezi.....	32
3.9. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	33
3.10. Protein İzolasyonu.....	35
3.11. Bradford Yöntemi ile Total Protein Miktar Tayini.....	36
3.12. Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi.....	38
3.12.1. Küresel yapıda altın nanopartikül sentezi ve yüzey modifikasyonu...	39

	Sayfa
3.13. GGT Enzim Aktivitesi Tayini.....	40
3.14. Glutasyon Tayini.....	41
3.15. Lökotrien Tayini.....	43
3.16. İstatistiksel Analiz.....	43
4. BULGULAR.....	45
4.1. Hücre Canlılığı Analizi.....	45
4.1.1. MTT ile hücre canlılığı analizi.....	45
4.1.2. Tripan mavisi ile hücre canlılığı analizi.....	48
4.2. Total RNA Düzeyleri.....	52
4.3. GGT-1, GGT-5, GGT-7 Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin qRT-PCR Analizleri ile Değerlendirilmesi.....	52
4.4. Protein Miktar Tayini.....	55
4.5. RAMAN Spektroskopi ile Yapılan Protein Analizi Sonuçları.....	57
4.6. GGT Aktivitesi.....	60
4.7. Redükte Glutasyon (GSH) Tayini.....	63
4.8. Lökotrien Tayini.....	65
4.9. Korelasyonlar.....	68
5. TARTIŞMA.....	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	83

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Meme kanseri histolojik tiplerinin sıklığı.....	6
Çizelge 2.2. Meme Kanseri Moleküller alt tipleri	6
Çizelge 2.3. Klinik çalışmaları devam eden bazı siRNA-temelli ilaçlar	23
Çizelge 3.1. Transfeksiyon deneylerden elde edilen bulgular	29
Çizelge 3.2. cDNA protokolu.	33
Çizelge 3.3. qRT-PCR analizlerinde kullanılan primerlerin baz dizileri.....	34
Çizelge 3.4. PCR reaksiyon karışımı	34
Çizelge 3.5. Reaksiyon koşulları	35
Çizelge 3.6. Standartların Konsantrasyonları ve Absorbans Değerleri.....	37
Çizelge 4.1. MCF 10A ve MDA-MB-231 hücrelerine ait RNA izolatlarının miktar ve saflık değerlerinin tayini.....	52
Çizelge 4.2. MCF 10A hücre hattında si-GGT1 kullanıldıktan sonra RAMAN ile yapılan protein analiz sonuçları.....	57
Çizelge 4.3. MDA-MB-231 hücre hattında si-GGT1 kullanıldıktan sonra RAMAN ile yapılan protein analiz sonuçları.....	58
Çizelge 4. 4. MCF 10A hücre hattında si-GGT5 kullanıldıktan sonra RAMAN ile yapılan protein analiz sonuçları.....	58
Çizelge 4.5. MDA-MB-231 hücre hattında si-GGT5 kullanıldıktan sonra RAMAN ile yapılan protein analiz sonuçları.....	58
Çizelge 4.6. MCF 10A hücre hattında si-GGT7 kullanıldıktan sonra RAMAN ile yapılan protein analiz sonuçları.....	59

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.7. MDA-MB-231 hücre hattında si-GGT7 kullanıldıktan sonra RAMAN ile yapılan protein analiz sonuçları.....	59
Çizelge 4.8. MCF 10A hücre hattında değişkenler arası ilişkiler.....	68
Çizelge 4.9. MDA-MB-231 hücre hattında değişkenler arası ilişkiler.....	68

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Türkiyede GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında kadınlarda yeni kanser vakalarının sayısı ve vakaların kanser türüne göre dağılımları.....	3
Şekil 2.2. Meme kanserinin histolojik sınıflandırılması.....	4
Şekil 2.3. Meme patolojisinin görünümü.....	5
Şekil 2.4. Transmembran proteinlerin farklı topolojik tipleri.....	10
Şekil 2.5. İnsan GGT1'in kristal yapısı.....	11
Şekil 2.6. Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü.....	15
Şekil 2.7. γ -Glutamil döngüsü.....	17
Şekil 2.8. Lökotrien sentezi.....	18
Şekil 2.9. siRNA interferans yolakları.....	21
Şekil 2.10. Hücre dışı (A) ve hücre içi (B) bölgelerdeki iletim engellerinin şematik gösterimi.....	23
Şekil 3.1. Bradford standart grafiği.....	38
Şekil 3.2. MCF 10 A hücre hattında Raman spektroskopisi ile GGT7 protein tayini...	40
Şekil 3.3. γ -GT aktivitesi standart grafiği.....	41
Şekil 3.4. GSH standart grafiği.....	42
Şekil 3.5. LTD4 standart grafiği.....	43
Şekil 4.1. MCF 10A hücre hattında si-GGT1, si-GGT5, si-GGT7'nin hücre canlılığına etkileri (MTT analizi).....	46
Şekil 4.2. Kontrol ve si-GGT1, si-GGT5, si-GGT7 ile transfekte edilen MCF 10A hücrelerinde canlılık oranlarındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi..	46
Şekil 4.3. MDA-MB-231 hücre hattında si-GGT1, si-GGT5, si-GGT7'nin hücre canlılığına etkileri (MTT analizi).	47
Şekil 4.4. Kontrol ve si-GGT1, si-GGT5, si-GGT7 ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde canlılık oranlarındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.....	47
Şekil 4.5. MCF 10A hücre hattında si-GGT1, si-GGT5, si-GGT7'nin hücre canlılığına etkileri (Tripan mavisi analizi).....	48
Şekil 4.6. Kontrol ve si-GGT1, si-GGT5, si-GGT7 ile transfekte edilen MCF 10A hücrelerinde canlılık oranlarındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi (Tripan mavisi analizi).....	49

Şekil	Sayfa
Şekil 4.7. MDA-MB-231 hücre hattında si-GGT1, si-GGT5, si-GGT7'nin hücre canlılığına etkileri (Tripan mavisi analizi).....	50
Şekil 4.8. Kontrol ve si-GGT1, si-GGT5, si-GGT7 ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde canlılık oranlarındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi (Tripan mavisi analizi).....	51
Şekil 4.9. MCF 10A ve MDA-MB-231 hücre hatlarında GGT genlerinin susturulduktan sonra siklus sayısına karşı SYBR-GI floresans ışıma değerleri gösteren amplifikasyon grafiği.....	53
Şekil 4.10. MCF 10A hücre hattında GGT-1, GGT-5, GGT-7 genlerinin susturulmasının etkisinin mRNA düzeyinde gösterilmesi.....	54
Şekil 4.11. MDA-MB-231 hücre hattında GGT-1, GGT-5, GGT-7 genlerinin susturulmasının etkisinin mRNA düzeyinde gösterilmesi.....	54
Şekil 4.12. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MCF 10A hücrelerinden izole edilen protein miktarı.....	55
Şekil 4.13. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MCF 10A hücrelerinden izole edilen protein miktarlarındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.....	56
Şekil 4.14. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen protein miktarı.....	56
Şekil 4.15. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen protein miktarlarındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.....	57
Şekil 4.16. MCF 10A ve MDA-MB-231 hücre hatlarında si-GGT1, si-GGT5 ve si-GGT7 kullanıldıktan sonra protein oranları.....	60
Şekil 4.17. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MCF 10A hücrelerindeki GGT aktivitesi.....	61
Şekil 4.18. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MCF 10A hücrelerinde GGT aktivitesindeki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.	61
Şekil 4.19. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MDA-MB-231 hücrelerindeki GGT aktivitesi.....	62

Şekil	Sayfa
Şekil 4.20. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MDA-MB-231 hücrelerinde GGT aktivitesindeki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.	62
Şekil 4.21. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MCF 10A hücrelerindeki GSH seviyesi.....	63
Şekil 4.22. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MCF 10A hücrelerinde GSH seviyesindeki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.	64
Şekil 4.23. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MDA-MB-231 hücrelerindeki GSH seviyesi.....	65
Şekil 4.24. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MDA-MB-231 hücrelerinde GSH seviyesindeki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.	65
Şekil 4.25. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MCF 10A hücrelerindeki LTD4 seviyesi.....	66
Şekil 4.26. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MCF 10A hücrelerinde LTD4 seviyesindeki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.	66
Şekil 4.27. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MDA-MB-231 hücrelerindeki LTD4 seviyesi.....	67
Şekil 4.28. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MDA-MB-231 hücrelerinde LTD4 seviyesindeki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.	67

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Nanodrop ile si-GGT7 ile transfekte edilen MCF 10A hücrelerinde RNA izolatının ölçüm görüntüsü.....	32
Resim 4.1. MCF 10A hücre hattı, 48 saat siRNA'ların uygulaması sonrası mikroskop ile alınan görüntüler.....	49
Resim 4.2. MDA-MB-231 hücre hattı, 48 saat siRNA'ların uygulaması sonrası mikroskop ile alınan görüntüler.....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
μL	Mikrolitre
L	Litre
mL	Mililitre
ng	Nanogram
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece

Kısaltmalar	Açıklamalar
AA	Araşidonik asit
AHP	Akut hepatik porfiri
AGO2	Endonukleaz argonaute 2
AP-1	Aktivatör protein-1
5-LOX	5-Lipooksigenaz
BÇ	Baz çifti
BRCA1	Meme kanseri duyarlılık geni 1
cDNA	Komplementer DNA
CLP	Koaktosin benzeri protein
CK5/6	Sitokeratin 5/6
CK5	Sitokeratin 5
CK6	Sitokeratin 6
CK17	Sitokeratin 17
CK18	Sitokeratin 18
CK19	Sitokeratin 19
Cys-LT	Sisteinil-lökotrien
DNA	Deoksiribonükleik asit

DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
dsRNA	Çift zincirli RNA
EMT	Epitel mezenkimal geçiş
EpRE/Nrf2	Elektrofil-yanıt element/ Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 sinyalleşmesinin
ER	Östrojen reseptörü
FABP7	Yağ asidi bağlayıcı protein 7
FGF7	Fibroblast büyüme faktörü 7
FLAP	5-lipoksijenaz aktive edici protein
GBM	Glioblastoma
GCL	Glutamat sistein ligazı
γGC	Gama-glutamilsistein
GGT	Gama-glutamil transferaz
GGT1	Gama-glutamil transferaz 1
GGT5	Gama-glutamil transferaz 5
GGT7	Gama-glutamil transferaz 7
GSH	Glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
HER1	İnsan epidermal büyüme faktör reseptör 1
HER2	İnsan epidermal büyüme faktör reseptör 2
HNF-3	Hepatosit nükleer faktör 3
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
İDK-NST	Spesifik olmayan tip invaziv duktal karsinom
KLF2	Kruppel benzeri faktör 2
LT	Lökotrien
LTA4	Lökotrien A4
LTA4H	LTA4 hidrolaz
LTB4	Lökotrien B4
LTC4	Lökotrien C4
LTC4S	LTC4 Sentaz
LTD4	Lökotrien D4

LTE4	Lökotrien E4
MAPK	p38 mitojen aktive edici protein kinaz
MMP-9	Matriks metalopeptidaz 9
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat,(indirgenmiş formu)
NK	Negatif kontrol
NO	Azot monoksit
NTN-hidrolaz	N-terminal nükleofil hidrolaz
PK	Pozitif kontrol
PLA2	Fosfolipaz A2
PR	Progesteron reseptörü
PTGS	Post-transkripsiyonel gen susturma
qRT-PCR	Kantitatif Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RISC	RNA aracılı induklenen susturma kompleksi
RNAi	RNA interferansı
ROS	Reaktif oksijen türleri
5(S)-HpETE	5(S)-hidroperoksieikosatetraenoik asit
si RNA	Small interfering RNA
TGS	Transkripsiyonel gen susturma
TN	Triple (üçlü) negatif
UTR	Çevrilmemiş bölge
Vav1	Vav guanin nükleotid değişim faktörü 1
VEGFC	Vasküler endotelial büyüme faktörü C
XBP1	X-box bağlayıcı protein 1

1. GİRİŞ

Kanser, tüm insan hastalıkları arasında Sakatlığa Ayarlanmış Yaşam Yılları (Disability Adjusted Life Years – DALY; Erken ölüm sebebiyle kaybedilen yaşam yılları ve sakatlıkla geçirilen yaşam yıllarını toplamsıyla hesaplanmaktadır) açısından en yüksek klinik, sosyal ve ekonomik yükünün sebebidir. DSÖ'nün verilerine göre dünya çapında en büyük yüke sahip olan hastalık grubu kanserlerdir (244,6 milyon DALYs), bunu iskemik kalp hastalığı (203,7 milyon DALYs) ve inme (137,9 milyon DALYs) izlemektedir. Bunula birlikte meme kanseri, 15-49 yaş aralığında en sık görülen malignitedir [1]. Proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi birçok süreçte yer alan çeşitli faktörler, kanser tedavisinde hedeflenmektedir. Gamma-glutamil transferaz (GGT), hücre zarına bağlanan, glutatyon metabolizmasında rol alan ve hücre içi sistein seviyelerini dengeleyerek hücrenin içindeki redoks dengesinin korunmasına yardımcı olan önemli bir enzimdir. Ayrıca GGT'nin inflamasyon mediatörleri olan lökotrien metabolizmasındaki rolü ilgi çekicidir. Lökotrienler, astım, atopik dermatit, sedef hastalığı, ateroskleroz, artrit, obezite, kanser ve yaşa bağlı makula dejenerasyonu dahil olmak üzere kronik inflamatuvar hastalıklarda rol oynamaktadır. GGT, LTC₄'ten reseptörlere daha fazla afiniteye sahip olan LTD₄'ü oluşturmak üzere glutamili LTC₄'ten uzaklaştırarak LTD₄ oluşmasını sağlar [2,3]. Yüksek serum GGT seviyelerinin, meme kanseri, rahim ağzı kanseri, karaciğer kanseri, renal hücreli karsinom ve endometriyal kanser hastalığında kötü prognoz ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir [4]. Ayrıca değişik insan kanser hücrelerinde aşırı eksprese edildiği bulunmuştur. GGT'nin tümör ilerlemesini, invazyonu ve antikanser-ilaç direncini desteklediği ve serumda yüksek GGT seviyesinin kanser riskinin artmasıyla yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir [5]. Yapılan ön-genom çalışmaları, insan genomunun GGT1'in yanı sıra ek olarak ilişkili genler veya diziler içerdiğini göstermiştir. Genişletilmiş GGT ailesine ait 13 gen tanımlanmıştır ve bunlardan en az 6'sının aktif olduğunu bildirilmiştir. GGTL1 ve GGTL2 olarak adlandırılan iki gen, GGT'nin yalnızca hafif zincir kısmını kodlama potansiyeline sahiptir. Beş tam uzunluktaki genlerden üçü önemli nükleotit dizi homolojisinden yoksundur. Heisterkamp ve çalışma arkadaşları HUGO Gen Adlandırma Komitesi (HGNC) ile işbirliği içinde, GGT1'e nükleotit veya amino asit dizisi benzerliği olan olası aktif genleri GGT5, GGT6 ve GGT7 rapor etmişlerdir [6]. GGT5, redoks regülasyonunda, bağışıklık sisteminde ve ilaç metabolizmasında kritik rol oynamaktadır [7]. Wei ve çalışma arkadaşları, GGT5'in akciğer kanserinde kanserle ilişkili fibroblastlarda yüksek oranda eksprese edildiğini, kanser hücrelerinin hayatta kalma sürecini

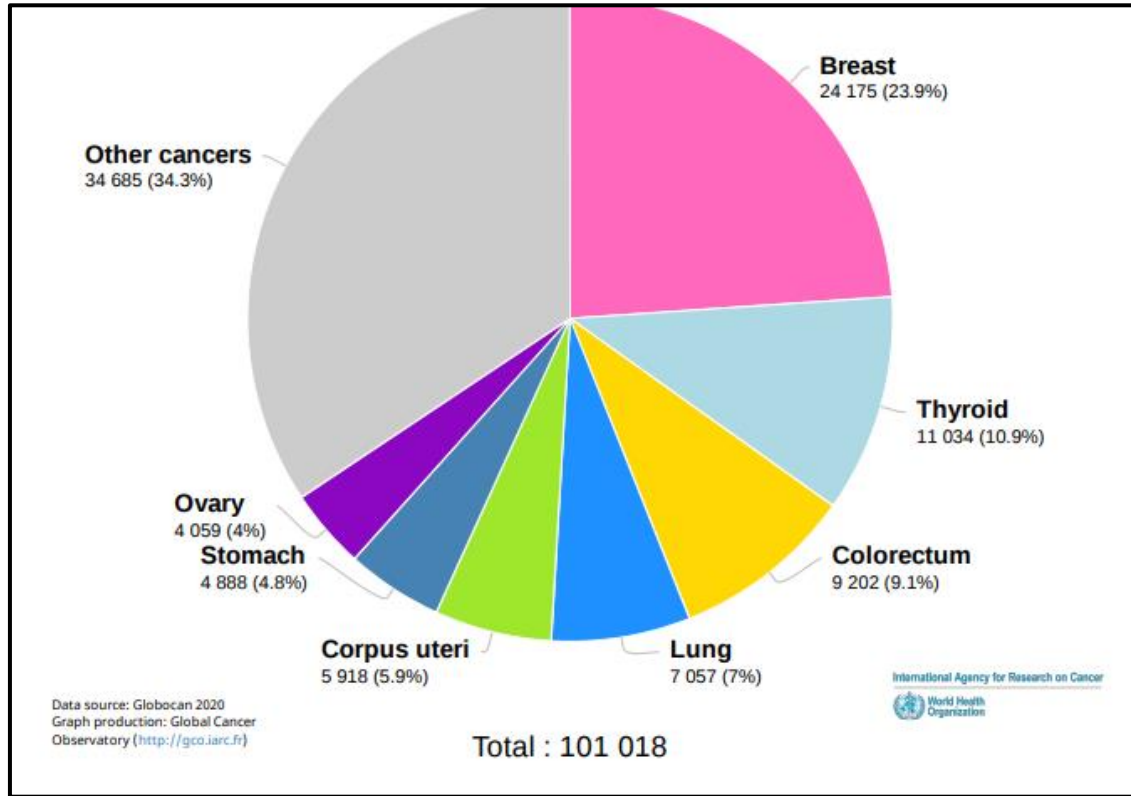
ve ilaç direnci gelişimini desteklediğini bildirmişlerdir [8]. GGT5 ayrıca mide kanseri ve kolon kanserinde metabolizma ile ilgili anahtar gen olarak kabul edilmiştir [7].

GGT7, GGT ailesinin yeni bir üyesidir. GGT7'nin akciğer kanserinin ilerlemesiyle ilişkili anahtar proteinlerle etkileşime girdiği bildirilmiştir [7]. Pang ve Panee çalışmalarında, HIV-1 Transgenik Sıçanlarında GGT7'nin mRNA seviyesinin beyindeki diğer GGT izoformlarından ~20 kat daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. HIV-1 Transgenik Sıçanların talamusunda bir GGT izoformu olan GGT7'nin protein düzeyinde ekspresyonunun azalmasının sıçanlarda yaşlanma ile meydana gelen GSH metabolizmasının bozulmasına katkıda bulunabileceği yönünde değerlendirme yapmışlardır [9]. GGT7 ve glioblastoma ile ilgili başka bir çalışma, GGT7'nin reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerini düzenleyerek glioblastoma büyümesini teşvik etmede önemli bir rol oynayabileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca fizyolojik karaciğer dokularına kıyasla malign karaciğer dokularında GGT7'nin mRNA düzeyinde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [7]. Gazi Üniversitesi, Biyokimya Anabilim Dalında yürütülen bir başka çalışmada, fizyolojik ve malign meme dokularında GGT7 ekspresyonunun mRNA düzeyinde arttığı gösterilmiştir [10]. Genel olarak GGT enzim aktivitesi birçok kanser türünde artış göstermekle birlikte, farklı GGT genlerinin tespit edilmiş olması, artan aktiviteden hangisinin sorumlu olduğu sorusunu akla getirmektedir. Bu tez kapsamında, MCF 10A, sağlıklı meme epitel hücre hattında (kontrol grubu) ve MDA-MB-231, üçlü negatif meme kanseri hücre hattında siRNA aracıyla gen susturmasının takiben GGT1'in, GGT5'in ve GGT7'nin olası fonksiyonları araştırılacaktır. Ayrıca GGT1, GGT5 ve GGT7 genlerinin siRNA aracıyla susturulmasının hücre canlılığı üzerine etkilerini tespit edilecektir. GGT aktivitesi ve GSH ve LTD4 düzeyleri belirlenerek bu düzeyler ile gen susturması arasındaki olası ilişkiler değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Epidemiyolojisi

Kanser dünya genelinde, ikinci ölüm nedenidir [11]. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) bir alt kuruluşudur. IARC Küresel Kanser Gözlemevi'nin bir parçası olan GLOBOCAN 2020 verilerine göre dünya çapında 2020 yılında yaklaşık 684 bin kadın meme kanseri nedeniyle hayatını kaybetmiş ve her iki cinsiyette yaklaşık 2,26 milyon yeni meme kanseri vakası bildirilmiştir; böylece dünyada meme kanseri kanserler arasında ilk sırada yerini almıştır. Aynı verilere göre Türkiye'de 7 161 kadın meme kanseri nedeniyle hayatını kaybetmiş ve kadınlarda yaklaşık 24 175 yeni vaka (yeni vakalarının %23,9'u) bildirilmiştir (Şekil 2.1) [12].



Şekil 2.1. Türkiyede GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında kadınlarda yeni kanser vakalarının sayısı ve vakaların kanser türüne göre dağılımları [12].

2.1.1. Kanser etyolojisi

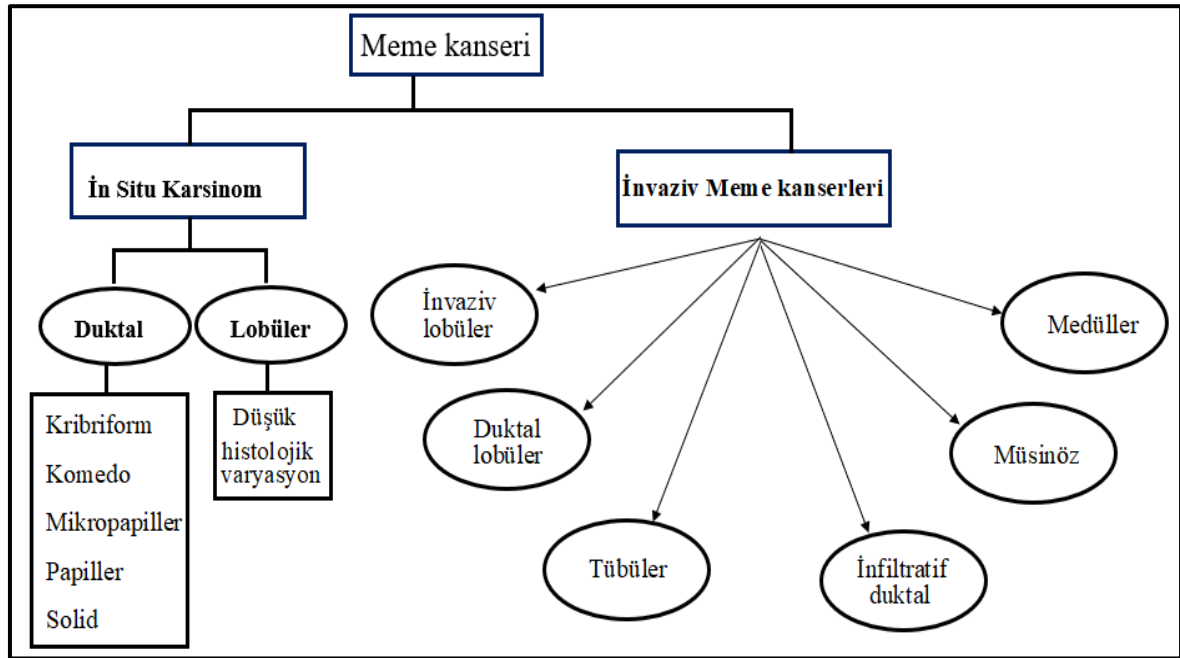
Meme kanseri; yaş faktörleri, ilk doğum yaşı, erken yaşta menarş, cinsiyet, diyet faktörleri, obezite, sigara kullanımı, alkol tüketimi, düşük dozda irradyasyon, fiziksel aktivite,

emzirme, hormonal faktörler, hormon replasman tedavisi, steroid hormon reseptörleri, meme yoğunluğu, iyi huylu meme hastalığı ve genetik faktörlere bağlı, multifaktöriyel bir hastalıktır. Bununla birlikte, hangi risk faktörlerinin meme kanserinin karsinogenezinde; baş role sahip olduğu hala belirsizdir [13].

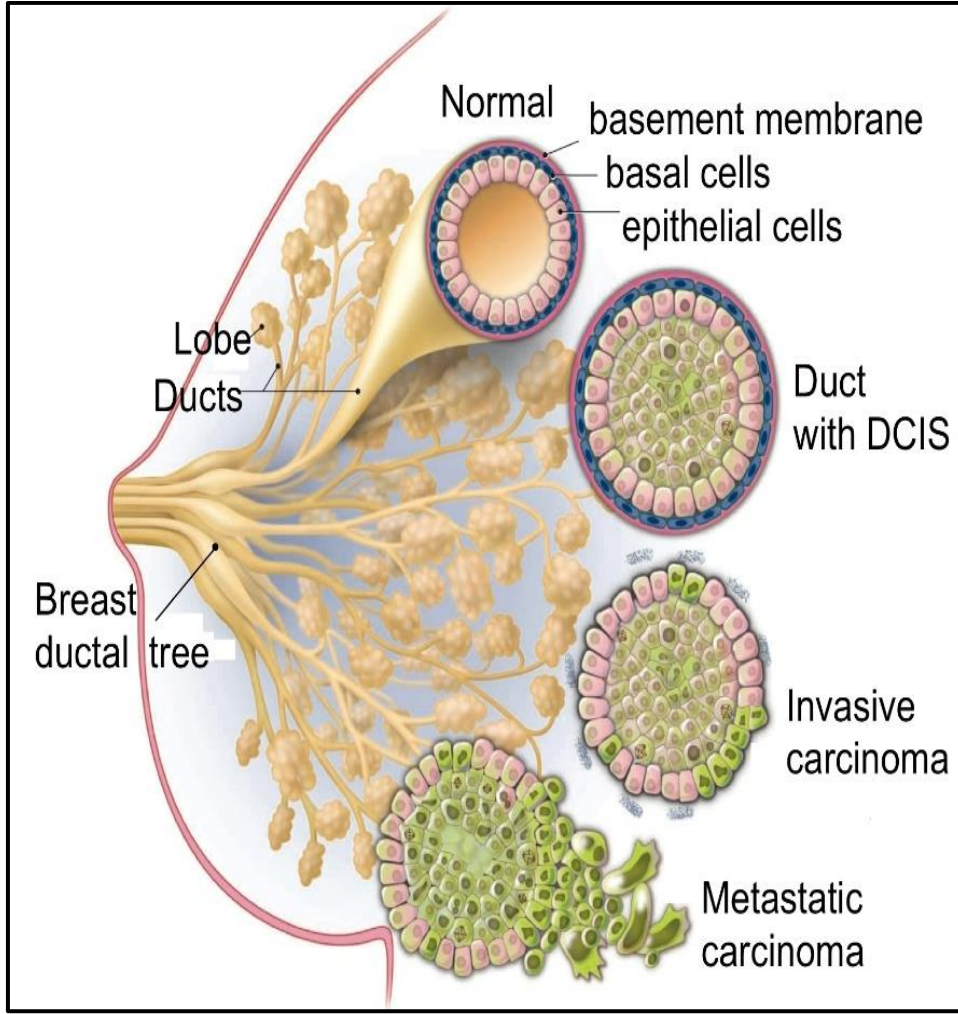
2.2. Meme Kanseri Sınıflandırması

Meme kanseri, farklı histolojik ve biyolojik özellikleri olan heterojen bir hastalıktır [14]. Meme kanserlerinin alt tiplerinin belirlenmesi, tedavi protokolünün belirlenmesi ve hastalığın prognozunun değerlendirilmesi yönünden önemlidir. Meme kanseri, tümörün histopatolojik görünümü, moleküler patolojik durumu, genetik analizi ve gen ekspresyonuna göre sınıflandırılır [15].

Meme kanserleri, histolojik dereceleri ve histolojik tiplerine göre biyolojik ve klinik olarak alt sınıflara ayrılmaktadır. Histolojik derece (grade), bir tümörün farklılaşma derecesini (tübül oluşumu ve nükleer pleomorfizm) ve proliferatif aktivitesini (mitotik indeksi) değerlendirir ve tümörün agresif özelliklerini gösterir. Histolojik tip ise tümörlerin büyüme paternini ifade eder (Şekil 2.2 ve Şekil 2.3).



Şekil 2.2. Meme kanserinin histolojik sınıflandırılması [16].



Şekil 2.3. Meme patolojisinin görünümü [17].

En yaygın meme kansinom türü, spesifik olmayan tip invaziv duktal kansinomdur (İDK-NST). Bu tipi, meme kanserlerinin özel tiplerinden birinde sınıflandırılabilmesi için spesifik özellikler göstermeyen adenokarsinomlar içermektedir. Meme kanseri özel tipleri, tüm meme kanserlerinin% 25'ini oluşturur ve Dünya Sağlık Örgütü sınıflandırmasına göre, en az 17 farklı histolojik özel tipi vardır (Çizelge 2.1) [14].

Çizelge 2.1. Meme kanseri histolojik tiplerinin sıklığı [18].

