

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİ LAKTİK-KO-GLİKOLİK ASİT NANOPARTİKÜLLERİ
KULLANARAK HEDEFLİ HÜCRELERDE RNA İNTERFERANS İLE GEN
SUSTURMA YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Şeyma CEYLAN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahri AKBAŞ

HAZİRAN 2019

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİ LAKTİK-KO-GLİKOLİK ASİT NANOPARTİKÜLLERİ
KULLANARAK HEDEFLİ HÜCRELERDE RNA İNTERFERANS İLE GEN
SUSTURMA YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Şeyma CEYLAN
(175309001)

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahri AKBAŞ
İkinci Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Fatemeh BAHADORİ

HAZİRAN 2019

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 175309001 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Şeyma CEYLAN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "Poli laktik-ko-glikolik asit nanopartikülleri kullanarak hedefli hücrelerde RNA interferans ile gen susturma yöntemi geliştirilmesi" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç.Dr. Fahri AKBAŞ**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Eş Danışman : **Dr.Öğr. Üyesi Fatemeh BAHADORİ**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç.Dr. Ahmet ÖZAYDIN**
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa

Doç.Dr. Sema SIRMA EKMEKÇİ
İstanbul Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Birsen ELİBOL
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Teslim Tarihi : **19 Temmuz 2019**

Savunma Tarihi : **19 Haziran 2019**



Aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tez çalışmam sürecinde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve çalışmamın her aşamasında desteği ile yanımda olan, her sorumu büyük bir sabır ve özveri ile yanıtlayan çok değerli danışmanım Doç. Dr. Fahri AKBAŞ ve eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Fatemeh BAHADORİ'ye

Tez çalışmam sürecinde laboratuvar olanaklarına erişim imkanı tanıyan biyokimya ana bilim dalı başkanı Prof.Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT ve tüm biyokimya çalışanlarına;

Çalışmam süresince uzun uğraşlarla ve her aşamasında destek veren, yardımını hiçbir zaman esirgemeyen değerli Öykü ZEYBEK ve Fatma KAZDAL'a;

Tez çalışmalarım sırasında fikirlerini, tecrübelerini benimle paylaşan, her an dostluğunu, arkadaşlığını hissettiren ve tüm tez aşamasında bana yardım eden Seda SÜSGÜN'e;

Çalışmam süresince beni destekleyen, hep yanımda olan, bana inanan, beni cesaretlendiren ve maddi-manevi yardımlarını esirgemeyen çok değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 6.2018/11 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Haziran 2019

Şeyma Ceylan

(Biyolog)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Şeyma CEYLAN

İmza

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	İV
BEYAN	V
İÇİNDEKİLER	VI
KISALTMALAR	X
TABLO LİSTESİ	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 KANSER.....	4
2.1.1 Pankreas Kanseri	5
2.1.1.1 GPR87 geni	6
2.1.2 Kanser Tedavi Yöntemleri	8
2.1.2.1 Cerrahi yaklaşımlar	8
2.1.2.2 Kemoterapi	9
2.1.2.3 Radyoterapi	9
2.1.2.4 İmmünoterapi	9
2.1.2.5 Hipertermi	10
2.1.2.6 Gen tedavisi	10
2.2 GEN SUSTURMA STRATEJİLERİ.....	11
2.2.1 Antisens Teknolojisi.....	12
2.2.1.1 RNA İnterferans Teknolojisi (RNAİ).....	14
2.2.1.2 RNAi mekanizması	16
2.2.1.3 RNAi Temelli Gen Baskılama Bileşenleri	18
2.2.1.4 RNAi Terapötiklerinin Uygulama Alanları.....	23
2.3 Nanoteknoloji	25
2.3.1 Pasif Hedefleme	26

2.3.2 Aktif Hedefleme	27
2.3.2.1 Lipozomlar	29
2.3.2.2 Miseller.....	30
2.3.2.3 Dendrimerler	31
2.3.2.4 Karbon Nanotüpler	31
2.3.2.5 Metalik Nanopartiküller	32
2.3.3 İlaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılan polimerler	32
2.3.4 PLGA	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1 GEREÇ.....	36
3.1.1 Cihazlar	36
3.1.2 Kimyasallar ve kitler	38
3.1.3 Enzimler	40
3.1.4 Mikroorganizma	41
3.1.5 PCR primerleri	41
3.1.6 siRNA Oligonükleotid Kalıbı.....	42
3.1.7 Vektör Sistemi.....	42
3.1.8 DNA Markerları	43
3.1.9 Tampon ve çözeltiler	44
3.1.9.1 Büyütme medyumları	44
3.1.9.2 Agaroz jel elektroforezi çözeltileri.....	45
3.1.9.3 Nanopartikül sentezinde kullanılan çözeltileri	46
3.2 YÖNTEM.....	47
3.2.1 PCR primeri tasarımı.....	47
3.2.2 GPR87 geninin klonlanması.....	48
3.2.2.1 GPR87 geninin eldesi ve PCR ile çoğaltılması	48
3.2.2.2 PCR ürününün saflaştırılması.....	49
3.2.2.3 PCR ürünü ve vektörün restriksiyon kesimi.....	50
3.2.2.4 psiCHECK™-2 ve GPR87 geninin ligasyonu	52
3.2.2.5 Transformasyon.....	53
3.2.3 siRNA üretimi	58
3.2.3.1 siRNA için Oligonükleotit kalıp tasarımı.....	58
3.2.3.2 Oligonükleotitlerin T7 promoter primer ile hibridizasyonu.....	59

3.2.3.3 Klenow DNA polimeraz ile polimerizasyon	60
3.2.3.4 dsRNA sentezlenmesi.....	61
3.2.3.5 siRNA pürifikasyonu.....	61
3.2.4 PLGA nanopartiküllerinin Sentezi	62
3.2.4.1 siRNA'nın önceden hazırlanmış PLGA nanopartiküllerine yüklenmesi	63
3.2.4.2 PLGA Nanopartikül sentezi ve vortex ile siRNA yüklenmesi.....	64
3.2.4.3 PLGA nanopartikül sentezi ve ultrasonic prob ile siRNA yüklenmesi.....	65
3.2.5 PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonu	66
3.2.6 Enkapsülasyon veriminin (%EE) ve yükleme veriminin (LE) Hesaplanması ..	66
3.2.7 siRNA-PLGA-1 nanopartiküllerinin in vitro salımı.....	68
3.2.7.1 Standart konsantrasyon eğrisinin oluşturulması	68
3.2.8 Sitotoksite çalışmaları.....	69
3.2.9 Hücre kültürü.....	70
3.2.9.1 HEK 293T ve 1.1B4 Pankreas hücre hattı	70
3.2.9.2 Hücrelerin kültüre edilmesi	71
3.2.10 Lusiferaz aktivitesi ile siRNA etkinliğinin kantitatif olarak belirlenmesi	72
3.2.10.1 Lusiferaz ile katalizlenen biyoluminesans reaksiyon	72
3.2.10.2 Rekombinant plazmitin hücre hattına transfeksiyonu	74
3.2.10.3 Lusiferaz assay ile siRNA etkisinin gösterilmesi.....	74
3.2.10.4 PLGA nanopartikülleri kullanılarak siRNA'nın hücrelere gönderilmesi...	77
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	78
4.1 PCR Yöntemi ile HEK 293T Hücre Hattından GPR87 Gen Bölgesi Eldesi	78
4.2 GPR87 Geninin Pürifikasyonu.....	79
4.3 GPR87 geni-psiCHECK™-2 Vektörünün Restriksiyon Kesimi ve Ligasyonu.....	80
4.4 Transformasyon.....	80
4.5 siRNA Üretimi ve Saflaştırma Bulgusu	82
4.6 PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonu	83
4.6.1 siRNA-PLGA-1 nanopartiküllerin karakterizasyonu.....	83
4.6.1.1 Boş PLGA-1 partiküllerin karakterizasyonu	83
4.6.1.2 siRNA-PLGA-1 partiküllerin karakterizasyonu.....	85
4.6.2 siRNA-PLGA-2 nanopartiküllerin karakterizasyonu	87
4.6.2.1 Boş PLGA-2 partiküllerin karakterizasyonu	87
4.6.2.2 siRNA-PLGA-2 partiküllerin karakterizasyonu.....	89

4.6.3 siRNA-PLGA-3 nanopartiküllerin karakterizasyonu.....	90
4.6.3.1 Boş PLGA-3 partiküllerin karakterizasyonu.....	90
4.6.3.2 siRNA-PLGA-3 partiküllerin karakterizasyonu.....	92
4.7 siRNA-PLGA NP'lerinin enkapsülasyon verimi (%EE) ve yükleme verimi (%LE).....	95
4.8 Sentezlenen siRNA-PLGA NP'lerinin Gen Sustuma Sonuçları.....	97
4.9 siRNA-PLGA NP ile 1.1B4 Hücre Hattında Sitotoksisite Deneyi Sonuçları.....	102
4.10 siRNA-PLGA-1 Nanopartiküllerinin İn Vitro Salım Sonucu.....	104
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	105
KAYNAKLAR	108
ÖZGEÇMİŞ.....	126



KISALTMALAR

bp	: Baz çifti
BSA	: Bovin serum albumin
°C	: Celsius
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPBS	: Dulbecco fosfat tamponlu salin
dsRNA	: Çift zincirli RNA
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EE	: Enkapsülasyon verimliği
FBS	: Fetal bovin serum
FDA	: Food and drug administration
g	: Gram
GPR87	: G-protein bağımlı reseptör 87
GPRC	: G protein-bağlantılı hücre yüzeyi reseptörleri
L	: Litre
LB	: Luria bertani
LE	: yükleme verimliği
mg	: Miligram
miRNA	: MikroRNA
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı RNA
nm	: Nanometre
NP	: Nanopartikül
OD	: Optik yoğunluk
PBS	: Fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PLGA	: Poli laktik-ko-glikolik asit
PTGS	: Post-Transkripsiyonel Gen Susturulması
RISC	: RNA - İndükleyici Susturucu Kompleks
RNA	: Ribonükleik asit
RNAi	: RNA interferans
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
siRNA	: Küçük Engelleme RNA
sn	: Saniye
TAE	: Tris asetik asit EDTA
UV	: Ultraviyole

μL : Mikrolitre
 μM : Mikromolar



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 : RNAinterferans (RNAi) teknolojisi ile çeşitli yapılan çalışmaların kronolojik gelişimi.	15
Tablo 2.2 : Klinik denemeleri devam eden siRNA terapötikleri [158].	24
Tablo 3.1 : Kullanılan cihazların listesi.	36
Tablo 3.2 : Kullanılan kit,kimyasal listesi.	38
Tablo 3.3 : Kullanılan enzimlerin listesi.	40
Tablo 3.4 : GPR87 geni için tasarlanan primer ve özellikleri.	41
Tablo 3.5 : GPR87 geni için tasarlanan primer ve özellikleri.	42
Tablo 3.6 : psiCHECK™ -2 Vektör dizisinin referans noktaları.	43
Tablo 3.7 : GPR87 geni için tasarlanan primerler.	48
Tablo 3.8 : GPR87 için PCR Prtotokolü.	49
Tablo 3.9 : GPR87 için PCR Prtotokolü.	49
Tablo 3.10 : Insert restriksiyon kesim işlemi madde miktarları.	50
Tablo 3.11 : Vektör psiCHECK™-2 defosforilasyon işlemi madde miktarları.	52
Tablo 3.12 : Vektör psiCHECK™-2 defosforilasyon işlemi madde miktarları.	52
Tablo 3.13 : Vektör psiCHECK™-2 defosforilasyon işlemi madde miktarları.	53
Tablo 3.14 : psiCHECK™-2+GPR87 plazmidlerini alan hücrelerin tespiti için yapılan PCR karışım bileşenleri.	55
Tablo 3.15 : psiCHECK™-2+GPR87 vektörü için PCR Prtotokolü.	56
Tablo 3.16 : psiCHECK™-2+GPR87 plazmidlerinin PstI restriksiyon enzimi ile kesimi.	57
Tablo 3.17 : Oligonükleotit templatın T7 promoter primer ile hibridizasyonu.	60
Tablo 3.18 : Klenow DNA polimeraz ile polimerizasyon.	60
Tablo 3.19 : Transkripsiyon için gerekli bileşenler.	61
Tablo 3.20 : siRNA pürifikasyon bileşenleri.	61
Tablo 3.21 : Yüksek aralık standart eğrisi için hazırlanan protokol.	67
Tablo 3.22 : Düşük aralık standart eğrisi için hazırlanan protokol.	67

Tablo 3.23 : Thermo Scientific Pierce Renilla-Firefly Luciferase Dual Assay Kit tarafından önerilen dalga boyları.....	76
Tablo 4.1 : Farklı yöntemlerle üretilen siRNA-PLGA NP'lerinin DLS sonuçları.	94
Tablo 4.2 : Farklı yöntemlerle üretilen siRNA-PLGA NP'lerinin %EE ve %LE sonuçları.....	96



ŞEKİL LİSTESİ

Safya

Şekil 2.1	: GPR87 geninin görevli olduğu sinyal yolağı [50].	8
Şekil 2.2	: Farklı antisens stratejilerinin karşılaştırması.	13
Şekil 2.3	: Petunya bitkisinde chs geninin ekspresyonunun baskılanması.	14
Şekil 2.4	: RNA interferans(RNAi) mekanizması[116].	17
Şekil 2.5	: RNA interferans(RNAi) mekanizmasının başlangıç adımı [117].	18
Şekil 2.6	: Dicer enziminin domain yapısı [121].	19
Şekil 2.7	: RNAi mekanizmasında DICER ve RISC kompleksi [129].	20
Şekil 2.8	: siRNA (small interfering RNA).	21
Şekil 2.9	: siRNA ve miRNA yolakları[144].	22
Şekil 2.1	: Gelişmiş Geçirgenlik ve Alıkonma (EPR) etkisi [175].	27
Şekil 2.11	: Hedefli ilaç taşıma sisteminde kullanılan bazı nanopartiküller [189].	29
Şekil 2.12	: Misel oluşumu [197].	31
Şekil 2.13	: PLGA moleküler yapısı (x=laktik asit birimi, y=glikolik asit birimi).	33
Şekil 2.14	: PLGA hidrolizi [15].	34
Şekil 2.15	: Biyobozunur polimerik nanopartiküllerde enkapsüle edilen edilen biyoaktif ajanların salımı. Polimerik sistem çevre ile etkileşime girerek çevredeki ortam sıvısı matrise giriyor (A), sıvı polimerik sistemin şişmesine neden oluyor (B), sıvı difüzyon kanalları oluşturuyor (C), polimerik sistemin bozunması (D) [231].	35
Şekil 3.1	: psiCHECK™-2 vektör haritası.	42
Şekil 3.2	: Thermo Scientific O'GeneRuler DNA Ladder Mix.	44
Şekil 3.3	: psiCHECK™-2 vektörünün çoklu klonma bölgesi.	51
Şekil 3.4	: psiCHECK™-2 vektörünün haritası.	51
Şekil 3.5	: Rekombinant vektörü (psiCHECK™-2+GPR87) alarak transforme olan bakteri kolonileri.	55
Şekil 3.6	: siRNA üretim protokolü.	58

Şekil 3.7	: Water-Oil-Water (W1/O/W2) ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle PLGA nanopartiküllerinin oluşumu.	63
Şekil 3.8	: Nanopartikül oluşumu.	64
Şekil 3.9	: Yüksek aralık standart eğrisi.	69
Şekil 3.10	: Düşük aralık standart eğrisi.	69
Şekil 3.11	: 40X objektif altında HEK293T hücrelerinin görüntüsü.	71
Şekil 3.12	: Coelenterazine ve green Renilla lusiferazın kimyasal reaksiyonu.	72
Şekil 3.13	: Lusiferin ve kırmızı ateş böceği lusiferazının kimyasal reaksiyonu.	73
Şekil 3.14	: Lusiferaz raportörün çalışma şeması.	73
Şekil 3.15	: Luciferaz deneyinin çalışma prensibi.	75
Şekil 4.1	: GPR87 geninin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ürünün UV görüntüsü.	79
Şekil 4.2	: psiCHECK™-2 vektörüne GPR 87 geninin ligasyon sonucu.	80
Şekil 4.3	: psiCHECK™-2-GPR 87 ligasyon ürünün jel görüntüsü.	82
Şekil 4.4	: Saflaştırılan siRNA UV spektrofotometre sonucu.	83
Şekil 4.5	: PLGA-1 sayıca dağılım (Number).	84
Şekil 4.6	: PLGA-1 şiddetçe dağılım (Intensity).	84
Şekil 4.7	: PLGA-1 hacimce dağılım (Volume).	85
Şekil 4.8	: siRNA-PLGA-1 sayıca dağılım (Number).	85
Şekil 4.9	: siRNA-PLGA-1 şiddetçe dağılım (Intensity).	86
Şekil 4.10	: siRNA-PLGA-1 hacimce dağılım (Volume).	86
Şekil 4.11	: PLGA-2 sayıca dağılım (Number).	87
Şekil 4.12	: PLGA-2 şiddetçe dağılım (Intensity).	88
Şekil 4.13	: PLGA-2 hacimce dağılım (Volume).	88
Şekil 4.14	: siRNA-PLGA-2 sayıca dağılım (Number).	89
Şekil 4.15	: siRNA-PLGA-2 şiddetçe dağılım (Intensity).	89
Şekil 4.16	: siRNA-PLGA-2 hacimce dağılım (Volume).	90
Şekil 4.17	: PLGA-3 sayıca dağılım (Number).	91
Şekil 4.18	: PLGA-3 şiddetçe dağılım (Intensity).	91
Şekil 4.19	: PLGA-3 hacimce dağılım (Volume).	92
Şekil 4.20	: siRNA-PLGA-3 sayıca dağılım (Number).	92
Şekil 4.21	: siRNA-PLGA-3 şiddetçe dağılım (Intensity).	93
Şekil 4.22	: siRNA-PLGA-3-hacimce dağılım (Volume).	93

Şekil 4.23 : Green Renilla ve Red Firefly floresan emisyon alanının taranması. siRNA-PLGA-1 NP ile HEK 293T hücre hattında GPR87 gen susturma sonucu.....	98
Şekil 4.24 : Green Renilla ve Red Firefly floresan emisyon alanının taranması. siRNA-PLGA-2 NP ile HEK 293T hücre hattında GPR 87 gen susturma sonucu.	99
Şekil 4.25 : Green Renilla ve Red Firefly floresan emisyon alanının taranması. siRNA-PLGA-3 NP ile HEK 293T hücre hattında GPR 87 gen susturma sonucu.	99
Şekil 4.26 : Green Renilla ve Red Firefly floresan emisyon alanının taranması. siRNA-PLGA-1,2 ve 3 NP ile HEK293T hücre hattında GPR87 gen susturma sonucu.	100
Şekil 4.27 : Pozitif ve negatif kontrol ile farklı siRNA-PLGA nano-formülasyonlarının GPR87 gen susturma aktivitesinin 490 nm ve 690 nm’de ölçüm sonuçları.	101
Şekil 4.28 : Green Renilla ve Red Firefly floresan emisyon alanının taranması. siRNA-PLGA NP ile 1.1B4 hücre hattında GPR 87 gen susturma sonucu.....	101
Şekil 4.29 : SRB yöntemiyle 1.1B4 hücrelerinin sitotoksosite sonucu.	103
Şekil 4.30 : siRNA-PLGA NP’lerinin salım sonucu.	104

POLİ LAKTİK-KO-GLİKOLİK ASİT NANOPARTİKÜLLERİ KULLANILAN HEDEFLİ HÜCRELERDE RNA İNTERFERANS İLE GEN SUSTURMA YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Pankreas kanseri hem dünyada hem de Türkiye'de mortalite insidans oranı en yüksek kanser türleri arasında sayılmaktadır. Bu veri var olan tedavi stratejilerinin yeterince etkili olmadığını göstermektedir. Modern yöntemlere rağmen henüz etkili bir ilaç tedavisi geliştirilememiştir.