İnvaziv Meme kanserlerinin histolojik tipleri	Sıklığı	10 Yıllık Sağkalım Oranı
Spesifik olmayan tip invaziv duktal karsinomdur (İDK-NST).	% 50–80	% 35–50
İnvaziv lobüler karsinom	% 5–15	% 35–50
Adenoid kistik karsinom	% 0,1	% 90–100
Apokrin karsinom	% 0,3–4	İDK-NST gibi
Osteoklastik dev hücreli içeren invaziv duktal karsinom	Bilinmiyor	İDK-NST gibi
Medüller karsinom	% 1–7	% 50–90
Metaplastik karsinom	< % 5	Bilinmiyor
Mikropapiller karsinom	< % 3	Bilinmiyor
Müsinöz karsinom	< % 5	% 80–100
Nöroendokrin karsinom	% 2–5	Bilinmiyor
Tübüler karsinom	% 1–6	% 90–100

2.2.1. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması

Günümüzde, gen ekspresyon çalışmaları ile meme kanserinin en az 7 farklı moleküller alt tipi ortaya konmuştur. Bunlar arasında luminal A, luminal B, luminal C, HER2 ile zenginleştirilmiş, bazal benzeri, üçlü negatif, klaudin düşük ve normal meme benzeri yer almaktadır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Meme kanserinin moleküller alt tipleri

Meme Kanserinin Moleküller Alt Tipleri	Hormon Reseptör Durumu			ki-67 proteini	Önemli Belirteçler
	ER	PR	HER2		
Luminal A	+	+	-	-	CK'ler, (zarf) PL1, XBP1, HNF-3, GATA3, ve Anneksin XXXI
Luminal B	+	+	-	+	
HER2 ile zenginleştirilmiş	-	-	+		
Bazal benzeri	-	-	-		CK5/6, CK17, integrin-β4, laminin ve FABP7
Üçlü negatif (TN)	-	-	-		BRCA1
Klaudin-düşük	-	-			CXCL12, FGF7, KLF2, MMP-9, VEGFC, CD79b, CD14, vav1, ALDH1A1
Normal meme benzeri	+	+	-	-	

Luminal benzeri meme kanseri türleri

Luminal benzeri meme kanseri, adını normal luminal meme epitelinin ekspresyon profiline benzerliğinden almaktadır. Meme tümörleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır:

Luminal A

Bu alt tipte, östrojen reseptörü ER ve/veya PR progesteron reseptörü pozitif, insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (HER 2) ise negatiftir ve tümör proliferasyonu ile ilişkili olan ki-67 proteini daha düşük oranda saptanır. Luminal A, en sık görülen alt tip olup tüm meme kanserlerinin yaklaşık % 40'ını oluşturmaktadır. Genelde en iyi prognozlu olan tiptir. Bu grup hastalar hormon tedavilerine duyarlı iken sitotoksik ajanlara daha az duyarlıdır.

Luminal B

Tümörlerinde ER ile ilgili genlerin ifadesi luminal A tümörlerinden daha düşüktür, bazı durumlarda HER2 ifade etmektedir ve proliferasyon ile ilgili genlerin ifadeleri ise luminal A kanserlerinden nispeten daha yüksektir. Ayrıca Nüks riski daha yüksektir. Luminal B, meme kanserlerinin yaklaşık % 20'sini oluşturmaktadır. Luminal B tümörlerinin genomik kararsızlığı ve TP53 geninde mutasyonları gösterilmiştir.

Luminal A ve B tümörlerinin her ikisinin de neoadjuvan kemoterapiye düşük patolojik yanıtlar verdikleri rapor edildiği için sitotoksik kemoterapiye çok az duyarlı olduğu bilinmektedir.

Luminal C

Fonksiyonları bilinmeyen farklı genlerin yüksek ekspresyonu ile luminal A ve B alt tiplerinden ayırt edilir. Ayrıca, bu genlerin bazal benzeri ve HER2 ile zenginleştirilmiş alt tiplerde aşırı ifade edildiği bulunmuştur. Luminal C'de tanımlanmış genler, transferrin reseptörü (CD71), MYB, nükleer protein p40, SQLE ve GGH içermektedir.

HER2 ile zenginleştirilmiş meme kanseri alt tipi

HER2 ile zenginleştirilmiş alt tipi, meme kanserlerinin yaklaşık %20-30'unu oluşturmaktadır. Bu alt tip tümörlerinde HER2/neu proliferatif genlerin yüksek ekspresyonu, luminal kümelerin düşük ekspresyonu ile karakterizedir.

Luminal kümelerde, luminal sitokeratinleri (CK'ler) CK7, CK8, CK18 ve CK19 ve insan endojen retrovirüs envelope (zarf) PL1, X-box bağlayıcı protein 1 (XBP1), hepatosit nükleer faktör 3 (HNF-3), GATA bağlayıcı protein 3 (GATA3), Anneksin XXXI ve östrojen reseptörü 1 gibi lümenle ilişkili diğer belirteçler bulunmaktadır.

HER2 ile zenginleştirilmiş tümörler her zaman olmamakla birlikte genellikle HER2-pozitif ve ER / PR-negatiftir. Klinik olarak, luminal A tümörlerine kıyasla daha kötü prognoza sahiptir.

Bazal benzeri meme kanseri alt tipi

Bazal benzeri meme kanseri alt tipi, invazif duktal meme kanserlerinin yaklaşık % 15'ini oluşturur. Normal bazal epitel hücrelerinin gen ifade paternlerini gösterdiğinden dolayı bazal benzeri adı verilmiştir. Bazal epitel hücrelerinin karakteristik gen kümesinin ifadesi, (CK5/6) ve CK17, integrin- β 4, laminin ve yağ asidi bağlayıcı protein 7 (FABP7) içerir. Bazal benzeri tümörler, çoğunlukla ER-negatif, PR-negatif, HER 2-negatif, CK5/6-pozitif ve/veya EGFR (HER1)- pozitifdir. Bu tümörlerin, luminal ve HER2 gen kümelerinin düşük ekspresyonu nedeniyle ER/PR ve HER2/neu negatif (üçlü negatif) oldukları varsayılır. Bununla birlikte, üçlü negatif (TN) ve bazal meme kanseri eş anlamlı değildir. TN meme kanserleri, bazal benzeri meme kanserlerinden daha heterojen bir hastalık grubunu temsil eder.

TN tümörlerinin, yaklaşık %30 kadarı bazal benzeri değildir. Bu alt tip ayrıca, nispeten yüksek BRCA1 (meme kanseri duyarlılık geni 1) mutasyonları, artan genomik kararsızlığı, proliferatif genlerin kümesinin yüksek ekspresyonu ve yüksek bir histolojik derece ile karakterizedir.

Klaudin düşük meme kanseri alt tipi

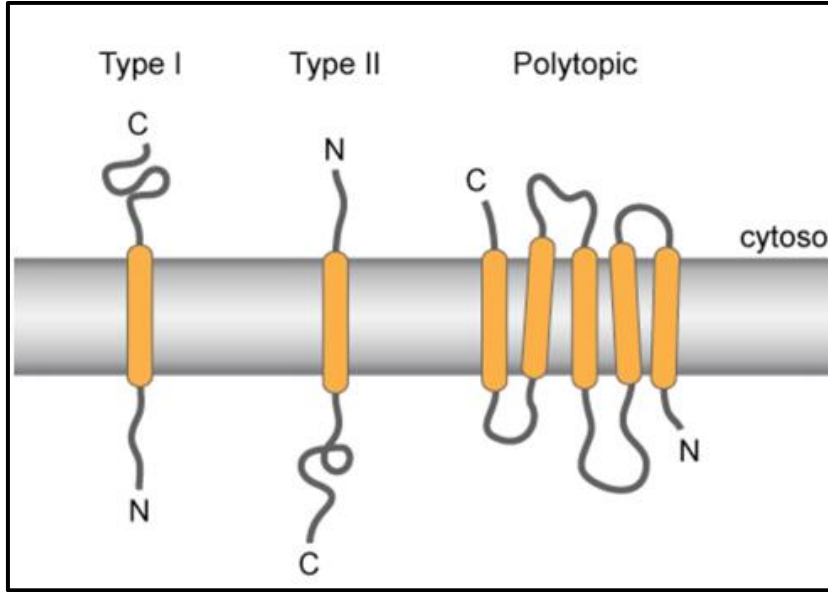
Yakın zamanda tanımlanan klaudin düşük meme kanseri alt tipi, epitel mezenkimal (EMT) geçişle ilişkili genlerin aşırı ekspresyonu ile karakterizedir. Bu genler arasında, kemokin (C-X-C motif) ligand 12 gibi hücre iletişim genleri, vimentin ve fibroblast büyüme faktörü 7 (FGF7) genleri gibi hücre dışı matriksi oluşturan genler, Kruppel benzeri faktör 2 (KLF2) gibi hücre farklılaşma genleri, integrin $\alpha 5$ ve moesin hücre migrasyon genleri, vasküler endotelial büyüme faktörü C (VEGF-C) anjiyogenez genleri, matriks metallopeptidaz 9 (MMP-9), bağışıklık ile ilişkili genler, örneğin CD79b, CD14 ve vav guanin nükleotid değişim faktörü 1 (vav1); ve kök hücre benzeri genler, örneğin CD44 + / CD24- ve Aldehit Dehidrojenaz 1 Aile Üyesi A1 (ALDH1A1) bulunmaktadır. Sıklıkla metaplastik ve medüller farklılaşma sergiler, luminal belirteçleri ifade etmezler ve genellikle bazal alt tipin bir parçasıdır [19].

Normal benzeri meme kanseri

Bu tümörler tüm meme karsinomlarının yaklaşık % 5-10'unu oluşturur. İyi bir şekilde karakterize edilmemiştir. Bu alt tiple ilgili çok az çalışma vardır bu yüzden klinik önemi belirsizdir [20].

2.3. Gamma-Glutamil Transferaz (GGT)

Gamma-glutamil transferaz, (γ -glutamil transpeptidaz; (5-L-glutamil)-peptid, amino asit 5-glutamil transferaz, EC 2.3.2.2) glutatyon metabolizmasında önemli bir enzimdir. GGT, bir amino terminal hidrofobik bölge tarafından hücre zarına bağlanan heterodimerik bir glikoproteindir. Enzim, katalitik aktivite sergileyen büyük bir karboksi-terminal ektodomen ve belirgin bir sinyal peptidi içeren yaklaşık 20 amino asit kalıntısından oluşan tek bir transmembran alana sahip olduğu için tip II transmembran proteini olarak kabul edilir (Şekil 2.4) [21].



Şekil 2.4. Transmembran proteinlerin farklı topolojik tipleri [22]

Evrimsel olarak, yaygın olan GGT, prokaryotlarda, ökaryotlarda ve arkelerde korunmuştur. GGT, glutatyonun (GSH) γ -glutamil bağının kırılmasını ve γ -glutamil grubunun, su (hidroliz reaksiyonu) veya diğer amino asitler veya peptitler (transpeptidasyon reaksiyonu) gibi alıcı substratlara transferini katalize eden iki substratlı bir enzimdir. GGT proteinleri, N-terminal nükleofil hidrolaz (NTN-hidrolaz) ailesinin üyeleridir. Bu proteinler, dizi homolojisi göstermeyen ancak aynı kinetik mekanizmalara ve kendi yapısını bölme işleme sahipleridir. Bunlar, tek bir amino asit zinciri sentezlendikten sonra kendi yapısını bölme reaksiyonu yoluyla bölünmesinden kaynaklanan, büyük ve küçük bir alt birimden oluşan heterodimerik proteinlerdir. Şimdiye kadar karakterize edilen tüm GGT proteinlerinde, korunmuş bir treonin (Thr-381), kataliz reaksiyonunun yanı sıra küçük ve büyük alt birimlere kendi yapısını bölme işleminde nükleofil görevi görür. GGT'nin katalitik bölgesi, iki ardışık cepten, verici ve alıcı bölgelerden oluşuyor gibi görünmektedir. γ -glutamil grubu veren substratın bağlandığı donör bölge şimdiye kadar daha kapsamlı bir şekilde karakterize edilirken, alıcı bölgeye katılan amino asit kalıntıları hakkında çok daha az şey bilinmektedir. Katalizin ilk adımında, Thr'nin hidroksil grubu, glutatyon substratının karbonil grubuna saldırır. İkinci adım, bir geçiş durumunun oluşumudur. Üçüncü adım, glutatyon substratından 'Cys-Gly'nin salınmasıyla bir γ -glutamil-GGT ara kompleksinin oluşumuna yol açar. Bu ara kompleks, yaygın olarak "oksianyon deliği kalıntıları" olarak bilinen iki korunmuş GGT glisini ile substratın arasındaki hidrojen bağları yoluyla stabilize edilir. Bu mekanizmanın dördüncü ve son adımı, γ -glutamil parçasının suya veya kısa peptide transferini içerir [23].

2.3.2. GGT gen yapısı

İnsan GGT'si, en az yedi GGT geni veya psödogenden oluşan bir multigen ailesidir. İnsan GGT genlerinin genomik organizasyonunun sıçaninkine benzer olduğu varsayılmaktadır; bu demek ki, transkripsiyonu aynı zamanda çoklu ardışık olarak konumlandırılmış promotörler tarafından da kontrol edilir. Birkaç insan GGT cDNA'sı hepatom hücrelerinden, plasentadan, akciğerden ve pankreastan klonlanmıştır. Tip I mRNA olarak tanımlanan bu GGT transkriptleri, farklı 59-UTR (çevrilmemiş bölge) sergiler ancak aynı kodlama dizisini paylaşır. 22. kromozomda bulunan tek bir GGT geninden kopyalanırlar. Diğer dört insan GGT geninin ekspresyonu da gösterilmiştir ve ekspresyonları dokuya özgü görünmektedir. Bunlar, daha sonra GGTL2, GGTL3, GGTL4P ve GGTL5P olarak tanımlanmıştır, bunların tümü sadece GGT'nin hafif zincirini kodlar ve bu nedenle aktivite için her iki alt üniteye de ihtiyaç duyulduğundan enzimatik aktiviteye sahip değildirler. Heisterkamp ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, insan GGT'si ile ilgili tüm genlerin gen yapısı ve ekspresyonu sistematik olarak analiz edilmiştir. İnsan genomu araştırıldıktan sonra 13 insan GGT geni homologue tanımlandı ve bunlardan en az altısının aktif olduğu görünmektedir (mRNA'ları kodlamak için). Bunlar arasında GGT 1 ve GGT 5'in GGT aktivitesi sergileyen proteinleri kodladığı bulunmuştur. Bununla birlikte, kromozom 22. kromozomda yer alan ve GGT1 ile yakından ilişkili olan bir gen olan GGT2'nin, tam uzunlukta bir proteini kodladığı gösterilmiştir. Muhtemelen GGT2'nin insan genomunda mevcut olması ve diğer primatlar dahil başka hiçbir türde bulunmaması nedeniyle evrimin sonlarında meydana gelen GGT1 geninin bir kopyası olduğu düşünülmektedir. GGT1 ve GGT2 arasında %97 nükleotid özdeşliği ve %94 amino asit özdeşliği vardır. GGT2'ye ait mRNA tespit edilmiştir ve bu, GGT2'nin enzimatik olarak aktif bir proteini kodladığı varsayımına yol açmıştır. Ancak yakın zamanda, GGT2'nin üç izoformunun tümü tarafından kodlanan GGT2 propeptitlerinin kendi yapısını ikiye ayırma işleminde başarısız olduğu, enzimatik olarak inaktif olduğu, plazma zarına yerleşmediği ve hücre içinde hızla bozunduğu gösterilmiştir. GGT5 ilk olarak farelerde, GSH S-konjugat lökotrien C4'ü lökotrien D4'e dönüştürebilme özelliğine dayanarak tanımlanmıştır ve inflamasyon ile ilişkilendirilmiştir. Fare GGT5, GSH'yi parçalamaz. İnsan GGT5 geni, GGT1 ile % 40 amino asit özdeşliğine sahiptir, ancak ikinci derece hız kinetiği, insan GGT5'inin GSH, GSSG ve lökotrien C4'ü hidrolize etmede GGT1'in aktivitesinin %4'ünden daha azına sahip olduğunu göstermektedir [24]. GGT7 (eski adıyla GGTL3, GGTL5), GGT ailesinin ayrıntılı incelenmemiş yeni bir üyesidir [26]. Figlewicz ve ark.

GGT benzeri 3 dahil olmak üzere 18., 19. ve 20. kromozom üzerinde GGT ile ilgili birkaç diziyi tanımlamıştır. Aktif γ -glutamyltranspeptidaz bölgesini içeren 252 amino asitli bir proteini kodlayan bir GGTL3 izoformu izole edilmiştir [27]. GGT7, daha iyi karakterize edilmiş aile üyeleri GGT1 ve GGT5 ile sırasıyla % 47 ve % 52 benzer amino asit dizisine sahiptir. Benzer olmakla birlikte, GGT7, GGT1 ve GGT5 ile karşılaştırıldığında hafif zincirindeki yüksek varyasyonun bir sonucu olarak yeni bir işleve sahip olabilir, bu da farklı substrat bağlanmasına neden olur. Bu farklılık, yalnızca GGT7'nin akciğer kanseri ile ilişkili proteinlerle etkileşime girdiğine ve kanserin ilerlemesinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca GGT7, normal dokulara kıyasla beyinde ~20 kat daha yüksek mRNA ekspresyonuna sahip olan tek izoform olduğu için diğer GGT izoformlarından farklıdır. Normal beyin ile karşılaştırıldığında gliomalarda GGT7 ekspresyonu azalmıştır. Bu önceki bulgular, GGT7'nin glioblastoma GBM büyümesinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir [26].

2.3.3. GGT'nin fonksiyonları

Normal dokularda GGT, vücuttaki bezleri ve kanalları kaplayan salgılayıcı ve emici hücrelerin lümen yüzeyinde eksprese edilir, bununla birlikte, en yüksek GGT aktivitesi seviyesi böbrekte bulunmaktadır. GGT knockout fareler, renal tübüllerini kaplayan hücreler GSH'yi geri alamadıkları için idrarlarında yabancı tip farelere göre 2500 kat daha fazla GSH salgılamaktadır. Glutatyoni, böbreğin proksimal tübüllerinin apikal yüzeyinde GGT aktivitesinin olmamasının bir sonucudur. GSH'nin sürekli atılımı, bir sistein eksikliği ile sonuçlanır, GGT knockout farelerin plazmasındaki sistein konsantrasyonu, yabancı tip farelerde görülenin sadece %20'sidir. GGT knockout farelerin normal bir şekilde büyüemedikleri ve sistein eksikliği nedeniyle yaklaşık 10 haftada öldükleri bildirilmiştir. Ölümden önce, farelerde katarakt geliştiği, oksidatif DNA hasarı seviyeleri arttığı ve hücre içi GSH'nin azalmasının ve redoks stresinin tüm semptomlarına sahip oldukları görülmüştür [24].

GGT'nin ekspresyonu, kültürdeki hücrelerin hücre dışı glutatyona bir sistein kaynağı olarak erişmesine izin vermektedir. Fakat *in vivo* sistein, düşük ve büyümeyi sınırlayan konsantrasyonlarda mevcuttur. Tümörlerin dolaşımından glutatyon ve sistein alabileceğini ve glutatyon alımlarının GGT inhibitörü asivisin tarafından azaltılabileceği gösterilmiştir [28]. Bu sonuçlara dayanarak, GGT'nin tümör büyümesinde bir rolü olduğu söylenebilir, ancak

malign transformasyonda temel bir rol oynamamaktadır. Bununla birlikte, GGT'nin oksidatif hasara dahil olduğuna dair bazı kanıtlar daha temel bir katkı olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, bir dizi ilaç glutatyon ile glutatyon-S-transferazlar tarafından konjuge edilir ve glutatyonun varlığı GGT aktivitesine bağlı olduğundan, GGT ifadesinin tümörlerin kemoterapinin etkilerine direnmesine izin verip vermediği de incelenmiştir. Hanigan ve ark. GGT'nin tümör büyümesi ve sisplatine duyarlılık üzerine etkisi ile ilgili çalışmalarında, GGT ile transfekte edilmiş insan prostat kanseri hücreleri nude farelere enjekte edildiğinde tümörün büyüme hızını arttırdığı ve GGT-pozitif tümörler sisplatinin etkilerine daha az duyarlı olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, germ hücreli tümörleri olan insan hastalarda, GGT-pozitif tümörlerde sisplatine artan yanıtın kanıtı yoktur. Son olarak, insanlarda, GGT beyindeki kan damarlarının etrafındaki astrositlerde eksprese edilir, toksik ksenobiyotikleri konjuge ederek veya vazoaktif lökotrienleri metabolize ederek kan-beyin bariyerinde rol oynadığı düşünülmektedir [28].

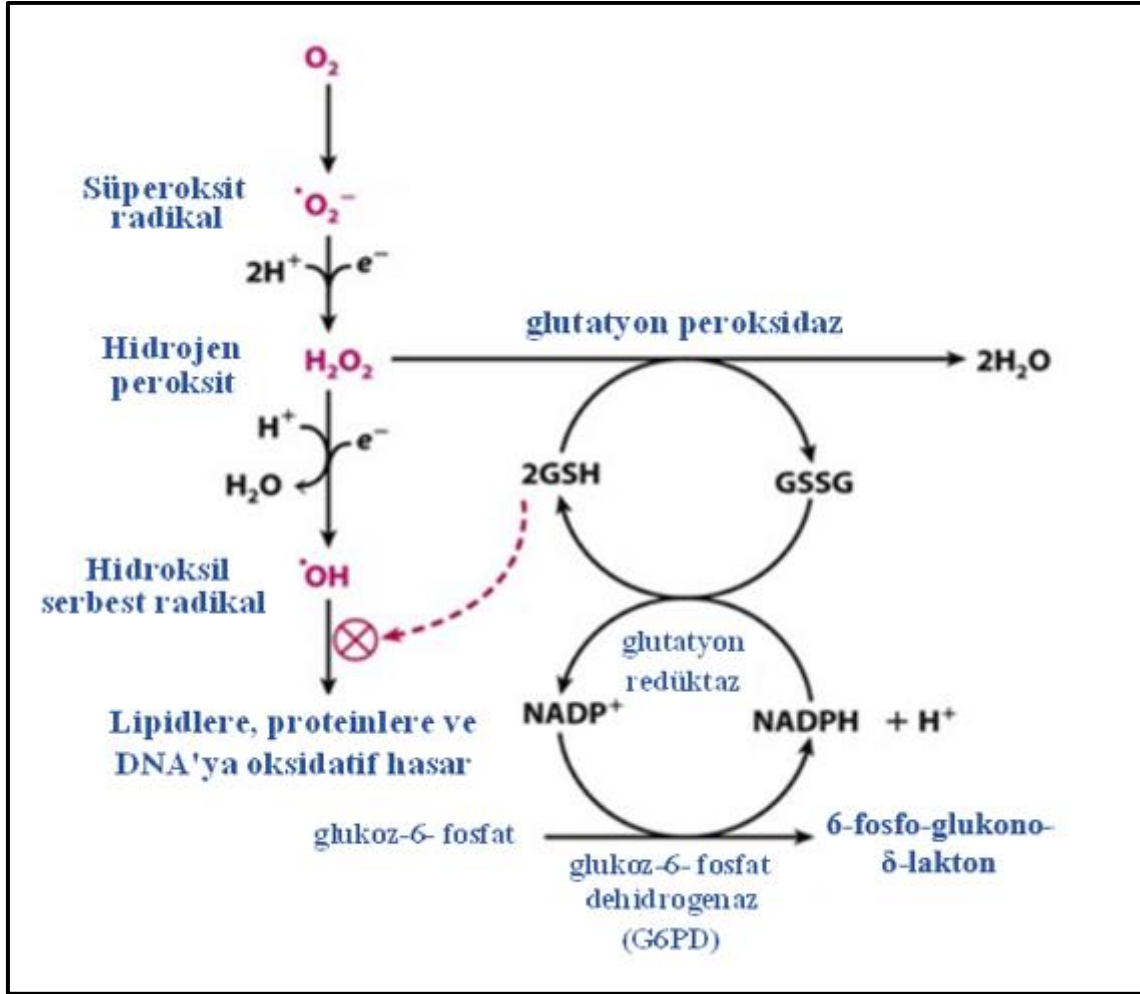
2.4. Glutatyon (GSH)

Glutatyon (L- γ -glutamil-L-sisteinilglisin; GSH) doğada yaygın olan, düşük moleküler ağırlıklı tiyol yapısında, genellikle hayvan hücrelerinde nispeten yüksek (0.1-10 mM) konsantrasyonlarda bulunan bir tripeptittir. Hücresel GSH'nin çoğu (%85-90) sitozolde, geri kalanı birçok organelde (mitokondri, nükleer matriksi ve peroksizomlar dahil) bulunur. 10 mmol/L'ye kadar GSH içerebilen safra asidi dışında, hücre dışı GSH konsantrasyonları nispeten düşüktür (örn; plazmada 2–20 μ mol/L) [29].

2.4.1. Glutatyon fonksiyonları

Glutatyon, birçok hücresel reaksiyona katılır.

- I. GSH, serbest radikalleri ve diğer reaktif oksijen türlerini (örn., hidroksil radikali, lipid peroksil radikali, peroksinitrit ve hidrojen peroksit) doğrudan ve dolaylı olarak enzimatik reaksiyonlar yoluyla etkili bir şekilde temizler. Bu tür reaksiyonlarda GSH, GSSG oluşturmak üzere oksitlenir ve daha sonra NADPH'ye bağlı glutatyon redüktaz tarafından GSH'ye indirgenir (Şekil 2.6). Ek olarak, glutatyon peroksidaz (selenyum içeren bir enzim), hidrojen peroksitin (H_2O_2) ve diğer peroksitlerin GSH'ye bağlı indirgenmesini katalize eder.



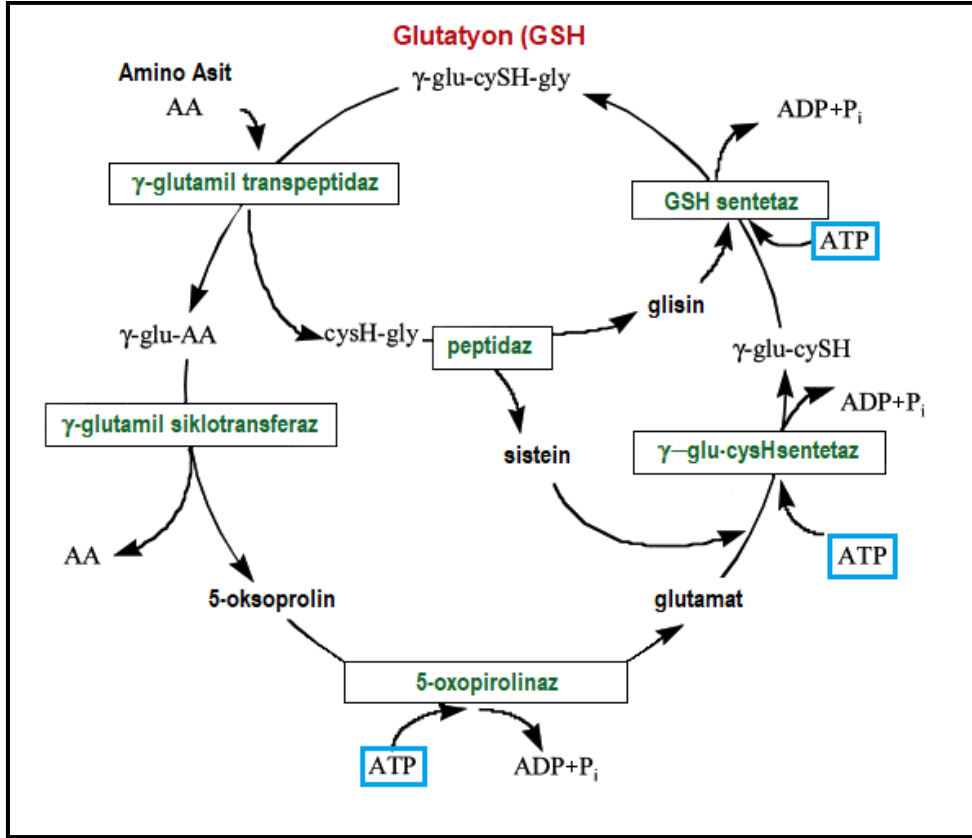
Şekil 2.6. Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü [30]

- II. GSH çeşitli elektrofiller, fizyolojik metabolitler (örn. östrojen, melaninler, prostaglandinler ve lökotrienler) ve ksenobiyotikler (örn., bromobenzen ve asetaminofen) ile merkaptüratlar oluşturmak üzere reaksiyona girer. Bu reaksiyonlar glutatyon-S-transferaz (bir Faz II detoksifikasyon enzimleri ailesi) tarafından başlatılır.
- III. GSH ile NO birleşerek bir S-nitroso-glutatyon bileşiğinin oluşturulmasını sağlar, bu bileşik GSH ve NO'yu serbest bırakmak için tioredoksin sistemi tarafından parçalanmaktadır. Son kanıtlar, endojen NO'nun hedeflenmesine hücre içi GSH'nin aracılık ettiğini göstermektedir. Ek olarak, hem NO hem de GSH, insülin duyarlılaştırıcı ajanların hepatik etkisi için gereklidir, bu da lipid, glukoz ve amino asit kullanımını düzenlemedeki kritik rollerini gösterir.

- IV. GSH, formaldehiti S-formil-glutatyona dönüştüren formaldehit dehidrojenaz için bir substrat görevi görür. Metionin, kolin, metanol (alkol dehidrojenaz), sarkozin (sarkozin oksidaz) ve ksenobiyotiklerin (sitokrom P450'ye bağlı monooksijenaz sistemi yoluyla) metabolizmasından üretilen formaldehit, kanserojen bir bileşik olduğu için uzaklaştırılması fizyolojik öneme sahiptir,.
- V. Prostaglandin H₂'nin (araşidonik asidin bir metaboliti) endoperoksit izomeraz tarafından prostaglandin D₂ ve E₂'ye dönüştürülmesi için GSH gereklidir.
- VI. GSH, metilglioksal'i, mikroorganizmalarda aktif bir yol olan D-laktat'a dönüştüren *glioksalaz sisteminde* yer alır. Son olarak, proteinlerin glutatyonilasyonu (örneğin, tiyoredoksin, ubikitin konjuge edeci enzim ve sitokrom c oksidaz) hücre fizyolojisinde önemli bir rol oynar.

Böylece GSH hayvanlarda hayati fonksiyonlara hizmet eder. Lenfositler ve bağırsak epitel hücreleri dahil olmak üzere hücrelerin çoğalması için yeterli GSH konsantrasyonları gereklidir. Ayrıca glutatyon spermatogenez ve sperm olgunlaşmasında önemli bir rol oynar. Ek olarak, GSH, T-lenfositlerin ve polimorfonükleer lökositlerin aktivasyonunun yanı sıra sitokin üretimi için ve dolayısıyla konakçı immünolojik olarak tehdit edildiğinde başarılı bağışıklık tepkileri oluşturmak için gereklidir [29].