Ayrıca tedavi amaçlı kullanılan kemoterapi ilaçlarının tümörü hedef alamaması ve sağlıklı dokular üzerinde etkili olması; tedavi amaçlı kullanılan radyoterapinin ise radyasyona maruz kalan sağlıklı dokuda fonksiyon kaybı oluşturması gibi bu yöntemlerin çeşitli dezavantajları vardır.

Kanser tedavisinde geleneksel tedavi yöntemlerinin yerini, tümöre özgü hedeflenmiş yeni nesil tedaviler almaktadır. Hedefe yönelik tedaviler sağlıklı hücrelere zarar vermediği ve yüksek seçiciliğe sahip oldukları için oldukça ilgi görmektedir.

RNA interferans (RNAi) tekniği, çekirdekte DNA tarafından kodlanan çift iplikli mi-RNA'nın tek sarmalının sitoplazmada komplementeri olan spesifik mRNA moleküllerini yıkıma uğratması sonucu, gen ekspresyonunun inhibe edildiği doğal, biyolojik bir süreçtir. Antisense etki gösteren moleküllerin hedef mRNA'ya bağlanması, genin ekspresyonu engellemektedir. RNAi mekanizmasında, antisense etki gösteren mikroRNA (miRNA), küçük engelleyici RNA (siRNA) gibi çeşitli moleküller kullanılmaktadır.

Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartiküller; biyobozunurluk, yüksek biyouyumluluk, düşük toksisite gibi özellikleriyle kanser teşhis ve tedavisinde kullanılmaktadır. PLGA nanopartiküllerin içerisine yüklenen siRNA ile mRNA düzeyinde etkili gen susturulması mümkündür.

GPR87 (G-protein bağımlı reseptör 87) geni, GPCR (G protein-bağımlı hücre yüzeyi reseptörleri) ailesine dahil hücre yüzey reseptörünü kodlayan genidir.

Pankreas kanserinde aşırı eksprese olan GPR87 geni hücrelerin canlılığını devam ettirmede önemli rol oynamaktadır.

GPR87 geni, siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri kullanılarak genin susturulması hücrelerin yaşam süresini önemli derecede etkilemektedir.

Bu çalışmada farklı hücrelerde GPR87 geni PLGA nanopartikülleriyle hedeflenerek, genin RNAi mekanizmasıyla post transkripsiyonel susturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla ilk olarak GPR87 geni HEK293T hücre hattından izole edilmiş, izole edilen gene özgü tasarlanan primerler ile genin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR ürünü ve psiCHECK™-2 vektörü XhoI ile kesilerek ligasyonu gerçekleştirilmiştir. GPR87-psiCHECK™-2 rekombinant vektörü *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon kontrolü PCR, agaroz jel elektroforezi ve biyoinformatik araçlarla kontrol edilmiştir. Daha sonra GPR87 gen dizisine özgü siRNA üretimi gerçekleştirilmiştir. siRNA üretimi ilk önce oligonükleotit template tasarımı gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan bu template T7 promotör primer ile hibridizasyonu sağlandıktan sonra Klenow DNA polimeraz ile polimerizasyonu gerçekleştirilerek dsRNA elde edilmiştir.

Tezin ikinci aşamasında PLGA nanopartiküllerinin sentezlenmesi, karakterizasyonu, optimum salım süresi ve toksisitesi tespit edilmiştir. Bu amaçla ilk önce water-oil-water (W1/O/W2) çift emülsiyon çözücü buharlaştırılması yöntemiyle PLGA nanopartikülleri hazırlanmıştır. Üç farklı formülasyonda nanopartiküller hazırlanmış ve bu nanopartiküllere siRNA yüklenmiştir. Elde edilen siRNA-PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonları gerçekleştirilmiş, enkapsülasyon veriminin (%EE) ve yükleme veriminin (LE) hesaplanmıştır. Ayrıca oluşturulan nanopartiküllerin *in vitro* salım süreci optimize edilmiş ve sitotoksitesi ölçülmüştür.

Son aşamada ise üretilen nanopartiküller insan embriyonik böbrek hücre hattı HEK293T ve pankreas hücre hattı 1.1B4 hücrelerinde gen susturma oranları lusiferaz aktivitesi ile tespit edilmiştir. Üç farklı protokol kullanarak hazırlanan siRNA-PLGA nanopartiküllerinin gen susturma oranlarının farklı olduğu, yüksek enkapsülasyon ve yükleme verimliliğine sahip olduğu, *in vitro* salım süresinin istenilen düzeyde olduğu ve ayrıca hazırlanan siRNA-PLGA nanopartiküllerinin genin post transkripsiyonel susturulmasını sağlayarak hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: siRNA, PLGA, RNAi, GPR87, pankreas kanseri

DEVELOPMENT OF GENE SILENCING METHOD WITH RNA INTERFERENCE IN TARGET CELLS USING POLY LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID NANOPARTICLES

SUMMARY

Pancreatic cancer is considered among the highest cancer incidence and mortality in the world and in Turkey. These data indicate that existing treatment strategies are not sufficiently effective. In spite of developed modern methods, pancreatic cancer, can be treated with surgical methods only.

In addition, chemotherapy drugs used for therapeutic purposes can not target the tumor and have a harmful effect on healthy tissues; these methods have several disadvantages, such as radiotherapy used for therapeutic purposes, resulting in loss of function in healthy tissue exposed to radiation.

Traditional treatment methods for cancer treatment are replaced by new generation therapies specific to the tumor. Targeted therapies are of great interest of scientific authorities as they do not harm healthy cells and have high selectivity to the tumor tissue. The RNA interference (RNAI) technique is a natural, biological process in which gene expression is inhibited as a result of the destruction of specific mRNA molecules that are complementary to the cytoplasm of the single strand of double stranded miRNA encoded by DNA in the nucleus. The binding of antisense-acting molecules to the target mRNA inhibits the expression of the gene. In the RNAi mechanism, a variety of molecules such as microRNA (miRNA) and small interfering RNA (siRNA) are used which exhibit an antisense effect.

Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles; used for diagnosis and treatment of cancer; shows superior properties such as characteristic biodegradability, high biocompatibility, low toxicity compared to other nano drug delivery systems. It is possible to silence the gene at the level of mRNA with the siRNA loaded into the PLGA nanoparticles.

The GPR87 (G protein-coupled receptor 87) gene is the gene encoding the cell surface receptor included in the GPCR (G protein-coupled receptors) family. The GPR87 gene, which is overexpressed in pancreatic cancer, plays an important role in maintaining the viability of cells.

Silencing of the gene using the GPR87 gene, siRNA-loaded PLGA nanoparticles, significantly affects the survival of the cells.

In this study, the GPR87 gene was targeted by PLGA nanoparticles in different cells, and the gene was aimed to be post transcribed by the RNAi mechanism.

For this purpose, the GPR87 gene was isolated from the HEK293T cell line, and the gene isolated polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed with the gene-specific primers.

The PCR product and the psiCHECK2 vector were ligated by XhoI. The GPR87-psiCHECK™-2 recombinant vector was transformed into *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R cells. Transformation control was controlled by PCR, agarose gel electrophoresis and bioinformatics. Then, the generation of siRNA specific to the GPR87 gene sequence was performed. The first generation of siRNA production was carried out by the oligonucleotide template design. After hybridization with this template T7 promoter primer was achieved, polymerization with Klenow DNA polymerase was performed to obtain dsRNA.

In the second stage of the thesis, the synthesis, characterization, optimum release time and toxicity of PLGA nanoparticles were determined. For this purpose, PLGA nanoparticles were first prepared by water-oil-water (W1 / O / W2) double emulsion solvent evaporation method. Using different techniques, nanoparticles were prepared in three different formulations and siRNA was loaded into these nanoparticles. Characterization of the obtained siRNA-PLGA nanoparticles were performed, and the efficiency of the Encapsulation efficiency (% EE) and loading efficiency (LE) were calculated. In addition, the in vitro release process of the generated nanoparticles was optimized and cytotoxicity was measured.

In the final stage, the gene silencing caused by nanoparticles at human embryonic kidney cell line HEK293T and pancreatic cell line 1.1B4 were determined by luciferase activity. The gene silencing results obtained from siRNA-PLGA nanoparticles produced using three different protocols were not equal. It was determined that the nanoparticles had high encapsulation and loading efficiency, the

in vitro release time was optimum, and the prepared siRNA-PLGA nanoparticles caused a complete post-transcriptional silencing of the gene which consequently caused %15 cell death.

Keywords: siRNA, PLGA, GPR87, pancreatic cancer



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, hücrede genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması sonucu oluşan kötü huylu tümörler olarak tanımlanmaktadır [1]. Dünya Sağlık Örgütünü (WHO)'nün yaptığı çalışmalar sonucu dünya genelinde görülen ölümlerin kalp rahatsızlıklarından sonra en büyük pay sahibinin kanser olduğu belirtilmektedir. Pankreas kanseri, mortalite insidans oranı en yüksek kanser türleri arasında sayılmaktadır. Bu veri var olan tedavi stratejilerinin yeterince etkili olmadığını göstermektedir. Modern yöntemlere rağmen henüz etkili bir ilaç tedavisi geliştirilemeyen pankreas kanserine ancak cerrahi yöntemler ile müdahale edilmektedir [2]. Ayrıca tedavi amaçlı kullanılan kemoterapötik ilaçların tümörü hedef alamaması ve sağlıklı dokular üzerinde sayısız yan etki göstermesi; tedavi amaçlı kullanılan radyoterapinin ise radyasyona maruz kalan sağlıklı dokuda fonksiyon kaybı gibi çeşitli problemlere neden olmaktadır. Bu nedenle geleneksel kanser tedavi yöntemleri yerini, tümöre özgü yeni nesil tedavi yöntemleri almaktadır. Hedefe yönelik tedaviler, sağlıklı hücrelere zarar vermedikleri ve yüksek seçiciliğe sahip oldukları için büyük ilgi çekmektedir [3]. RNA interferansı (RNAi) tekniği, gen ekspresyonunun sitoplazmada spesifik mRNA moleküllerinin parçalanarak inhibe edildiği doğal, biyolojik bir süreçtir. RNAi mekanizmasında, antisens etkisine sahip miRNA ve siRNA gibi çeşitli moleküller kullanılabilir. Antisens etkili moleküller hedef mRNA'ya bağlanarak, genlerin transkripsiyon sonrası fonksiyonlarının ve hedefteki istenmeyen genetik aktivitenin durdurulması yoluyla hastalıkların tedavisinde özgün bir yaklaşım sunmaktadır [4]. RNAi mekanizmasında güçlü ve etkili gen susturma özelliği nedeniyle ekzojen kaynaklı siRNA'lar kullanılmaktadır. siRNA temelli gen terapisi kanser gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmede umut verici yeni bir strateji olarak görülmektedir [5]. Bununla birlikte, siRNA'nın klinik uygulamasında hızlı degradasyon, spesifik olmayan dağılım, zayıf hücre alımı ve düşük endozomal kaçış etkinliği nedeniyle direkt olarak uygulanamamaktadır [6] ve taşıyıcı bir sisteme gereksinim duyulmaktadır.

Ayrıca ekzojen olarak sentezlenen siRNA'nın aktivitesi, makromoleküler yapısı, siRNA'nın negatif yükü ve hücre zarının negatif yüklü fosfolipid yapısı nedeniyle bir

itici kuvvet uygulayarak hücre zarından girişine engel olur [7, 8]. Oligonükleotitlerin nükleaz enzimler tarafından parçalanması, siRNA'nın hedeflenen hastalık bölgesine sistemik ulaşmasında ana engellerdendir [9].

Biyouyumlu ve biyopaçlanabilir nano ilaç taşıma sistemleri, DNA ve RNA gibi terapötik molekülleri, enzimatik reaksiyonlardan, bağışık sisteminden koruyarak sistemik kan dolaşımında istenilen boyutta, güvenle hedefe taşınmasını sağlar [10, 11]. siRNA'nın nükleaz enzimlerine duyarlılığı ve etkili susturma kabiliyeti nano-ilaç taşıma sisteminde, DNA'ya oranla siRNA taşınmasını daha cazip hale getirir [12]. siRNA taşınmasında yükünün ayarlanabilmesi, hızlandırılmış membran penetrasyon sağlaması [13] ve hücre içerisine girişe imkan vermesi, gibi özellikleri nedeniyle nanopartiküller kullanılmaktadır.

Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), laktik ve glikolik kopolimerinden oluşan sentetik bir polimerdir. Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylı, biyouyumlu, biyobozunur ve toksik olmaması nedeniyle çeşitli terapötik molekkülerin taşınmasında kullanılmaktadır [14, 15]. PLGA, endo-lizozomal kompartmandan sitoplazmik bölmeye kaçtığı ve fizyolojik ortamda hazırlanan nanopartikül uzun süre boyunca nükleik asit salınımını gerçekleştirdiğinden, hedef dokuda uzun süreli gen ifadesi sağlar [16].

Çeşitli nanopartiküller bulunmasına rağmen [17-20], büyük oranda siRNA taşınmasında PLGA nano-miselleri üzerinde yoğunlaşmaktadır [15, 21].

siRNA dışsal faktörlerin etkisiyle yıkımının kolay olması üretim sürecinin optimizasyonunun önemini ortaya koymaktadır. Literatürde bugüne kadar bildirilmiş olanlara rağmen, ultra sonikasyon, oda sıcaklığında uzun süreli reaksiyonlar, proses sırasında organik çözücülerin uygulanması ve hatta santrifüj gibi ajitasyon süreci [22, 23]. RNA'nın yapısına zarar vermektedir. Ayrıca nanopartikül üretim süreci sırasında kaybedilen RNA oranı, yayınlanmış araştırma verilerinde nadiren tartışılmıştır [24].

siRNA yüklü nanopartikül geliştirilirken, RNA yapısını bozmadan küresel şekilli, optimum salım süresi ve yüksek kapsüllasyon verimliliğine sahip (%EE), mono dispers parçacık üretimi oldukça zordur. Hidrofilik siRNA ve amfifilik PLGA'nın etkileşimi sayesinde, uzun salım süresine sahip monodispers parçacıkların üretimi gerçekleştirilebilir [22]. Bu amaca ulaşmak için poli-vinil alkol (PVA) veya poli-etilen imid (PEI) [24] gibi polimerler yüzey gerilimini azaltarak sulu ortamda

siRNA'nın kendiliğinden bileşen sistemle oluşan PLGA nano-misellerinin hidrofobik kısmına girmesini kolaylaştırır. Fakat PVA/PEI gibi toksisiteye neden olabilecek moleküllerin santrifüj ile atılması gerekir. Santrifüj işlemi PLGA içerisinde bulunan siRNA'nın nanopartikülden dışarı çıkmasına ve enkapsülasyon veriminin düşmesine neden olur.

Ayrıca su ile karışabilen çözücülerin nükleotidlere bağlanma ve etkileşimleri nükleotit omurgasının stabilitesini azalatabilir, bu nedenle araştırmacılar PLGA'yı çözmek ve nanopartikül hazırlanmada su-yağ-su yöntemini kullanmaya yönlendirir. Bu yöntemde organik çözücü içeren PLGA'nın ultrasonik probalar kullanarak su içeren RNA'da emülsifikasyonunu gerekir [24].

G protein-bağlı reseptörler (GPCR) 87, yeni tanımlanan bu gen 3q24 kromozomu üzerinde yer alır. G protein-bağlı reseptörler hücre zarını yedi kez geçen heliksli yapısı, hücre içine bakan bir C-ucuna ve hücre dışına bakan bir N ucu ile sahip olduğu açıklanmaktadır [25, 26]. Hücre yüzey GPCR'leri çeşitli kanser türlerinde aşırı eksprese olduğu ve tümör hücrelerinin hayatta kalmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir [25-27]. GPR87 geninin pankreas kanserinde dikkate değer ekspresyonun arttığı ve pankreas kanseri olan hastaların daha kısa genel sağkalımı ile ilişkili bulunmuştur. GPR87'nin aşırı ekspresyonu, pankreas kanserinde kemoterapötik bir ajan tarafından indüklenen proliferasyon, metastaz, anjiyogenez ve apoptoza direnç sağladığı belirtilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada GPR87'inin pankreas kanserinin ilerlemesinde hayati bir onkogenik rol oynadığı ve pankreas kanseri tedavisi için potansiyel bir hedef olacağı belirtilmektedir [26].

Bu çalışmada siRNA yüklü PLGA nanopartikülleri kullanılarak GPR87 genin post transkripsiyonel susturması amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk önce siRNA üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen siRNA literatür ile uyumlu olarak PLGA nanopartiküllerinin oluşumu sırasında ve yeni bir metod kullanılarak önceden üretilmiş PLGA nanopartiküllerine yüklenmiştir. Farklı yöntemlerle üretilen PLGA nanopartiküllerine siRNA yüklenmesi, GPR87 geninin en yüksek %EE değerine sahip, mono dispers PLGA nanopartikülleri kullanılarak susturulması ve optimize edilmiş salım süresi elde edilmeye çalışmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanser bir organ veya dokudaki hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması sonucu oluşan kötü huylu tümörler olarak tanımlanmaktadır [28]. Kansersiz hücrelerde genetik ve epigenetik değişiklikler kontrolsüz hücre bölünmesine yol açar [29]. Günümüzde buldukları organa ve köken aldıkları hücre türüne göre farklı isimlendirilen 100'den fazla kanser çeşidi tanımlanmış, tahmini kanser çeşidinin 200'den fazla olabileceği ileri sürülmüştür [30].

Oldukça karmaşık bir hastalık olan kanser, popülasyonlarda, bireylerde, genetik materyalde moleküler düzeydeki değişikliklere kadar birçok seviyede farklılıklar göstermektedir. Kanseri genomik araştırmaları, özellikle insan genom projesinin sonuçlandırılması ile kanserin çok çeşitli genomik değişiklikler sonucu ortaya çıktığı tezini güçlendirmiştir [31].

Normal vücut hücrelerinde hücre büyümesi ve çoğalmasını kontrol eden çeşitli mekanizmalar mevcuttur. Hücrede mutasyonlar, UV ışığı, kimyasallar, tütün ürünleri, virüs ve çevresel faktörlerin etkisiyle [32] hücre anormal büyümeye ve bölünmeye başlar. Bu hücreler vücudun farklı bölgelerine yayılır (invazyon) ve bu ikincil alanlarda çoğalarak tümör oluşturur (metastaz) [33].

İnsan vücudunda bulunan genler arasında bazıları kanser ile ilişkilidir. Kanseri türüne bağlı olarak bu genlerde mutasyon adı verilen değişiklikler meydana gelir. Protoonkogenler bu genlerden bazılarıdır. Protoonkogenler hücrede büyüme, çoğalma, farklılaşma, apoptoz gibi çeşitli işlevleri kontrol eden hücre sinyal iletiminde etkili proteinlerin sentezinden sorumlu olan genlerdir [34]. Protoonkogenler mutasyona uğradıklarında onkogene dönüşürler. Protoonkogenlerin mutasyona uğraması büyüme faktörlerinin aşırı üretimi, transkripsiyon faktörlerinin sentezinin artması [35], bu genlerden üretilen enzimlerin substrat yüzeyleri modifiye ederek bağlanma kapasitelerinin artmasına neden olur [36].

Onkogenlerin aksine tümör baskılayıcı genler hücre bölünmesi, DNA onarımı ve hücrelerin ne zaman öleceğinin bilgisini veren genlerdir. Bu genlerden p53 gibi

tümör baskılayıcı genler hücre ölümünü arttırarak veya büyümei baskılayarak tümör büyümesini engeller [37]. Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar hücre bölünmesinin kontrol edilememesine neden olur [38].

Diğer gen gruplarına ek olarak genom kararlılık genleri; DNA onarımında rol oynayan, kromozom bütünlüğünü koruyan ve düzenleyen genlerdir. Ayrıca bu genler tümör baskılayıcı ve protoonkogenlerin mutasyon hızını arttırır [39]. Bu genlerde çevresel etkenler, DNA replikasyonu sırasında yanlış nükleotid eklenmesi gibi çeşitli faktörlerin etkisiyle DNA hasarı meydana gelebilir. Ayrıca bu genlerde oluşan mutasyonlar hataların düzeltilmesini engelleyerek mutasyonların artarak yayılmasına neden olur. Bu hücrelerde kanser görülme potansiyelini arttırır. Örneğin XP (Xeroderma pigmentosum)'da DNA onarımında sorumlu genlerde meydana gelen mutasyon sonucu derinin UV ışığına duyarlılığı ve cilt kanserinin oluşma olasılığı artar [40].

2.1.1 Pankreas kanseri

Pankreas kanseri hem dünyada hem de Türkiye'de mortalite insidans oranı en yüksek kanser türüdür [41]. Pankreas kanseri agresif seyirli, ölümcül, ileri yaşlarda görülme sıklığı daha da artan malign kanser türüdür [42]. Mevcut tedavi protokolleriyle tanı koyulduktan sonra ki yaşam süresi ortalama 6 aydır. Modern yöntemlere rağmen henüz etkili bir ilaç tedavisi geliştirilemeyen pankreas kanserine ancak cerrahi yöntemler ile müdahale edilmekte ve etkin bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Pankreatik kanserin en ölümcül tedavi yöntemleri arasında olmasının nedenleri; agresif tümör gelişimiyle kemoterapi ve radyoterapiye direnç gelişmesi, erken evrede metastaz yapabilme özelliğidir [43]. Pankreatik kanser türleri arasında en sık rastlanan duktal adenokarsinomadır [44]. Bu nedenle pankreatik kanser denilince pankreatik duktal adenokarsinom anlaşılmaktadır.

Pankreas kanserinin daha iyi erken tanı ve tedavisinin yapılabilmesi için moleküler patogenezinin detaylı olarak açıklanması gerekmektedir. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi pankreatik kanserde de çeşitli kromozomal değişiklikler, nokta mutasyonları gibi çok çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler tespit edilmiştir. Tespit edilen bu değişiklikler hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına yol açarak malign tümörlere neden olmaktadır [45].

Pankreas kanseri gelişiminde, tümör süpresör gen ve onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar, kromozomlarda görülen anormaliler, mikrosatellit kararsızlığı, epigenetik değişiklikler gibi moleküler düzeyde meydana gelen değişiklikler etkilidir [46].

Kromozomal anormaliler içerisinde en sık 1, 4, 6, 9, 12, 17, 18, 21, Y kromozomlarda gözlenmektedir. Nadir olarak diğer kromozomlarda çeşitli kayıplar meydana gelmektedir [47].

Gen düzeyinde değişiklikler; tümör süpresör genler ve onkogenlerde oluşabilir. Pankreatik kanserde mutasyonu belirlenen önemli genlerden bazıları CDKN2A/p16/MTS1 (%95), TP53 (%50-75), MADH/SMAD4/DPC4 (%55), FHIT (%70) 'dır [48].

Dukal adenokarsinomlarda yapılan çalışmalar sonucu birçok onkogende ekspresyon düzeyinde değişiklik gözlenmiştir. En yaygın değişiklik tespit edilen onkogenlerden bazıları; KRAS, CDKN2A (p16), TP53 ve SMAD4, RAS grubudur [47].

Pankreatik kanser türlerinde büyüme hormonları ve onların reseptörlerinin de içerisinde bulunduğu bazı genlerin ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmektedir. Bunlardan bazıları HER2/Neu/ERBB genidir. Normal dokuda ekspresyonu gözlenmezken, pankreatik endokrin ve ekzokrin bezlerde eksprese olduğu ve tümör dokusu boyunca ekspresyonunu devam ettirdiği gösterilmiştir. Bunun gibi çeşitli ekspresyon başlamakta veya genin ekspresyon seviyesinde artış gözlenmektedir. Bunlardan bazıları; Epidermal Growth Factor (EGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Insulinlike Growth Factor (IGF-1), IGF-1 reseptör, Nerve Growth Factor (NGF) ve Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) genlerinin ekspresyonlarında meydana gelen artışın artan tümörijenite ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir [47, 49].

2.1.1.1 GPR87 geni

GPR95 olarak da bilinen insan GPR87'si 2001'de bir Ekspres Dizisi Etiketli veritabanı kullanılarak yeni GPR kodlayan genlerin araştırılmasında Wittenberger ve ark. tarafından keşfedilmiştir [25, 50].

G protein-bağlı reseptörler (GPCR), insan genomu tarafından kodlanan tüm genlerin % 2'sinden fazlasını oluşturur. Endokrin ve ekzokrin bezlerden salınan hormon ve enzim, nörotransmisyon, çeşitli immün yanıt tepkileri, kalp ve düz kas kasılmaları, kan basıncının düzenlenmesi gibi çok çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli bir rol oynayan geniş ve gelişmekte olan bir integral membran protein ailesi oluştururlar [51]. G protein-bağlantılı hücre yüzeyi reseptörleri (GPCR); fotonlar, aminler,

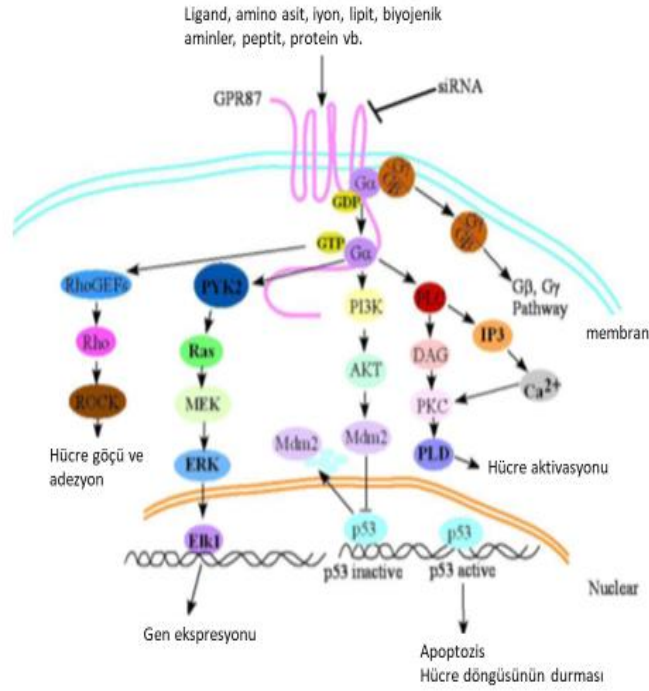
lipitler, peptitler ve proteazlar gibi hücre yüzeyinden gelen çeşitli sinyalleri hücre içine iletiminde rol oynayarak çok çeşitli yanıtlar oluştururlar. Yedi transmembran ailesine ait olan heterotrimerik G proteinleri; α , β , ve γ sübstütientlerinden oluşan proteinlerdir [52, 53]. Bu altbirimler intarasellüler sinyal yollarında adenilil siklazlar, küçük GTPazlar, fosfolipazlar ve kinazlar gibi çeşitli efektörlerin aktivasyonu ile hücrelerin sağkalım, proliferasyon, farklılaşma ve diğer çeşitli fonksiyonların gerçekleşmesini sağlayan genlerin ekspresyonunu düzenler [54, 55].

Tanımlanmış 400'den fazla GPCR vardır. Bunlardan doğal ligandları ve fizyolojik fonksiyonlarının tanımlanmaya devam ettiği 150 yeni orphan olarak adlandırılan GPCR'ler üzerinde araştırmalar devam etmektedir [56].

Orphan G-protein bağımlı reseptör 87 (GPR87); plasenta, baş ve boyun hariç, insan dokularında düşük seviyelerde ifade edilir. GPR87 akciğer, serviks, cilt, idrar kesesi, testis, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlarında (SCC) gibi bazı kanser türlerinde regülasyonun arttığı bildirilmiştir [27, 57, 58].

Bununla birlikte, GPR87'nin insan kanser hücrelerinin canlılığına katkıda bulunduğu [27] ve genotoksik strese cevap olarak p53'e bağlı hücre yaşamı için gereklidir [59].

Pankreatik kanserde de GPR87 geninin ekspresyonunun anlamlı düzeyde arttığı ve hastaların daha kısa sağkalım süresi ile korelasyonu bulunmuştur. GPR87'nin aşırı ekspresyonu proliferasyon, metastaz, anjiyogenezde etkilidir ve kemoterapötik bir ajan tarafından indüklenen apoptoza direnç sağlar [26]. Ayrıca GPR87 geninin aşırı ekspresyonu PDAC (Pankreatik duktal adenokarsinom) hastalarında sağ kalım süresini olumsuz etkilemektedir [50, 60].



Şekil 2.1: GPR87 geninin görevli olduğu sinyal yolağı [50].

2.1.2 Kanser tedavi yöntemleri

Günümüzde mevcut standart kanser tedavileri arasında cerrahi yöntemler, radyoterapi ve kemoterapötik ilaçlar [61] veya bu yöntemlerle kombine tedavi uygulanmaktadır. Ancak bu yöntemlerin çeşitli kısıtlamaları vardır. Gelişen teknoloji ile hipertermi [62], immünoterapi [63], gen tedavisi [64], hormonal terapi [65] gibi çeşitli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

2.1.2.1 Cerrahi yaklaşımlar

Günümüzde önemli tedavi yaklaşımlarından olan cerrahi, solid(katı) tümörlerde vücudun bir bölümünde lokal veya genel anestezi uygulanarak kanserli bölgenin alınmasıdır. Cerrahi biyopsiyle kanser teşhis veya tedavisinde bir seçenektir. Erken tanı kanserin bulunup tedavi edilmesinde önemlidir. Kanserli hücreler vücudun başka bölümlerine yayıldığında cerrahi yöntem etkili ve genel bir tedavi yöntemi olarak kabul edilmez. Çoğunlukla kanserin tamamıyla temizlenmesinde ve yok edilmesinde etkili olmamaktadır [66]. Ayrıca bu yöntemin kendine has farklı yan etkileri bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; cerrahi uygulama sırasında anestezi nedeniyle ölüm riski, cerrahi sonrası bakımın uzun sürmesi, kanserli hücrelerin başka dokulara yayılması ve sonucunda tümörün tamamıyla yok olmaması [67].

Gelişen medikal teknoloji ile ultrason, bilgisayarlı tomografi (BT), magnetik rezonans görüntüleme (MRI), pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi yöntemlerle tümörleri kesmede ve yok etmede daha az yan etkili yöntemler üzerinde çalışılıyor [68].

2.1.2.2 Kemoterapi

Kemoterapi kanser hastalarında ilaçla tedavi demektir. Hastalara uygulanan özel tedavi protokolleri ile vücutta istemeyen hücrelerin bir veya birkaç ilaç kullanarak öldürülmesi hedeflenmektedir [69]. Kemoterapötik ilaçlar genellikle kan dolaşımında düşük moleküler ağırlığa sahip ve kısa yarı ömüre sahiptirler. Bu küçük ilaç molekülleri hızlı bir şekilde tüm vücuda eşit olarak yayılır ve sağlıklı hücrelerde sistematik toksisiteye sebep olur [70].

Ayrıca kullanılan ilaçlar; anemi ve hematolojik sorunlar, anemi ve hematolojik sorunlar, lezzet alterasyonu, kilo/anoreksi kaybı, saç dökülmesi, ağrı, bulantı, kusma, hafıza problemleri, yorgunluk, deri yan etkileri, bağışıklık sistemi sorunları, viral enfeksiyonlar, kanama problemleri gibi kişilerde farklı yan etkiler görülebilir [71].

Bu nedenle çeşitli çalışmalarda, anti-tümör ilaçların hücreye özgü alımını arttırma ve kontrollü salım gerçekleştirme yeteneği olan hedefli ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesi üzerinde odaklanmıştır [72].

2.1.2.3 Radyoterapi

Radyoterapi, parçacık demetleri ve dalgalar yolu ile taşınan enerjinin özel araçlarla yüksek dozda kanser hücrelerinin öldürülmesi ve bölünerek çoğalmasını engellemek amacıyla kullanılır. Ayrıca cerrahi müdahale sonrası bölgede kalmış kanserli hücrelerin yok edilmesi amacıyla da uygulanabilmektedir. Kanser hastalarında çoğunlukla ameliyat, kemoterapi ile birlikte kombine tedavi yöntemi olarak da kullanılmaktadır [73]. Yan etkiler genellikle tedavi dozu ve tedavi edilen bölgeye göre farklılık göstermektedir. Bunlar bağırsak rahatsızlıkları, epitaliyal yüzeyin zarar görmesi, kusma, saç dökülmesi, bulantı, üreme ve solunum sistemi rahatsızlıkları, sekonder kanser, kalp hastalıkları, bilişsel gerileme, tükürük ve gözyaşı kuruması gibi çeşitli yan etkilere sebep olmaktadır [74].

2.1.2.4 İmmünoterapi

İmmünoterapi, hastanın kendi bağışıklık sistemine ait belli bölümleri kullanarak çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılması amaçlanmaktadır [75]. Kanser

tedavisinde amaç kanser hücrelerinin hedef alınarak yok edilmesidir. Monoklonal antikolar, immün sistem kontrol inhibitörleri, sitokinler, interlökinler, interferonlar [68], kanser ilaçları gibi çeşitli yollar kullanılarak kanser tedavisine spesifik, sağlıklı hücelere zarar vermeden immün yanıt oluşturması amaçlanmaktadır. İmmünoterapide kullanılan yöntemler kanser türüne göre tek başına veya diğer tedavi yöntemleri ile beraber kullanılmaktadır [76].