γ -glutamil döngüsü yoluyla glutatyon biyosentezi, GSH homeostazını ve normal redoks durumunu korumak için önemlidir. Plazma zarının dış yüzeyinde yer alan döngünün tek enzimi olan GGT, hücre dışı GSH'yi parçalayarak γ -glutamil bileşiklerini ve daha sonra zara bağlı dipeptidazlar tarafından parçalanarak sisteinilglisinini üretir, böylece GGT, hücre içi GSH de novo sentezi için hız sınırlayıcı substrat olan sisteini sağlayarak GSH homeostazında kilit rol oynamaktadır. GSH'nin de novo sentezi, iki ardışık ATP'ye bağlı reaksiyondan oluşur: ilk reaksiyonda, glutamat sistein ligazı (GCL, γ -glutamilsistein sentaz olarak da bilinir), γ -glutamilsistein (γ GC) üretmek için substratlar olarak glutamik asit ve sistein kullanır, daha sonra glisin ile reaksiyona girerek glutatyon sentaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonda GSH oluşturur (Şekil 2.7).



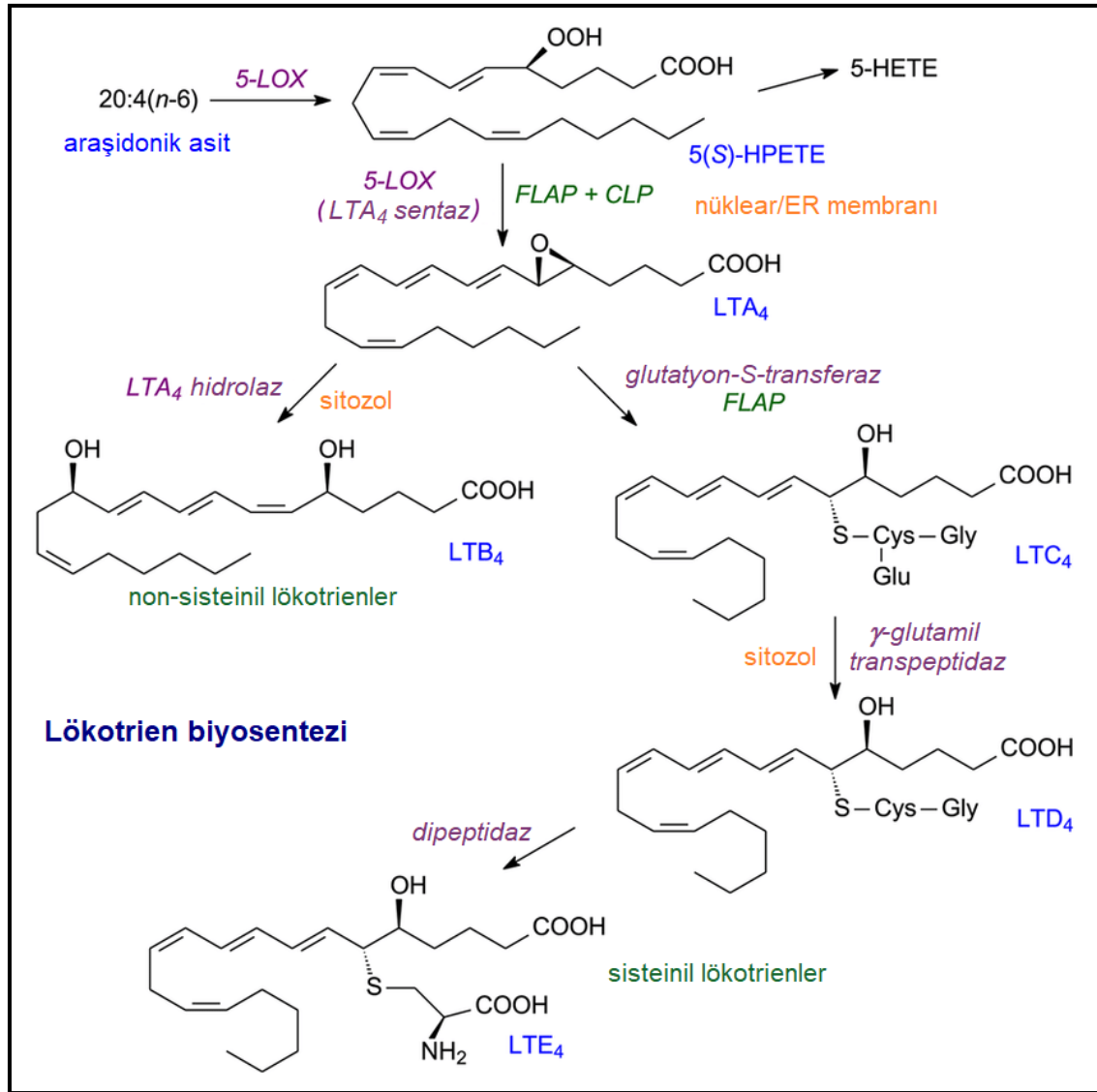
Şekil 2.7. γ-Glutamil döngüsü [31].

Ayrıca GGT tarafından GSH S-konjugatlarının ve diğer γ-glutamyl bileşiklerinin bölünmesi, lökotrien -C4, prostaglandinler ve östrojen gibi doğal biyomoleküllerin yanı sıra kanserojenler, mutajenler ve ilaç bileşikleri gibi ksenobiyotik bileşiklerin metabolizmasında da önemli bir rol oynamaktadır [32].

2.5. Lökotrienler

Lökotrienler, esas olarak miyeloblastik (nötrofiller, eozinofiller ve mast hücreleri) ve monoblastik soylardan (monositler/makrofajlar) lökositler tarafından biyosentezlenir. Bu lipid mediatörleri, parakrin bir şekilde etkilerini gösterirler, işlevlerini nanomolar konsantrasyonlarda gösterirler ve hedef hücre tipine göre farklı tepkilere yol açarlar. Lökotrienin iki sınıfı vardır: dihidroksi yağ asidi lökotrien LTB₄ ve lipid-peptit konjugatı LTC₄'ü ve sıralı peptidolitik bölünme ile oluşturulan metabolitleri LTD₄ ve LTE₄'ü içeren sisteinil-lökotrienler (Cys-LT'ler). Lökotrienler, çeşitli fosfolipaz A2 enzimleri (PLA₂'ler) tarafından hücre içi olarak membran fosfolipidlerinden serbest bırakılan araşidonik asitten (AA) sentezlenir [33, 34].

Lökotrien biyosentezindeki merkezi enzim olan 5-lipoksijenaz (5-LOX), tam aktivite için bir dizi uyarıcı faktör gerektirir ve iki yardımcı protein, 5-LOX aktive edici protein (FLAP) ve koaktosin benzeri protein (CLP) tarafından desteklenir [35]. Aktifleştirilmiş 5-LOX'un katalitik demir merkezi, AA'yı iki aşamalı bir reaksiyonda dönüştürür: ilk önce 5(S)-hidroperoksieikosatetraenoik asite [5(S)-HpETE], ardından geçici epoksit ara ürünü LTA₄'e dönüştürmektedir. LTA₄, LTA₄ hidrolaz (LTA₄H) tarafından dihidroksi asit LTB₄'e dönüştürülürken, LTC₄ sentaz (LTC₄S), LTA₄'ü glutatyon (GSH) ile konjuge ederek Cys-LTs LTC₄, LTD₄ ve LTE₄'ün ana bileşiği olan LTC₄'ü oluşturur (Şekil 2.8) [33].



Şekil 2.8. Lökotrien sentezi [36].

LTB4'ün klasik biyolojik etkileri arasında kemotaksi, endotelial tutunma ve lökositlerin aktivasyonu yer alırken, cys-LT'ler - özellikle LTD4 - mikrodolaşımdaki ve solunum yolundaki düz kasların kasılmasını sağlar. Ek olarak, tüm bu lökotrienlerin proinflatuar ve immün düzenleyici fonksiyonları bulunur, bu nedenle biyosentezde görevli enzimler potansiyel ilaç hedefleri olarak değerlendirilebilmektedir [33].

2.6. GGT ile Kanser

İnsan tümörlerinde GGT'nin dağılımı ve konsantrasyonu, normal dokularda gözlenenden bazı farklılık gösterir. Yumurtalık, kolon, karaciğer, astrositik glioma, yumuşak doku sarkomu, melanom ve lösemilerde GGT düzeylerinde artış gözlenmiştir. Hanigan ve ark. tarafından 451 insan tümörü ile yapılan geniş bir çalışma, GGT pozitif dokulardan türeyen tümörlerin çoğunun kendilerinin de pozitif olduğunu ve akciğer ve yumurtalık kansinomlarının da GGT negatif epitelden türetilmesine rağmen genellikle GGT pozitif olduğunu göstermişlerdir [37]. Melanom hücrelerinde *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, artan invaziv büyümeye eşlik eden yüksek GGT aktivitesinin olduğu bulunmuş ve insan meme kanserinde GGT ekspresyonu ile olumsuz prognostik işaretler arasında pozitif bir korelasyon tanımlanmıştır. Bununla birlikte, diğer çalışmalar, prostat, kolorektal ve meme kanseri modellerinde GGT ekspresyonu ile standart klinik patolojik parametreler arasında herhangi bir ilişki bulamamıştır. Bu farklılıklar, kanser hücrelerinde bulunan yüksek değişkenliğin yanı sıra çevre, ilaçlar ve diyet gibi diğer faktörlerin, GGT ekspresyonu da dahil olmak üzere neoplastik lezyonların fenotipini değiştirebilen etkisinin bir sonucu olarak açıklanabilir [37].

2.7. GGT İndüksiyon Yolları

Kimyasal karsinojenlere maruz kalan laboratuvar hayvanlarında GGT-pozitif odakların varlığını gösteren ilk raporlar, GGT'nin neoplastik dönüşümün erken bir belirteci olduğunu öne sürmüştür. Bununla birlikte, kanserojenler tarafından indüklenen artan GGT ekspresyonunun altında yatan mekanizmalar tanımlanamamıştır. Çalışmalar, farklı hücre tiplerinde oksidatif strese akut maruziyete bağlı GGT'nin yukarı regüle edildiğini göstermiştir. Bu artmış GGT ekspresyonunun, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) ve p38 mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) yollarının aktivasyonu yoluyla aktivatör protein-1 (AP-1) benzeri transkripsiyon faktörlerinin veya elektrofilyanıt

element/ Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 sinyalleşmesinin (EpRE/Nrf2) katılımından kaynaklandığını düşünmektedir. Aslında, GGT ekspresyonu ile Ras-MAPK yollarının aktivasyonu arasındaki bağlantı, kolon kanseri hücrelerinde gösterilmiştir. Ayrıca, reaktif oksijen türleri (ROS), karsinogenez sürecinde yer almıştır ve aynı zamanda, ROS/elektrofillere yanıt olarak birçok genin redoks düzenlemesi, GGT ekspresyonunu modüle ettiği önerilmiştir [37].

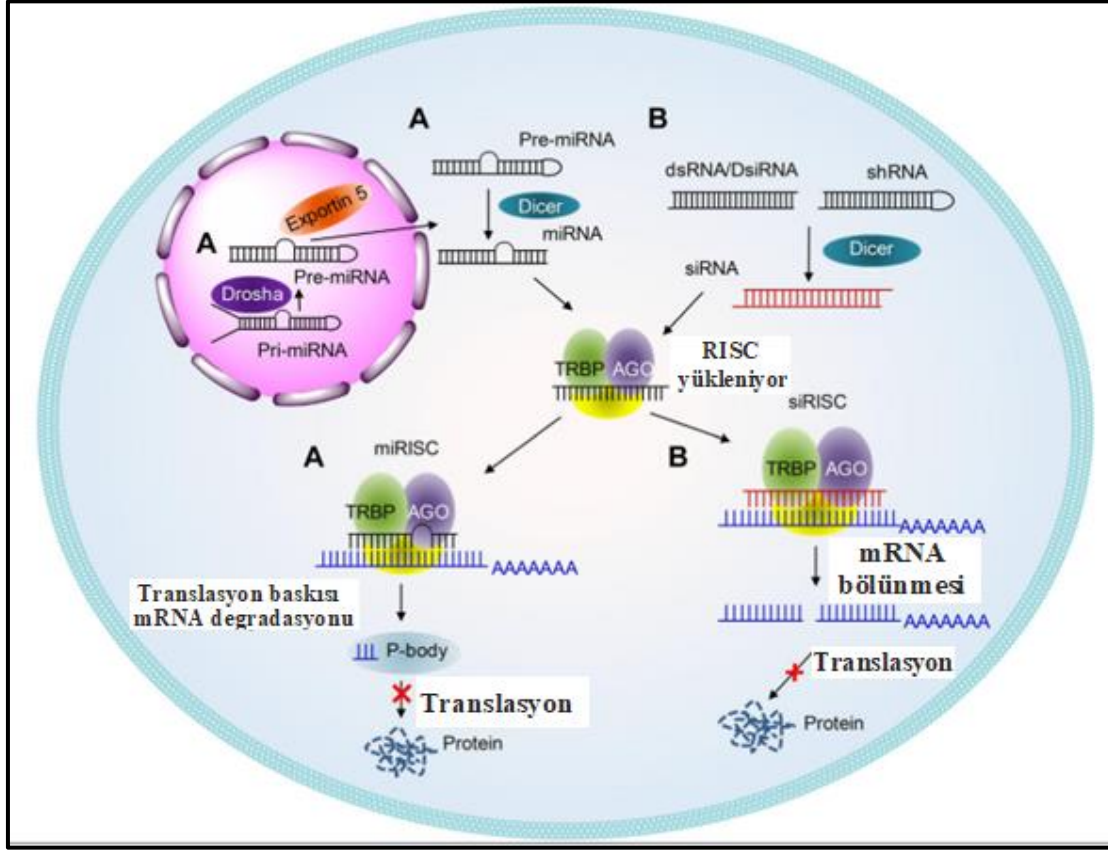
2.8. RNA Susturma ile Gen Düzenlenmesi

RNA susturma, bir genin transkripsiyonunu baskılayarak (transkripsiyonel gen susturma [TGS]) veya mRNA'nın dizi-spesifik parçalanmasına yol açan (post-transkripsiyonel gen susturma [PTGS]/RNA interferansı [RNAi]) yeni bir gen düzenleyici mekanizmadır. RNA interferansı (RNAi) mekanizması, ilk defa bitkilerde keşfedildi, ancak daha sonra RNAi protozoa, sinekler, nematodlar, insektler, parazitler, fare ve insan hücre hatları dahil olmak üzere hemen hemen tüm ökaryotik organizmalarda tanımlanmıştır. RNAi sırasında, çift zincirli RNA (dsRNA), hedef mRNA'ların (indükleyici moleküllerin) önce parçalanmasına ve sonunda yıkımına yol açar. Sonuç olarak, hedef mRNA'lar sitozolde birikemezler, ancak nükleer analiz yöntemleri ile var oldukları tespit edilebilmektedir. RNAi'nin doğal işlevleri ve bununla ilgili süreçlerin, genomun virüsler ve transpozonlar gibi hareketli genetik unsurların istilasına karşı korunmasında ve hücrelerin gen ifadesinin denetiminde rol aldığı bilinmektedir [38].

2.8.1. RNAi mekanizması

RNAi, evrimsel olarak büyük oranda korunmuştur. RNAi mekanizması ayrıntılı olarak şu şekilde açıklanabilir; endojen dsRNA'lar, dicer adı verilen bir ribonükleaz proteini ile küçük interferans siRNA'lere (siRNA: small interfering RNA) parçalanır. siRNA, 21-23 baz çifti (bç) uzunluğunda ve her iki 3' ucunda 2 nükleotidlik uzantıya sahiptir. siRNA, RNA aracılı indüklenen susturma kompleksi (RISC-RNA) ile bağlanır ve RISC'nin katalitik bileşeni olan endonükleaz argonat 2 (AGO2) zinciri (sens) parçalanır, kılavuz zinciri (antisens) ise RISC içine yerleştirilir. Daha sonra, kılavuz zinciri, aktif siRNA-RISC'yi hedef mRNA'ya yönlendirir. RISC kompleksi mRNA'yı tarar ve kılavuz zincirini tamamlayıcı olan mRNA bölgesini bularak endonükleaz argonat 2 (AGO2) proteini ile

mRNA'nın parçalanmasını sağlar ve böylece transkripsiyonun baskılanması sağlanmış olur (Şekil 2.9) [39-41].



Şekil 2.9. siRNA interferans yolları [42]

2.8.2. siRNA temelli gen terapisi

Fire ve Mello 1998'de, *Caenorhabditis elegans* organizmasına, eksojen bir dsRNA enjekte ettikten sonra RNA interferans (RNAi) mekanizmasıyla genleri susturduğunu göstermişlerdir [40]. Bu çalışmanın ardından, spesifik gen fonksiyonlarını inceleme, gen tedavisi ve ilaç geliştirme alanlarında büyük adımlar atılması nedeniyle Andrew Z. Fire ve Craig C. Mello 2006 yılında Tıp alanında Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir [43]. siRNA, spesifik bir genin aşırı ifadenemesinin veya mutasyonlarının transkripsiyon sonrası gen düzenlenmesini sağlayarak genetik hastalıklar, viral enfeksiyonlar, kardiyovasküler hastalıklar ve otoimmün bozukluklar gibi çeşitli patolojik durumlar için ümit verici bir terapötik yaklaşımdır. Kanseri ile ilgili birçok gen bulunduğu için siRNA'ların yeni tedavi olmada önemli potansiyelleri vardır. Son yıllarda siRNA yöntemi kullanılarak onkogenlerin ifadesi durdurulmuştur, ayrıca bazı tümör baskılayıcı genlerdeki

mutasyonlar ve kanserde bazı sinyal yollarındaki anahtar molekülleri aydınlatılmıştır. Aynı zamanda siRNA spesifik özellikleri ve geniş hedefleme yeteneği nedeniyle çeşitli hastalıklarda kişiselleştirilmiş gen terapisinde rol alabilmektedir [40].

siRNA ile kanser tedavisinin avantajları

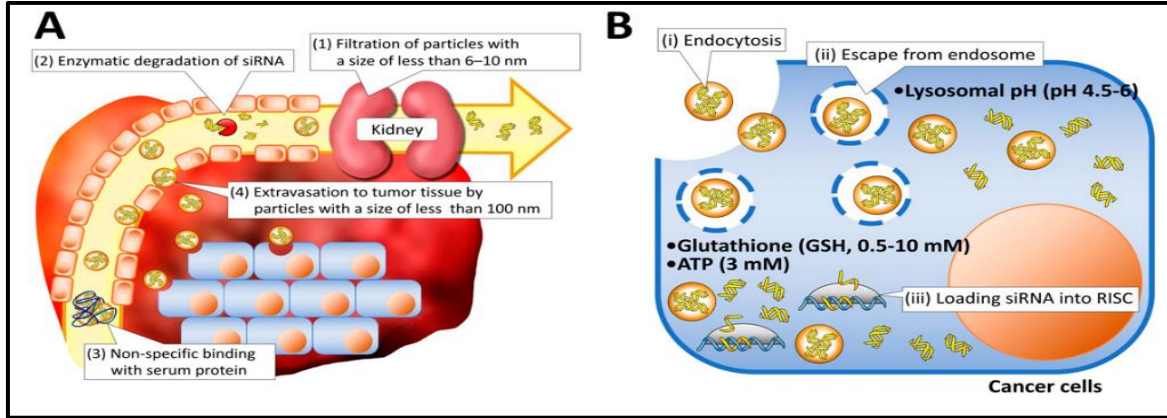
siRNA ilaçlarının, kemoterapötik antikanser ilaçları ile karşılaştırıldığında, özellikle de tedavisi olmayan kanserler için avantajları vardır:

1. siRNA'lar, yüksek derecede güvenli ilaçlardır.
2. siRNA'lar, gen transkripsiyonunun sonrasında etki ettikleri için DNA ile etkileşime giremez, böylece gen terapisinde yaygın olan mutasyon ve teratojenik risklerinden kaçınır
3. siRNA'lar, oldukça etkilidir.
4. siRNA'lar, sadece birkaç kopya ile tek bir hücrede gen ifadesinin dramatik bir şekilde bastırılmasına neden olabilirler.

Diğer küçük ilaç molekülleri veya antikor bazlı ilaçlarla karşılaştırıldığında, siRNA'nın en büyük avantajı, tamamlayıcı baz eşleşmesinden dolayı tüm genlere hedeflenebilmesi ve hedef gene karşı yüksek seçiciliğidir [39].

siRNA ile kanser tedavisinin engelleri

Şu anda, klinikte siRNA temelli tedavinin uygulanmasının önündeki ana engel, etkili bir taşıyıcı sisteminin bulunmamasıdır. siRNA'nın etkisini gösterebilmesi için, kanser hücrelerine ulaşması ve hücre membranından geçerek sitoplazmada bulunması gereklidir. İdeal taşıyıcı sistemi, siRNA'yı serum nükleaz ile parçalanmadan, böbrek ile eliminasyonundan ve fagositler tarafından alınmasından korumalıdır, böylece siRNA'ların uzun süre stabil kalmaları ve hedef hücreye ulaşması sağlanabilir (Şekil 2.10). Uygun taşıyıcı sistem bulunamaması siRNA'nın klinik çalışmalarının başlangıçta umulandan daha yavaş ilerlemesine sebep olmuştur.



Şekil 2.10. Hücre dışı (A) ve hücre içi (B) bölgelerdeki iletim engellerinin şematik gösterimi [40].

Son yirmi yılın büyük kısmı hem siRNA moleküllerini belirli hedef organlara ulaştırmanın hem de siRNA'nın kan dolaşımındayken stabilitesini koruyabilen nanopartiküller üretmenin etkili yollarını araştırarak geçirilmiştir [39]. Bu mücadelenin sonunda ONPATTRO® (patisiran, ALN-TTR02), siRNA-temelli ilk ilaç olarak 2018'de Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa Komisyonu (EC) tarafından onaylanmıştır. Ayrıca yakın zamanda FAD, GIVLAARI™ (givosiran, ALN-AS1)'nin, akut hepatik porfiri (AHP) olan yetişkinlerin tedavisi için kullanılmasını onaylamıştır [42]. Bunun yanı sıra klinik çalışmaları devam eden siRNA-temelli ilaçlar mevcuttur (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Klinik çalışmaları devam eden bazı siRNA-temelli ilaçlar [42].

İlaç ad	Uygulanan Kanseler	Dağıtım sistemi	Hedefi	Klinik Fazı
Atu027	Pankreatik duktal karsinom,	AtuPlex	PKN3	1/2
siG12D-LODER	Pankreatik duktal karsinom, Pankreatik kanser	Polymeric matrix	KRAS G12D	2
Cobomarsen (MRG-106)	Kan kanserleri (kutanöz T hücreli lenfoma, lösemi...)	NA	MicroRNA- 155	2
ARO-HIF-2	Berrak hücreli karsinom (ccRCC)	TRiM (RGD- siRNA conjugate)	HIF-2 α	1
si-PT-LODER	Prostat kanseri	Polimerik matriks (LODER polimer)	HSP90	Preklinik

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Ultra saf su cihazı Thermo scientific Barnstead
- Hassas terazi: And GR-200
- Vorteks: Select Bio-Products Select
- PH Metre: inoLab WTW
- Mini Santrifüj Cihazı: Grant-Bio PCV-3000
- EVE™ NanoEntek cihazı
- NanoDrop, Thermo Scientific, ABD
- Prime Pro 48 Real-time qPCR, Techne, İngiltere
- Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi

3.2. Kullanılan Kimyasallar

- DMEM vasat (Biological Industries, ABD)
- Fetal Sığır Serum (FBS) (Biological Industries, ABD)
- %1 Penisilin - Streptomisin (Pen-Strep) (Biological Industries, ABD)
- Trypsin-EDTA (%0,05) (Biological Industries, ABD)
- Dharma FECT™ transfeksiyon reaktifi (Horizon, İngiltere)
- siRNA solüsyonları (Horizon, İngiltere)

- Bradford Ultra™ çözeltisi (Expedeon, ABD)
- % 30 luk H_{Au}Cl₄ çözeltisi
- Küresel yapıda altın nanopartikülleri (AuNP)
- DTNB (5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit))
- Tripan mavisi
- MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromit)
- Trizol (Thermo Fisher, ABD)
- (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific, ABD)
- Primerler (Oligomer)
- Master mix (Bioline, Avustralya)
- GGT1, GGT5 ve GGT7 antikorları (Abcam, İngiltere)
- γ -GT Activity Assay Kit, E-BC-K126-M, (Elabscience, ABD)
- Human (GSH) ELISA Kit, (SUNRED, Çin)
- Human Leukotriene D4 (LTD4) ELISA Kit, (SUNRED, Çin)

3.3. Hücre Kültürü

3.3.1. Kullanılan hücre dizileri

MCF 10A, sağlıklı meme epitel hücre hattı kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

MDA-MB-231, üçlü negatif meme kanseri hücre hattıdır.

3.3.2. Hücrelerin kültüre edilmesi

- MCF 10A ve MDA-MB-231 hücre hatlarının çoğaltılması için DMEM vasat (Biological Industries) kullanıldı. Vasat içerisine %10'luk Fetal Sığır Serum (FBS) (Biological Industries) ve %1 Penisilin - Streptomisin (Pen-Strep) (Biological Industries) eklendi. MCF 10A ve MDA-MB-231 hücre hatları 37 °C, %5 CO₂ inkübatör içerisinde, 75 cm²'lik flasklarda çoğaltıldı.
- Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında kültür vasatını boşaltıp Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi (PBS) (Biological Industries) ile bir dakika yıkandı.
- Hücrelerin üzerine 5 mL Tripsin-EDTA (%0,05) (Biological Industries) ekleyerek yüzeyi bir dakika yıkandı. Fazla tripsin boşaltılıp hücre tabakası yüzeyden ayrılincaya kadar inkübatörde (5-10 dk) bekletildikten sonra 5 ml taze vasat eklenip süspanse edildi.
- Hücre süspansiyonu 15 mL'lik falkon tüpüne aktarılıp 3000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonucu oluşan süpernatant atıldı ve hücrelere 3 ml taze vasat eklenerek resüspanse edildi.
- Daha sonra 1 mL alınarak yeni bir 75 cm²'lik flaska ekim yapıldı. Üzerine 15 mL vasat eklendi, böylece hücrelerin yeniden çoğalmaları sağlandı.
- Ekim sonrası fazla kalan hücreler, %50'lik FBS ve %10'luk dimetilsülfoksit (DMSO) içeren vasat içinde -80 °C'de donduruldu.

3.4. siRNA Transfeksiyonu ile Gen Susturma Deneyleri

Prensip: siRNA, spesifik bir genin aşırı ifadenmesinin veya mutasyonlarının transkripsiyon sonrası gen düzenlenmesini sağlamaktadır.

Yöntemin Uygulanışı: MCF 10A ve MDA-MB-231 hücre hatlarında GGT1, GGT5 ve GGT7 genlerin fonksiyonlarını belirlemek amacıyla hücrelerdeki siRNA transfeksiyon yöntemi uygulayarak GGT1, GGT5 ve GGT7 genleri translasyonu baskılanmıştır. Transfeksiyonda kullanılan materyaller aşağıda sıralanmıştır:

- 6 kuyucuklu hücre külütrü plağı
- FBS ve Pen-Strep içermeyen vasat
- Dharma FECTTM transfeksiyon reaktifi (Horizon, İngiltere)
- GGT1, GGT5, GGT7, pozitif kontrol ve negatif kontrole ait siRNA'lar (5 µM solüsyonlar, DharmaconTM Horizon, İngiltere).

3.4.1. Transfeksiyon şartlarının optimize edilmesi

Transfeksiyon çalışmalarında, 48 kuyucuklu hücre külütrü plağı hücre ekimi yapıldıktan sonra 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından transfeksiyon koşullarının optimize edilmesi amacıyla ilk olarak MDA-MB-231 hücreleri kullanılmıştır. Bu çalışmalarda siRNA'ların konsantrasyonlarının ve inkübasyon süresinin belirlenmesine yönelik deneyler yapılmıştır. Değişik hacmilerdeki Dharma FECTTM ajanı (0.75, 1, 2, 2.5 µL) ve farklı inkübasyon süresi ile (24, 48, 68 saat) deneyler gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1.). Ardından MDA-MB-231 hücreleri ile yapılan çalışmalardan elde edilen etkin sonuçların ışığında transfeksiyon vasat içerisinde ideal konsantrasyonlar ve gerekli olan inkübasyon süresi MCF 10A hücrelerinde tekrarlanmıştır. İki hücre hatlarından elde edilen etkin sonuçlar daha sonra 3 kere tekrarlanmıştır.

Çizelge 3.1. Transfeksiyon deneylerden elde edilen bulgular.

Hücre Hattı	Transfeksiyon ajanı	Transfeksiyon ajanı miktarı ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Transfeksiyon süresi (saat)	Bulgular
MDA-MB-231	DharmaFECT™ (Horizon)	0.75,1,1.5,2	24/ 48/ 68	Transfekte edilmemiş hücrelerle karşılaştırıldığında hedef genler susmamışlar veya kısmen susmuşlar
		2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	24	Hedef genler kısmen susmuşlar
		2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	48	Hedef genler tamamen ya da büyük oranda susmuşlar
		2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	68	Yeniden ekspresyon gerçekleşmiş

3.4.2. siRNA transfeksiyonunun uygulanması

Birinci gün, 2000 μL vasat içerisinde 5×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre plağına ekim yapıldı.

İkinci gün, transfeksiyon vasatı aşağıdaki deney prosedürüne göre hazırlandı:

1. Tüp 1: 10 μL siRNA solüsyonu + 190 μL FBS ve Pen-Strep içermeyen besiyeri eklendi.
2. Tüp 2: 10 μL DharmaFECT™ transfeksiyon reaktifi +190 μL FBS ve Pen-Strep içermeyen vasat eklendi.
3. Her tüp mikropipet yardımıyla hafifçe karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
4. Tüp 1, tüp 2'ye eklenip mikropipet yardımıyla hafifçe karıştırıldı ve oda sıcaklığında 20 dk bekletildikten sonra 1600 μL tam ortam (FBS+ besiyeri) eklendi.
5. Kuyucuklardan vasat çekildi ve her kuyucuğa 2000 μL hazırlanan transfeksiyon vasat eklendi.