2.1.2.5 Hipertermi

Hipertermi vücudun sağlıklı bölgesinde bulunan hücelere fizyolojik sıcaklıkların üzerinde, daha yüksek sıcaklık uygulayarak zarar vermek ve onları öldürmek amacıyla veya diğer tedavilere duyarlı hale getirmek için uygulanan tedavi yaklaşımıdır [77].

İnsan vücudu sıcaklığını 37°C korur ve homeostatik dengenin devamı sağlamak için sıcaklığını belli değerler arasında korunması gerekir [78]. Sıcaklık belli değerler üzerine çıktığında dokuların sıcaklık homeostazı, dokuların metabolizması tarafından üretilen ısıyı onu çevreleyen doku aracılığıyla cilt yüzeyine veya kan akışıyla düzenler [79]. Tümör dokusunda bulunan vasküler ağda hem normal doku hem de tümör dokusundan büyüyenler bulunur. Bu karmaşık vasküler oluşum tümör dokusunda kan akışının değişmesine [80] ve homeostaz yeteneğinin düşmesine neden olur.

Sıcaklığın 41°C ve üzerine çıkması yani hipertermi durumunda hücre zarının parçalanması, proteinlerin denatürasyonu ve hücre ölümü görülür [81]. Bu tedavi yönteminde tümör bölgesinin sıcaklığı 41-43°C arasında uzun süre tutularak kanser hücrelerinin ölümü hedeflenmektedir [82]. Hipertermide görünebilir ışık, lazer ışını [83], radyo dalgaları, ses dalgaları, mikrodalgalar [84] kullanılabilir.

2.1.2.6 Gen tedavisi

Terapötik etkiye sahip nükleik asitlerin çeşitli vektörler aracılığıyla hücreye aktarımını ifade etmektedir [85]. Gen tedavisi hastalığa neden olan genin değiştirilmesi, onarılması ve hastalık ortamında bulunun hücrelerin desteklenmesi amacıyla hem genetik hem de enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde kullanımı amaçlanan alternatif bir tedavi şeklidir [86]. Spesifik dokuya veya hücreye minimum toksisite ile hedeflenerek aktarılan nükleik asit, bir genin işlevini engelleyebilir, gene

yeni bir fonksiyon kazandırabilir veya eski haline getirip iyileşmesini sağlayabilir [87].

Gen tedavisi uygulanacak hücre türüne göre eşey (germ) ve somatik gen tedavisi olmak üzere iki farklı tedavi yaklaşımı vardır.

Eşey hücre gen tedavisi; hayvan ve bitki çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edilmiş, eşey hücrelerinde yani yumurta ve sperm gibi kalıtsal özellikleri aktaran hücrelerin çekirdeğine fonksiyonel nükleik asit eklenmesiyle gerçekleştirilir [88]. Eşey hücrelerinde yapılan değişik sonraki nesilleri etkilemesi, genom düzeyinde ortaya çıkan değişikliklere neden olması ve bu değişikliklerin geri dönüşümsüz olması, gelecek nesillerdeki riskler hakkında yeterince bilgi sahibi olmadığından birçok ülkede etik ve teknik nedenlerle uygulamada sıkıntılar olabilir [89].

Somatik hücre gen tedavisi; somatik hücre gen tedavisinde terapötik özelliğe sahip genler somatik hücrelere transfer edilir [90]. Gen tedavisi uygulanan hücreler kemik iliği, kan ve deri gibi hücreler olduğundan etkileri vücut düzeyinde sınırlı kalır. Somatik hücrelere uygulanan gen tedavisi vücut düzeyinde kalır ve gelecek kuşaklara aktarılmaz [91].

Günümüzde gen tedavisi *ex vivo* ve *in vivo* gen tedavisi olarak uygulanmaktadır. Yöntemlerden hangisinin tercih edileceği hedef hücrenin yapısına, terapötik gene ve salın sisteminin özelliklerine bağlıdır [92].

In vivo gen tedavisi, genetik materyalin doğrudan hastanın hedefli hücrelerine verilmesi esasına dayanır [93]. Bu yöntemde geni alan hücrelerin seçilmesi ve çoğaltılması mümkün olmadığından gen aktarım başarısı vektöre ve gen ekspresyonunun başarısına bağlıdır [94].

Ex vivo gen tedavisi, hastandan alınan hedef hücrelere terapötik gen transfer işlemi kültür ortamında gerçekleştirilerek tedavi edilmiş hücreler tekrar hastaya geri verilir [95]. Hedef hücreye transfer edilen genin kalıcı olarak ifade edilmesi kalıcı bir entegrasyona bağlıdır. Entegrasyon kalıcı olmadığı durumda transfer edilen gen ürünü parçalanır veya hücreden atılır [96].

2.2 Gen Susturma Stratejileri

Gen susturma stratejileri genlerin kendisini veya onların kodladığı mRNA'ları hedef olarak yanlış veya fazla çalışan genlerin ekspresyonlarının engellenmesi, sağlıklı gen

ekspresyonunu sağlamayı amaçlamaktadır. Hedef genetik materyali veya genin ürünü mRNA hedeflenerek gen susturulabilir [97].

Gen susturma stratejilerinden Transkripsiyonel gen susturma (TGS) ve Post transkripsiyonel (transkripsiyon sonrası) gen susturma (PTGS) olmak üzere iki farklı şekilde uygulanabilir [97].

Transkripsiyonel gen susturma mekanizması (TGS), hedeflenen genin ekspresyonu, protein sentezinin transkripsiyonu aşamasında baskılanır. TGS DNA metilasyonu, kromatin modifikasyonundan kaynaklanabilir [98].

Post-transkripsiyonel gen susturma mekanizmasında (PTGS), genden transkribe olan mRNA molekülünün komplementeri ile yıkıma uğraması veya translasyon basamağına geçememesine dayanır. Böylece mRNA üzerinden genin ifadesi engellenmiş olur [99].

2.2.1 Antisens teknolojisi

Antisens stratejileri, hedef proteini kodlayan mRNA'ya spesifik DNA veya RNA oligonükleotitlerinin hücreye aktarılarak gen ekspresyonunun engellenmesidir [100].

1970 yılında Zamecnik ve Stephenson tarafından ilk kez kullanılmıştır. Araştırmacılar Rous Sarcoma virüsün (RSV) 35S RNA' sının integrasyon genine 5' ve 3' uçlu nükleotid sekansını kullanarak viral integrasyonun önlendiğini tespit etmişlerdir. 21 nükleotidlik tekrarlayıcı sekanslar kullanılarak viral sekansın bir kısmına komplementer d(AATGCTAAAATGG)13 mer'lik oligonükleotid ile fibroblast hücre kültüründe viral üretiminin engellenebildiğini göstermişlerdir [101].

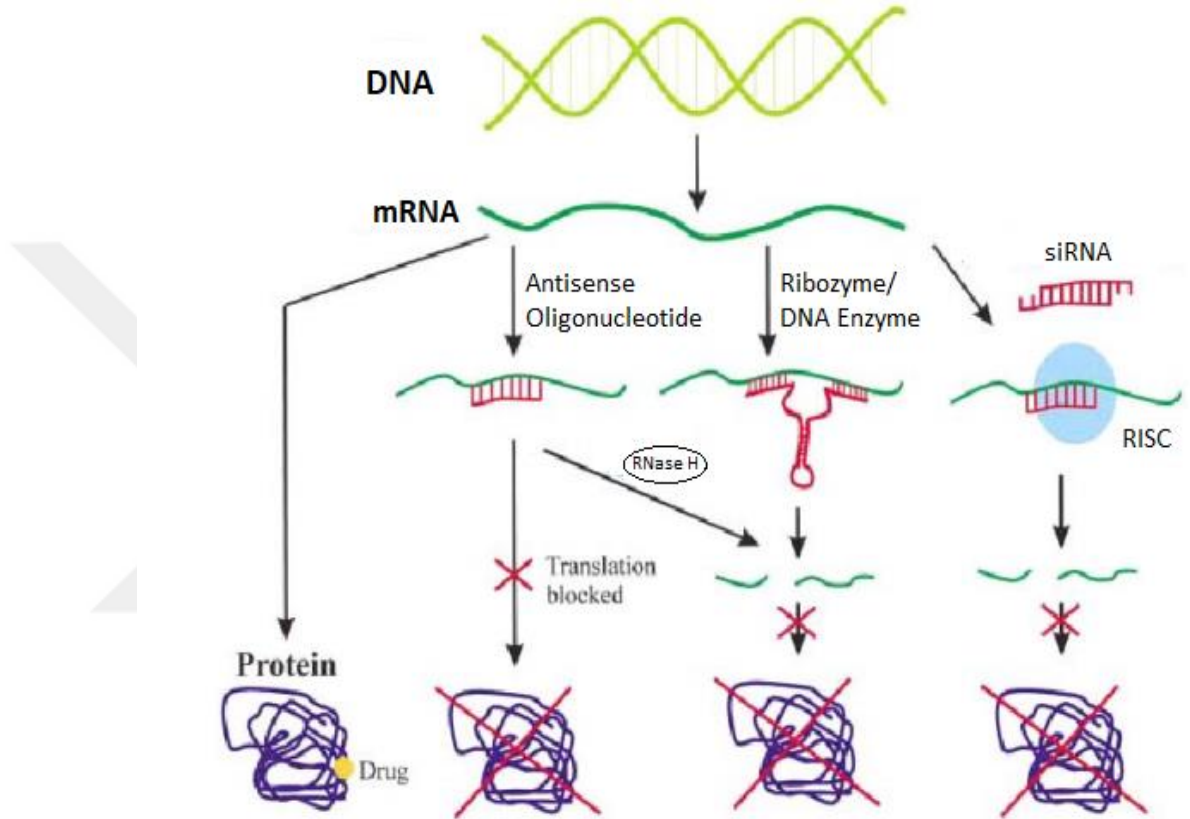
Kullanılan ilaçların çoğu proteine bağlanarak onların fonksiyonları üzerinde değişikliğe neden olurken, antisens oligonükleotitler hedef mRNA'ya bağlanarak translasyonunu engelleyebilir. RNAz H gibi endojenik nükleazlar ya da ribozimlerde hedef mRNA'nın parçalanarak genin ekspresyonunu engelleyebilir [102].

mRNA seviyesinde gen sessizleştirilmesi ile geliştirilen yöntemler genel olarak 3 başlık altında incelenebilir:

- mRNA'ya bağlanarak herhangi bir enzim aracılığı ile mRNA degradasyonuna sebep olmadan translasyonu durduran antisens

oligonükleotitler veya RNAz H enzimiyle mRNA yıkımını endogenik olarak tetikleyen oligonükleotitler.

- Hedef mRNA degradasyonunu gerçekleştiren Ribozimler ve DNA enzimleri.
- Hedef mRNA'yı RISC enzimi aracılığıyla degrades eden siRNA (Küçük İnterfere Edici RNA)'lardır [103].



Şekil 2.2: Farklı antisens stratejilerinin karşılaştırması.

Antisens oligonükleotitler mRNA dizisine Watsons-Crick baz (selektif hibridizasyon) eşleşmesi sistemiyle nükleus ve protein üretim bölgeleri arasındaki genetik bilginin üretimini çeşitli mekanizmalar aracılığı ile baskılamaktadır [104]. Son yıllarda antisens oligonükleotid çalışmalarında son derecede etkili bir yöntem olan RNA interferansın (RNAi) keşfedilmesiyle genetik ve infeksiyöz hastalıkların tedavisinde veya hücreye yeni bir fonksiyon kazandırılmasında terapötik olarak kullanılmaktadır [105]. Ökaryotlarda çift zincirli RNA (dsRNA) veya miRNA (micro

RNA) ile post-transkripsiyonel gen susturulmasına RNA interferansı (RNAi) denir [106].

2.2.1.1 RNA interferans teknolojisi (RNAi)

RNA interferans (RNAi), canlılarda hedef mRNA'nın parçalanarak post transkripsiyonel gen susturma mekanizmasıdır [107].

Post transkripsiyonel gen susturma ilk olarak 1990 yılında petunya çiçeğinde tanımlanmıştır. Jorgensen ve arkadaşları, genetik transformasyon çalışmaları ile pigmentasyonu katalizleyen chalcone syntase (chs) ekspresyonundan sorumlu genin aktivitesini düzenlemek amacıyla koyu mor petunya çiçeği elde etmeyi amaçlamışlardır. Ancak petunya bitkisinde promotor kontrolü altında olan mor pigment üreten genin aktarılmasıyla beklenmeyen renksiz veya normalden daha açık renkli petunya çiçekleri ortaya çıkmıştır.



Şekil 2.3: Petunya bitkisinde chs geninin ekspresyonunun baskılanması.

Yapılan araştırmalarda, transkripsiyonun gerçekleştiği ancak translasyon aşamasında proteine dönüşmeden hızla parçalandığı tespit edilmiştir. Bunun sebebinin chalcone syntase (chs) geni içindeki dsRNA bölgesinin dejenerasyonunun sebep olduğu belirtilmiştir. Bu olgunun “transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizması” ilgili olabileceği açıklanmıştır [99].

1995 yılında Guo ve Kempheus, *Caenorhabditis elegans* ile yaptıkları çalışmada non-coding RNA'ların transkripsiyon sonra gen susturmada etkili olduğunu ortaya koymuşlardır [108]. 1998'de Prof. Andrew Fire ve Craig Mello *Caenorhabditis elegans* ile yaptıkları çalışmada çift iplik RNA'nın (dsRNA) gen ekspresyonunu engellemede etkili olduğunu göstererek RNA interferansı keşfetmişlerdir [109]. Tablo 2-1' de RNA interferans (RNAi) konusunda yapılan çalışmaların tarihsel gelişimi gösterilmiştir [109].

Tablo 2.1: RNAinterferans (RNAi) teknolojisi ile çeşitli yapılan çalışmaların kronolojik gelişimi.

Yıl	Araştırmacılar	Yöntem ve Sonuç
1995	Guo ve Kempheus	C. elegans'da gen ifadesini baskılama da sense RNA'nın da antisense RNA kadar etkili olduğunu gözlemlendi.
1998	Fire ve arkadaşları	C.elegans'da çift iplikçikli RNA (dsRNA)'nın bazı spesifik genlerin susturulmasını sağladığını gözlemeledi. (RNA interferans)
2000	Zemore ve arkadaşları	Drosophila'da uzun dsRNA'nın RNase III (Dicer) enzimi tarafından 21-23 nükleotidlik küçük parçalara kesildiği gözlemlendi.
2001	Tuschi ve arkadaşları	Memeli hücrelerinde RNA interferans (RNAi) tanımlandı. shRNA'ların memeli hücrelerinde bazı gen dizilerine spesifik inaktivasyonu sağlandığını gözlemlendi.
2003	Paddison ve arkadaşları	siRNA'ları tedavi amaçlı memelilerde kullanılabileceği açıklandı.
2003	Song ve arkadaşları	İnsanda genlerin transkripsiyon seviyesinde siRNA kullanılarak de novo DNA metilasyonu ile susturabileceği açıklandı.
2004	Kawasaki ve arkadaşları	AMD (sarı nokta hastalığı) hastalığı için siRNA temelli ilacın birinci faz klinik denemelerde kullanılmaya başlandığı açıklandı.
2004	Acuity Pharmaceuticals	

RNAi mekanizması canlılarda doğal olarak var olan bir işlem olup, virüs kalıtım materyali ve transpozon gibi hareketli genetik materyallerin istilasına karşı genomu koruyan hücrel savunma mekanizması olarak rol oynamaktadır. Ayrıca ökaryot canlılarda gelişimsel fonksiyonlar için önemli olan post transkripsiyonel gen susturma ile gen regülasyonunda rol oynamaktadır [110]. RNAi doğal süreçlerde meydana geldiğinden bu tekniğin etikisi ve spesifitesi diğer antisens oligonükleotid, ribozim gibi diğer nükleik aside dayalı post transkripsiyonel gen susturma tekniklerinden farklıdır [111]. Böylece RNA interferans tekniği diğer pek çok klasik antisense teknolojilere oranla önemli potansiyel alternatif bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır [97].

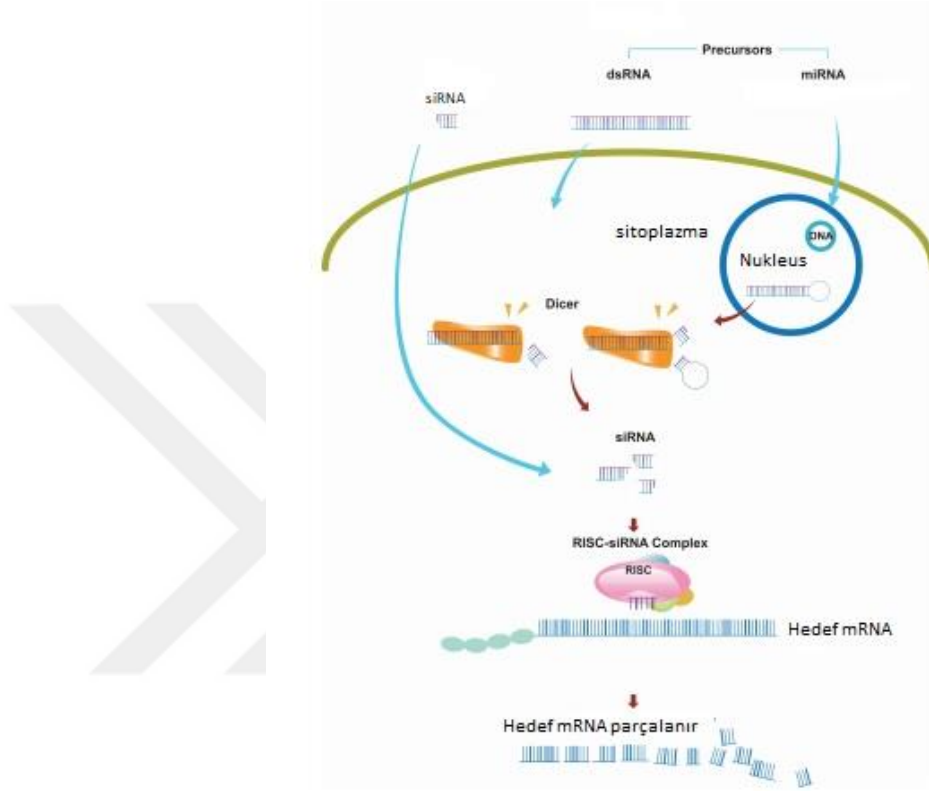
Memeli hücrelerine gönderilen siRNA'lar komplementer mRNA'ya bağlanarak RNA interferans mekanizmasını harekete geçirdiği ve RNA'nın degradasyonuna yol açtığı saptanmıştır [109]. Bu elde edilen veri temel metabolik olaylarda rol oynayan genlerin düzenlenmesinde kullanılacak yeni bir mekanizma olarak ortaya çıkmıştır, ayrıca çeşitli biyomedikal araştırmalarda siRNA kullanımına olan ilgiyi arttırmıştır. Yüksek derecede spesifik özelliğe sahip RNAi ile hedef geninin susturularak kanser, viral hastalıklar, çeşitli genetik hastalıkların tedavisi ve gen fonksiyonlarının düzenlenmesini mümkün kılmaktadır [112].