Ardından, 37°C, %5 CO₂ inkübatör içerisinde 48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra transfeksiyon sonlandırılıp vasatlar atıldı ve PBS ile yıkandı. Transfekte edilen bir grup

hücre qRT-PCR ve Raman-spektroskopi yöntemlerinde kullanmak için 1 mL trizol ile kaldırıldı, diğer grup hücreler ise Elisa kitlerinde kullanmak için 500 µL Tripsin EDTA (%0,05) ile kaldırıldı.

3.5. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Tespiti

Prensip: Tripan mavisi boyası, canlı hücre membranının zarar görmediğinden hücre içine geçemezken, ölü hücre membranından geçerek hücreleri maviye boyar. Böylece canlı ve ölü hücreler birbirinden ayrılır. Bu yöntemle EVETM NanoEntek cihazı yardımıyla hücreler sayılarak canlılıkları belirlendi.

Yöntemin Uygulanışı: EVETM NanoEntek cihazı ile sayım için 10 µL hücre +10µL tripan mavisi bir ependorfa alındı ve sayım yapıldıktan sonra hücreler -80°C’de saklandı.

3.6. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Tespiti

Prensip: MTT yöntemi, genellikle hücre canlılığını, çoğalmasını ve sitotoksiteyi ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu kolorimetrik testin prensibi, sarı bir tetrazolyum tuzunun ((3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromit; MTT) metabolik olarak aktif hücreler tarafından mitokondriyal redüktaz enzimiyle suda çözünmeyen mor formazana indirgenmesine dayanır. Çözünmeyen formazan kristalleri, bir çözündürme solüsyonu kullanılarak çözülür ve elde edilen renkli solüsyonun spektrofotometrede 570 nm’de absorbansı ölçülür, oluşan boya yoğunluğu canlı hücre sayısını verir [44] .

Yöntemin Uygulanışı: 96-kuyucuklu plakaya 100 µL pensilin içermeyen besiyerine MCF 10A ve MDA-MB-231 10.000 hücre/kuyucuk konsantrasyonunda ekim yapılmıştır, 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra besiyeri uzaklaştırılıp hücreler 4 gruba ayrıldı:

1.grup : Kontrol hücreleri (siRNA uygulamasına tabi tutulmamış).

2.grup : GGT siRNA (si-GGT)

3.grup : PK siRNA

4.grup : NK siRNA

Hücreler siRNA ile 48 saat boyunca muamele edildikten sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyucuklar PBS ile yıkandıktan sonra 100 µL MTT solüsyonu eklenip karanlık ortamda 4 saat 37°C' de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda MTT solüsyonu uzaklaştırılıp, 100 µL izopropil alkol eklendi. Ardından tekrar 4 saat 37°C' de inkübe edildikten sonra mikropilaka okuyucuyla 570 nm dalgaboyunda absorbanslar değerleri kaydedildi.

3.7. RNA İzolasyonu

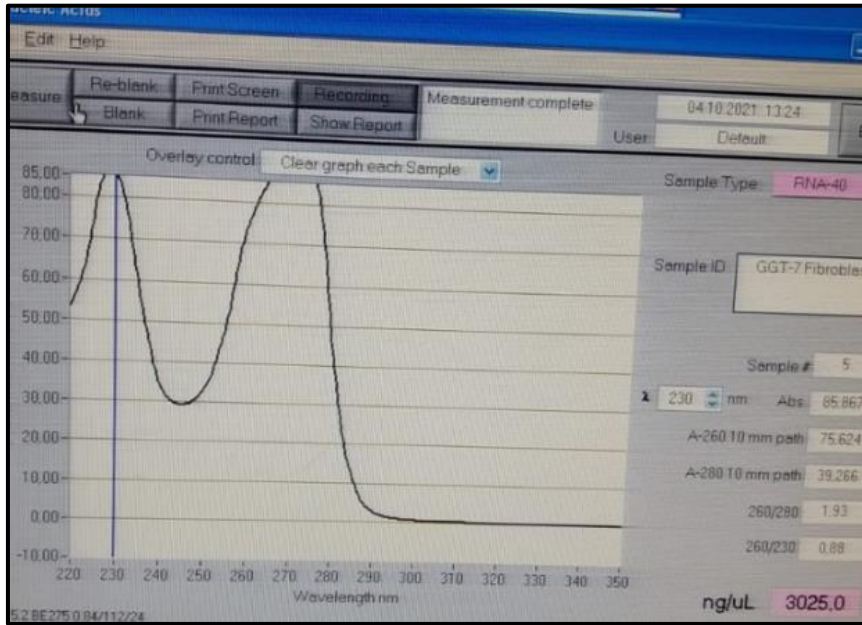
Prensip: RNaz aktivitesinin etkili inhibisyonu nedeniyle homojenizasyon sırasında RNA'nın bütünlüğünü koruyan TRIzol™ Reagent ile homojenizasyon yapıldıktan sonra, kloroform eklenmesiyle DNA, RNA ve protein olmak üzere oluşan 3 katmandan izopropanol ile RNA'nın çöktürülmesi esasına dayanır.

Yöntemin Uygulanışı: MCF 10A ve MDA-MB-231 hücreleri Trizol (Thermo Fisher) ile kaldırıldı ve -80° C'de saklandı.

Trizol RNA izolasyon kiti ile yapılan RNA izolasyonunda aşağıdaki protokol izlenmiştir:

1. Trizol ile daha önceden kaldırılmış ve -80° C'de dondurulmuş hücreler, RNA izolasyonundan önce çıkarıldı ve çözünmesi için beklendi.
2. Üstteki faz yeni tüpe alındı, üzerine 0.5 mL izopropanol eklendi ve 25-30°C'de 10 dk inkübe edildi.
3. Tüpler 12000 x g'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonucu oluşan süpernatant atıldı ve RNA pelletlerine 1 mL %75 etanol eklendi.
5. Tüpler hafifçe vortekslendikten sonra 7500 x g'de 5dk 4 °C'de santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonucu oluşan süpernatant atıldı ve tüplerdeki kalan etanol kurutmak için 10-15 dk beklendi.

7. RNA pelleti üzerine 30 μ L nükleaz içermeyen su eklendi ve mikropipet yardımıyla süspansiyon edildi.
8. Tüpler etüvde 55-60°C'de 10 dk inkübe edildi .
9. Ardından RNA konsantrasyonları ve saflığını belirlemek için NanoDrop (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanıldı, RNA saflığının belirlenmesinde 260/280 absorbans değeri dikkate alınarak ölçüm yapıldı. Yapılan ölçümlerden bir RNA izolatının ölçüm görüntüsü resim 3.1'de gösterilmiştir.
10. cDNA'ye çevirilinceye kadar kadar -80 °C'de saklandı.



Resim 3.1. Nanodrop ile si-GGT7 ile transfeke edilen MCF 10A hücrelerinde RNA izolatının ölçüm görüntüsü.

3.8. cDNA Sentezi

Prensip: Revers transkriptaz enzimi (RT), bir RNA kalıbı ve oligo(dT)18 primerinden PCR için bir kalıp olarak kullanılabilen tek iplikçik cDNA'nın sentezlenmesi esasına dayanır.

Yöntemin Uygulanışı: cDNA sentezi yapılmak üzere toplam RNA miktarına göre gerekli olan hacim hesaplandı. cDNA elde etmek için (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific, ABD) kiti kullanıldı.

Aşağıdaki protokol izlendi (Çizelge 3.2.)

Çizelge 3.2. cDNA sentezi için kullanılan protokol.

Protokol	
Total RNA	2 µg
Oligo (dT) ₁₈ primer	1 µL
Nükleaz içermeyen su	12 µL'ye tamamlanmıştır.
Hafifçe karıştırıldı	
5X reaksiyon tamponu	4 µL
Ribonükleaz inhibitörü (20 U/µL)	1 µL
10 mM dNTP karışımı	2 µL
M-MuLV Ters Transkriptaz (200 U/µL)	1 µL
Toplam hacim	20 µL
Nazikçe karıştırıldı ve santrifüj edildi	
cDNA sentezi için Thermal Cycler'da 42 °C' de 60 dk inkübasyona bırakıldı	
Reaksiyonun sonlanması için Thermal Cycler'da 70 °C' de 5 dk inkübasyona bırakıldı	
qRT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere cDNA'lar -80 C'de saklandı.	

3.9.Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Preşip: PCR reaksiyonu ile DNA amplifikasyonunun her bir turunda SYBR yeşil boyasının polimerleşme esnasında dsDNA'ya bağlanması ve her uzatma adımının sonunda floresan seviyesinde bir artış olması esasına dayanır. Reaksiyondaki dsDNA ürününün miktarı, floresan miktarı ile orantılıdır.

Yöntemin Uygulanışı: GGT genlerinin ekspresyonunun olup olmadığını değerlendirmek için elde edilen cDNA örneklerine Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) (Prime Pro 48 Real-time qPCR, Techne, İngiltere) ile gen amplifikasyonu yapılmıştır. Analizler değerlendirilirken β -aktin housekeeping gen olarak kullanılmıştır. qRT-PCR analizlerinde kullanılan primerlerin baz dizileri çizelge 3.3.'de verilmiştir. mRNA dizisine göre NCBI GeneBank (NM001160110.1, Bethesda, MD, USA) kullanılarak tasarlanmıştır.

Çizelge 3.3. qRT-PCR analizlerinde kullanılan primerlerin baz dizileri.

Oligo adı	Baz Dizisi 5'-3'	Erime Sıcaklığı
GGT1 (Forward)	TGACCTTCAGGAGAACGAGA	57
GGT1 (Reverse)	TCTTCTTCATGGCTCTGCGT	57
GGT5 (Forward)	CTCCAAGGTCTGCTCGGAT	58
GGT5 (Reverse)	GTTGTCACATTGTAGATGGTG	43
GGT7 (Forward)	ACACCGACCCGGACTCCTT	61
GGT7 (Reverse)	ACGGGTCTTTGCGCGTCTC	61
β -aktin (Forward)	GTCTTCCCCTCCATCGTG	58
β -aktin (Reverse)	AGGGTGAGGATGCCTCTCTT	59

qRT-PCR reaksiyon karışımı çizelge 3.4.'de ve reaksiyon koşulları çizelge 3.5.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.4. PCR reaksiyon karışımı

2x Light Cycler Sybr Green Master	5 μ L
cDNA	1,5 μ L
Distile Su	1,5 μ L
10 μ M F Primer	1 μ L
10 μ M R Primer	1 μ L
Toplam Hacim	10 μ L

Çizelge 3.5. Reaksiyon koşulları

Program	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Urasil DNA glikozilaz (UDG) İnkübasyon	95 °C	1 sn	1
Polimeraz aktivasyonu	95 °C	2 dk	1
PCR döngüsü	95 °C	5 sn	40
	65 °C	10 sn	
	72 °C	20 sn	
Erime eğrisi	95 °C	15 sn	1
	75 °C	1 dk	
	95 °C	15 sn	

qRT-PCR analizlerinden elde edilen nisbi gen ekspresyon miktarlarının (bağıl kantifikasyon, RQ) hesaplanmasında $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ eşitliği kullanılmıştır.

$\Delta Ct = Ct_{\text{hedef}} - Ct_{\text{referans}}$ eşitliği ile hesaplanmıştır.

Ardından $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{susturulmuş hücreleri}} - \Delta Ct_{\text{muamele edilmemiş hücreleri (kontrol)}}$ eşitliği kullanılmıştır. Son olarak bu değer kat değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ eşitliğinde kullanılarak genin ekspresyon seviyeleri hesaplanmıştır. Buna göre 2'nin üzerinde olan değerler susturulmuş hücrelerde, muamele edilmemiş hücrelere oranla ekspresyonun arttığı, 2'nin altındaki değerler ise ekspresyonun azaldığı şeklinde değerlendirilmiştir.

3.10. Protein İzolasyonu

Prencip: Monofazik bir fenol ve guanidin izotiyosiyanat çözeltisinden oluşan TRIzol™ Reagent ile homojenizasyon yapıldıktan sonra, kloroform eklenmesiyle DNA, RNA ve protein olmak üzere oluşan 3 katmandan izopropanol ile fenol-etanol süpernatantından proteinin çöktürülmesi esasına dayanır.

Yöntemin Uygulanışı:

1. RNA izolasyonu yapıldıktan sonra elde ettiğimiz fenol-etanol süpernatanı üzerine 1.5 mL izopropanol eklendi ve 25-30°C'de 10 dk inkübe edildi.

2. Ardından 12000 x g'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonucu oluşan süpernatant atıldı ve protein pelletlerine 2 mL yıkama solüsyonu eklendi (yıkama solüsyonu: %95 etanol içinde 0.3 M guanidin hidroklorür bulunmaktadır) ve 20 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. Ardından 5 dakika 4°C de 7500 x g'de santrifüj edildi.
5. Süpernatant atıldı ve bu yıkama işlemleri 3 kere tekrarlandı.
6. Pelletler üzerine 2 mL %100 lük etanol eklenip, hafifçe vortekslendikten sonra 20 dakika inkübasyona bırakıldı.
7. Pelletler 5 dakika 4°C' de 7500 x g'de santrifüj edildi.
8. Süpernatant atıldı ve oda sıcaklığında 5-10 dakika pelletlerin kuruması için bırakıldı.
9. Pelletler, 200 µL %1 SDS ile resüspanse edildi. Proteinlerin tamamen çözünmesi için 50°C ısıtıcı blok içerisinde inkübasyona bırakıldı.
10. Çözünmeyen materyalleri uzaklaştırmak için 10 dakika 4°C'de 10,000 x g'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant RAMAN çalışmasında kullanılmak üzere -20°C de saklanmıştır.

3.11. Bradford Yöntemi ile Total Protein Miktar Tayini

Prensip: Bradford çözeltisi içinde yer alan Coomassie G-250 boyasının proteinleri bağlamasıyla oluşan mavi rengin şiddetine göre kolorimetrik olarak total protein miktarının tayin edilmesi esasına dayanır.

Yöntemin Uygulanışı:

RAMAN yönteminde kullanılacak olan hücresel lizatlarındaki protein miktarı Bradford Yöntemiyle belirlenmiştir. Bradford analizi için standart grafiği oluşturulmuştur.

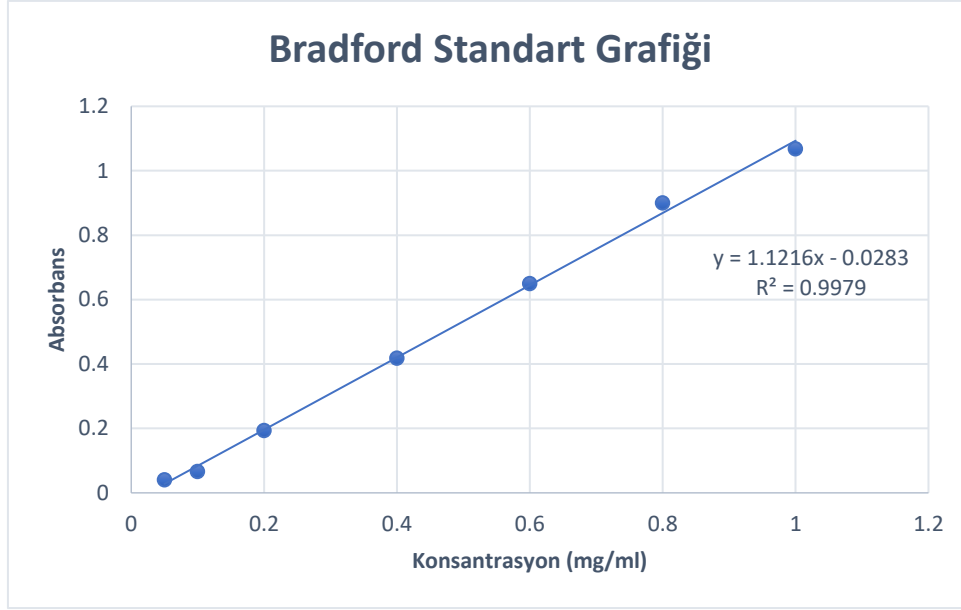
Standartların hazırlanması sırasında 1mg Bovine Serum Albümin (BSA) tartılmış ve 1 mL distile su ile çözülerek 1 mg/mL konsantrasyonlu stok solüsyonu elde edilmiştir. Daha sonra yapılan seri seyreltmeler ile 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1 ve 0,05 mg/mL konsantrasyonda 7 adet BSA standardı hazırlanmıştır (Çizelge 3.6.).

Çizelge 3.6. Standartların Konsantrasyonları ve Absorbans Değerleri

Standartlar	Konsantrasyon (mg/mL)	Absorbans Değeri
Standart 1	1	1,068
Standart 2	0,8	0,9
Standart 3	0,6	0,65
Standart 4	0,4	0,418
Standart 5	0,2	0,193
Standart 6	0,1	0,066
Standart 7	0,05	0,04

Bradford yönteminde uygulanan prosedür:

1. Her standarttan ve her örnekten 3 tekrarlı olmak üzere 96 kuyucuklu ELISA mikropalakasına 10 μ L aktarılmıştır.
2. Her kuyucuğa 250 μ L Bradford Ultra™ çözeltisi (Expedeon, ABD) eklenmiştir.
3. Mikropalaka oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra 595 nm dalga boyunda mikropalaka okuyucuda absorbanslar ölçülmüştür.
4. Elde edilen absorbans değerlerine göre standart grafiği oluşturularak örneklerdeki protein miktarlarını hesaplanmıştır (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. Bradford standart grafiği.

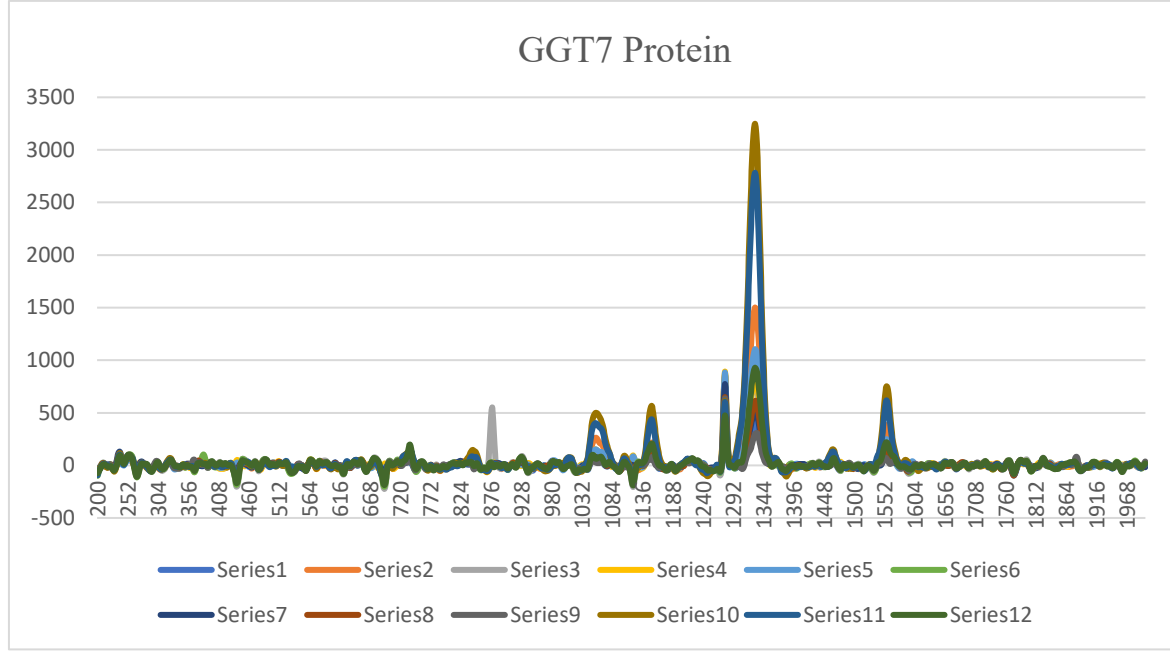
3.12. Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi

Bu yöntemle çalışılan proteinlerin susturma sonrasında ekspresyonlarında değişiklik olup olmadığının tayin edilmesi amaçlanmıştır.

Prensip: Raman spektroskopisi, molekül üzerine gönderilen şiddetli bir ışık demetinin molekülle etkileşmesi sonucu meydana gelen saçılmanın dedektör ile takibine dayanan bir tekniktir. Işık saçılması esnasında saçılan ışığın büyük bir kısmının enerjisi madde ile etkileşen ışığın enerjisine eşit olur, Rayleigh saçılması adını alan bu olay bir elastik saçılma olayıdır. Elastik saçılma olayından başka saçılan ışığın çok az bir miktarı Raman saçılması adını alan elastik olmayan saçılma olayını gerçekleştirir. Raman saçılması spektroskopik olarak incelenebilmektedir. Saçılan ışığın enerjisinde molekül ile etkileşen ışığına göre oluşan fazlalık veya azlık ışıkla etkileşmiş molekülün titreşim düzeyleri arasında bilgi vermektedir. Yüzeyde zenginleştirilmiş Raman saçılması (YZRS), düşük derişimlerdeki maddelerin tayinine imkan sağladığı için düz Raman'a göre çok daha hassas bir tekniktir. Yeni tip nanoparçacıkların üretimi bu parçacıkların yüzey plazmon rezonanslarının farklı olması ve parçacıklardaki topaklanma bu parçacıkların yakınında bulunan moleküllerin YZRS sinyallerini etkilemektedir. YZRS'in kimyasal [45-47] ve biyolojik ajanın [48,49] hassas tespiti için yaygın olarak kullanılması sağlanmıştır.

3.12.1. Küresel yapıda altın nanopartikül sentezi ve yüzey modifikasyonu

Küresel yapıda altın nanopartikülleri (AuNP) Turkevich metoduna göre sentezlemek için öncelikle 18 μL % 30 luk HAuCl_4 çözeltisi 50 mL'ye distile su ile seyreltilmiştir. Bu çözelti 250 mL lik balonda geri soğutucu altında kaynayanaya kadar ısıtılmıştır. Daha sonra, sabit kaynama ile çözeltiye 5 mL 40 mM sodyum sitrat çözeltisi eklenip ve renk şarap kırmızısına döndükten sonra 10 dk. daha karıştırma işlemi devam edilmiştir. Daha sonra çözelti sıcak yağ banyosundan çıkarılıp, oda sıcaklığında biraz daha olgunlaşması için 15 dk daha karıştırma işlemine devam edilmiştir ve 4 °C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir. Sentezlenen altın nanopartiküllerin boyutları TEM cihazı ile karakterize edilmiştir. Sentezlenen sitratlı bazlı AuNP'ler Yüzeyde zenginleştirilmiş Raman saçılması (YZRS) etiket olarak kullanılmak üzere DTNB (5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)) ile modifiye edilmiştir. Bu amaçla AuNP çözeltisinin 1 mL'sine 20 μL , 20 mM DTNB (5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)) çözeltisi ilave edilmiştir, 650 rpm hızda 1 gün boyunca karıştırılarak DTNB moleküllerinin nanopartikül yüzeyine bağlanması sağlanmıştır. Modifiye partiküller 13000 rpm'de santrifüj edilerek bağlanmayan DTNB molekülleri uzaklaştırılmıştır. Sonrasında 1 mL partikül çözeltisine 100 μL , 35 $\mu\text{g/mL}$ monoklonal GGT1, GGT5, GGT7, GAPDH antikorları ilave edilmiştir ve 650 rpm'de 15 dk karıştırılarak antikorların bağlanması sağlanmıştır. Daha sonra spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için antikor bağlı nanopartiküller 100 μL , 1 mg/mL BSA çözeltisi ile 60 dk etkileştirilmiştir. 14000 rpm'de 20 dk santrifüj edilip ve fazla BSA uzaklaştırılmıştır. Antikor bağlı etiketli AuNP'ler 2 mM PBS tamponuna (pH 7.4, %10 sukroz içeren) alınarak konjugasyon pede yüklenerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Ardından modifiye manyetik partiküller GGT1, GGT5 ve GGT7 numuneleri ile etkileştirmiştir ve bir mıknatıs yardımıyla $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ partiküller ve etkileşen bakteriler deney tüp içinde toplanarak $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ partiküller yıkama işlemi ile numune ortamındaki diğer bileşenler uzaklaştırılmıştır. GGT1, GGT5, GGT7 ve GAPDH antikorları, antijen ile etkileştikten sonra YZRS etiket ve antikorlar ile fonksiyonel hale getirilmiş olan AuNPs ile oluşturulan sandviç kompleks üzerinden kantitatif tayin yapılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. MCF 10 A hücre hattında Raman spektroskopisi ile GGT7 protein tayini.

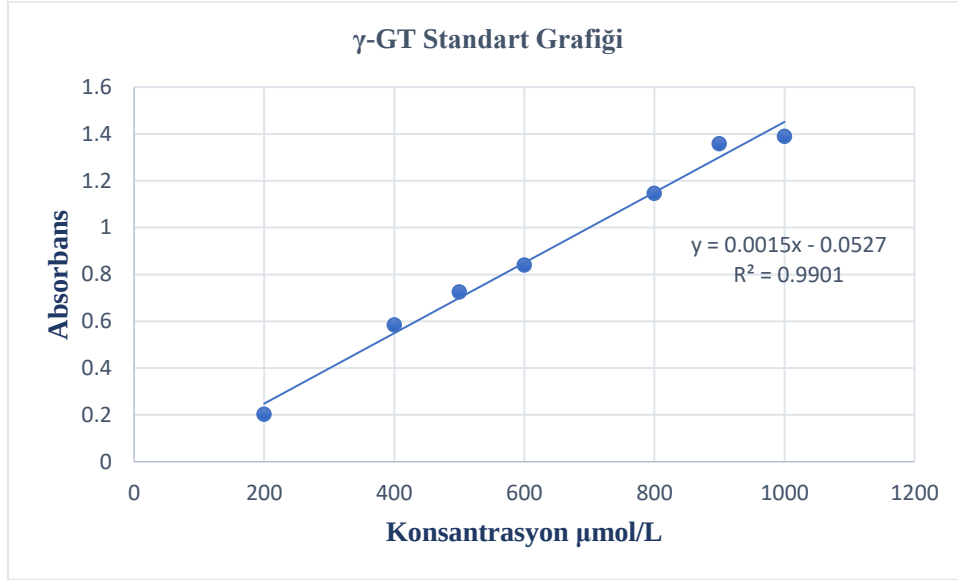
3.13. GGT Enzim Aktivitesi Tayini

Prensip: Örnek içerisindeki GGT'nin aktivitesiyle orantılı olarak spesifik bir substrat olan L- γ -Glutamil-p-nitroanilinden N-glisil glisine gama glutamil grubunun transferini katalize ederken verdiği absorbansın 405nm'de ölçülerek enzim aktivitesinin tayin edilmesi prensibine dayanır.

Yöntemin Uygulanışı: GGT aktivitesi, (γ -GT Activity Assay Kit, E-BC-K126-M, Elabscience, ABD) kit ile tayin edilmiştir. Hücre lizatı aşağıdaki aşamalara göre hazırlanmıştır;

- Alınan hücre örnekleri PBS ile yıkandıktan sonra 1000 x g'de 4 °C'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Üst süpernatant kısmı atılıp pellet üzerene 0,3 mL reajan 3 eklenmiştir.
- Sonikatör kullanarak buz üzerinde hücreler parçalanmıştır.
- Ardından hücre örnekleri 1500 x g'de 4 °C'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Üst süpernatant kısmı alınmış ve kit prosedürüne göre analizi yapılmıştır.

- Numunelere çalışma solüsyonu ekledikten 1 dk sonra 405 nm dalga boyunda ilk okuma gerçekleştirilmiş, ardından 5 dk sonra ikinci okuma gerçekleştirilmiştir.
- Elde edilen absorbens değerlerine göre standart grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. γ-GT aktivitesi standart grafiği.

Örneklerdeki γ-GT aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır;

$$\gamma\text{-GT aktivitesi (U/g protein)} = 0.4 \times (\Delta A_{\text{numune}} - b) \div a \div C_{\text{pr}}$$

a : Standart eğrinin eğimidir.

b: Eğim-kesme noktasıdır.

$$\Delta A_{\text{numune}} : A_1 - A_2.$$

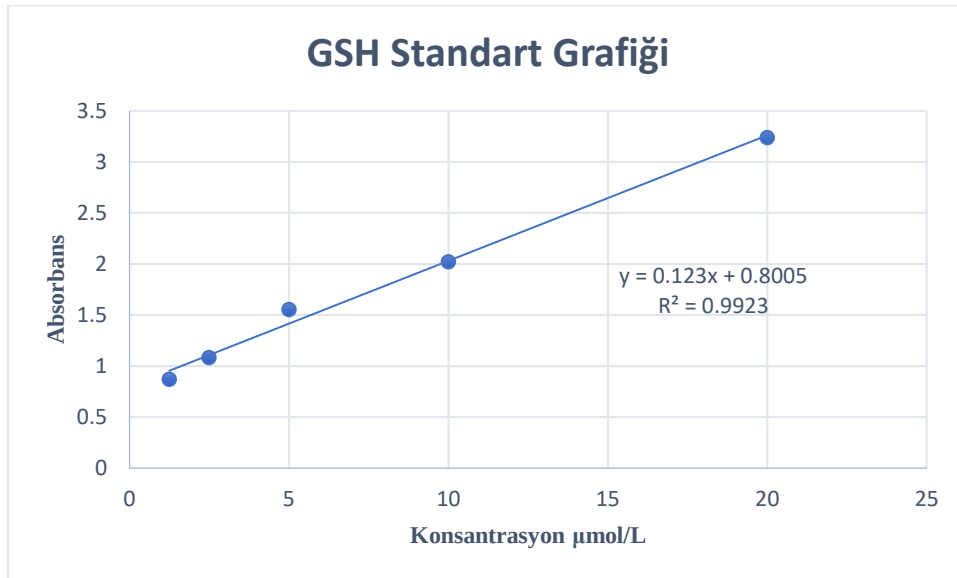
C_{pr} : Numunedeki protein konsantrasyonu (g/L).

3.14. Glutasyon Tayini

Prensip: Redükte glutasyon (GSH)'un, dinitrobenzoik asit (DNTB) ile reaksiyona girerek oluşturduğu sarı renkli kompleksin 405 nm'de kolorimetrik deneyle saptanarak GSH içeriğinin hesaplanması esasına dayanır.