RNAi mekanizmasında siRNA'ların düşük konsantrasyon seviyesinde etkin gen susturma özelliğine sahip olması, hedef gen bölgesine kolay bağlanabilmeleri ayrıca yüksek özgüllük göstermeleri sebebiyle bir metod haline gelmiştir. Kullanılan siRNA ile nükleusta veya sitoplazmada gen susturmak mümkündür. Nükleusta transkripsiyonun engellemesi ile sitoplazmada ise mRNA degradasyonu ile translasyon engelleyerek gen susturulmaktadır. Doğal bir hücrel mekanizma olan bu yöntem ile hedef mRNA'ya dizi homoloji gösteren dsRNA tanınması ve RNAi yolağının aktive olması ile başlar [113].

2.2.1.2 RNAi mekanizması

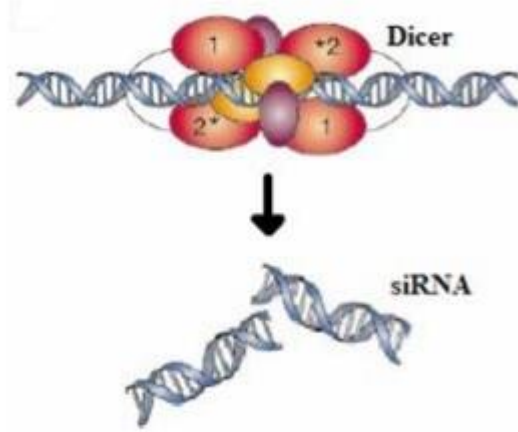
RNA interferans mekanizması 1998'de Andrew Fire ve Craig Mell tarafından ilk kez *Caenorhabditis elegans* nematodunda çift sarmallı RNA'nın homoloji gösterdiği mRNA'ları degradasyona yönlendirdiğini gösterilmeleri üzerine 2006 yılında Fizioloji ve Tıp dalında Nobel Ödülüne layık görüldüler [114].

RNAi, uzun çift iplikli (dsRNA)'ların ribonükleazlar tarafından 21-23 nükleotidlik RNA fragmentlerine parçalanması ve multinükleaz RISC (RNA- Induced Silencing Complex) kompleksine katılan siRNA rehberliğinde komplementer mRNA degradesyonunun gerçekleştiği bir mekanizmadır [115].



Şekil 2.4: RNA interferans(RNAi) mekanizması [116].

RNA interferans mekanizması, ilk olarak sitoplazmada uzun dsRNA bir RNase III enzimi familyası (Dicer) tarafından dinükleotid çıkıntısı bulunan 3' hidroksil ve 5' fosfat uçlarına sahip ~22 nükleotidlik siRNA'lara parçalanmasıyla başlar [106].



Şekil 2.5: RNA interferans(RNAi) mekanizmasının başlangıç adımı [117].

siRNA RISC kompleksi komponentlerine bağlanır [115]. RNA- multiprotein nükleaz kompleksinin (RISC) içerisinde bulunan argonaute proteini siRNA'nın rehber zinciri sayesinde hedef mRNA'yı bulurken, diğer yolcu zinciri substratı olarak parçalar [118, 119]. Yolcu zincirin parçalanmasıyla tamamen aktif hala gelen RISC kompleksi, rehber zincir eşliğinde hedef mRNA'yı bulur [118]. RISC kompleksi içerisinde bulunan argonaute proteini aracılığıyla mRNA'da bulunan fosfodiester bağlarını endonükleaz aktivitesiyle kesmektedir [118, 120].

2.2.1.3 RNAi temelli gen baskılama bileşenleri

RNA interferans bitki, solucan, maya ve insanlar arasında yüksek derecede korunmuş, doğal olarak meydana gelen biyolojik bir süreçtir. RNAi gen susturma mekanizmasında bazı bileşenler başlatıcı (initiator), bazıları etki edici (effector), bazıları çoğaltıcı (amplifier) veya bazıları iletici (transmitter) olarak görev almaktadır [115].

Dicer Enzimi

RNAse III ribonükleaz ailesine ait olan enzimler RNAi ilk basamağını başlatır. İlk olarak Bernstein ve arkadaşları tarafından *Drosophila*'dan izole edilmiş ve RNAi mekanizmasında 21-23 nükleotid uzunluğunda fragmentler oluşturduğunu göstermişlerdir [121]. Dicer enzimi dört farklı domaine sahiptir. Bunlar; bir tane N-terminal helikaz domaini, bir tane PAZ domaini (Piwi, Argo ve Zwillie/Pinhead proteinlerinden oluşan domain), iki tane Rnase III bölgesi ve bir tane C-terminalinde bulunan dsRNA'ların bağlanma (dsRBD) domainidir [122]. Dicer enziminin kesim

işlemi arka arkaya sıralı iki katalitik RNAase III bölgesi tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir [123]. Dicer enziminde yer alan helikaz domaini ise siRNA'nın açılması ve tek zincirinin RISC kompleksine aktarılmasında rol oynar. PAZ domaini ise nükleik asitin (dsRNA) enzime bağlanmasında rol oynamaktadır [124].



Şekil 2.6: Dicer enziminin domain yapısı [121].

Dicer enzimi RNAi ilk basamağında siRNA'nın elde edilmesinin yanı sıra sonraki basamak olan RISC kompleksine yüklenmesinde de rol oynamaktadır [125].

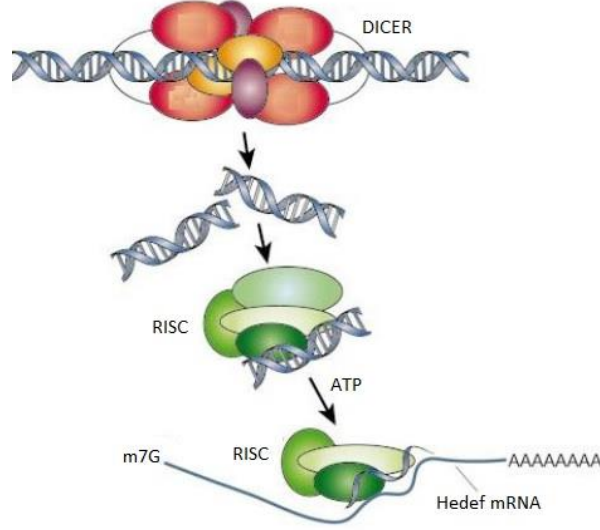
Dicer enzimi mantar, bitki ve memelilerde evrimsel olarak korunmuştur [115]. Ancak canlılar arasında farklılık gösterebilir. *Drosophila*'da gibi daha basit yapıları ökaryotik canlılarda kesim aktivitesi için ATP kullanılırken, memelilerde ATP kullanımına gereksinim duymamaktadır [115, 124].

Endonükleaz aktivitesi sırasında ATP gereksinimi dicer enzime özgüdür. ATP siRNA'ların serbest kalabilmesi için kullanılmaktadır [126].

RISC (RNA- Induced Silencing Complex)

RISC (RNA indükleyici baskılama kompleksi), nükleaz aktiviteli RNA-multiprotein kompleksidir (500 kDa). Yapısında ekzonükleaz ve helikaz enzimleri içerir [127]. Bu kompleksin önemli protein bileşenlerinden biri argonaute ailesi üyesi olarak tanımlanmıştır. Argonaute proteininde iki korunmuş domain yapısı içermektedir: PAZ domaini ve bu proteini özgü PIWI domainidir [115].

Dicer aktivitesiyle oluşan siRNA, RISC ile etkileştiğinde siRNA'nın çift sarmallı yapısı açılır ve yapısında bulunan enzim kompleksi hedef mRNA ile aynı baz dizisine sahip siRNA (sense) zincirini uzaklaştırır [128]. RISC kompleksi antisens diziye sahip siRNA zincirini rehber olarak kullanarak hedef mRNA ile hibritleşir ve mRNA'nın 5' ucundan ölçerek endonükleaz aktivitesiyle 10. Ve 11. Nükleotitler arasında bulunan fosfodiester bağı keser [118].



Şekil 2.7: RNAi mekanizmasında DICER ve RISC kompleksi [129].

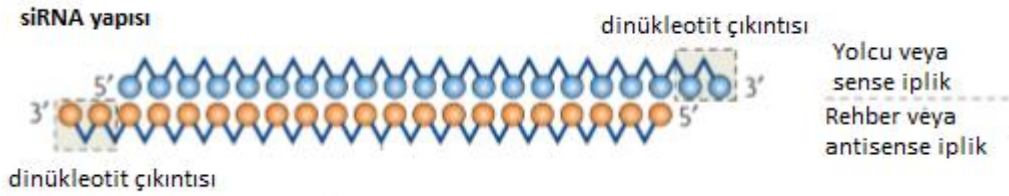
MikroRNA

Hücrede RNA polimeraz enziminin katalizlediği reaksiyonla genom tarafından üretilen çift iplikli miRNA (mikro RNA)'lar, RNAi mekanizmasının temelini oluşturmaktadır. miRNA'lar RISC kompleksini aktif hale getirebilmesi için bazı aşamalardan geçer [130]. İlk olarak RNA polimeraz II endojen veya ekzojen kaynaklı kaynaklı bir RNA'yı kullanarak dsRNA sentezler [131]. Bu yapı intron bölgelerinden gevşeyerek saç tokası şeklinde kıvrılarak eşleşir [132]. Böylece transkripsiyon sonrası pri-miRNA olarak isimlendirilen ilk miRNA oluşur [133]. Rnaz III grubu üyesi bir endonükleaz olan drosha, oluşan pri-miRNA'ya etki ederek bu saç tokası gibi kıvrılmış RNA parçasını zincirden ayırarak pre-miRNA'yı oluşturur [134]. Oluşan pre-miRNA eksportin 5 aracılığı ile sitoplazmaya taşınır [130]. Sitoplazmada bulunan dicer enzimi, ATP bağımlı etkileşim ile RNA'ya bağlanır ve RNA'nın ucundaki kıvrımlı yapıyı keser [134]. Sonra dsRNA helikaz aktivitesiyle çift iplikli yapısı açılır ve kısa RNA fragmentleri şeklinde keser [134]. Oluşturulan kısa RNA parçacıkları daha tekrardan ATP bağımlı şekilde RISC kompleksine aktarılır [133]. RISC içerisinde bulunan argonaute proteini substrat seçiliğini sağlayarak [135] miRNA ile mRNA etkileşimini sağlar. Hedef mRNA ile birebir eşleşme bölgelerinde endonükleazlar tarafından kesilir [131].

siRNA

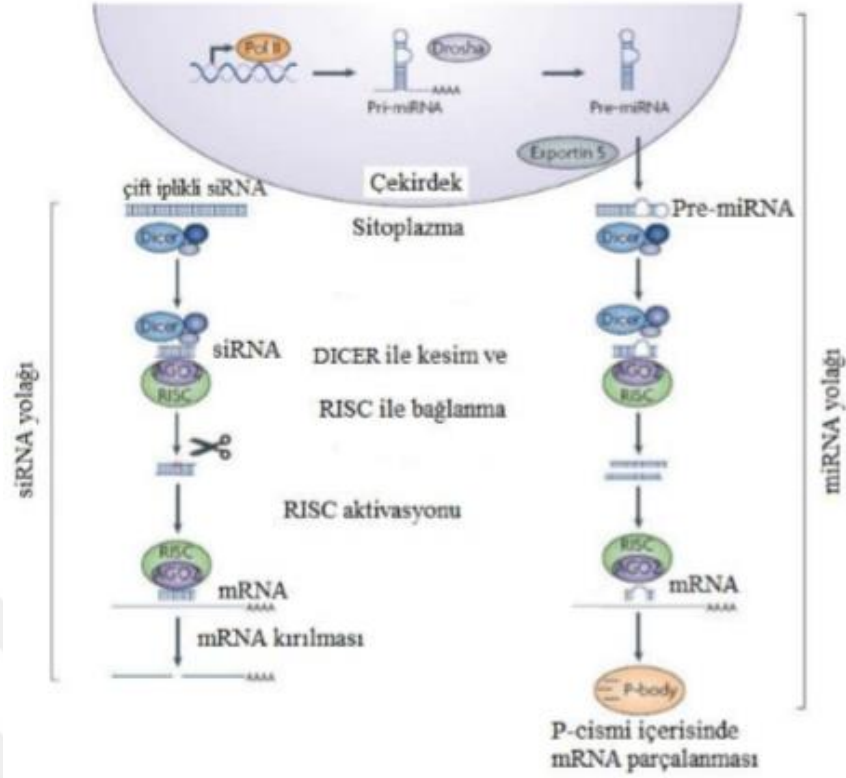
siRNA (Small interfering RNA veya short interfering RNA)'lar 20-25 baz çifti uzunluğunda in vitro sentezlenen çift iplikli RNA (dsRNA)'lardır [136]. siRNA'lar 5'- fosfat ve 3'- hidroksil uçları bulunan ve 3'-hidroksil uçlarında iki nükleotidlik çıkıntıya sahip, 21-23 nükleotid uzunluğunda çift zincirli (dsRNA) RNA molekülleridir [106, 137].

Başlangıçta endojen veya ekzojen orijinli dsRNA molekülleri hedef mRNA ile birleşmeden önce dicer enzimi tarafından tanınır ve yaklaşık 21-23 nükleotidlik küçük fragmanlere ayrılır [106]. RISC kompleksini tarafından tanınan ve yapısında bulunan helikaz enzimi ile çift iplikli siRNA dubleksini açılır [138]. Bir zinciri parçalanır, diğer rehber zinciri ve RISC kompleksi hedef mRNA'ya bağlanarak mRNA degradasyonunu sağlar [139].



Şekil 2.8: siRNA (small interfering RNA).

Günümüzde RNA interferans mekanizması ile yapılan çalışmalarda gen susturucu molekül olarak siRNA ve miRNA'lar öne çıkmaktadır [140]. Protein ifadesi bulunmayan siRNA ve miRNA'lar, hücrede farklılaşma, gelişim, hücre çoğalması, apoptoz gibi çeşitli biyolojik olaylarda gen ifadesinin negatif düzenleyicisi olarak görev yaparlar [107, 141]. Bu protein kodlamayan iki tür RNA sentez ve olgunlaşma süreçlerinde ortak aşamalardan geçerler fakat aralarında bazı farklılıklar da bulunur [140]. miRNA'lar sadece memelilerde bulunurken, siRNA'lar ökaryotik canlılar ve memelilerde bulunur [142]. siRNA molekülleri sentetik endojen kaynaklıdır ve hedef dizi ile mükemmel eşleşme gösterirken, miRNA'lar genomik kaynaklı endojen moleküllerdir ve hedef dizi ile tam eşleşme yapamazlar [139, 143].



Şekil 2.9: siRNA ve miRNA yolları[144].

RNAi'in etkili bir şekilde gerçekleşmesi için terapötik etkili siRNA'nın hücreye taşınması gerekir. siRNA vücut içerisine girdikten sonra nükleazlar tarafından hızla bozunabilir, dolaşımında retiküloendotelial sistem (RES) tarafından parçalanabilir [145], hücreye transfekte edildiğinde hücre içi helikaz ve Rnaz'lar ile etkileşime girerek parçalanmasında ve gen susturma özelliği yok olmasına neden olur [146]. Bu etkileşimler siRNA'ların parçalanmasına yol açmakta ve dolayısıyla siRNA hücreye viral taşıyıcı sistemler veya non-viral taşıyıcı sistemlerle taşınabilir [147].

Viral taşıyıcı vektörler gen tedavisi araştırmalarında kullanılan ilk vektör grubudur. Birçok virüs genetik materyallerini memeli hücrelerine etkili bir şekilde aktarma yeteneğine sahiptirler. Retrovirüs, adenovirüs, lentivirüs, herpes simplex virüsü, adeno ilişkili virüs gibi çeşitli viral sistemler kullanılmaktadır [148]. İn vivo gen taşınmasında patojenitesi arındırılmış virüsler kullanılmaktadır. Daha yüksek verim elde etmek amacıyla kullanılan virüslerin üretimleri zordur, toksisite ve immün yanıt oluşumuna neden olurlar [149].

Viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerin sentezleri kolaydır, düşük toksisite ve immünojenik özellik gösterirler. Ayrıca aktif hedefleme özelliğine sahiptirler. Yüksek transfeksiyon etkinliğine sahip viral vektörlere oranla, viral olmayan

vektörlerin genetik materyal taşıma kapasitesi sınırlıdır ve belli hücre, doku ve organlara özgü bağlanabilmeleri nedeniyle daha dikkat çekici ve tercih edilen taşıyıcı sistemlerdir [150].

siRNA taşınmasında son yıllarda özellikle üretim ve saflaştırma aşamalarının kolaylığı, güvenli olması, uygulanmasının kolay, stabilitesinin yüksek olması ve her boyutta üretilebilmeleri nedeniyle viral olmayan taşıyıcı sistemler kullanılmaktadır. Viral olmayan gen taşıyıcı sistemler olarak polikatyonik lipidler, lipozomlar, peptit-protein yapıda taşıyıcı sistemler [151] veya çeşitli polimerik taşıyıcı sistemler biyoyumlu ve biyoparçalanabilir olmasından dolayı tercih edilmektedir [152].

2.2.1.4 RNAi Terapötiklerinin Uygulama Alanları

RNAi teknolojisinin; özgüllük, potens özellik, çok yönlülük gibi pek avantajları bulunmaktadır [153]. RNAi mekanizmasında özellikle son yıllarda siRNA'ların sentezlenip kullanılmaya başlanmasıyla bilim dünyasında heyecan verici yeni pencere açılmasına neden olmuştur [154].

RNAi mekanizması ile bu güne kadar HIV/AIDS, SARS, hepatit, influenza, HPV gibi viral hastalıklarda; alzheimer, parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda, diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıklarda, özellikle kanser türlerinde tanı ve tedavi amaçlı uygulanması ile ilgili çok sayıda ümit veren gelişmeler vardır [154, 155].

RNAi mekanizması özellikle onkogenез yolağında, hücre döngüsünün düzenlenmesinde, apoptozda, hücre yaşlanmasında, geleneksel tedavilerde direnç mekanizmasına neden olan genleri hedef alarak etkili potansiyel yeni bir tedavi stratejisi olarak karşımıza çıkmaktadır [156].

RNAi temelli terapötikle ilgili çeşitli faz çalışmaları başlamış ve bazı ilaç firmaları çeşitli RNAi teknolojisi temelli siRNA'ları çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanmak üzere patent başvurularında bulunmaktadır [157].

Tablo 2.2: Klinik denemeleri devam eden siRNA terapötikleri [158].

siRNA Terapötik İsmi	Endikasyonlar	siRNA Hedefi	Faz	Taşıma Sistemi	Şirket / Merkez
ALN-VSP02	İlerlemiş solid tümör (karaciğer)	KSP ve VEGF1	1, tamamlandı	Lipit nanopartiküller	Alnylam Pharmaceuticals
Atu027	İlerlemiş solid tümör Pankreatik Duktal Karsinoma Solid tümör, multipl	PKN3	1, tamamlandı	Lipozomal partiküller (AtuPLEX®)	Silence Therapeutics GmbH
DCR-MYC (Dicer Substrat siRNA)	miyelom, non Hodgkin Lenfoma Hepatosellüler karsino	MYC onkogen	1,devam ediyor	Lipit nanopartiküller (EnCore)	Dicerna Pharmaceuticals, Inc.
sİG12D LODER	İleri evre pankreatik kanser	Mutant KRAS onkogen	1, tamamlandı	Biyobozunur polimer temelli iskelet DPC (Kolesterol	Silenseed Ltd
ARC-520Kronik	Kronik HBV enfeksiyonu	HBV'nin korunmuş bölgeler	1, tamamlandı	konjüge siRNA taşıyan membran litik peptitler	Arrowhead Research Corp.
TKM-100201	Ebola virüs enfeksiyonu	Ebola L Polimeraz, VP24 ve VP25	1,sonlandırıldı	Lipit nanopartikülleri	Arbutus Biopharma Corp.
Bamosiran (SYL040012)	Göz hipertansiyonu, Glokom	ADRB2	1, tamamlandı	Direkt uygulama	Sylentis, S.A Sylentis, S.A
PF-04523655	AMD	RTP801	1,2 tamamlandı	Direkt uygulama	Quark Pharmaceuticals

Tablo 2.2 (devamı): Klinik denemeleri devam eden siRNA terapötikleri.

ALN-AT3sc	Hemofili A ve B	AT	1, devam ediyor	GalNAc-siRNA konjüгатı	Alnylam Pharmaceuticals
	Akut böbrek yetmezliđi,				
	böbrek hasarı,				
QPI-1002 (I5NP)	Böbrek nakli sırasında doku reddinin geciktirilmesi	P53	1, tamamladı 1,sonlandırıldı	Direkt uygulama	Quark Pharmaceuticals
ND-L02-s0201	Hepatik fibroz	HSP47	1, tamamlandı	Vitamin A bağlı lipozomlar	Nitto Denko Corporation

2.3 Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, herhangi bir ölçünün milyarda birini ifade etmektedir [159]. Nanopartiküler sistemler 1-1000 nm arasında değişen, ilaçların hapsedildiği, yüzeye bağlandığı veya adsorbe edildiği katı kolloidal sistemlerdir [160].

Nanopartiküller, ilaç moleküllerinin sınırlı karakteristik özelliklerini koruyarak ve stabilitesini arttırarak [161] hedef hücre ve doku membranlarını aşabilme kabiliyetlerinin olduğu bilinmektedir [162]. Nano boyutta hazırlanan taşıyıcılar hedef bölgeye ulaştığında desorpsiyon, nanopartikülün kabuk veya kor bölgesinden ilacın difüzyonu, nanopartikülün kabuk veya kor bölgesinin erozyonu gibi çeşitli mekanizmalardan bir veya birkaçını kullanarak ilaç salınımını gerçekleştirebilir [161].

Nano boyuttaki taşıyıcı sistemlerin çeşitli avantajları vardır. Nano taşıyıcı sistemler kullanılarak ilaçların toksik etkisi azaltılabilir, çoklu ilaç direncinin önüne geçilebilir [163], ilaç dağılımı kontrol edilebilir, terapötik madde hedef bölgeye taşınarak yan etkisi azaltılabilir, yüksek seçicilikte tedaviye olanak sağlanır [164]. Ayrıca hedefli nano ilaç taşıma sistemleri ilacın hızlı bir şekilde degradasyonu önler, hedef dokuda ilaç konsantrasyonunu arttırarak düşük dozda etkin tedavi imkanı sağlar [165].

Hedefli ilaç taşıma konsepti 1900'lerin başında Paul Ehrlich tarafından "Magic Bullet" adı altında önerilmesiyle başladı [166].

Günümüzde genel itibariyle hedefli ile taşıma sistemleri pasif, ters (invers), aktif ve kombine hedefleme olmak üzere dört kategori altında toplanabilir [167].

2.3.1 Pasif hedefleme

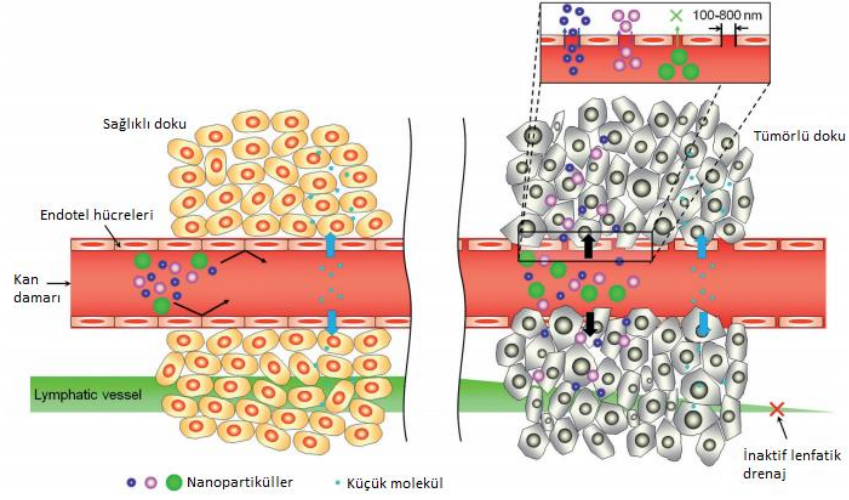
Pasif hedefleme, ilacın hedef dokunun doğal özellikleri ve fizyolojik yapısından dolayı nanopartiküllerin hedef bölgeye yığılması ile gerçekleşmektedir [168]. Pasif hedeflemede retikulo-endotelial sistemin (RES) bileşenlerini hedeflemeyi amaçlayan önemli bir stratejidir. RES elemanları yabancı maddeleri kan dolaşımından temizlerken bazı ilaç taşıma sistemlerini de etkilemektedir. Nanotaşıyıcıları hidrofilik bir polimer ile kaplayarak makrofaj gibi kan bileşenleriyle etkileşimini engellenmektedir [169].

Pasif ilaç hedeflemesi, sağlıklı dokular kıyasla tümör dokularının eşsiz patofizyolojik özelliklerine dayanarak yapılmaktadır. Tümör hücrelerinin aşırı büyümesi nedeniyle kusurlu vasküler yapı ve geniş anjiyogenez meydana gelir. Buna ek olarak solid tümör dokusunda yüksek geçirgenliğe sahip ara madde ve fonksiyonel lenf drenajından yoksundur [167]. Tümör dokularının bu patofizyolojik özelliklerinden yararlanılarak uygun nano taşıyıcılar tasarlanabilir ve hedefli bölgede anormal hücrelere kolayca etki ederek terapötik etki gösterebilir. Bu mekanizma Gelişmiş Geçirgenlik ve Alıkonma (Enhanced Permeability and Retention (EPR)) etkisi olarak tanımlanmaktadır [170].

EPR etkisinin keşfi, tümörlere karşı daha hedefe yönelik tedaviye yol açan en büyük buluş olarak kabul edilir [171]. İlk kez 1986'da Matsumura ve Maeda [170] EPR etkisini bildirmişlerdir.

Araştırmalar sonucunda, tümörlerin genellikle çeşitli vasküler geçirgenlik faktörleri ürettiği ve katı tümörlerin çoğunda kan damarlarının hatalı formlara sahip olduğunu ortaya çıkmıştır. Solid tümörlere ait damarlar, hızlı gelişim için tümörlere bol miktarda besin ve oksijen verilmesini sağlayan daha fazla damar geçirgenliğine sahiptir. EPR etkisi makromoleküllerin tümör dokularına taşınmasını kolaylaştıran tümöre ait kan damarlarının bu eşsiz anatomik-patofizyolojik doğasını dikkate alır [172]. 40 kDa'dan daha büyük boyutları olan makromoleküller tümör damarlarından sızabilir ve tümör bölgelerinde toplanabilir. Ayrıca tümör kan damarları perisitler ve düz kas hücre katmanları içermez, bu da onları yüksek interstisyel basınçlara karşı daha savunmasız hale getirir ve kan akışını hızla değiştirir.

Tümör tipine bağlı olarak, tümör vaskülatüründeki açıklıklar tipik olarak 100-800 nm arasındadır [173]. Bununla birlikte, bu EPR etkisi sağlıklı dokularda görülmez [174].



Şekil 2.10: Gelişmiş Geçirgenlik ve Alıkonma (EPR) etkisi [175].

2.3.2 Aktif hedefleme

Ligand hedefleme olarak da bilinen aktif hedefleme, nano taşıyıcıların hedef hücelere spesifik olarak tutulma ve alım için yüzeyinde afinite ligandlarını kullanmasıdır [176]. Aktif hedeflemede, seçilen ligandlar hedef bölgede bol bulunan veya yüzey elemanlarını hedef almak için seçilir [177].

Aktif hedeflemede nanopartiküllerin tasarlanmasında çeşitli faktörlere dikkat edilmesi gerekir. Bunlardan bazıları ligand tipi, ligand konjugasyon yapısı ve uygulama şeklidir [178]. Ayrıca ligand yoğunluğu, hazırlanan nanopartiküllerin boyutu, hedeflenen ligandın seçimi gibi fizikokimyasal özellikler de in vitro ve in vivo etkinliği etkiler [179].

Ligandın substratı ile eşleşmesi aktif hedeflemenin temel mekanizmasıdır. Protein, şeker, nükleik asit, antikor, vitamin gibi küçük moleküller ligand olarak kullanılabilir [180]. Hedef elementler, hedef bölgede veya hücelerin yüzeyinde mevcut olan şekerler veya proteinler olabilir [181].

Aktif hedeflemede hedeflemenin özgüllüğü ve hedefleme sağlama kapasitesi dikkat edilmesi gereken iki kritik faktördür [179].

Şu anda, aktif hedeflenen nanopartiküllerin özellikle kanser çalışmalarında EPR etkisinin tamamlayıcı bir prosedür olduğuna inanılmaktadır.

2.4.3 Nano ilaç taşıyıcı sistemler

Nano ilaç taşıyıcı sistemler tıpta görüntüleme, implant, teşhis ve tedavi gibi çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır [182].

Nano taşıyıcı sistemler, ilacın çözünürlük ve stabilitesinin artırılması [183], ilacın hedeflenen bölgeye gitmesi sonucu biyoyararlanımın artması [184], alınan doz miktarının azaltılması, istenmeyen yan etkilerin azaltılması ve hatta ortadan kaldırılması mümkündür [185].

İlaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiş ve hala yeni taşıyıcı sistemler araştırılmaktadır. Nanopartiküllerin hazırlanmasında genel olarak iki farklı yöntem kullanılır. Bunlar yukarıdan aşağı (top-down) ve aşağıdan yukarı (bottom-up)'dır. Yukarıdan aşağıya yönteminde, büyük boyutta olan maddeler farklı yöntemler kullanılarak (öğütme, homojenizasyon, sonikasyon, termal yöntemler gibi) nano boyuta dönüştürülür.

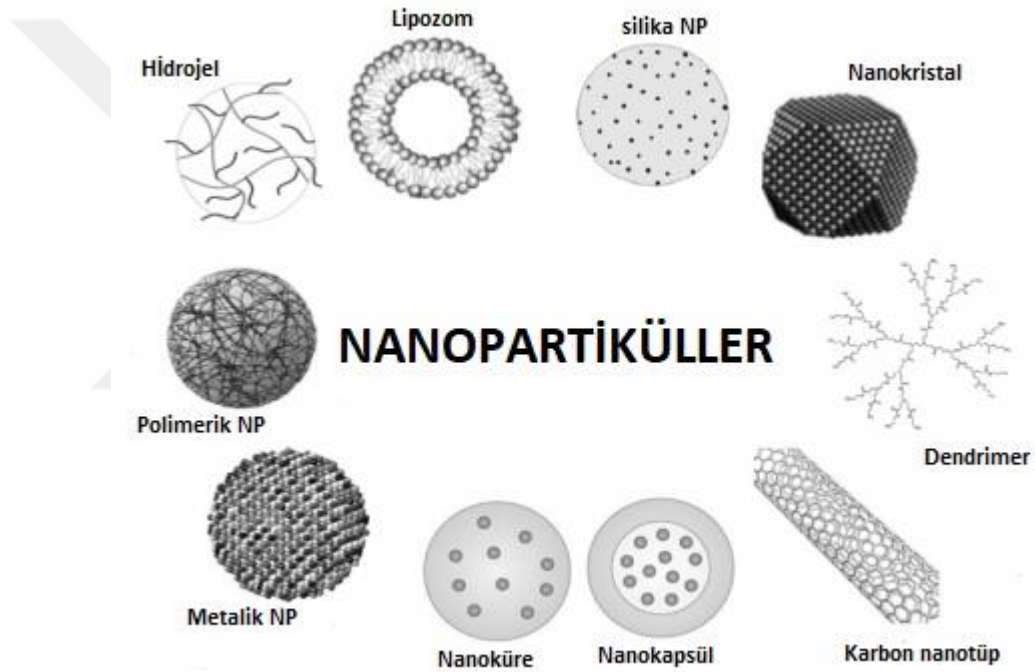
Aşağıdan yukarı yönteminde ise, moleküler seviyedeki maddelerin, kimyasal sentez, kendiliğinden bileşen sistemler (self-assembly) gibi çeşitli yöntemlerle nanometre boyutuna yükselmesini sağlamaktır [167, 186].

Nano ilaç taşıyıcı sistemlerin üstünlükleri genel olarak aşağıdaki gibi özetlenebilir [167, 187]:

- İlaç alındıktan belli bir süre boyunca terapötik özelliğe sahip madde plazma konsantrasyonu sabit kalır. Böyle hasta daha az sıklıkta ve küçük dozlarla tedavi imkanı sağlanır.
- Hastaya tedavi düşük dozlarla sağlandığı için ilaçların yan etkileri ve toksisite problemleri azaltılır/görülmez.
- Kullanılan etkin maddenin yarılanma ömürlerinin uzaması sağlanır.
- Kontrollü salım sistemlerinde istenilen doku veya organlara hedeflendirilebilirler.
- İlaçların kullanımı sırasında yaşanan unutma, kısa zaman aralıkları ile kullanma gibi çeşitli sorunların ortadan kalkması sağlanır.
- Terapötik etkisi sınırlı olan maddeler için kullanımları uygundur.
- Hedefli ilaç taşıma sistemi kullanılan hastalarda yaşam kalitesi artar ve hasta bakımı kolaylaşır.

Fakat bu sistemler ile ilgili bazı dikkat edilmesi gereken noktalar mevcuttur. Bunlar; nano ilaç taşıma sisteminin hazırlanmasında kullanılan polimerin parçalanma ürünlerinin toksik veya biyolojik olarak uyumsuz olması, nano sistem vücut içerisinde ilaç salınmasının istenilen sürede durdurulamaması veya hedef bölgeye ulaşmadan salımın gerçekleşmesi, formülasyon maliyetlerinin yüksek olması, formülasyon hazırlama yöntemlerinin çeşitli olması ve her etkin maddenin hedefli kontrollü salım sistemlerininin hazırlanmaması gibi çeşitli dikkat edilmesi gereken noktalar bulunmaktadır [188].

Nanotıpta çeşitli nanopartiküler sistemler kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 2.11: Hedefli ilaç taşıma sisteminde kullanılan bazı nanopartiküller [189].

2.3.2.1 Lipozomlar

Lipozomlar, bir veya birden fazla lipit tabakadan oluşan, çekirdeğinde ve tabakalar arasında sulu faz bulunduran kapalı veziküler sistemlerdir. Genellikle amfilik fosfolipid molekülleri ile hazırlanırlar. Buna ek olarak çeşitli sterollerin, özellikle de kolesterolün eklenmesiyle lipozomların stabilizasyonunu ve ilaç hedefleme kapasitesi artırılabilir. Lipozomlar, hücre zarlarında doğal olarak bulunan fosfolipidlere ve lipoproteinlere yapısal benzerlik göstermektedir. Lipozomlar bu özelliklerden dolayı biyolojik olarak uyumludur, biyobozunurdur ve ciddi toksik

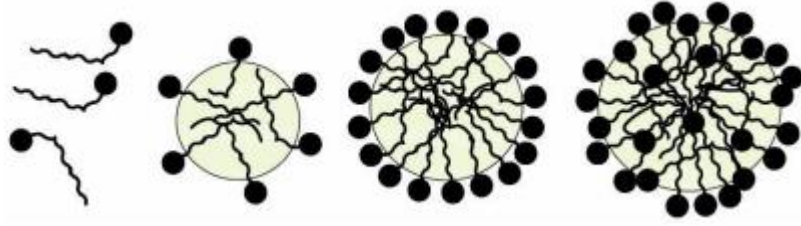
etkilere yol açmaz. İlaç depolama süresi boyunca lipidlerin oksidasyonları, hidrolizi ve parçacıkların zamanla büyüme eğilimi lipozomların stabilite problemleri arasındadır [190, 191].

Bu stabilite problemlerinden kaçınmak amacıyla, ayrıca fosfolipitlerin yüksek maliyetine ekonomik bir alternatif de sağlayabilen alternatif niosomlar ortaya çıkmıştır. Niosomlar, lipozomlara benzer yöntemlerle çift kat iyonik olmayan yüzey aktif maddelerle hazırlanan veziküler sistemlerdir. Sürfaktanların yapıdaki toksik etkileri, füzyon riski ve depolanma sırasında birikme niosom bazlı sistemlerin dezavantajları arasındadır [192].

2.3.2.2 Miseller

Miseller, polimerik veya lipid bazlı amfifilik molekküllerin sulu ortamdan herhangi bir enerji gerektirmeden kendiliğinden oluşan küçük boyutlu (5-100 nm) partiküllerdir. Sferoidlerin iç kısmı hidrofobiktir yağda çözünen ilaçlar için uygun bir taşıyıcı görevi görürken ve dış kısmı hidrofiliktir [193, 194]. Amfifilik molekküller, sadece belirli bir konsantrasyona ulaştıktan sonra sulu ortamda miseller oluştururlar, bu süreçte sistemin serbest enerjisinin azalması şeklinde bir birleşme de meydana gelebilir. Bu eşik konsantrasyon değeri kritik misel konsantrasyonu (CMC) olarak adlandırılır ve amfifilik molekküllerin yapısına bağlı olarak değişir. Düşük CMC'li sistemler dilüsyona daha dirençlidir. Misel içeren sulu dispersiyon sistemi su ile seyreltiğinde, sistemde monomer olarak bulunan amfifilik molekül konsantrasyonu azalır ve misel CMC değerine geri getirmek için gereken miktara getirilmesi gerekir. Bu durumda, misellere yüklenen ilaç da aynı zamanda miselden sulu ortamda salınır. Enjeksiyondan ve fazla kan hacmi ile temastan sonra, yüksek CMC'li miseller, ilacın aniden salınmasıyla emboliye neden olabilir. Bu nedenlerden dolayı, tedavilerde düşük CMC değerleri tercih edilir [195].

Miseller, en fazla tercih edilen ilaç taşıyıcılarıdır çünkü hazırlanmaları kolaydır, yüksek miktarda ilaç taşıyabilirler, yapıları son derece stabildir ve farklı amaçlara göre yapılarında değişiklikler yapılabilir [185]. Bunlara ek olarak, fosfolipitler kullanılarak hazırlanan miseller, kabul edilebilir düşük bir toksisite profili sergiler [196].



Şekil 2.12: Misel oluşumu [197].

2.3.2.3 Dendrimerler

Dendrimerler, birbirini tekrarlayan monomerlerin basamaklar halinde eklenmesiyle merkezden yüzeye doğru sentezlenen üç boyutlu geometrik desene sahip küresel makromoleküllerdir [198]. Dendrimerler ağaç şeklinde üç boyutlu bir mimaride ve monodispers yapıdadırlar [167]. Yapsında merkezi bir iç kısım, iç dendritik dallar ve fonksiyonel gruplara sahip bir dış yüzey olmak üzere üç bileşenden oluşur. Bu bileşenlerle çeşitli kombinasyonda konumları iç çekirdekten farklı şekil ve boyutlarda nano ürünlerin üretimi gerçekleştirilebilir. Dendrimerler, nano yapıları ve dar polidispersite indeksli olmaları, ayrıca iç kısımlardaki kaviteelerde veya boşluklarda fazla fonksiyonel grup bulundurmaları gibi cazip özellikleri vardır [199]. Bu özelliklerinden dolayı aşı, oligonükleotid, enzim, aşı, çeşitli genler veya biyoaktif maddelerin taşınmasında kullanılmak üzere araştırılmaktadır [200, 201].

2.3.2.4 Karbon nanotüpler

Karbon nanotüpler silindir şeklindeki bir karbon allotropudur. Karbon nanotüpler tek duvarlı, sadece tek grafen sarılmış şeklinde veya birden fazla duvarlı, birden fazla tabaka eş merkezli sarılmış olarak iki temel grupta incelenebilir [202]. Karbon nanotüpler; gen, protein, ilaç gibi çeşitli biyolojik maddeleri taşıyabilen silindir yapısına benzer nanomalzemelerdir [203]. Çapları birkaç nanometreden yüzlerce nanometreye kadar değişkenlik gösterebilir [204]. Yüzey alanlarının geniş olmasından dolayı çok çeşitli terapötik özelliğe sahip maddeleri adsorbe etme veya konjuge etme özelliğine sahiptir [205]. Karbon nano tüpler çeşitli yöntemlerle işlevselleştirmesi, daha çözünür, biyouyumlu, kovalent veya kovalent olmayan bağlarla yüzeylerine çeşitli moleküllerin yüklenmesine yardımcı olur. Böylelikle hedefli kanser tedavisinin her basamağında iyi bir taşıyıcı ajan olmaları sağlanmış olur. Özellikle son yıllarda benzersiz mekanik özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmektedirler [206].

2.3.2.4 Metalik nanopartiküller

Metalik nanopartiküller genellikle altın, platin, gümüş, bakır ve demir oksit gibi toprak elementleri kullanılarak hazırlanan kolloidal nanotaşıyıcılardır. Metalik nanopartiküller çeşitli şekil ve boyutarda hazırlanabilir. Yüzeyleri farklı moleküllerle kolayca değiştirilebilir ve aynı zamanda işlevselleştirilebilir [204].

Gümüş nanopartiküller etkili antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahiptir [207]; altın nanopartiküller eşsiz optik özelliklerinden dolayı tümörlerin erken tanısında, fototermal terapide kullanılırlar [208]. Demir içeren nanopartiküller manyetik özellikleri için kullanılır. Uygulamadan sonra harici olarak uygulanan manyetik alan demir nanopartikülleri istenen bölgede birikmesini sağlar [209].

Metalik nanopartiküllerin en büyük dezavantajı, biyolojik olarak parçalanamamaları ve vücutta birikme riskine sahip olmalarıdır. Toksik etkiler, kullanılan elemente ve partikül boyutuna bağlı olarak değişir [186].

2.3.3 İlaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılan polimerler

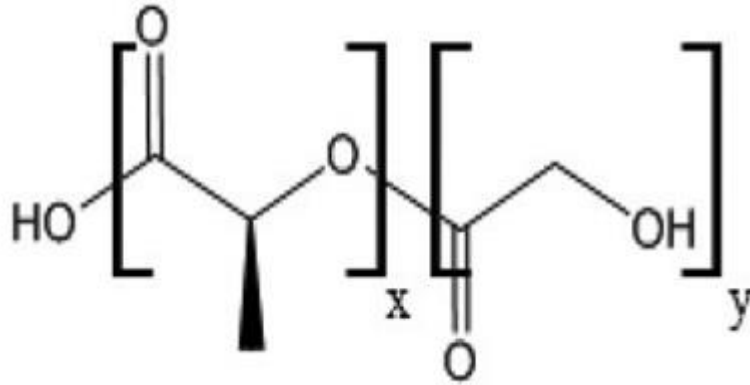
Polimerler, ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında olarak en çok araştırma konusu olan materyallerdendir [210]. Polimerler, pasif hedeflemede hedef dokuda ilaç birikimi, vücudun enzimatik koşullarında ilaçları korunmasını, ilaçların kontrollü olarak sürekli salınmasını sağlayabildikleri tespit edilmiştir. Ayrıca suda az çözünürlüğe sahip bazı ilaçların üstesinden gelmek amacıyla kullanılabilirler [211]. Polimer kompozitler uygulamalarda dayanıklı, güçlü ve çok fonksiyonludurlar [212].

Polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında temelde iki çeşit polimer kullanılmaktadır. Kullanılan bu sentetik ve doğal polimerlerin biyobozunur ve biyouyumlu olması ayrıca konsantrasyonları optimum olduğunda potansiyel toksisiteye sahip olmadıkları bildirilmiştir [213].

Doğal polimerler polisakkarit bazlı ve protein bazlı polimerler olarak ayrılırken; sentetik polimerler poliesterler, polieterler, ploxamerler ve rekombinant protein bazlı polimerler olarak alt gruplara ayrılır. Son yıllarda optimal terapötik etkiler elde etmek için doğal veya sentetik polimerler kullanılarak polimerik nano taşıyıcı sistemler üzerinde çalışılmaktadır [214].

2.3.4 PLGA

Polimer temelli nanopartiküller ilaçların biyoyararlanımını artırır ve olumsuz yan etkileri en aza indirir [14]. Poli laktik-ko-glikolik, nano ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan biyouyumlu polimerdir [215]. Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından trikarboksilik asit döngüsü ara maddeleri, laktik asit ve glikolik aside parçalanabilen [14] toksik olmayan, biyouyumlu ve biyoparçalanabilen bir polimerdir [15]. Ayrıca PLGA degradasyon özelliklerinin sürekli salım sistemlerinde kullanılması için uygun bir polimerdir [216]. PLGA hedefli ilaç taşıma sistemlerinde iyi araştırılmış ve biyolojik olarak kullanımı en elverişli, parçalanabilir polimerler arasında “altın standart” olarak kabul edilir [214]. Poly-(glikolik asit) (PGA) ve poli-(laktik asit) (PLA) ile birlikte PLGA, 1960’larda cerrahi dikişlerde kullanılmak üzere keşfedildi. PLGA, üreme sistemindeki düzenleyici hormonlar, steroid hormonlar, anti-enflamatuar ilaçlar, sitokinler, kemoterapötikler, antibiyotikler, büyüme hormonları, insülin ve aşılarda dahil olmak üzere küçük moleküllü ilaçlar, peptitler ve proteinlerin salınması için kullanılmıştır [217]. Diğer polimerlere kıyasla, PLGA enjekte edilebilir, mikroküre veya nanoküre gibi çeşitli şekillerde tasarlanması daha kolaydır. PLGA, laktik ve glikolik asit monomerlerinin kopolimerizasyonu ile oluşan poliester omurgalı alifatik bir polimerdir [217].



Şekil 2.13: PLGA moleküler yapısı (x=laktik asit birimi, y=glikolik asit birimi).

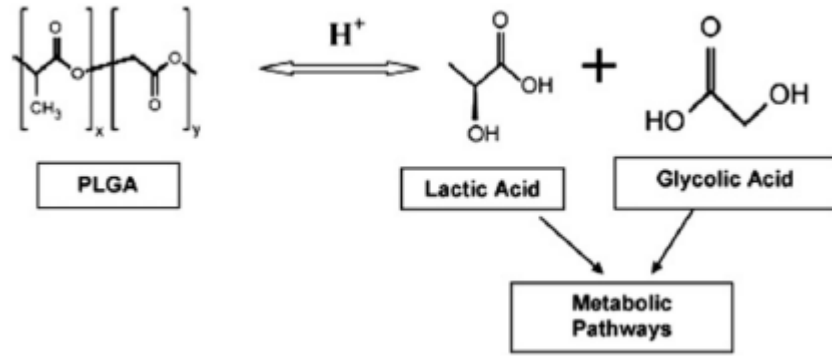
PLGA tamamen esnek, farklı boyutlarda ve şekillerde çalışmak için uygundur. Ayrıca hemen hemen her boyutta madde taşıyabilme kapasitesine sahiptir. PLGA; etil asetat, klorlu çözücüler, tetrahidofuran ve aseton gibi çeşitli çözücüler içinde çözülebilir [218].

PLA (poli laktik asit) ve PGA (poli glikolik asit) polimerlerinden oluşan PLGA kopolimeri özellikleri en iyi açıklanmış biyomateryaldir. Laktik yapısı asimetrik yapıda bir karbon içerir, D ve L olmak üzere iki optik izomeri bulunur. Sonuçta, optikçe aktif olan L-laktik ve D-laktik, ayrıca optikçe aktif olmayan DL-laktik olmak üzere üç farklı laktik oluşmaktadır [216, 219]. PLA yapısında bulunan metil yan grubundan dolayı hidrofobik bir polimerdir ve biyobozunması PGA'dan daha uzun sürede gerçekleşmektedir. Metil grubunun sterik engel oluşturması nedeniyle PGA'ya göre hidrolize daha da dayanıklı olmasını sağlar [220].

PGA iseyapısında metil yan grubu içermez. % 45-55 oranında kristalin yapı gösterir. Bundan dolayı, birçok organik çözücüde çözünmez. PLGA kopolimerinin elde edilmesinde glikolik ile L-laktik veya DL-laktik kullanılarak kopolimerizasyon yapmak mümkündür [216, 221].

Kopolimer zincirindeki glikolik:laktik 'in tür ve molar oranı; PLGA'nın kristallik derecesini, mekanik dayanıklılığını, şişme davranışını, hidrolize uğrama kapasitesini ve polimerin biyolojik parçalanma oranını etkiler [216]. Araştırmalar kopolimer yapısındaki laktik içeriğinin ve moleküler ağırlıktaki azalmanın PLGA'nın Tg değerini düşürdüğünü göstermiştir [222].

PLGA kopolimeri sulu ortamda ester bağları üzerinden hidrolize uğrar. Hidroliz ile monomer düzeyinde asitlere parçalanır. Krebs döngüsü ile CO₂ ve su halinde idrarla atılırlar [15, 223].



Şekil 2.14: PLGA hidrolizi [15].

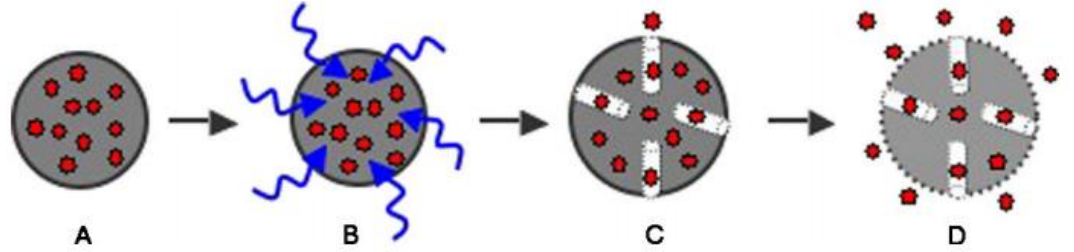
PLGA, hedefli ilaç taşıma sisteminde özel bir araç olarak kullanıldığında, enkapsüle edilmiş maddesini hedeflenen bölgeye istenen konsantrasyonda, istenen sürede taşıyabilme özelliğine sahiptir. Bu nedenle PLGA nanopartiküllerinin tasarımına, içerdiği farmasötik bileşenlerin bozunma süresine dikkat edilmelidir.

PLGA'nın biyo-dağılımının ve farmakokinetiğinin doğrusal olmadığı ve doza bağlı olduğu bildirilmiştir [224].

İlaç salım sistemlerinde kullanılan PLGA; emülsiyon çözücü buharlaştırma, emülsifikasyon-difüzyon, nanoçöktürme, ara yüzde depolama gibi çeşitli yöntemlerle PLGA nanopartikülleri üretilir [225]. Çeşitli sentez metodlarıyla üretilen PLGA nanopartiküllerine hapsedilmiş veya yüzeyine adsorbe edilerek protein/peptit yapıdaki ilaçlar, aşılarda, genler, büyüme faktörleri, antikanser etkili etkin maddelerin taşınması amacıyla üretilir. Ayrıca farklı uygulama yollarına yönelik (nazal, oral, oftalmik gibi) nanopartiküller üretilir [226, 227].

Terapötik maddeleri içeren bu nanopartiküller, çözünürlüğü düşük, endozomlar tarafından yakalanıp hücre içine alınabilir ve aynı zamanda kılcal damarlardan geçebilecek kadar küçük yapılardır [228]. Ayrıca üretilen nanopartiküller yüzeylerinde çeşitli modifikasyonlar yapılarak hedef dokuya taşınabilir, orada salım yapabilir [229].

PLGA nanopartiküllerinin matrisine yerleştirilen terapötik maddeler, polimerin matristen difüzyonuyla ve polimerin bozunmasına bağlı olarak salınır. Polimerin bozunması blok kopolimerin bileşimine, moleküler ağırlığına bağlı olarak günler veya aylarca sürebilir [230].



Şekil 2.15: Biyobozunur polimerik nanopartiküllerde enkapsüle edilen biyoaktif ajanların salımı. Polimerik sistem çevre ile etkileşime girerek çevredeki ortam sıvısı matrise giriyor (A), sıvı polimerik sistemin şişmesine neden oluyor (B), sıvı difüzyon kanalları oluşturuyor (C), polimerik sistemin bozunması (D) [231].