Yöntemin Uygulanışı: Glutasyon (GSH) (Human (GSH) ELISA Kit, SUNRED, Çin) miktarı kit ile tayin edilmiştir. Hücre lizatı aşağıdaki aşamalara göre hazırlanmıştır;

- Alınan hücre örnekleri PBS ile yıkandıktan sonra 2500 rpm'de 4 °C'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Üst süpernatant kısmı atılıp pellet üzerine 0,2 mL PBS eklenmiştir.
- Sonikatör kullanarak buz üzerinde hücreler parçalanmıştır.
- Hücre örneklerinden 0,1 mL alınıp üzerine 0,1 mL reaktif 1 ekleyerek karıştırıldıktan sonra 4500 x g de 4 °C'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Ardından hazırlanan hücre örneklerinin kit prosedürüne göre analizi yapılmıştır.
- Elde edilen absorban değerlerine göre standart grafiği oluşturularak örneklerdeki GSH miktarları hesaplanmıştır (Şekil 3.4.)



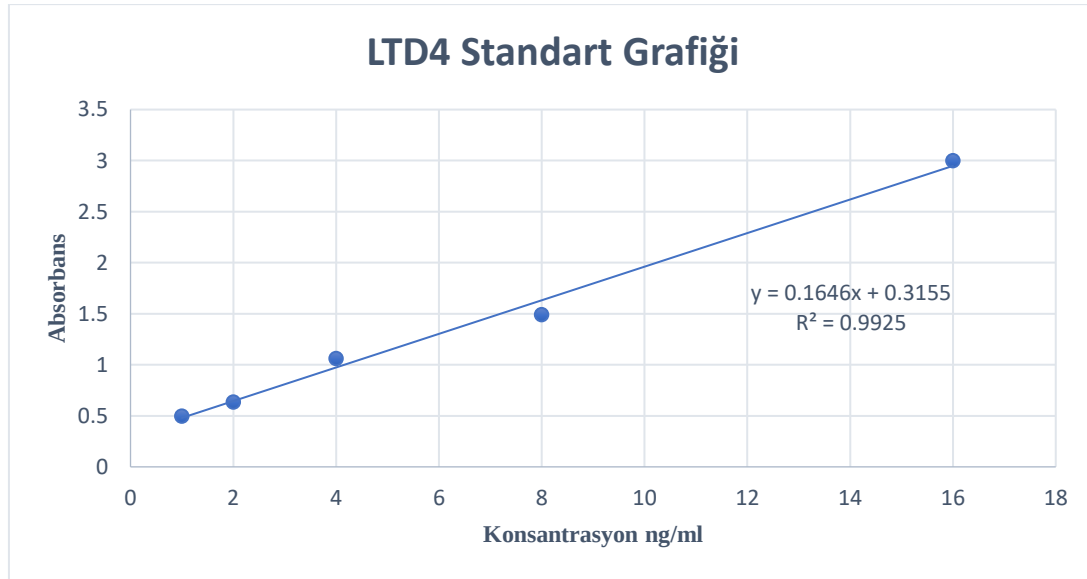
Şekil 3.4. GSH standart grafiği.

3.15. Lökotrien Tayini

Prensip: LTD4, dinitrobenzoik asit (DNTB) ile reaksiyona girerek oluşturduğu sarı renkli kompleksin 405 nm'de kolorimetrik deneyle saptanarak LTD4 içeriğinin hesaplanması esasına dayanır.

Yöntemin Uygulanışı:

Lökotrien (Human Leukotriene D4 (LTD4) ELISA Kit, SUNRED, Çin) miktarı kit kullanılarak tayin edilmiştir. Toplanan hücre örnekleri 2500 rpm'de 4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Üst süpernatant kısmı alınıp kit prosedürüne göre analizi yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerlerine göre standart grafiği oluşturularak örneklerdeki LTD4 miktarları hesaplanmıştır (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. LTD4 standart grafiği.

3.16. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS Statistics 23 (IBM SPSS statistics for Windows, version 23.0 Armonk, NY: IBM Corp.) programı ile yapılmıştır. Sayısal değişkenler ortanca ve standart sapma değerler ile özetlenmiştir. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler ile verilerinin normal dağılıma göstermediğini tespit edilmiştir. Normal dağılıma göstermeyen sürekli sayısal değişkenler ikiden fazla bağımsız grup karşılaştırması için parametrik olmayan Kruskal Wallis testi kullanılmıştır.

Değişkenler arasındaki istatistiksel olarak anlamlı korelasyon olup olmadığı Spearman's korelasyon testi ile değerlendirildi.

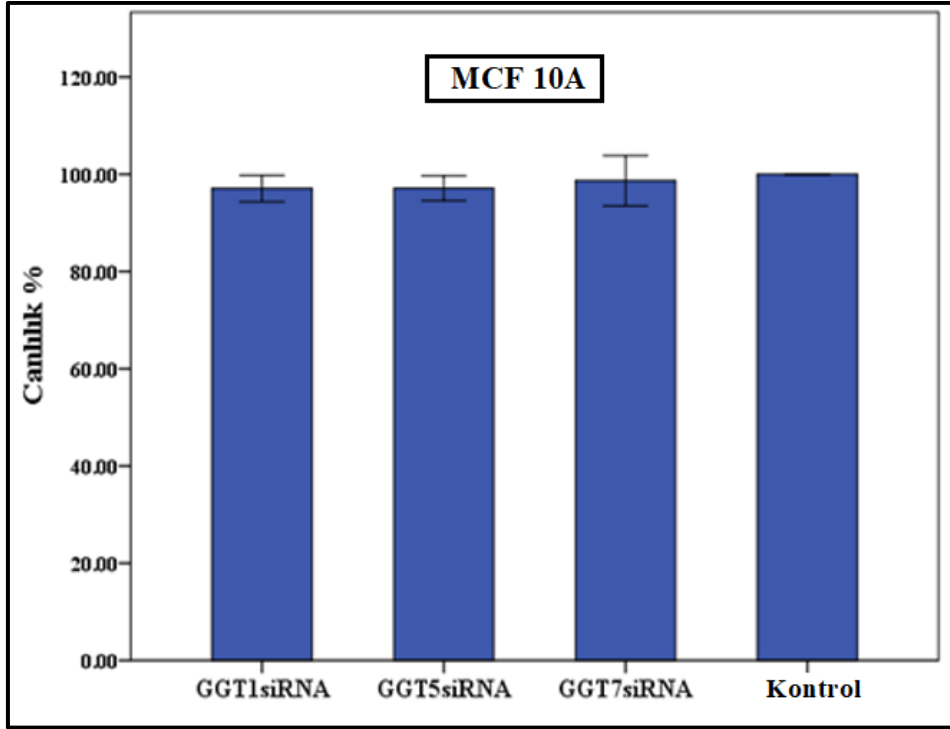
4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı Analizi

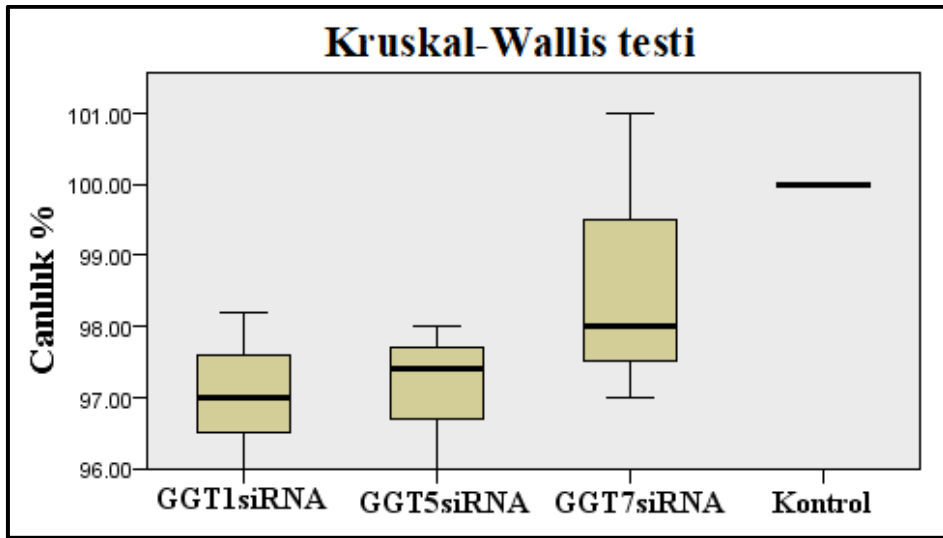
Hücre canlılığı analizi, si-GGT1, si-GGT5 ve si-GGT7'nin MCF 10A ve MDA-MB-231 hücreler hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi amacıyla MTT testi ve tripan mavisi testi kullanıldı. Tez çalışmamızda MTT ve tripan mavisi testleri, kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış), si-GGT1, si-GGT5 ve si-GGT7 olmak üzere 4 grupta gerçekleştirildi. Hücreler si-GGT1, si-GGT5 ve si-GGT7 ile 48 saat boyunca muamele edilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonunda MTT ve tripan mavisi testleri yapılmıştır.

4.1.1. MTT ile hücre canlılığı analizi

MTT analizi için her örnekten aynı mikropiakanın 8 farklı kuyucuğuna eklenmiştir. MCF 10A hücre hattında, kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücreleri için hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi. si-GGT1, si-GGT5 ve si-GGT7 ile muamele edilen grupta hücre canlılığı sırayla %97; %97,13; %98,66 olarak saptandı. Kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerin canlılık oranı ile transfekte edilen hücrelerdeki canlılık oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,152 > 0,05$) (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



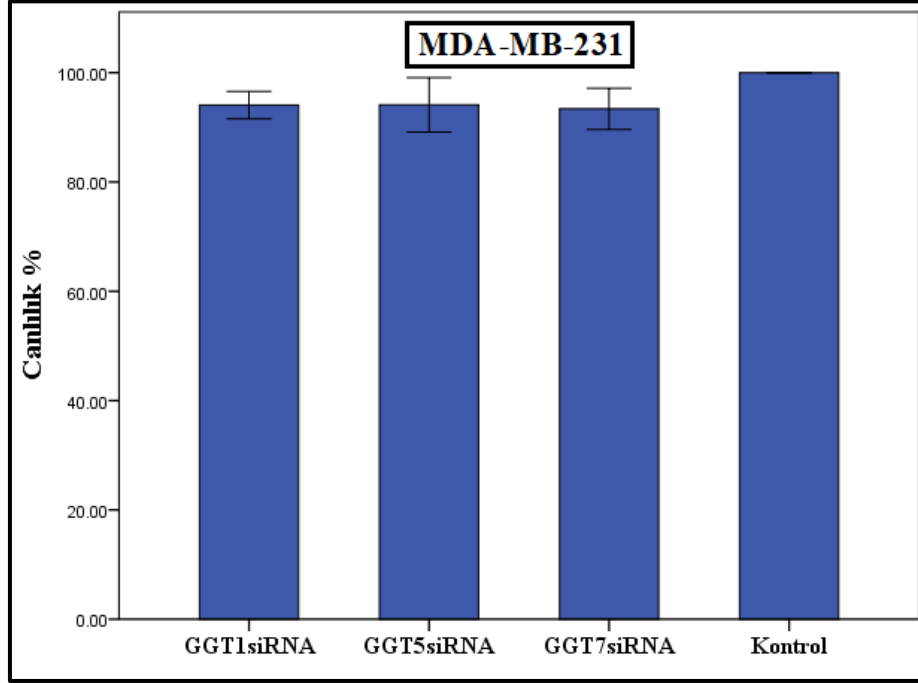
Şekil 4.1. MCF 10A hücre hattında si-GGT1, si-GGT5, si-GGT7'nin hücre canlılığına etkileri (MTT analizi).



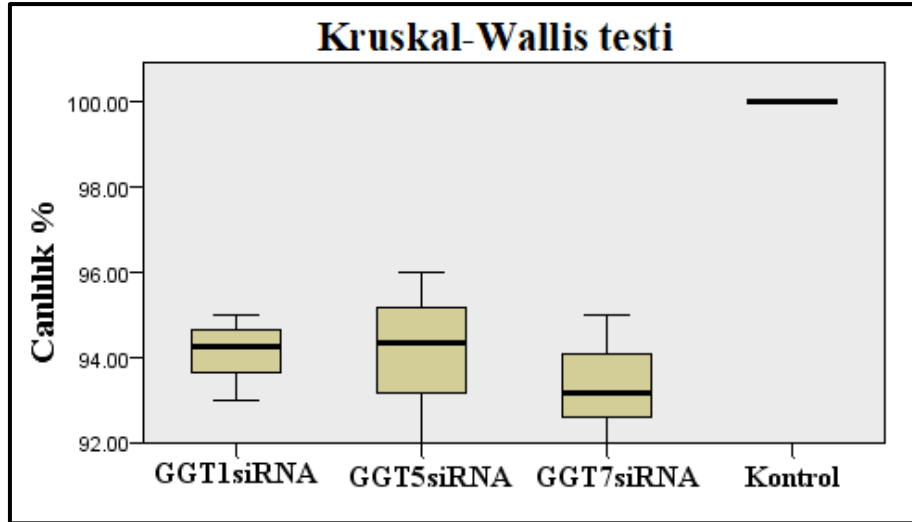
Şekil 4.2. Kontrol ve si-GGT1, si-GGT5, si-GGT7 ile transfekte edilen MCF 10A hücrelerinde canlılık oranlarındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.

MDA-MB-231 hatlarında, kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücreler için hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi. si-GGT1, si-GGT5 ve si-GGT7 ile muamele edilen grupta hücre canlılığı sırayla %94; %94,1; %93,4 olarak saptandı. Kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerin canlılık oranı ile transfekte edilen hücrelerdeki canlılık

oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,088 > 0,05$) (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).



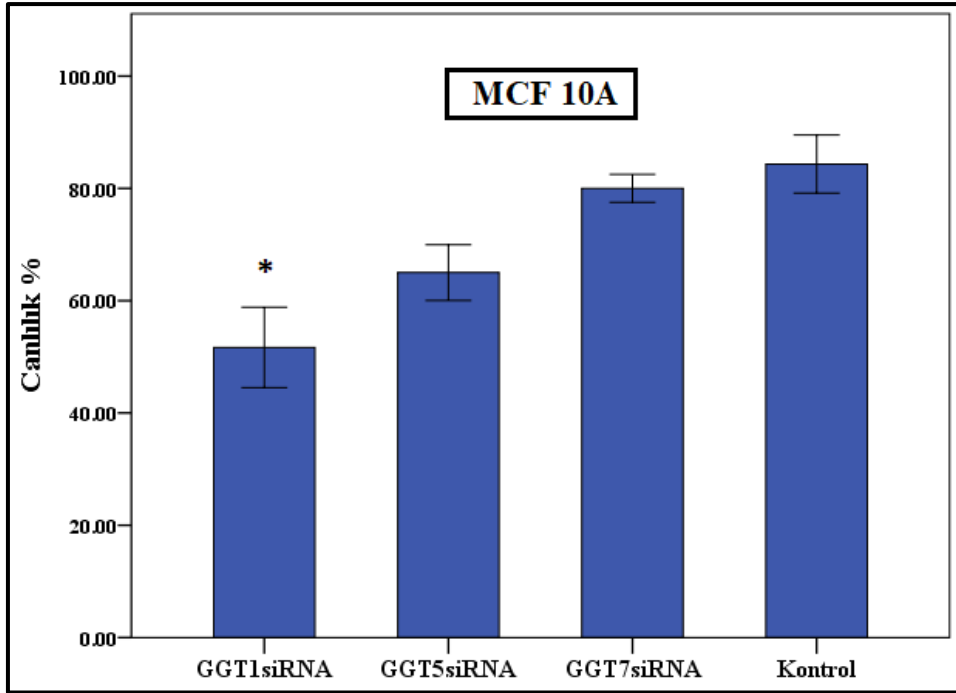
Şekil 4.3. MDA-MB-231 hücre hattında si-GGT1, si-GGT5, si-GGT7'nin hücre canlılığına etkileri (MTT analizi).



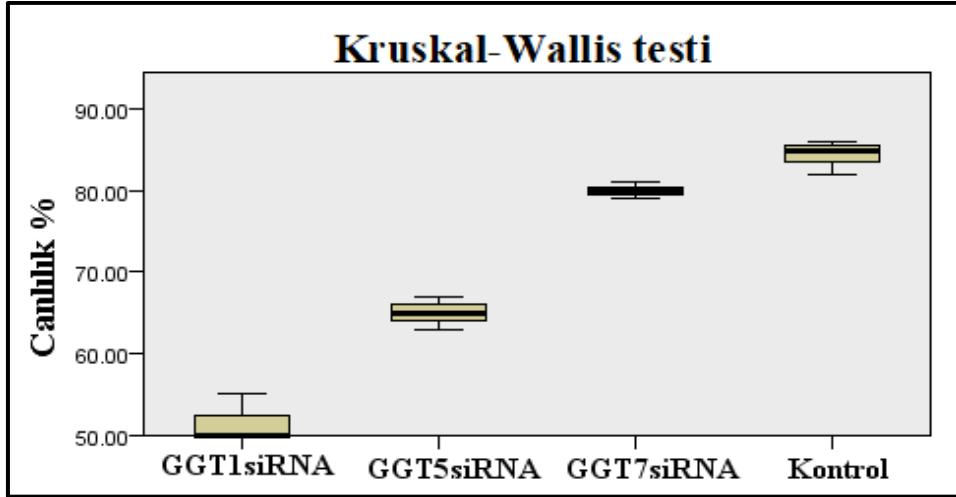
Şekil 4.4. Kontrol ve si-GGT1, si-GGT5, si-GGT7 ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde canlılık oranlarındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.

4.1.2. Tripan mavisi ile hücre canlılığı analizi

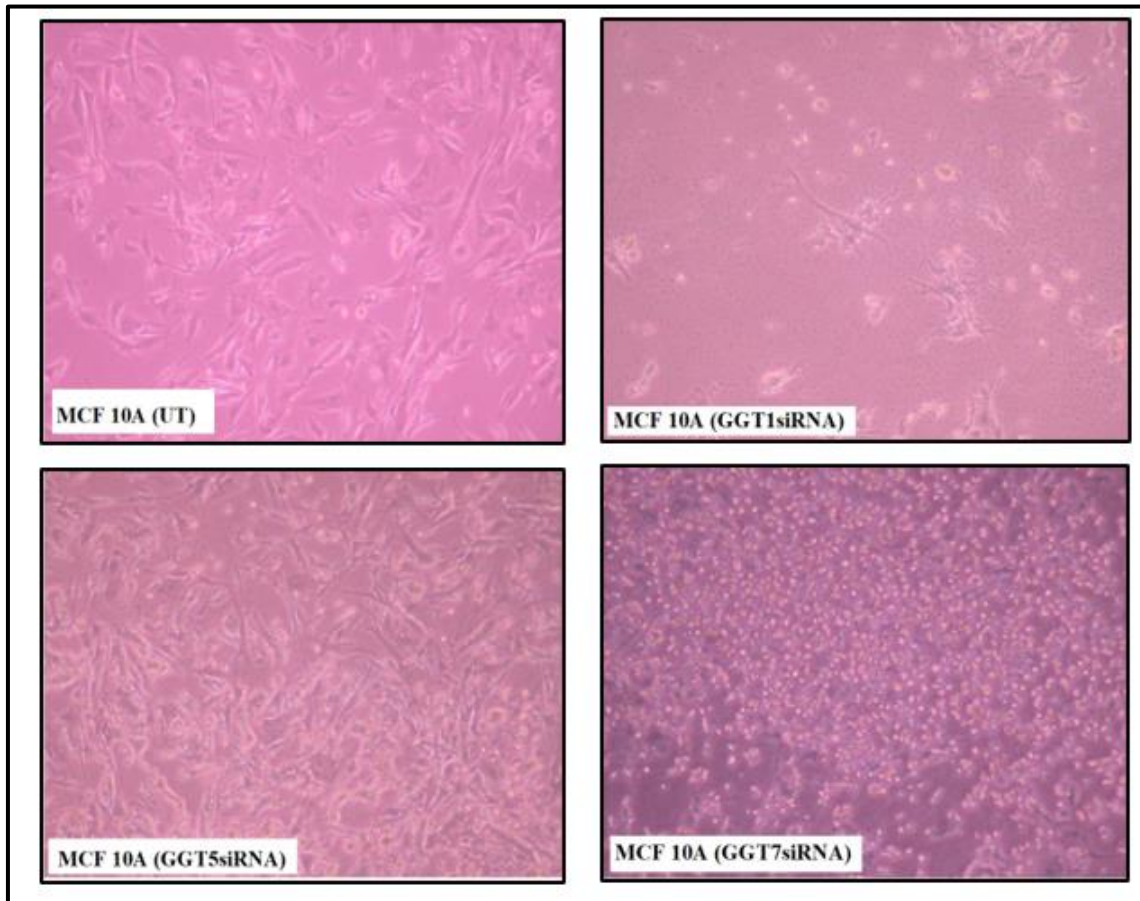
Tripan mavisi analizi için her örnekten 3 tekrar olacak şekilde çalışılmıştır. MCF 10A hatlarında, kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücreler için hücre canlılığı %84,33 olarak tespit edildi. si-GGT1, si-GGT5 ve si-GGT7 ile muamele edilen grupta hücre canlılığı sırayla %51,66; %65; %80 olarak saptandı. Kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerin canlılık oranı ile si-GGT5 ve si-GGT7 ile transfekte edilen hücrelerdeki canlılık oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmazken, kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerin canlılık oranı ile si-GGT1 ile transfekte edilen hücrelerin canlılık oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,015 < 0,05$) (Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Resim 4.1).



Şekil 4.5. MCF 10A hücre hattında si-GGT1, si-GGT5, si-GGT7'nin hücre canlılığına etkileri (Tripan mavisi analizi)



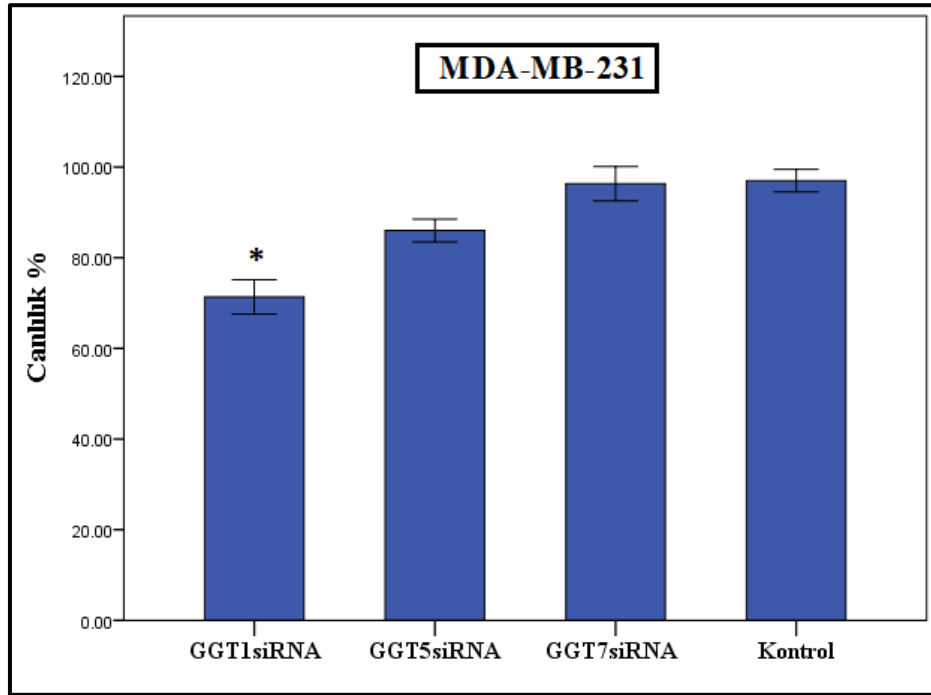
Şekil 4.6. Kontrol ve si-GGT1, si-GGT5, si-GGT7 ile transfekte edilen MCF 10A hücrelerinde canlılık oranlarındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi (Tripın mavisi analizi).



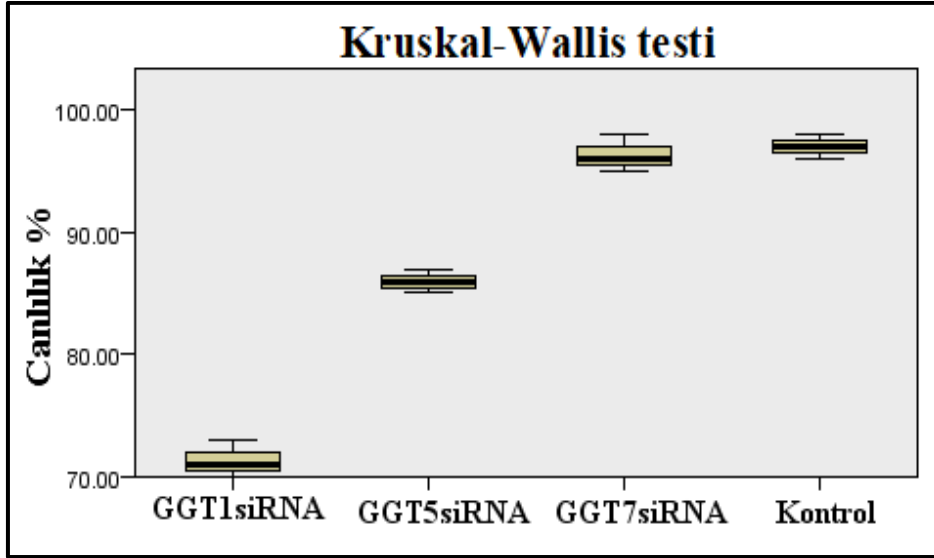
Resim 4.1. MCF 10A hücre hattı, 48 saat siRNA'ların uygulaması sonrası mikroskop ile alınan görüntüler.

MDA-MB-231 hatlarında, kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücreler için hücre canlılığı %97 olarak tespit edildi. si-GGT1, si-GGT5ve si-GGT7ile muamele edilen grupta

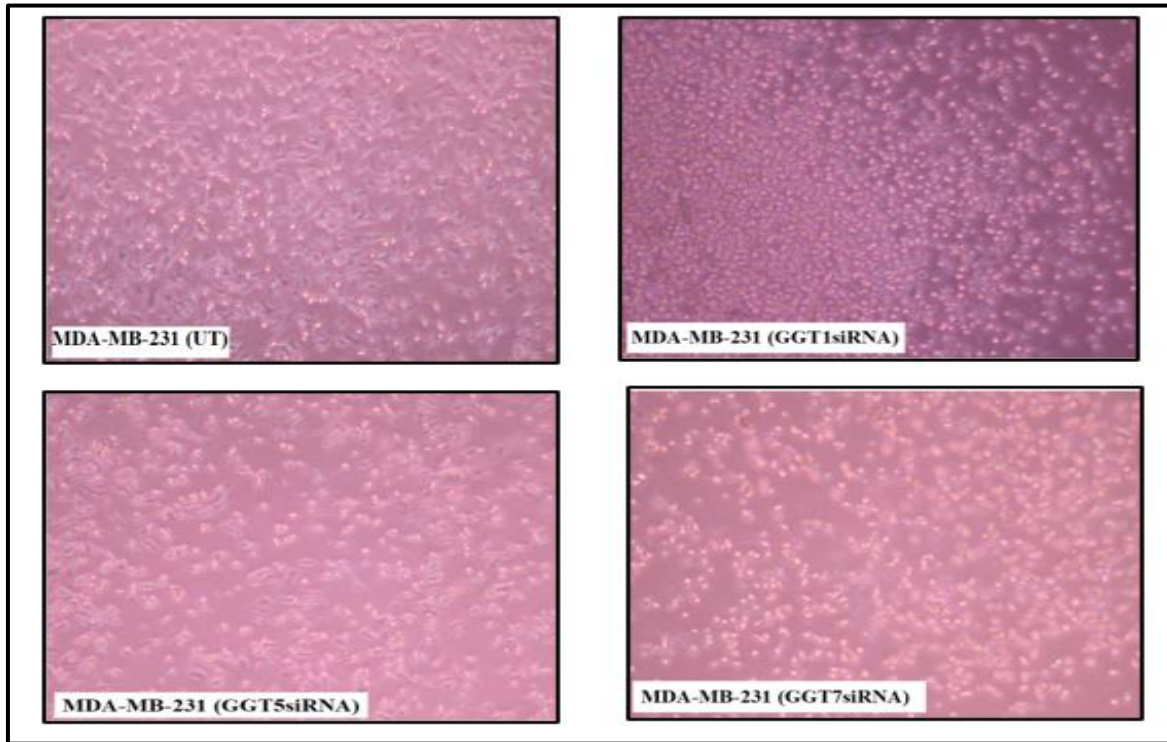
hücre canlılığı sırayla %71,33; %86; %96,33 olarak saptandı. Kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerin canlılık oranı ile si-GGT5 ve si-GGT7 ile transfekte edilen hücrelerin canlılık oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmazken kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerin canlılık oranı ile si-GGT1 ile transfekte edilen hücrelerin canlılık oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,038 < 0,05$) (Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Resim 4.2).



Şekil 4.7. MDA-MB-231 hücre hattında si-GGT1, si-GGT5, si-GGT7'nin hücre canlılığına etkileri (Tripan mavisi analizi).



Şekil 4.8. Kontrol ve si-GGT1, si-GGT5, si-GGT7 ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücrelerinde canlılık oranlarındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi (Tripın mavisi analizi).



Resim 4.2. MDA-MB-231 hücre hattı, 48 saat siRNA'ların uygulaması sonrası mikroskop ile alınan görüntüler.

4.2. Total RNA Düzeyleri

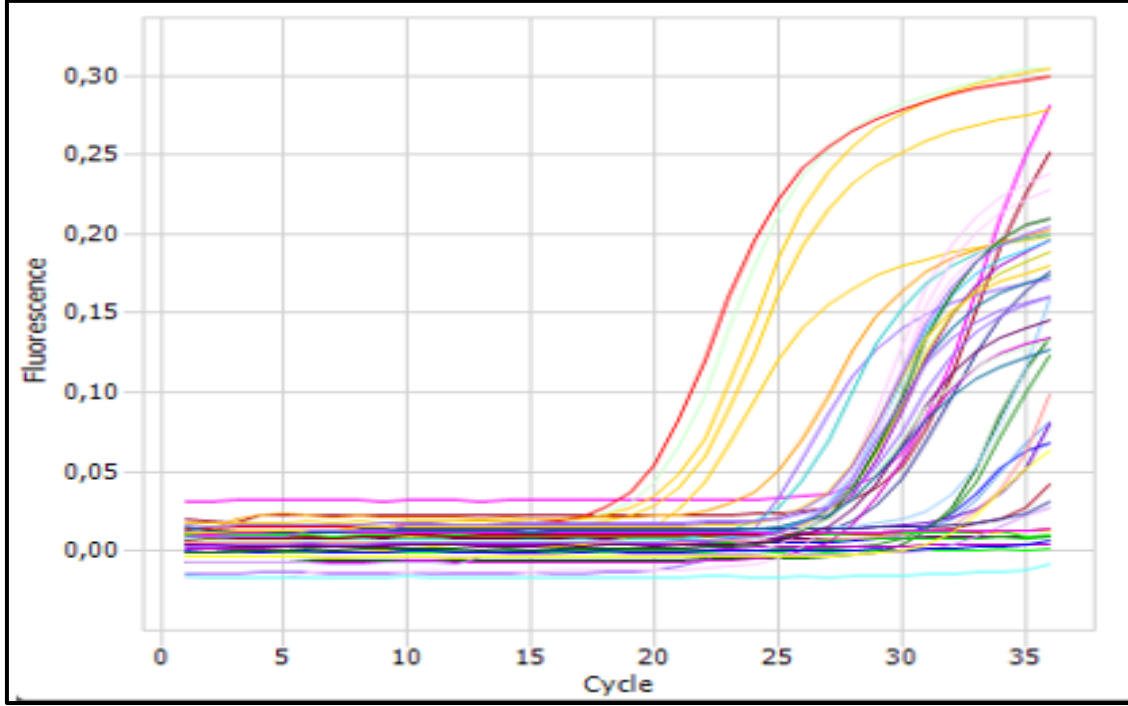
RNA izolasyonu yapıldıktan sonra, cDNA'ya çevrilmesi sırasında RNA izolatlarının eşit miktarlarda kullanılması için RNA miktarı ve saflığı Nanodrop yardımıyla analiz edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. MCF 10A ve MDA-MB-231 hücrelerine ait RNA izolatlarının miktar ve saflık değerlerinin tayini.

Örnek Hücre	RNA Miktarı (ng/μL)	RNA Saflığı (260/280)
MCF 10A, si-GGT1	1841	1,72
MCF 10A, si-GGT5	3904	1,8
MCF 10A, si-GGT7	3025	1,93
MCF 10A, UT	3493	1,73
MDA-MB-231, si-GGT1	3916	1,68
MDA-MB-231, si-GGT5	2759	1,7
MDA-MB-231, si-GGT7	2674	1,88
MDA-MB-231, UT	3915	1,78

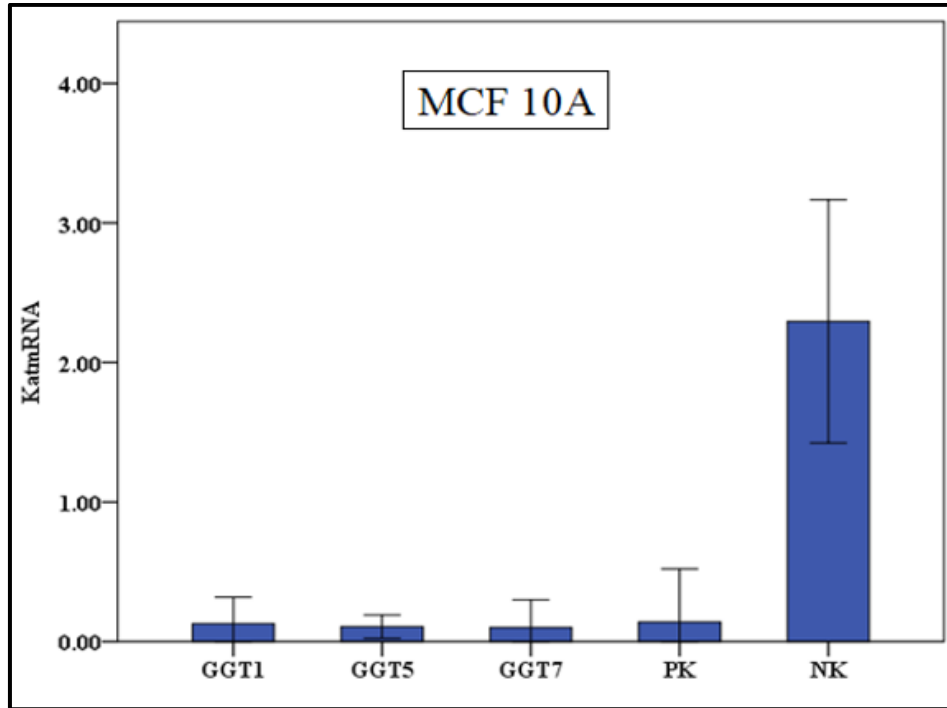
4.3. GGT-1, GGT-5, GGT-7 Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin qRT-PCR Analizleri ile Değerlendirilmesi

MCF 10A ve MDA-MB-231 hücre hatlarında GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra bu genlerin ekspresyon düzeyleri değerlendirmek amacıyla qRT-PCR analizleri yapıldı (Şekil 4.9). Analizler değerlendirilirken β -aktin referans gen olarak kullanılmıştır. Hücre hatlarında birbirinden bağımsız üç deney ve her deneyde üç tekrar olacak şekilde çalışılan cDNA'lara ait Ct değerleri ortalamaları kullanılarak $\Delta Ct = Ct_{\text{hedef}} - Ct_{\text{referans}}$ formülü ile hesaplanmıştır. Ardından $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{susturulmuş hücreler}} - \Delta Ct_{\text{siRNA uygulaması yapılmamış hücreler (kontrol)}}$ formülü kullanılmıştır. Son olarak bu değer kat değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak genin ekspresyon seviyeleri hesaplanmıştır. Buna göre 2'nin üzerinde olan değerler susturulmuş hücrelerde, siRNA uygulaması yapılmamış hücrelere oranla ekspresyonun yüksek oranda arttığı, 1'in altındaki değerler ise ekspresyonun azaldığı şeklinde değerlendirilmiştir.

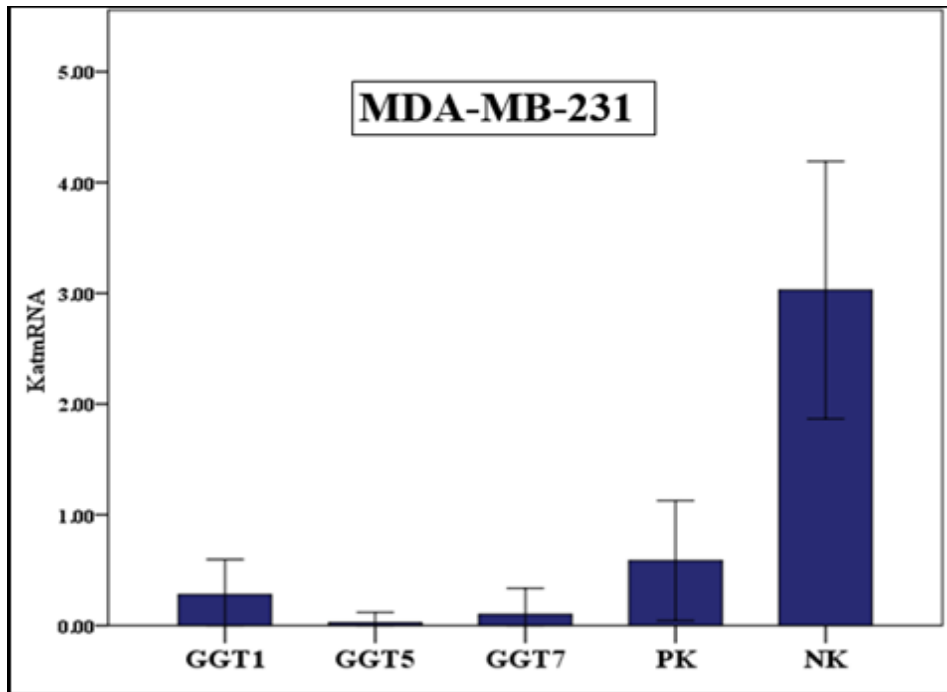


Şekil 4.9. MCF 10A ve MDA-MB-231 hücre hatlarında GGTgenlerinin susturulduktan sonra siklus sayısına karşı SYBR-GI floresans ışıma değerleri gösteren amplifikasyon grafiği.

Bu değerler kullanılarak gen susturma yapılmış hücrelerin ve kontrol hücrelerinin ekspresyon düzeylerinden elde edilen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerlerinin negatif kontrollerle karşılaştırıldığında oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Bu sonuçlar gen susturmanın başarılı olduğunu göstermektedir.



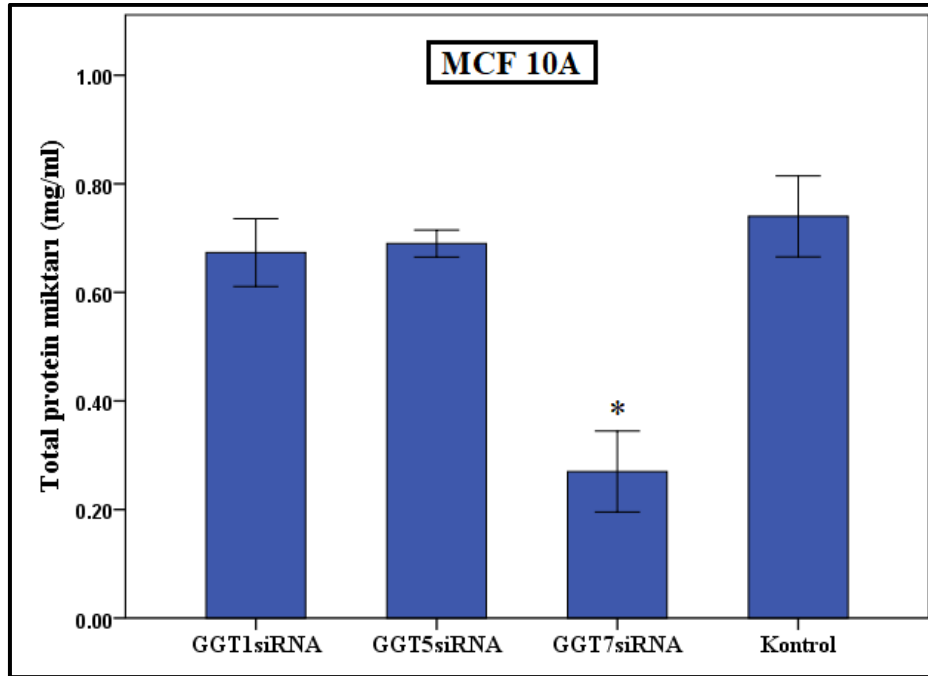
Şekil 4.10. MCF 10A hücre hattında GGT-1, GGT-5, GGT-7 genlerinin susturulmasının etkisinin mRNA düzeyinde gösterilmesi



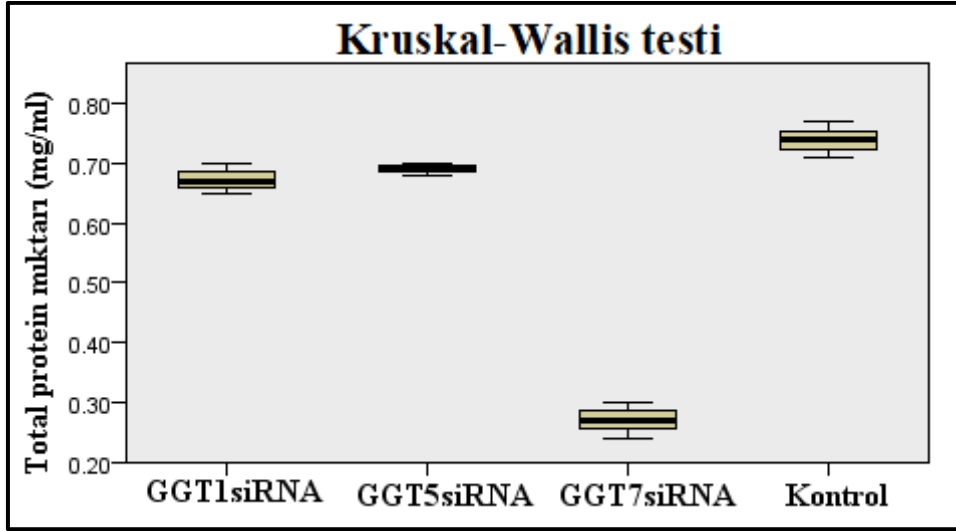
Şekil 4.11. MDA-MB-231 hücre hattında GGT-1, GGT-5, GGT-7 genlerinin susturulmasının etkisinin mRNA düzeyinde gösterilmesi.

4.4. Protein Miktar Tayini

MCF 10A hücre hattında, kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerde total protein miktarı $0,74 \pm 0,3$ mg/mL olarak tespit edildi. si-GGT1, si-GGT5 ve si-GGT7 ile muamele edilen grupta total protein miktarı sırayla $0,67 \pm 0,25$; $0,69 \pm 0,1$; $0,27 \pm 0,3$ mg/mL olarak tespit edildi. Kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerinde total protein miktarı ile si-GGT1 ve si-GGT5 ile transfekte edilen hücrelerdeki total protein miktarı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmazken GGT-7siRNA ile transfekte edilen hücrelerdeki total protein miktarı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,013 < 0,05$) (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13).

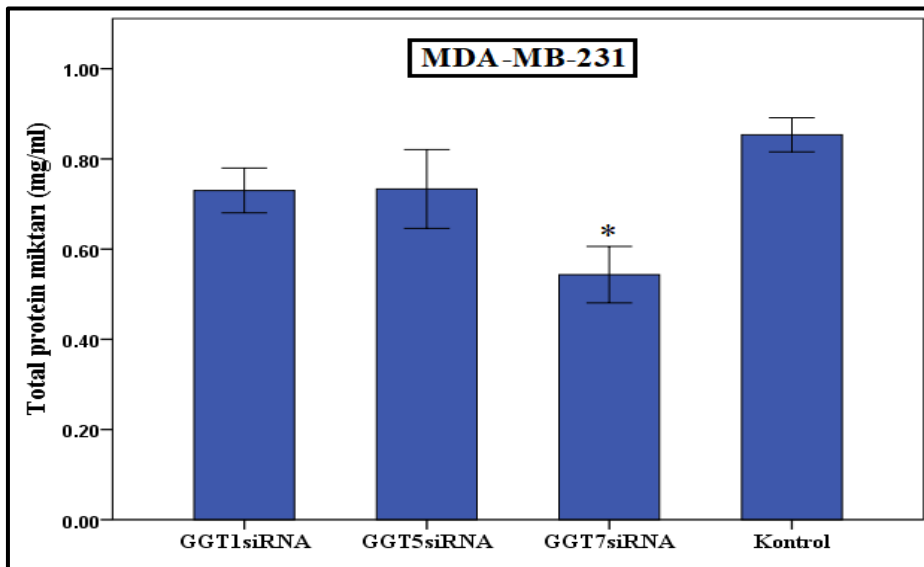


Şekil 4.12. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MCF 10A hücrelerinden izole edilen protein miktarı.

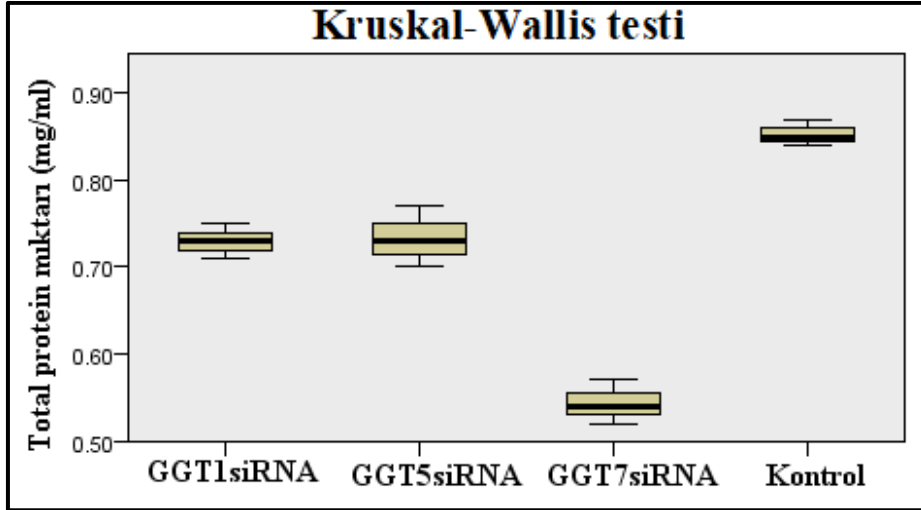


Şekil 4.13. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MCF 10A hücrelerinden izole edilen protein miktarlarındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.

MDA-MB-231 hatlarında, kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerde total protein miktarı $0,85 \pm 0,01$ mg/mL olarak tespit edildi. si-GGT1, si-GGT5 ve si-GGT7 ile muamele edilen grupta total protein miktarı sırayla $0,73 \pm 0,2$, $0,73 \pm 0,35$, $0,54 \pm 0,25$ mg/mL olarak tespit edildi. Kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerinde total protein miktarı ile si-GGT1 ve si-GGT5 ile transfekte edilen hücrelerindeki total protein miktarı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmazken GGT-7siRNA ile transfekte edilen hücrelerindeki total protein miktarı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,013 < 0,05$) (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).



Şekil 4.14. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen protein miktarı.



Şekil 4.15. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen protein miktarlarındaki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.

4.5. RAMAN Spektroskopi ile Yapılan Protein Analizi Sonuçları

Çalışmamızda RAMAN spektroskopi yöntemi ile hücre kültüründe protein analizi yapılmıştır. GGT1, GGT5 ve GGT7 proteinlerine ait antikorlar kullanılarak elde edilen sonuçlar aynı örneklerdeki referans protein GAPDH ölçüm sonuçları ile oranlanarak oransal olarak protein analiz sonuçları elde edilmiştir (Çizelge 4.2, Çizelge 4.3, Çizelge 4.4, Çizelge 4.5, Çizelge 4.6, Çizelge 4.7 ve Şekil 4.16). Buna göre mRNA sonuçları ile paralel bir şekilde siRNA ile transfekte edilen hücrelerde protein miktarları transfekte edilmemiş hücrelere göre belirgin bir şekilde azalmıştır.

Çizelge 4.2. MCF 10A hücre hattında si-GGT1 kullanıldıktan sonra RAMAN ile yapılan protein analiz sonuçları.

si-GGT1 ile transfekte edilen MCF 10A hücre hattında		
	Raman shift /cm ⁻¹	%RSD
GGT1 Proteini	10 124 ± 1 429	14
GAPDH Proteini	18 635 ± 4 644	25
(GGT1/ GAPDH) oranı	0,543	
siRNA uygulaması yapılmamış MCF 10A hücre hattında		
	Raman shift /cm ⁻¹	%RSD
GGT1 Proteini	17 736 ± 5 185	29
GAPDH Proteini	9 145 ± 1 977	22
(GGT1/ GAPDH) oranı	1,939	

Çizelge 4.3. MDA-MB-231 hücre hattında si-GGT1 kullanıldıktan sonra RAMAN ile yapılan protein analiz sonuçları.

si-GGT1 ile transfeke edilen MDA-MB-231 hücre hattında		
	Raman shift /cm ⁻¹	%RSD
GGT1 Proteini	10 423 ± 1 927	18
GAPDH Proteini	17 999 ± 3 815	21
(GGT1/ GAPDH) oranı	0,579	
siRNA uygulaması yapılmamış MDA-MB-231 hücre hattında		
	Raman shift /cm ⁻¹	%RSD
GGT1 Proteini	16 239 ± 2 549	16
GAPDH Proteini	18 395 ± 6 564	36
(GGT1/ GAPDH) oranı	0,882	

Çizelge 4.4. MCF 10A hücre hattında si-GGT5 kullanıldıktan sonra RAMAN ile yapılan protein analiz sonuçları.

si-GGT5 ile transfeke edilen MCF 10A hücre hattında		
	Raman shift /cm ⁻¹	%RSD
GGT5 Proteini	3 280 ± 888	27
GAPDH Proteini	14 615 ± 2 875	20
(GGT5/ GAPDH) oranı	0,224	
siRNA uygulaması yapılmamış MCF 10A hücre hattında		
	Raman shift /cm ⁻¹	%RSD
GGT5 Proteini	16 737 ± 2 510	15
GAPDH Proteini	9 145 ± 1 977	22
(GGT5/ GAPDH) oranı	1,83	

Çizelge 4.5. MDA-MB-231 hücre hattında si-GGT5 kullanıldıktan sonra RAMAN ile yapılan protein analiz sonuçları.

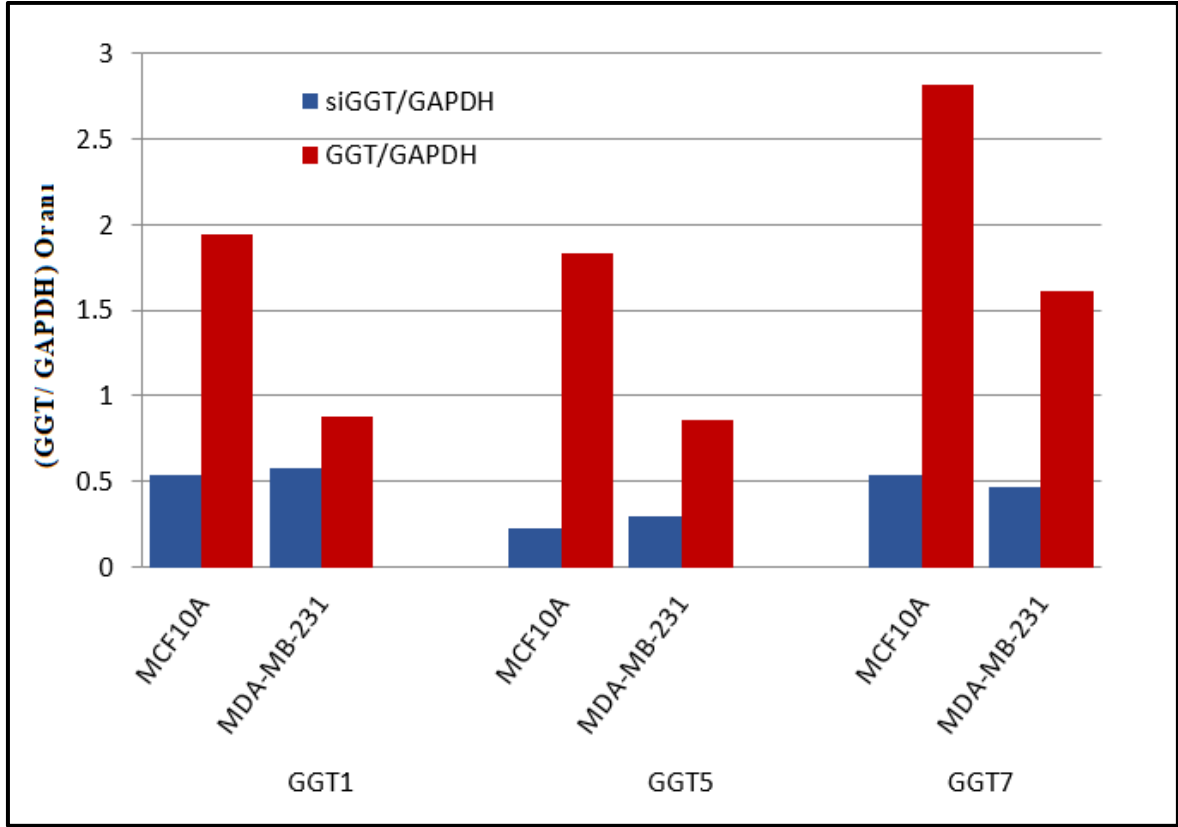
si-GGT5 ile transfeke edilen MDA-MB-231 hücre hattında		
	Raman shift /cm ⁻¹	%RSD
GGT5 Proteini	4 997 ± 2 000	40
GAPDH Proteini	16 207 ± 3 549	22
(GGT5/ GAPDH) oranı	0,3	
siRNA uygulaması yapılmamış MDA-MB-231 hücre hattında		
	Raman shift /cm ⁻¹	%RSD
GGT5 Proteini	15 801 ± 1 209	8
GAPDH Proteini	18 395 ± 6 564	36
(GGT5/ GAPDH) oranı	0,858	

Çizelge 4.6. MCF 10A hücre hattında si-GGT7 kullanıldıktan sonra RAMAN ile yapılan protein analiz sonuçları.

si-GGT7 ile transfekte edilen MCF 10A hücre hattında		
	Raman shift /cm⁻¹	%RSD
GGT7 Proteini	5 784 ± 1 561	27
GAPDH Proteini	10 654 ± 1 360	13
(GGT7/ GAPDH) oranı	0,542	
siRNA uygulaması yapılmamış MCF 10A hücre hattında		
	Raman shift /cm⁻¹	%RSD
GGT7 Proteini	25 723 ± 3 831	15
GAPDH Proteini	9 145 ± 1 977	22
(GGT7/ GAPDH) oranı	2,81	

Çizelge 4.7. MDA-MB-231 hücre hattında si-GGT7 kullanıldıktan sonra RAMAN ile yapılan protein analiz sonuçları.

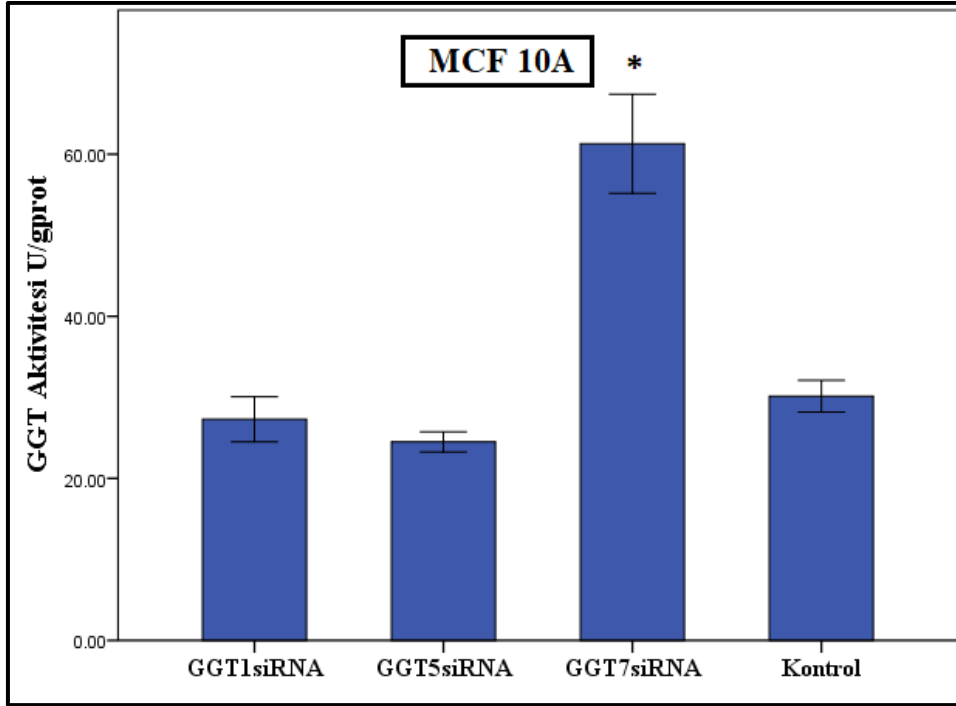
si-GGT7 ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücre hattında		
	Raman shift /cm⁻¹	%RSD
GGT7 Proteini	4 237 ± 1 930	46
GAPDH Proteini	8 965 ± 2 540	28
(GGT7/ GAPDH) oranı	0,472	
siRNA uygulaması yapılmamış MDA-MB-231 hücre hattında		
	Raman shift /cm⁻¹	%RSD
GGT7 Proteini	29 650 ± 5 508	19
GAPDH Proteini	18 395 ± 6 564	36
(GGT7/ GAPDH) oranı	1,611	



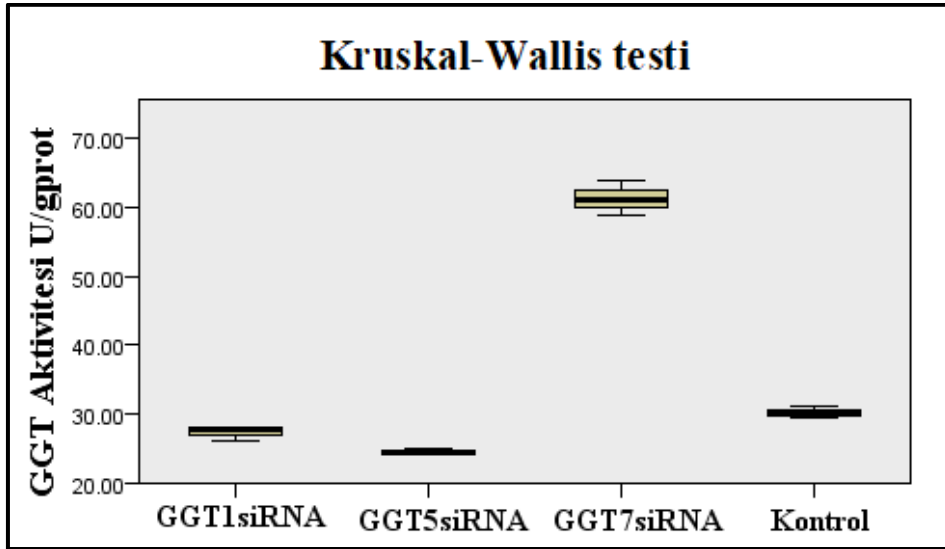
Şekil 4.16. MCF 10A ve MDA-MB-231 hücre hatlarında si-GGT1, si-GGT5 ve si-GGT7 kullanıldıktan sonra protein oranları.

4.6. GGT Aktivitesi

MCF 10A hattında, kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerde GGT aktivitesi $30,14 \pm 0,78$ U/gprot olarak tespit edildi. si-GGT1, si-GGT5 ve si-GGT7 ile muamele edilen grupta GGT aktivitesi sırayla $27,29 \pm 1,12$; $24,5 \pm 0,5$; $61,3 \pm 2,46$ U/gprot olarak tespit edildi. Kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerindeki GGT aktivitesi ile si-GGT1, si-GGT5 ve si-GGT7 ile transfekte edilen hücrelerindeki GGT aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. si-GGT5 ile transfekte edilen hücrelerindeki GGT aktivitesi GGT-7siRNA ile transfekte edilen hücrelerindeki GGT aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,013 < 0,05$) (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18).



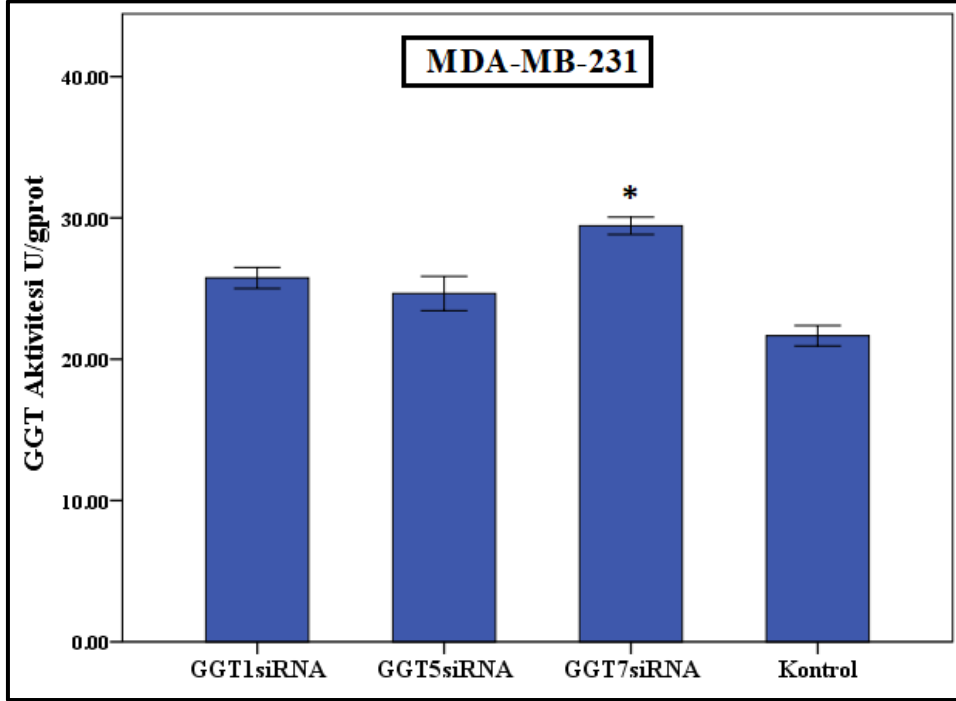
Şekil 4.17. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MCF 10A hücrelerindeki GGT aktivitesi.



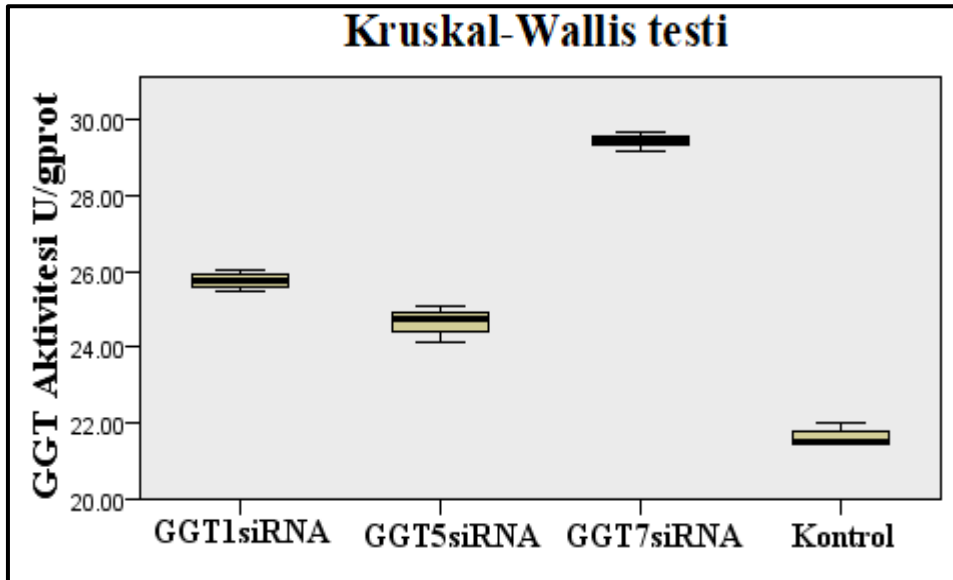
Şekil 4.18. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MCF 10A hücrelerinde GGT aktivitesindeki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.

MDA-MB-231 kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerde GGT aktivitesi $21,66 \pm 0,29$ U/gprot olarak tespit edildi. si-GGT1, si-GGT5 ve si-GGT7 ile muamele edilen grupta GGT aktivitesi sırayla $25,75 \pm 0,3$; $24,65 \pm 0,48$; $29,44 \pm 0,24$ U/gprot olarak tespit edildi. Kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerindeki GGT aktivitesi ile si-GGT1 ve GGT-5siRNA ile transfekte edilen hücrelerdeki GGT aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmazken GGT-7siRNA ile transfekte edilen

hücrelerdeki GGT aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,013<0,05$) (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20).



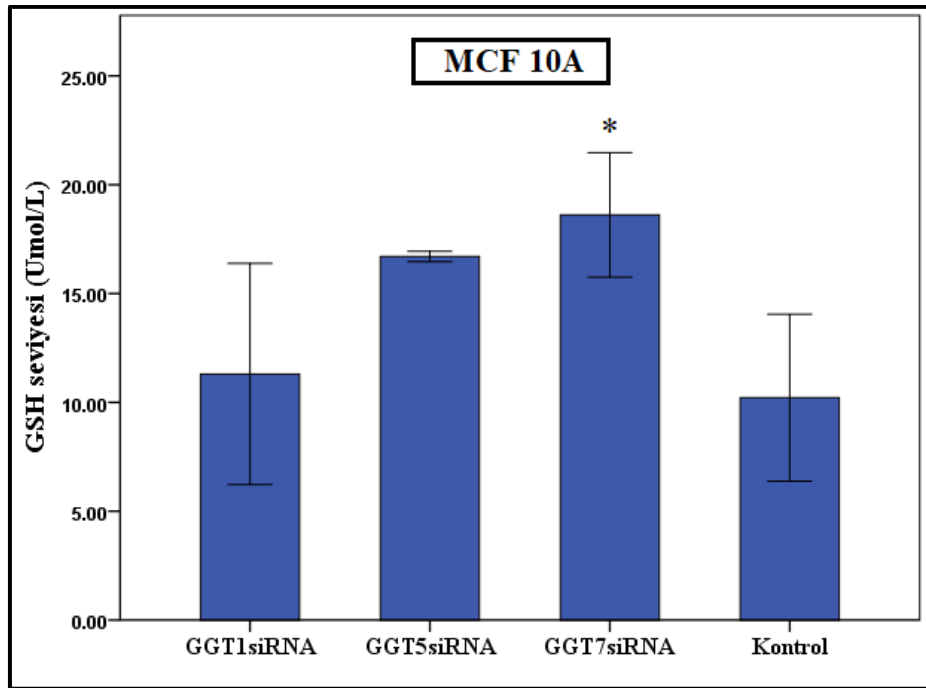
Şekil 4.19. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MDA-MB-231 hücrelerindeki GGT aktivitesi.



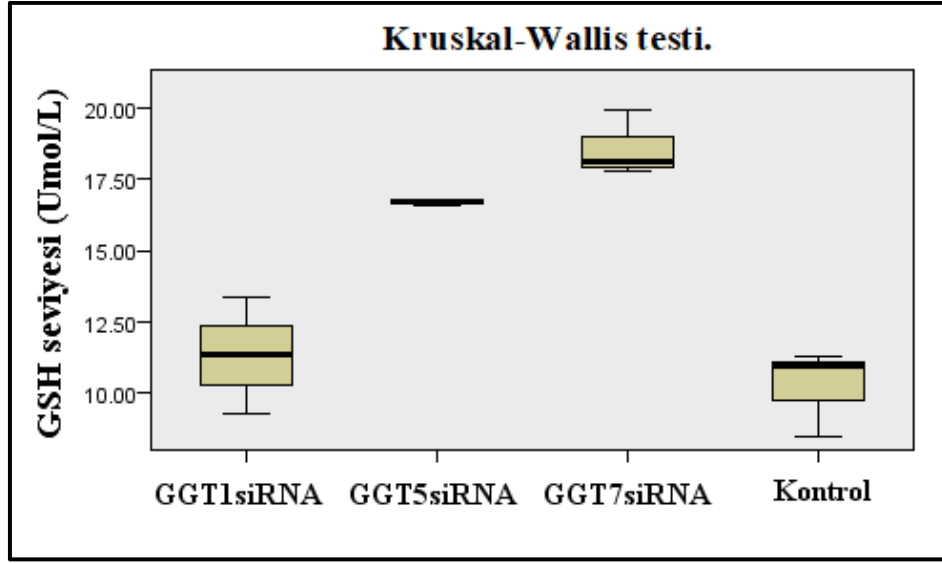
Şekil 4.20. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MDA-MB-231 hücrelerinde GGT aktivitesindeki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.

4.7. Redükte Glutasyon (GSH) Tayini

MCF 10A hattında, kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücreler için GSH seviyesi $10,12 \pm 1,54$ Umol/L olarak tespit edildi. si-GGT1, si-GGT5 ve si-GGT7 ile muamele edilen grupta GSH seviyesi sırayla $11,3 \pm 2,05$; $16,7 \pm 0,1$; $18,61 \pm 0,66$ Umol/L olarak tespit edildi. Kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerindeki GSH seviyesi ile si-GGT1, si-GGT5 ile transfekte edilen hücrelerindeki GSH seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmazken si-GGT7 ile transfekte edilen hücrelerindeki GSH seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,028 < 0,05$), (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22).

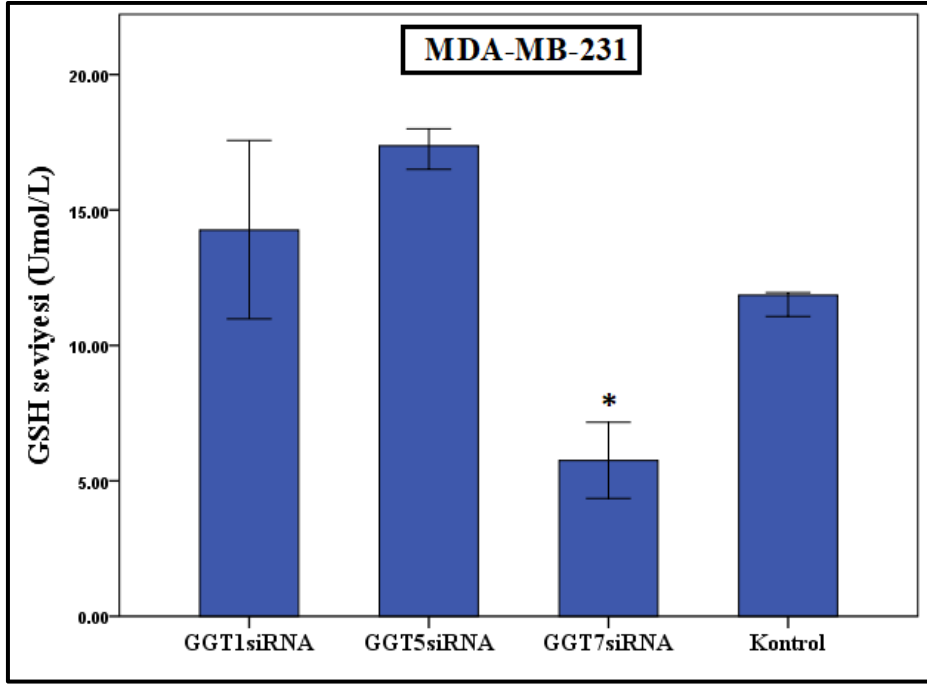


Şekil 4.21. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MCF 10A hücrelerindeki GSH seviyesi.

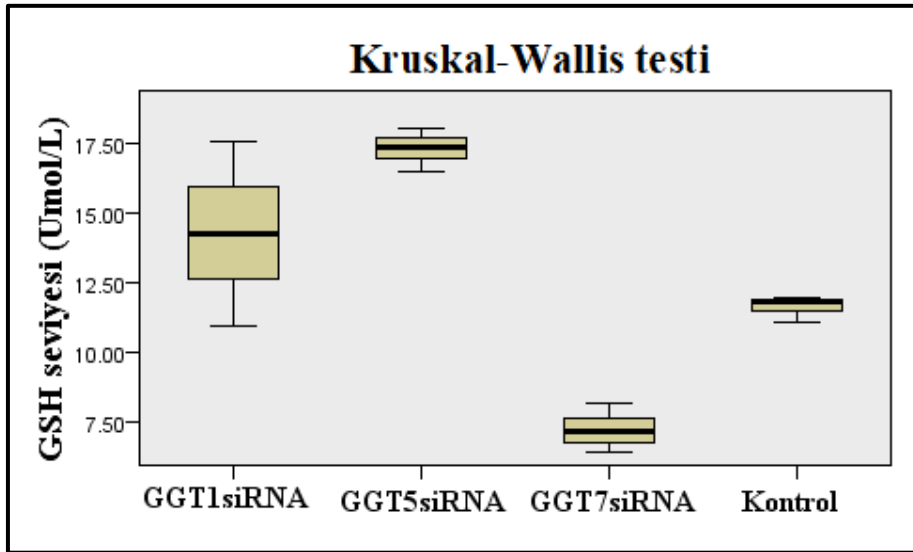


Şekil 4.22. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MCF 10A hücrelerinde GSH seviyesindeki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.

MDA-MB-231 kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücreler için GSH seviyesi $11,1 \pm 1,25$ Umol/L olarak tespit edildi. si-GGT1, si-GGT5 ve si-GGT7 ile muamele edilen grupta GSH seviyesi sırasıyla $14,26 \pm 3,3$; $17,29 \pm 0,7$; $7,16 \pm 0,89$ Umol/L olarak tespit edildi. Kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerindeki GSH seviyesi ile si-GGT1, si-GGT5 ve si-GGT7 ile transfekte edilen hücrelerdeki GSH seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. si-GGT5 ile transfekte edilen hücrelerindeki GSH seviyesi ile si-GGT7 ile transfekte edilen hücrelerdeki GSH seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,028 < 0,05$). (Şekil 4.23 ve Şekil 4.24).



Şekil 4.23. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MDA-MB-231 hücrelerindeki GSH seviyesi

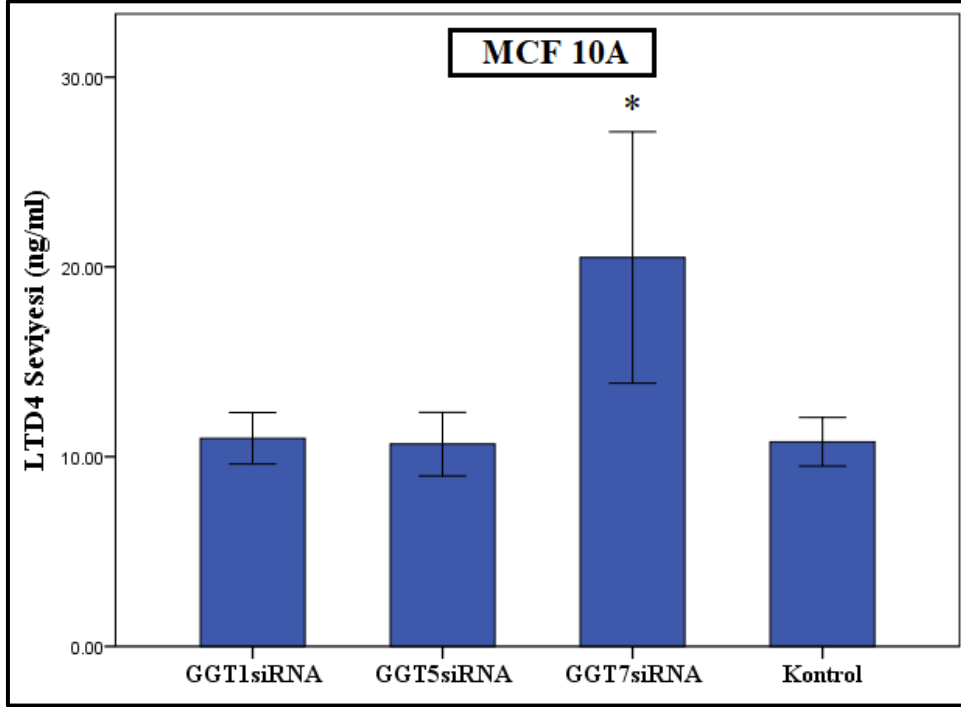


Şekil 4.24. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MDA-MB-231 hücrelerinde GSH seviyesindeki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.

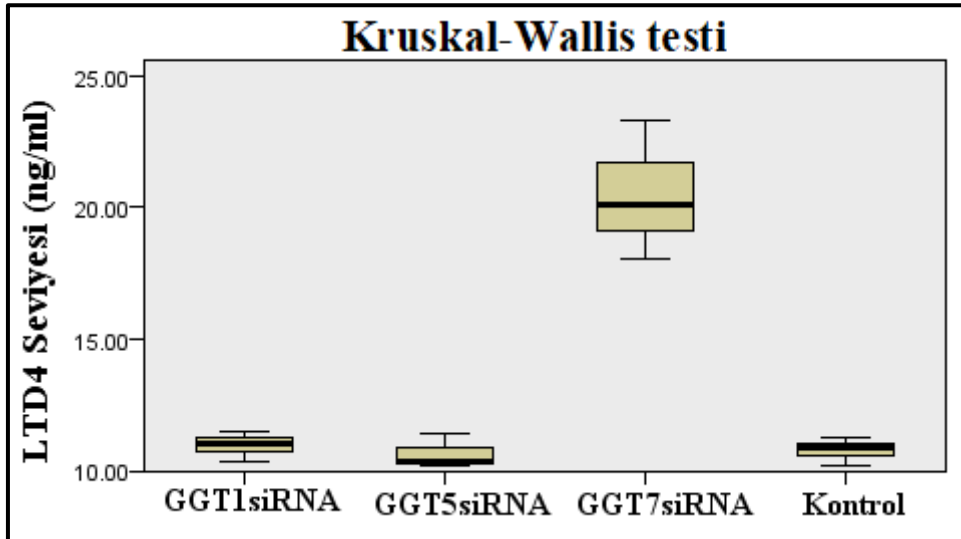
4.8. Lökotrien Tayini

MCF 10A hattında, kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücreler için LTD4 seviyesi $10,77 \pm 0,51$ ng/mL olarak tespit edildi. si-GGT1, si-GGT5 ve si-GGT7 ile muamele edilen grupta LTD4 seviyesi sırayla $10,96 \pm 0,54$; $10,66 \pm 0,673$; $20,49 \pm 2,66$ ng/mL olarak tespit edildi. Kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerin LTD4 seviyesi ile si-GGT1, si-

GGT5 ve si-GGT7 ile transfekte edilen hücrelerin LTD4 seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,075 > 0,05$). (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26).



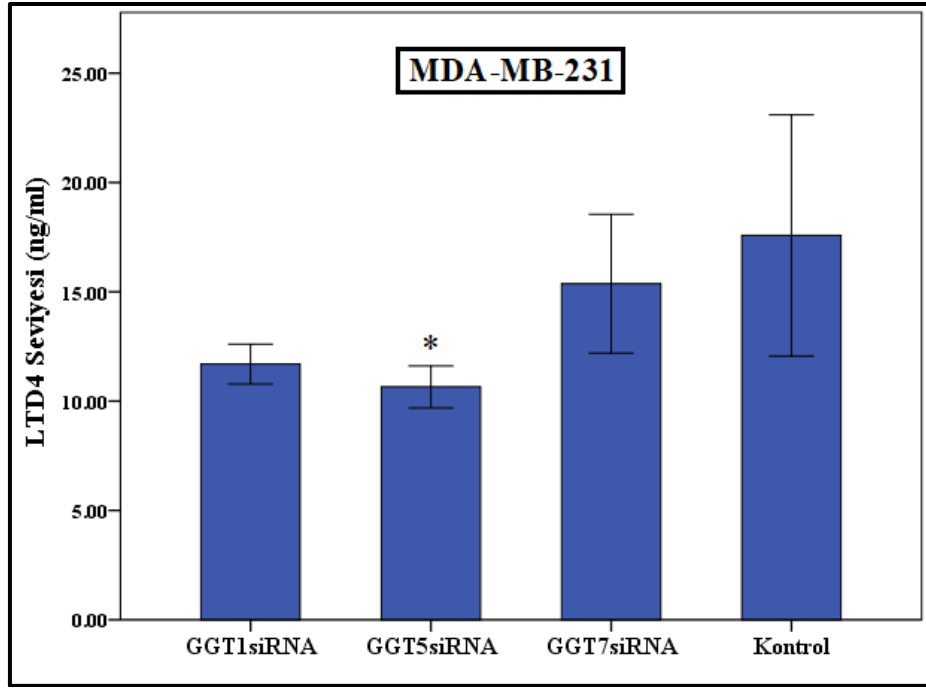
Şekil 4.25. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MCF 10A hücrelerindeki LTD4 seviyesi.



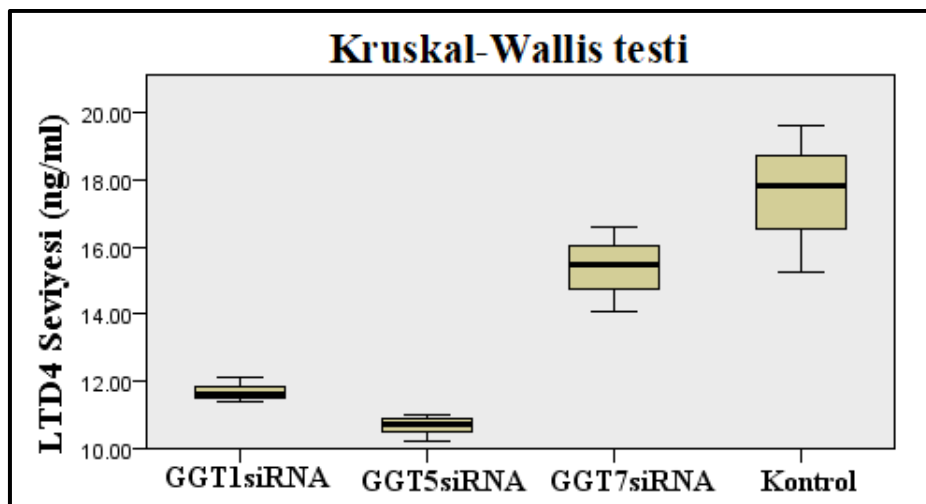
Şekil 4.26. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MCF 10A hücrelerinde LTD4 seviyesindeki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.

MDA-MB-231 kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücreler için LTD4 seviyesi $17,57 \pm 2,22$ ng/mL olarak tespit edildi. si-GGT-1, si-GGT-5 ve si-GGT-7 ile muamele edilen grupta LTD4 seviyesi sırasıyla $11,69 \pm 0,36$; $10,64 \pm 0,38$; $15,37 \pm 1,27$ ng/mL olarak

tespit edildi. Kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerin LTD4 seviyesi ile si-GGT1 ve si-GGT7 ile transfekte edilen hücrelerdeki LTD4 seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmazken si-GGT-5 ile transfekte edilen hücrelerdeki LTD4 seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,024 < 0,05$). (Şekil 4.27 ve Şekil 4.28).



Şekil 4.27. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MDA-MB-231 hücrelerindeki LTD4 seviyesi



Şekil 4.28. GGT-1, GGT-5, GGT-7 genleri susturulduktan sonra MDA-MB-231 hücrelerinde LTD4 seviyesindeki farklılığı gösteren Kruskal-Wallis testi.

4.9. Korelasyonlar

MCF 10A ve MDA-MB-231 hücre hatlarında değişkenler aralarındaki ilişkiyi incelemiştir.

İnceleme sonuçları; Çizelge 4.8. ve Çizelge 4.9.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. MCF 10A hücre hattında değişkenler arası ilişkiler.

		MTT	Tripan mavis	GGT aktivitesi	GSH Seviyesi	LTD4 Seviyesi
MTT ile yapılan hücre canlılığı	r	1,000	,658*	,481	-,163	,099
	p	.	,020	,113	,613	,759
Tripan mavis ile yapılan hücre canlılığı	r	,658*	1,000	,585*	-,025	,067
	p	,020	.	,046	,940	,837
GGT aktivitesi	r	,481	,585*	1,000	,245	,671*
	p	,113	,046	.	,443	,017
GSH Seviyesi	r	-,163	-,025	,245	1,000	,357
	p	,613	,940	,443	.	,255
LTD4 Seviyesi	r	,099	,067	,671*	,357	1,000
	p	,759	,837	,017	,255	.

* $p < 0.05$

Çizelge 4.9. MDA-MB-231 hücre hattında değişkenler arası ilişkiler.

		MTT	Tripan mavis	GGT aktivitesi	GSH Seviyesi	LTD4 Seviyesi
MTT ile yapılan hücre canlılığı	r	1,000	,562	-,689*	,049	,481
	p	.	,057	,013	,879	,114
Tripan mavis ile yapılan hücre canlılığı	r	,562	1,000	-,207	-,544	,677*
	p	,057	.	,519	,068	,016
GGT aktivitesi	r	-,689*	-,207	1,000	,476	-,035
	p	,013	,519	.	,118	,914
GSH Seviyesi	r	,049	-,544	,476	1,000	-,685*
	p	,879	,068	,118	.	,014
LTD4 Seviyesi	r	,481	,677*	-,035	-,685*	1,000
	p	,114	,016	,914	,014	.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

5. TARTIŞMA

Son zamanlarda, GGT aile üyelerinin işlevlerini araştıran çalışmalar artmıştır. Yapılan bir çalışmada, glutatyon sentetaz ve GGT7 gen polimorfizmlerinin tek başına ve kombinasyon halinde cinsiyet, yaş ve vücut kitle indeksinden bağımsız olarak tip 2 diyabet riski ile ilişkili olduğunu ve ayrıca plazma glutatyon, hidrojen peroksit ve açlık kan şekeri seviyeleri ile korele olduğunu bulunmuştur [50]. Diğer bir çalışmada altı genden oluşan potansiyel bir osteoporoz mRNA biyobelirteç modeli tanımlanmıştır; bunlardan biri GGT7'dir [51]. Ayrıca GGT7'nin mide karsinogenezinde çok önemli bir tümör baskılayıcı rol oynadığı, tümör olmayan komşu dokularda GGT7 ekspresyonunun mide kanseri olan kişiler için bağımsız bir prognostik faktör olarak hizmet ettiği gösterilmiştir [52]. Literatürde, GGT7'nin GSH ve LTC4'ten başka bir substratı olabileceğine işaret edilmiştir. Örneğin; S-geranylgeranyl L-glutatyon (GGG), bir P2RY8 ligandıdır. Germinal merkezler, antikor çeşitlendirmesi ve afinite olgunlaşması için önemli yerlerdir. P2RY8, lenfoid dokularda B hücrelerinin migrasyon inhibisyonuna ve büyüme regülasyonuna aracılık eden bir reseptördür. Gallman ve ark. stromal hücrelerde gama-glutamiltransferaz-5 (GGT5) ekspresyonunun (lenfoid dokularda hücre dışı) GGG katabolizması ve P2RY8 eksprese eden hücrelerin, germinal merkezlerinde kalması için gerekli olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışma diğer GGT aile üyelerinin GGG katabolizmasına olası katkılarını dışlamamıştır [53]. Diğer bir çalışmada, GGT5, foliküler dendritik hücreler (FDC'ler) tarafından yüksek oranda eksprese edildiği ve aşırı ekspresyonu P2RY8'in germinal merkezlere B-hücreleri hapsini teşvik etme kabiliyetini bozduğu, bu da lenfoid dokularda bir GGG gradyanı oluşturduğu gösterilmiştir [54]. Bizim çalışmamızda, GGT1, GGT5, ve GGT7 genlerinin hem normal hem kanser hücre hatlarında hücre canlılığı, GGT aktivitesi, GSH seviyesi, ve LTD4 seviyesi üzerine etkilerinin incelemesi hedeflenmiştir.

MCF 10A ve MDA-MB-231 hatlarında, kontrol (siRNA uygulaması yapılmamış) hücrelerin canlılık oranı ile GGT-5 siRNA ve GGT-7 siRNA ile transfekte edilen hücrelerdeki canlılık oranı arasında anlamlı bir fark saptanmadı, fakat kontrol hücrelerin canlılık oranı ile GGT-1 siRNA ile transfekte edilen hücrelerdeki canlılık oranı arasında anlamlı azalma saptandı. Harding ve ark. otozomal ressesif kalıtılan GGT1 eksikliği olan farelerde glutatyonüri, glutatyonemi, ciddi büyüme geriliği, kısalmış yaşam süreleri ve üreme yetersizliğini bildirmişler [55]. Michael W. ve ark.'nın çalışmalarında GGT1 nakavt farelerin idrarlarında büyük miktarlarda GSH salgılandığını ve bunun da ölümcül

sistein eksikliğine yol açtığını bildirilmiştir [56]. Bing Han ve ark. GGT5 nakavt farelerin fenotipik olarak normal olduğunu, ancak çoğu organda yabancı tipteki gama-glutamil lökotrienaz aktivitesinin sadece %10'una sahip olduğunu göstermişlerdir [57]. Literatürde GGT7 eksikliği ile canlılık oranı arasında ilişki gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışma sonuçlarımız literatürü destekler şekilde sadece GGT1 geni eksikliğinin hücre ölümüne yol açtığını gösterip GGT1 işlevlerinin, GGT5'in ve GGT7'nin işlevleriyle telafi edilemeyeceğini göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada, LNCaP prostat kanseri hücreleri ve MCF-7 meme kanseri hücreleri kullanılarak Epigallokateşin gallat (EGCG) tedavisinden sonra hücre çoğalmasını ve canlılığını ölçmek için yaygın olarak kullanılan beş yöntem karşılaştırılmıştır. Adenozin trifosfat (ATP) ve deoksinükleik asit (DNA) miktarını belirlemek için boyaları kullanan her iki yöntem de, tripan mavisi testi ile karşılaştırıldığında canlı hücrelerin ölçümünde doğruluk gösterdi ve sonuçlar iyi bir doğrusal korelasyon gösterdi. Bununla birlikte, MTT kullanımı, ATP, DNA veya tripan mavisi belirlemelerine kıyasla canlı hücre sayısını olduğundan fazla göstermiştir [58]. Chung ve ark. radyasyona maruz kalan insan hepatoma (HepG2) hücrelerinin canlılığı, hem MTT hem de Tripan mavisi testleri ile değerlendirmiştir. Hücre canlılığı, Tripan mavisi testi kullanılırken doza ve zamana bağlı bir şekilde azaldı, ancak MTT testi kullanılarak doza yanıtta önemli bir değişiklik saptanamadı. MTT testinin, hücre canlılığını belirlemek için 96 kuyuklu plaka üzerinde 1×10^4 hücre/kuyu hücre yoğunluğunda verimli olmadığını göstermişlerdir [59]. Bir çalışmada, hücre canlılığını veya çoğalmasını ölçmek için XTT veya MTT kullanılması, kültürlenmiş hücredeki koşullar süperoksit oluşumunu arttırdığında yanlış sonuçlar verebileceği belirlenmiştir [60]. Diğer bir kaç çalışmada, MTT testi kullanıldığında çelişen hücre canlılığı ve çoğalma sonuçları rapor edilmiştir [60-62]. Hiçbir sitotoksikite testi ideal değildir ve sonuçların mümkün olduğunda alternatif testlerden elde edilenlerle desteklenmesi her zaman tavsiye edilmiştir. Çalışmamızda, tripan mavisi testi kullanılırken transfekte edilen hücrelerdeki canlılık oranı azaldı, ancak MTT testi kullanılarak susturmaya yanıtta hiç bir değişiklik saptanamadı. Mikroskoptan alınan görüntüler tripan mavisi testi ile edilen sonuçların daha doğru olduğunu desteklemektedir.

Çalışmamızda protein ekspresyonu analizi için western blot yönteminin kullanılması amaçlanmıştır. Ancak yapılan western blot çalışmasında protein markerin bandı gözlenmesine rağmen GGT7 için bant gözlenmemiştir. Bunun üzerine yüzeyde

zenginleştirilmiş raman spektroskopisi yöntemi kullanılarak protein analizleri gerçekleştirilmiş ve sinyal elde edilmiştir. Çalışmamızda raman spektroskopisi kullanılarak ilk kez hücre kültüründe protein ölçümü yapılmıştır. Yöntemin hücrede protein ölçümü için yeni kullanılıyor olması, daha önce GGT proteinlerinin bu yöntemle ya da başka yöntemlerle bir arada gösterilmediği, standardımız olmadığı ve amacımızın zaten sadece ekspresyonda değişiklik olup olmadığının gösterilmesi olduğu için sonuçları oran olarak sunulmuştur. Genlerin mRNA ve protein ekspresyonlarında susturma işlemi sonunda birbirine paralel azalmalar gözlenmiştir. RAMAN sonuçlarına göre, susturma işlemi uygulanmamış hem MCF-10A hem de MDA-MB-231 hücre hattında GGT7 protein ekspresyonunun diğerlerine göre daha fazla olduğu gözlenmektedir. Bu da GGT7'nin hem sağlıklı hem de kanserli meme hücrelerinde ekspresyonunun yüksek olduğunu göstermektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada özellikle meme kanserli hastalarda belirgin derecede yüksek GGT7 mRNA ekspresyonları gözlenmiştir [10].

Si-GGT1 ve si-GGT5 ile transfekte edilen MCF 10A ve MDA-MB-231 hücre hatlarında susturulmamış hücrelerdeki ile karşılaştırıldığında GGT aktivitesinde azalma olmadığı gösterilmiştir. Bu da GGT-1 susturulduğunda GGT aktivitesinin, GGT5 ve GGT7 genlerinin ekspresyonlarından ve aynı şekilde GGT-5 susturulduğunda GGT aktivitesinin, GGT1 ve GGT7 genlerinin ekspresyonlarından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. si-GGT7 ile transfekte edilen MCF 10A ve MDA-MB-231 hücre hatlarında GGT aktivitesinin transfekte edilmemiş hücrelere göre belirgin bir şekilde arttığı görülmüştür. Bu sonuçlara göre si-GGT7 ile transfekte edilen hücrelerde daha yüksek enzim aktivitesi görülmesi ya GGT7'nin enzimatik aktivitesinin az olduğu ya da GGT7 eksikliğinden kaynaklanan enzim açığının GGT1 ve GGT5 tarafından kompanse edildiği şeklinde yorumlanabilir.

Bello ve ark. U937 hücre hattını, GGT aktivitesini inhibe eden glutamin antagonisti olan asivisin ile 48 saate kadar inkübasyona bıraktıktan sonra asivisin varlığında hücre içi GSH içeriğinde bir azalma gözlememiştir [63]. Çalışmamızda si-GGT1 ile transfekte edilen MCF 10A ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki GSH seviyesi, susturulmamış hücrelerdeki ile karşılaştırıldığında neredeyse değişmediği görülmüştür. Bu da GGT5'in ve GGT7'nin GSH oluşumunda rol aldığını göstermektedir. Fakat si-GGT5 ile transfekte edilen MCF 10A ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki GSH seviyesinin, si-GGT1 ile transfekte edilen hücrelerdeki ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da

arttığı görülmektedir. Bu artış GSH oluşumunda GGT1'in GGT 5'ten daha önemli bir rol aldığını düşündürmektedir. Yapılan bir çalışmada; GGT1'in GSH'yi GGT5'ten yaklaşık 46 kat daha hızlı parçaladığını göstermektedir [64]. Ayrıca si-GGT5 ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücre hattındaki GSH seviyesinin, si-GGT7 ile transfekte edilen hücrelerdeki ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görülmektedir. Bununla birlikte, çalışmamızda susturulmamış meme hücrelerdeki GGT7'nin hem mRNA'sı hem protein ekspresyonu, GGT1 ve GGT5 ekspresyonları ile karşılaştırıldığında daha fazla olduğu gözlenmiştir bu da meme dokusunda GGT7'nin önemli bir rol aldığını düşündürmektedir. GGT5 susturulduğunda oluşan GSH, GGT1 ve GGT7 enzimlerinin aktivitelerinden ve aynı şekilde GGT7 susturulduğunda oluşan GSH, GGT1 ve GGT5 enzimlerin aktivitelerinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Sonuçlar birlikte değerlendirilince MDA-MB-231 hücrelerinde, GGT7'nin GSH oluşumunda GGT5'ten daha büyük bir katkısı olduğu görülmektedir.

si-GGT7 ile transfekte edilen MCF 10A hücre hattında GSH seviyesi, susturulmamış hücrelerdeki ile karşılaştırıldığında arttığı görülmüştür. Bu artışı, artan GGT aktivitesinin sonucu olarak sayılabilir. si-GGT7 ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücre hattında GSH seviyesi, susturulmamış hücrelerdeki ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir.

GGT5, orjinal olarak farelerde, GSH S-konjugat lökotrien C4'ü lökotrien D4'e ayırma yeteneğine dayalı olarak tanımlandı ve inflamasyon ile ilişkilendirildi [24]. Bununla birlikte, insan GGT5'inin, LTD4'ün *in vitro* oluşumu açısından insan GGT1'i ile karşılaştırıldığında daha az verimli olduğu bildirilmiştir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, GGT5'in, insan doku makrofajlarında ve en çok akciğerlerde bulunduğu gösterilmiştir [65]. Shi ve ark. GGT5'in LTC4'ün LTD4'e dönüşümünü katalize etme yeteneğinin patofizyolojik sonuçlara sahip olduğunu bildirmişlerdir [66]. Kanser hücreleri, tümör oluşumunu desteklemek için çevredeki ortamda düşük dereceli inflamatuvar koşulları teşvik eder. Sisteinil lökotrienler (LTC4, LTD4 ve LTE4) enflamatuvar mediyatörlerdir ve kanserin ilerlemesine katkıda bulunurlar. LTD4'ün pro-tümörijenik etkisini destekler [67]. Tez çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre, si-GGT5 ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücre hattındaki LTD4 seviyesinin kontrol hücreler ile karşılaştırıldığında azaldığı görülmüştür. Bu da GGT-5'in, LTD4 oluşumunda önemli bir rol aldığını göstermektedir. Ayrıca MCF 10A normal hücrelerdeki LTD4 seviyesi MDA-MB-231 kanser hücrelerindeki

ile kıyaslandığında daha düşük olup susturma etkisi görülmemiştir. siRNA uygulaması yapılmamış MDA-MB-231 hücrelerindeki yüksek LTD4 seviyeleri kanser hücrelerinin inflamatuvar ortamı devam ettirmeye çalıştığı şeklinde düşünülebilir. GGT5'in LTD4 sentezindeki bilinen etkisi normal hücrelerde belirgin olmamakla birlikte kanserli hücrelerde susturulma sonucu düşük LTD4 seviyeleriyle kendini göstermiştir.

GGT aktivitesi ve tripan mavisi ile yapılan hücre canlılığı arasındaki ilişki incelendiğinde MCF 10A hücre hattında pozitif yönde orta düzeyde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulundu ($p=0,046^*<0,05$, $r= 0,585$), ancak MDA-MB-231 hücre hatında ilişki bulunmadı. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada tripan mavisi testi kullanılarak, asivisin ile GGT inhibisyonu yapılmış hücrelerde, 48 saatlik asivisin tedavisinden sonra çözünür DNA'nın önemli ölçüde arttığını bulmuşlardır [63]. GGT aktivitesi ve LTD4 seviyesi arasındaki ilişki incelendiğinde MCF 10A hücre hattında pozitif yönde orta düzeyde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulundu ($p=0,017<0,05$, $r= 0,671$), ancak MDA-MB-231 hücre hattında ilişki bulunmadı. Elde edilen sonuçlar, GGT'nin LTC4'ün LTD4'e dönüşümünü katalize edebilmesinden bahseden yukarıdaki çalışmalar ile uyumludur.

GSH seviyesi ve LTD4 seviyesi arasındaki ilişki incelendiğinde MDA-MB-231 hücre hattında negatif yönde orta düzeyde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulundu ($p=0,014<0,05$, $r= -0,685$), ancak MCF 10A hücre hattında ilişki bulunmadı. GSH fizyolojik metabolitler (örn. östrojen, melaninler, prostaglandinler ve lökotrienler) ile merkaptüratlar oluşturmak üzere reaksiyona girer. Bu reaksiyonlar glutatyon-S-transferaz (bir Faz II detoksifikasyon enzimleri ailesi) tarafından başlatılır [29].

LTD4 seviyesi ve tripan mavisi ile yapılan hücre canlılığı arasındaki ilişki incelendiğinde MDA-MB-231 hücre hattında pozitif yönde orta düzeyde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulundu ($p=0,016<0,05$, $r= 0,677$), ancak MCF 10A hücre hattında ilişki bulunmadı. Proinflamatuvar lökotrien D4 (LTD4)'ün, epitelyal hücre migrasyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, inflamasyonlu dokudan salınan proinflamatuvar CysLT medyatörlerinin kanserin gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Proinflamatuvar CysLT1R'nin kolon adenokarsinomlarında yukarı regüle olduğu gösterilmiştir ve bu reseptörün yüksek ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir [68]. Wikström ve ark.'nın çalışmasında, bağırsak epitel hücrelerinin LTD4'e uzun süre maruz kalması, siklooksijenaz-2, katenin ve Bcl-2 gibi kolon karsinogenezi ile ilgili

faktörlerin yukarı regülasyonu ile sonuçlanmıştır [69]. İnflamatuvar bağırsak hastalıkları, kolon kanseri gelişme riskinin artmasıyla ilişkilidir. Yapılan bir çalışmada, bu süreçte proinflamatuvar lökotrien D4'ün (LTD4) transforme olmayan bağırsak epitel hücrelerinde bir kanser hücresinin ayırt edici özellikleri olan proliferasyon, hayatta kalma ve hareketlerinin indüklediğini göstermiştir [70].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

MCF 10A ve MDA-MB-231 hatlarından elde edilen sonuçlar;

- Çalışmamız, literatürü destekler şekilde sadece GGT1 geni eksikliğinin hücre ölümüne yol açtığını gösterip GGT1 işlevlerinin, GGT5'in ve GGT7'nin işlevleriyle telafi edilemeyeceğini gösterilmiştir.
- MTT testi kullanıldığında hücre canlılığı sonuçları, mikroskoptan alınan görüntüler ile çelişmekte, bu da MTT testinin güvenli olmadığını göstermektedir.
- GGT-1siRNA ile transfekte edilen her iki hücre hattındaki muhtemelen GGT aktivitesi, GGT5 ve GGT7 genlerinin ekspresyonlarından kaynaklanmaktadır. GGT-7siRNA ile transfekte edilen her iki hücre hattında GGT aktivitesinin arttığı görülmüştür.
- GGT-1siRNA ile transfekte edilen her iki hücre hattında GSH seviyesinin değişmediği görülmüştür. GGT-7siRNA ile transfekte edilen MCF 10A hücre hatında GSH seviyesinin arttığı görülmüşken MDA-MB-231 hücre hatındaki GSH seviyesinin ise azaldığı tespit edilmiştir.
- GGT-5siRNA ile transfekte edilen MDA-MB-231 hücre hattında LTD4 seviyesinin azaldığı görülmüştür, fakat MCF 10A normal hücrelerdeki LTD4 seviyesinin MDA-MB-231 kanserli hücrelerine kıyaslandığında daha düşük olduğu bulunduğundan susturma etkisinin görülmemiştir.

MCF 10A hücre hatında, parametreler arasındaki ilişki incelendiğinde;

- GGT aktivitesi ve tripan mavisi ile yapılan hücre canlılığı arasında pozitif yönde orta düzeyde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur.
- GGT aktivitesi ve LTD4 seviyesi arasında pozitif yönde orta düzeyde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur.

MDA-MB-231 hücre hatında, parametreler arasındaki ilişki incelendiğinde;

- GSH seviyesi ve LTD4 seviyesi arasında negatif yönde orta düzeyde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur.
- LTD4 seviyesi ve tripan mavisi ile yapılan hücre canlılığı arasında pozitif yönde orta düzeyde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur.
- GGT1 ve GGT5 aynı zamanda susturup GGT7'nin olası fonksiyonlarının incelenmesi gerekmektedir. Aynı şekilde GGT1 ve GGT7 aynı zamanda susturup GGT5'in olası fonksiyonlarının incelenmesi gerekmektedir.
- GGT7 nakavt fare modelleri oluşturarak GGT7'nin, hücrelerin oksidatif hasarından korumasında rol alıp almadığının incelenmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Mattiuzzi, C. and Lippi, G. (2019). Current cancer epidemiology glossary. *The Journal of Epidemiology and Global Health*, 9(4), 217–222.
2. Carter, B.Z., Wiseman, A.L., Orkiszewski, R., Ballard, K.D., Ou, C.N. and Lieberman, M.W. (1997). Metabolism of leukotriene C4 in γ -glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*, 272(19), 12305–12310.
3. Sasaki, F. and Yokomizo, T. (2019). The leukotriene receptors as therapeutic targets of inflammatory diseases. *International Immunology*, 31(9), 607–615.
4. Sun, L., Yin, W., Wu, Z., Wang, Y. and Lu, J. (2020). The predictive value of pre-therapeutic serum gamma-glutamyl transferase in efficacy and adverse reactions to neoadjuvant chemotherapy among breast cancer patients. *Journal of Breast Cancer*, 23(5), 509–520.
5. J. Liu, S. Zhang, B. Zhao, C. Shen, X. Zhang, and G. Yang, (2019). A novel triarylboron based ratiometric fluorescent probe for in vivo targeting and specific imaging of cancer cells expressing abnormal concentration of GGT. *Biosensors and Bioelectronics*, 142(111497), 1-10.
6. Heisterkamp, N., Groffen, J., Warburton, D. and Sneddon, T.P. (2008). The human gamma-glutamyltransferase gene family. *Journal of Human Genetics*, 123(4), 321–332.
7. Tian, S., Li, J., Guo, Y., Dong, W. and Zheng, X. (2021). Expression Status and Prognostic Significance of Gamma-Glutamyl Transpeptidase Family Genes in Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 11(731144), 1-13
8. Wei, J.R., Dong, J. and Li, L. (2020). Cancer-associated fibroblasts-derived gamma-glutamyl; promotes tumor growth and drug resistance in lung. *Aging (Albany. NY)*, 12(13), 13220–13233,
9. Pang, X. and Panee, J. (2014). Roles of glutathione in antioxidant defense, inflammation, and neuron differentiation in the thalamus of HIV-1 transgenic rats. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 9(3), 413–423.
10. Gelen-Güngör, D., Miser-Salihoglu, E., Demokan, S., Hasan, K. and Yardim-Akaydin, S. (2020). mRNA expressions of specific gamma-glutamyl transferases in molecular subtypes of breast cancer. *Athens Journal of Health and Medical Sciences*, 7(3), 157–170.
11. Zhang, Y.B., Pan, X.F., Chen, J., Cao, A., Zhang, Y.G., Xia, L., Wang, J., Li, H., Liu, G. And Pan, A. (2020). Combined lifestyle factors, incident cancer, and cancer mortality: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies, *British Journal of Cancer*, 122(7), 1085–1093.
12. Cancer Today. International Agency for Research on Cancer, (2020).
13. Almutlaq, B.A., Almuazzi, R.F., Almuhayfir, A.A., Alfouzan, A.M., Alshammari,

- B.T., AlAnzi, H.S. and Ahmed, H.G. (2017). Breast cancer in Saudi Arabia and its possible risk factors. *Journal of Cancer Policy*, 12, 83–89,.
14. Weigelt, B., Geyer, F.C. and Reis-Filho, J.S. (2010). Histological types of breast cancer: How special are they?. *Molecular Oncology*, 4(3), 192–208.
 15. Sims, A.H., Howell, A., Howell, S.J. and Clarke, R.B. (2007). Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nature Clinical Practice Oncology*, 4(9), 516–525.
 16. Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H. and Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*, 10(10), 955–960.
 17. Emdin, M., Pompella, A. and Paolicchi, A. (2005). Gamma-glutamyltransferase, atherosclerosis, and cardiovascular disease: Triggering oxidative stress within the plaque. *Circulation*, 112(14), 2078–2080.
 18. Weigelt, B., Horlings, H.M., Kreike, B., Hayes, M.M., Hauptmann, M., Wessels, L.F., Jong, D., Vjiver, M. and Peterse, J.L. (2008). Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *Journal of Pathology*, 216(2), 141–150.
 19. Kittaneh, M., Montero, A.J. and Glück, S. (2013). Molecular profiling for breast cancer: a comprehensive review. *Biomarkers in cancer*, 5, 61-70.
 20. Yersal, O. and Barutca, S. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(3), 412–424.
 21. Ikeda, Y., Fujii, J., Taniguchi, N. and Meister, A. (1995). Expression of an active glycosylated human γ -glutamyl transpeptidase mutant that lacks a membrane anchor domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(1), 126–130.
 22. Reithinger, J. (2013). *Membrane Protein Biogenesis in Saccharomyces cerevisiae*. Doctoral Thesis in Biochemistry, Stockholm University, Sweden, 22.
 23. Verma, V. V., Gupta, R. and Goel, M. (2015). Phylogenetic and evolutionary analysis of functional divergence among Gamma glutamyl transpeptidase (GGT) subfamilies. *Biology Direct*. 10(1), 1–21.
 24. Hanigan, M. H. (2014). Gamma-glutamyl transpeptidase: Redox regulation and drug resistance. *Advances in Cancer Research*, 122, 103-141.
 25. West, M., Chen, Y., Wickham, S., Heroux, A., Cahill, K., Hanigan, M.H. and Mooers, B. H. M. (2013). Novel insights into eukaryotic γ -glutamyltranspeptidase 1 from the crystal structure of the glutamate-bound human enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 288(44), 31902–31913.
 26. Bui, T.T., Nitta, R.T., Kahn, S.A., Razavi, S.M., Agarwal, M., Aujla, P., Gholamin S. and Li, G. (2015). γ -Glutamyl transferase 7 is a novel regulator of glioblastoma growth. *BMC Cancer*, 15(1), 1–9.

27. He, X., Di, Y., Li, J., Xie, Y, Tang, Y. and Gu, J. (2002). Molecular cloning and characterization of CT120, a novel membrane-associated gene involved in amino acid transport and glutathione metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297(3), 528–536.
28. Whitfield, J.B., (2001). Gamma glutamyl transferase. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 38(4), 263–355.
29. Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R. and Turner, N.D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition*, 34(3), 489–492.
30. Nelson, D.L., Cox, M.M., and Lehninger, A.L. (2005). *Lehninger principles of biochemistry* (Fourth edition). New York : W.H. Freeman, 560.
31. Ristoff E. and Larsson, A. (1998). Patients with genetic defects in the γ -glutamyl cycle. *Chemico-Biological Interactions*, 112(5), 113–121.
32. Zhang, H., Forman, H.J. and Choi, J. (2005). Γ -Glutamyl Transpeptidase in Glutathione Biosynthesis. *Methods in Enzymology*, 401(5), 468–483.
33. Haeggström, J.Z. (2018). Leukotriene biosynthetic enzymes as therapeutic targets. *Journal of Clinical Investigation*, 128(7), 2680–2690.
34. Rouzer, C.A., Matsumoto, T. and Samuelsson, B. (1986). Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A₄ synthase activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(4), 857–861.
35. Leslie, C.C. (2015). Cytosolic phospholipase A₂: Physiological function and role in disease. *Journal of Lipid Research*, 56(8), 1386–1402.
36. Christi W.W. and Harwoo, J.L. (2020). Oxidation of polyunsaturated fatty acids to produce lipid mediators. *Essays in Biochemistry*, 64(3), 401–421.
37. Corti, A., Franzini, M., Paolicchi, A. and Pompella, A. (2010). Gamma-glutamyltransferase of Cancer Cells at the Crossroads of Tumor Progression, Drug Resistance and Drug Targeting. *Anticancer Research*, 1182, 1169–1181.
38. Agrawal, N, Dasaradhi, P.V., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K. and Mukherjee, S.K. (2003). RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. ,” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 657–685.
39. Subhan, M.A. and Torchilin, V.P. (2019). Efficient nanocarriers of siRNA therapeutics for cancer treatment. *Translational Research*, 214, 62–91.
40. Tatiparti, K., Sau, S., Kashaw, S.K. and Iyer, A.K. (2017). siRNA delivery strategies: A comprehensive review of recent developments. *Nanomaterials*, 7(4), 1–17.
41. Resnier, P., Montier, T., Mathieu, V., Benoit, J.P. and Passirani, C. (2013). A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer. *Biomaterials*, 34(27), 6429–6443.

42. Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Penge, L., Huang, Y. and Zhao, Y. (2020). Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(101), 1-25.
43. Gheysen G. and Vanholme, B. (2007). RNAi from plants to nematodes. *Trends in Biotechnology*, 25(3), 89–92.
44. Berridge M.V. and Tan, A.S.(1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysic*, 303(2), 474–482.
45. Kurouski, D. and Van Duyne, R.P. (2015). In situ detection and identification of hair dyes using surface-enhanced raman spectroscopy (SERS). *Analytical Chemistry*, 87(5), 2901–2906.
46. Wang, Y. Wen, G. Ye, L., Liang, A. and Jiang, Z. (2016). Label-free SERS study of galvanic replacement reaction on silver nanorod surface and its application to detect trace mercury ion. *Scientific Reports*, 6 (19650) 1–12.
47. Yang, D., Zhou, H., Ying, Y., Niessner, R. and Haisch, C. (2013). Surface-enhanced Raman scattering for quantitative detection of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(29), 9419–9425.
48. Driskell, J.D., Kwart, K.M., Lipert, R.J., Porter, M.D., Neill, J.D. and Ridpath, J.F. (2005). Low-level detection of viral pathogens by a surface-enhanced Raman scattering based immunoassay. *Analytical Chemistry*, 77(19), 6147–6154.
49. Gong, T., Zhang, N., Kong, K.V., Goh, D., Shum, P.P., Yong, K.T. and Olivo, M. (2016). Rapid SERS monitoring of lipid-peroxidation-derived protein modifications in cells using photonic crystal fiber sensor. *J. Biophotonics*, 9(1), 32–37.
50. Azarova, I., Klyosova, E. and Polonikov, A. (2021). The link between type 2 diabetes mellitus and the polymorphisms of glutathione-metabolizing genes suggests a new hypothesis explaining disease initiation and progression. *Life*, 11(9), 1-37.
51. Maasalu, K., Laius, O., Zhytnik, L., Koks, S., Prans, E., Reimann, E. and Martson, A. (2017). Featured Article: Transcriptional landscape analysis identifies differently expressed genes involved in follicle-stimulating hormone induced postmenopausal osteoporosis. *Experimental Biology and Medicine*, 242(2), 203–213.
52. Wang, X. Zhang, L., Gou, H. Su, H., Li, Z. and Liang, J.Q. (2021). 798 Gamma-Glutamyltransferase 7 Suppresses Gastric Carcinogenesis By Cooperating With Rab7 To Mediate Mitophagy. *Gastroenterology*, 160(6), 164-174.
53. Gallman, A., Wolfreys, F.D., Nguyen, D.N., Sandy, M., Xu, Y. and Cyster, J.C. (2021). Abcc1 and Ggt5 support lymphocyte guidance through export and catabolism of S-geranylgeranyl-L-glutathione. *Science Immunology*, 4(6), 1-25.
54. Lu, E., Wolfreys, F.D., Muppidi, J.R., Xu, Y. and Cyster, J.G. (2019). S-Geranylgeranyl-L-glutathione is a ligand for human B cell-confinement receptor P2RY8. *Nature*, 567, 244–248.

55. Harding, C.O., Williams, Ph., Wagner, E., Chang, D. Wild, K., Colwell, R.E., and Wolf, J. (1997). Mice with genetic γ -glutamyl transpeptidase deficiency exhibit glutathionuria, severe growth failure, reduced life spans, and infertility. *Journal of Biological Chemistry*, 272(19), 12560–12567.
56. Lieberman M.W., Wiseman, A., Shi, Z.Z. and Matzuk, M.M. (1996). Growth retardation and cysteine deficiency in γ -glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 7923–7926.
57. Han, B., Luo, G., Shi, Z. Barrios, R., Atwood, D, Liu, W., Habib, G.M., Sifers, N. and Lieberman M. (2002). γ -glutamyl leukotrienase, a novel endothelial membrane protein, is specifically responsible for leukotriene D4 formation in vivo, *The American Journal of Pathology*, 161(2), 481–490.
58. Wang, P., Henning, S.M. and Heber, D. (2010). Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLOS One*, 5(4),1-10.
59. Chung, D.M., Kim, J.H. and Kim, J.K. (2015). Evaluation of MTT and Trypan blue assays for radiation-induced cell viability test in HepG2 cells,” *International Journal of Radiation Research*, 13(4), 331–335.
60. Wang, S., Yu, H. and Wickliffe, J. K. (2011). Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO 2. *Toxicology in Vitro*, 25(8), 2147–2151.
61. Belyanskaya, L., Manser, P., Spohn, P., Bruinink, A. and Wick, P. (2007). The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes-cell interaction, *Carbon*, 45(13), 2643–2648.
62. Kroll, A., Pillukat, M.H., Hahn, D.and Schneckeburger, J. (2009). Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), 370–377.
63. Del Bello, B., Paolicchi, A., Comporti, M., Pompella, A. and Maellaro, E. (1999). Hydrogen peroxide produced during γ -glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology journal*, 13(1), 69–79.
64. Wickham, S., West, M.B., Cook, P.F. and Hanigan, M.H. (2011). Gamma-glutamyl compounds: Substrate specificity of gamma-glutamyl transpeptidase enzymes *Analytical Biochemistry*, 414(2), 208–214.
65. Lukic, A., Ji, J., Idborg, H., Samuelsoon, B., Palmberg, L., Gabrielsoon, S. and Radmark, O. (2016). Pulmonary epithelial cancer cells and their exosomes metabolize myeloid cell-derived leukotriene C4to leukotriene D4. *Journal of Lipid Research*, 57(9), 1659–1669.
66. Shi, Z.Z., Han, B., Habib, G.M., Matzuk, M.M. and Lieberman, M.W. (2001). Disruption of γ -Glutamyl Leukotrienase Results in Disruption of Leukotriene D 4 Synthesis In Vivo and Attenuation of the Acute Inflammatory Response. *Molecular*

and Cellular Biology, 21(16), 5389–5395.

67. Lukic, A., Wahlund, C.J., Gomez, C., Brodin, D., Samuelsoon, B., Wheelock, C.E., Gabrielsoon, S. and Radmark, O. (2019). Exosomes and cells from lung cancer pleural exudates transform LTC₄ to LTD₄, promoting cell migration and survival via CysLT₁. *Cancer Letters*, 444, (1), 1–8.
68. Magnusson, C., Liu, J. Ehrnstrom, R., Manjer, J., Jirstom, K., Andersson, T. and Sjölander, A. (2011). Cysteinyl leukotriene receptor expression pattern affects migration of breast cancer cells and survival of breast cancer patients. *International Journal of Cancer*, 129(1), 9–22.
69. Wikström, K., Juhas, M. and Sjölander A. (2003). The anti-apoptotic effect of leukotriene D₄ involves the prevention of caspase 8 activation and Bid cleavage. *Biochemical Journal*, 371(1), 115–124.
70. Paruchuri, S., Broom, O., Dib, K. and Sjölander, A. (2005). The pro-inflammatory mediator leukotriene D₄ induces phosphatidylinositol 3-kinase and Rac-dependent migration of intestinal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13538–13544.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : RAMAZANOĞLU, Sümeyye

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri :

Medeni hali :

Telefon :

e-posta :

Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya (ECZ.) ABD.	Devam ediyor
Doktora	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji ABD.	2021
Uzmanlık	Şam Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya ABD.	2013
Lisans	Halep Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi.	2008
Lise	Al-Qadisye Lisesi.	2003

İş Deneyimi,Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2017- 2020	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	Öğretim Görevlisi

Yabancı Dili

İngilizce

Yayınlar

1. Sayed Rammadan S ve Al-Quobaili F. Increased Serum Cholesteryl Ester Transfer Protein in Syrian Obese Humans. *Gazi Medical journal GMJ*. 2013;24:37-39.
2. Sayed Rammadan S, Cevik C ve Al-Quobaili F. Impact of Type 2 Diabetes on The Serum CETP Levels. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, Jun 2014; 26(1): 98-100.
3. Yardim-Akaydin S, Ramazanoğlu S, Miser-Salihoğlu E, Karanlık H, Demokan S. Leukotriene D4 Levels in Patients with Breast Cancer, *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences* (Kabul edildi).



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..