PLGA, endo-lizozomal kompartmandan sitoplazmik bölmeye kaçtığı ve fizyolojik ortamda hazırlanan nanopartiküller uzun süre boyunca nükleik asit salımını gerçekleştirdiğinden, hedef dokuda uzun süreli gen ifadesi sağlar [21].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 GEREÇ

3.1.1 Cihazlar

Tez aşamasında kullanılan cihazlar aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Tablo 3.1: Kullanılan cihazların listesi.

Cihaz Adı	Cihaz Firması	Kullanım Amacı
Yatay Jel Elektroforez Sistemi	Major Science	Agaroz jele yüklenen PCR ürünlerinin yürütülmesinde kullanılmıştır.
Jel Görüntüleme Sistemi	Fusion Fx7	Agarozda yürütülen DNA fragmanlarının görüntülenmesinde kullanılmıştır.
PCR Cihazı	Bio-Rad, Sacem	Klonlanacak DNA ürününün amplifikasyonunda kullanılmıştır.
Distile su cihazı	Sartorius Stedim Biotech	Tüm moleküler çalışmalarda kullanılmıştır.
Otoklav	Nüve	Laboratuvar malzemeleri sterilizasyonunda kullanılmıştır.
Hassas Tartı	Precisa	Kimyasal maddelerin miktarını ölçmede kullanılmıştır
Santrifüj	Hettich	Yüksek hızda (maksimum: 14000 rpm) ayırıştırma gerektiren tüm çalışmalarda kullanılmıştır (Hettich)
Soğutmalı Santrifüj	Nüve NF1200	RNA yüklü nanopartiküllerin saflaştırılmasında kullanılmıştır.
Vorteks	Stuart	Küçük hacimdeki solüsyon ve mixleri homojen hale getirmede kullanılmıştır.
Isıtıcı blok	Denville Scientific	Örneklerin ve belirli çözeltilerin ısıtılmasında kullanılmıştır.
Buz makinesi	Scotsman	Buz eldesinde kullanılmıştır.

Tablo 3.1 (Devamı): Kullanılan cihazların listesi.

Buzdolabı (+4°C)	Beko	Örnekler tampon ve stok çözeltilerin saklanması için kullanılmıştır.
Derin dondurucu (-20°C, -80°C)	Uğur, Haier	Örnekler, çeşitli çözeltilerin uzun süre saklanması için kullanılmıştır.
pH metre	Hanna Instruments	Çözeltilerin pH ayarlamasında kullanılmıştır.
Manyetik ısıtmalı karıştırıcı	Stuart	Çözelti ve nanopartikülün hazırlanmasında kullanılmıştır.
Etüv	Nüve	Katı besiyerine ekilen bakterilerin uygun sıcaklıkta kültüre alınıp çoğaltılmasında kullanılmıştır.
Vakum manifoldu	Welch	Pürifikasyon işlemlerinde atık sıvıların kolonlardan uzaklaştırılmasında kullanılmıştır.
Nanodrop	Thermo Scientific Multiskan GO	RNA, DNA konsantrasyon ölçümlerinde kullanılmıştır.
Fluoresan Mikroskop	Zeiss	Hücrelerin görüntülenmesinde kullanılmıştır.
Memeli Hücre Kültür Etüvü	Fisher Scientific	Hücre hattı büyütme aşamasında kullanılmıştır.
Çeker ocak	Vortice	Agaroz jel hazırlamada kullanılmıştır.
Mikrodalga fırın	Arçelik	Agaroz jel hazırlamada kullanılmıştır.
Liyofilizatör	LaboGene	Örneklerin liyofilizasyonunda kullanılmıştır.
Sıcak su banyosu	Nüve BM 30	Çeşitli çözeltilerin ısıtılmasında kullanılmıştır.
Karbondioksitli Etüv	Nüve EC 160	Hücre kültüründe kullanılmıştır.
Manyetik Karıştırıcı	Stuart	Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
Ultrasonikatör	Bandeln Sonorex	Çözeltilerin homojenizasyonunda kullanılmıştır.
Homojenizatör	MTOPS SR30	Çözeltilerin homojenizasyonunda kullanılmıştır.
DLS-Dinamik Işık Saçılım Spektrometresi	Malvern Instruments (Zetasizer Nano ZSP)	Nanopartikül boyutunun ölçülmesinde kullanılmıştır.

Tablo 3.1 (Devamı): Kullanılan cihazların listesi.

Laminar Flow Kabin	Nüve MN090/120	Deneysel çalışmalardakullanılmıştır.
Otomatik pipetler	Thermo, Eppendorf	Tüm moleküler çalışmalarda kullanılmıştır.
Şırınga (5-10 ml)	Biotech	Nanopartikül oluşumunda kullanılmıştır.
Mikropipet ucu (1, 200, 1000 µl)	Neptune	Tüm çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
Spektrofotometre - polistiren küvetler	ISOLAB	Nanopartikül boyutunun ölçümünde kullanılmıştır.
ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	VARIOSKAN FLASH, Thermo scientific	Gen susturma miktarının ölçümünde kullanılmıştır.

3.1.2 Kimyasallar ve kitler

Tez aşamasında kullanılan kimyasallar ve kitler aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Tablo 3.2: Kullanılan kit, kimyasal listesi.

Kimyasal Adı, Kit	Marka	Kullanım Amacı
LB (luria-bertani) broth ve agar	Sigma-Aldrich	Mikroorganizmaların büyütülmesinde kullanılmıştır.
Ampisilin	Sigma-Aldrich	Antibiyotik
Agaroz	Invitrogen	Elektroforez jel yapımın da kullanılmıştır.
Edta (Etilendiamin tetraasetik asit)	Sigma	Tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
Etidyum bromür	Millipor	Jel elektorforezinde oligonükleotidlerin görüntülenmesinde kullanılmıştır.
DNA jel yükleme boyası	New England Biolabs	DNA'nın jeldeki kuyucuk tabanına inmesinde ve boyanmasında kullanılmıştır.
FBS (Fetal Sığır Serum)	Gibco-Invitogen, USA, Lot # 10500	Hücre kültüründe besleyici serum olarak kullanılmıştır.
PBS (Fosfat tamponlu tuz)	Gibco-Invitogen, USA, Lot # 20031084R	Hücre kültüründe yıkama solüsyonu olarak kullanılmıştır.
Tris bazı	T1503- sigma, Lot # SLBN7135V	Bufferların hazırlanmasında kullanılmıştır.

Tablo 3.2 (Devamı): Kullanılan kit, kimyasal listesi.

Hidroklorik asit (HCl)	Sigma-Aldrich	Tampon çözeltilerin pH ayarlamalarında kullanılmıştır.
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich	Tampon çözeltilerin pH ayarlamalarında kullanılmıştır.
Diklorometan (DCM)	Merck #1,06044	Nanopartikül hazırlamada kullanılmıştır.
Asetillenmiş Sığır Serum Albumin (Acetylated BSA)	Promega, LOT#0000311319	Nanopartikül hazırlama ve RNA miktarının tespitinde kullanılmıştır.
Sulforhodamine B	Sigma-Aldrich, Lot # MKBX1736V	Sitotoksosite testinde kullanılmıştır.
PLGA; “Poly (lactic-co-glycolic acid)” or “Poly (D,L-lactide-co-glycolide) lactide:glycolide” (50:50) , mol wt 30,000-60,00	Sigma-Aldrich USA p2191-	Nanopartikül hazırlamada kullanılmıştır.
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	Merck, Darmstadt, Almanya	Hücre kültüründe pasajlamada kullanılmıştır.
Tween 80	Merck, Darmstadt, Almanya	Nanopartikül oluşumunda sürfaktan olarak kullanılmıştır.
Asetik asit	Sigma-Aldrich	Sulforhodamine B boyama yönteminde kullanılmıştır.
DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium)	Gibco® Waltham, Massachusetts, ABD	Hücre kültüründe kullanılmıştır.
TCA (Trikloroasetik Asit)	Thermo Fisher Scientific	Sulforhodamine B boyama yönteminde kullanılmıştır.
Quant-ıT™ RiboGreen™ RNA Reagent	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	Nanopartikül içerisindeki RNA miktarını ölçmede kullanılmıştır.
Silencer® siRNA Construction Kit	Ambion by life Technologies K#AM1620	siRNA üretiminde kullanılmıştır.
Pierce™ Renilla-Firefly Luciferase Dual Assay Kit	Thermo Scientific #K16185	Gen susturma ölçümünde kullanılmıştır.
NucleoSpin® Gel and PCR Clean- up Kit	Macherey-Nagel, # K740609.10 /.50 /.250	PCR ürünlerinin saflaştırılmasında kullanılmıştır.

Tablo 3.2 (Devamı): Kullanılan kit, kimyasal listesi.

TransformAid Bacterial Transformation Kit	Thermo Fisher Scientific, #K2710	Klonlamada kullanılacak bakterileri kompetan hale getirmede ve kompetent bakterilere plazmid transformasyonu için kullanılmıştır.
GeneRuler and O'GeneRuler DNA Ladders	Thermo Scientific	PCR ürününün boyunu tespit etmede DNA markörü olarak kullanılmıştır.
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	ZYMO RESEARCH #KD4036, D4019, D4020 & D4037	Plazmidlerin izolasyonunda kullanılmıştır
Phusion Flash HighFidelity PCR Master Mix Thermo	Thermo Fisher Scientific, #F-548S	Hedef gen bölgesinin PCR yöntemiyle çoğaltılmasında kullanılmıştır.
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Fisher Scientific, #K1422	PCR ürünü ile vektörün birleştirilmesinde kullanılmıştır.
Lentifectin™	Applied Biological Materials Inc.	Rekombinant DNA'nın hücre kültürüne gönderilmesinde kullanılmıştır.
PVA (Polivinil Alkol)	Sigma #363073	Nanopartikül hazırlamada kullanılmıştır.
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma #159220	RNase-free su hazırlamakta kullanılmıştır.

3.1.3 Enzimler

Tez aşamasında kullanılan enzimler aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Tablo 3.3: Kullanılan enzimlerin listesi.

Enzim Adı	Marka	Kullanım amacı
Taq DNA polimeraz	Thermo Fisher Scientific	PCR ürünlerinin 3' ucuna dATP eklenmesinde kullanılmıştır.
Alkalin fosfataz	Thermo Fisher Scientific	Restriksiyon enzimleri ile kesilen vektörün defosforilasyonunda kullanılmıştır.

Tablo 3.3 (Devamı): Kullanılan enzimlerin listesi.

XhoI, PstI	Thermo Fisher Scientific	PCR ürünleri ve vektörlerin restriksiyon endonükleaz kesiminde kullanılmıştır.
T4 DNA ligaz	Thermo Fisher Scientific	Restriksiyon enzimleri ile kesilen parçaların birleştirilmesinde kullanılmıştır.
Lizozim	Vivantis Technologies	Bakteri hücre duvarının parçalanmasında kullanılmıştır.
Ligasyon enzimleri	Thermo Fisher Scientific	PCR ürünü ile vektörün birleştirilmesinde kullanılmıştır.

3.1.4 Mikroorganizma

- **Escherichia coli One Shot® Mach1™-T1R kompetan hücreleri;**
(Thermo Fisher Scientific)

Escherichia coli suşuna aittir. Klonlama konakçısı ve klonlanan genin çoğaltılmasında kullanılmıştır.

3.1.5 PCR primerleri

Klonlanacak GPR87 gen bölgesinin PCR ile çoğaltılmasında kullanılmıştır. Primer3 programıyla tasarlanan primerlerin USCS In silico-PCR, Primer Design and Search Tool ve PCR Primer Stats biyoinformatik uzantılarıyla kontrolleri yapılmıştır. Kontrolleri yapılan primerler Sentromer DNA Teknolojileri (İstanbul) firması tarafından sentezlenmiştir.

Tablo 3.4: GPR87 geni için tasarlanan primer ve özellikleri.

Oligo adı	Baz Dizisi 5'-3'	Baz sayısı	Tm (°C)
GPR87- Forward	tactcgAGGGAACCTAGTAGCCTGTGGG	23	63.32
GPR87- Reverse	atctcgaGCTTATCAGCCCAAGGAACACGA	23	63.04

3.1.6 siRNA oligonükleotid kalıbı

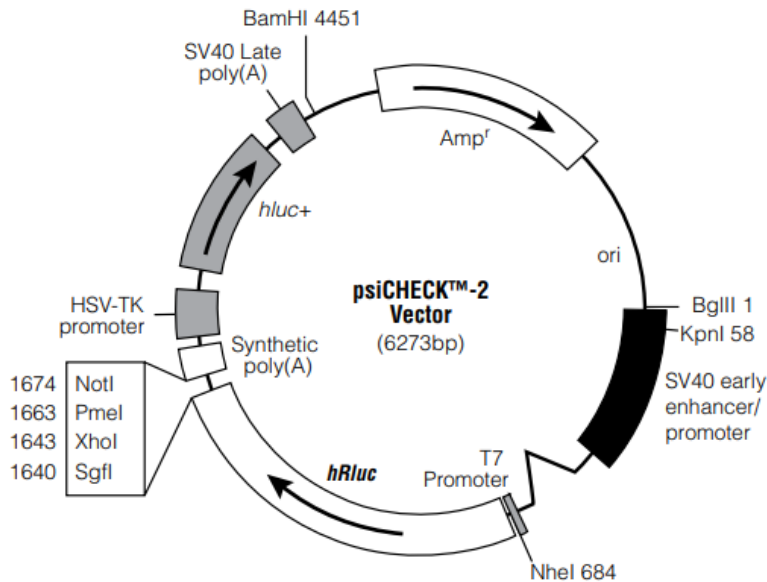
Silencer® siRNA Construction Kit protokolü doğrultusunda Custom Dicer-Substrate siRNA (DsiRNA) programıyla sense ve antisense siRNA oligonükleotitleri dizayn edilmiştir. siRNA üretiminde kullanılacak olan DNA oligonükleotit templateleri Sentromer DNA Teknolojileri (İstanbul) firması tarafından sentezlenmiştir.

Tablo 3.5: GPR87 geni için tasarlanan primer ve özellikleri.

siRNA Oligo Template	Baz Dizisi 5'-3'	Baz sayısı
Sense siRNA oligonucleotide template	CCTTGGTACTTCAAGTTTATTCTCTCCTGTCTC	23
Antisense siRNA oligonucleotide template	AGAGAATAAACTTGAAGTACCAAGGCCTGTCTC	33

3.1.7 Vektör sistemi

PsiCHECK™-2 vektörü (Promega, Cat.#C8021) GPR87 geninin klonlanmasında ve hücrelere aktarılmasında kullanılmıştır.



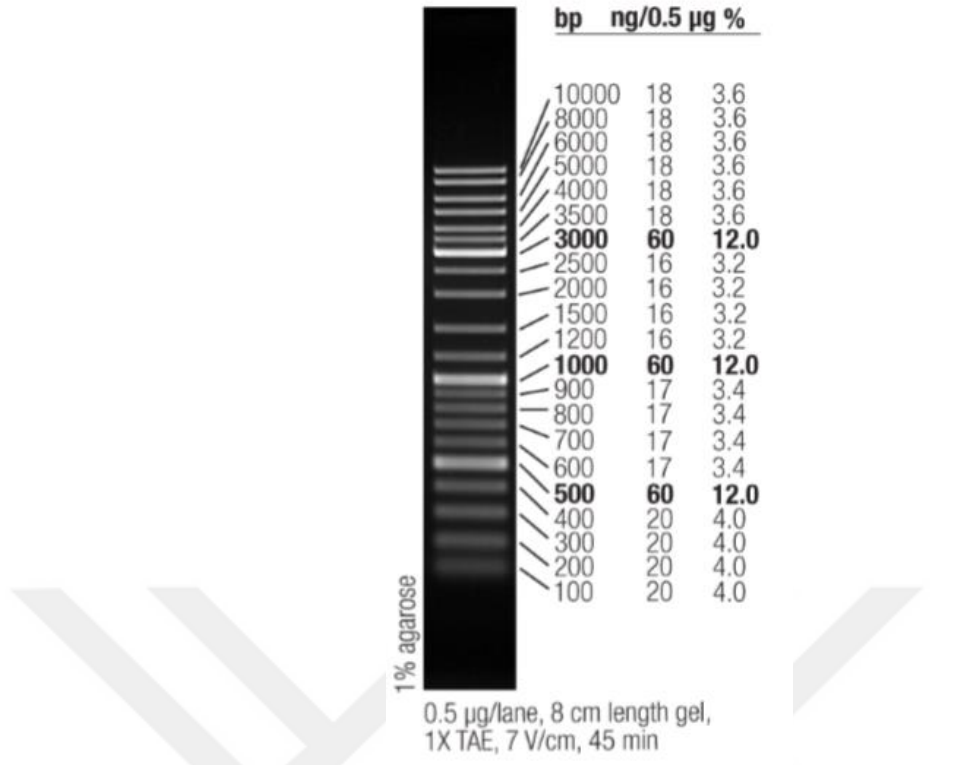
Şekil 3.1: psiCHECK™-2 vektör haritası.

Tablo 3.6: psiCHECK™ -2 Vektör dizisinin referans noktaları.

Özellik	Baz pozisyonu
SV40 early enhancer/promoter	7–425
Chimeric intron	489–621
T7 RNA polymerase promoter	666–684
Synthetic Renilla luciferase gene (hRluc)	694–1629
Çoklu klonlama bölgesi (MCS)	1636–1680
Synthetic poly(A)	1688–1736
HSV-TK promoter	1744–2496
Synthetic firefly luciferase gene (hluc+)	2532–4184
SV40 late poly(A)	4219–4440
β -lactamase (Ampr) coding region	4587–5447

3.1.8 DNA Markerları

DNA markörü olarak “Thermo Scientific O'GeneRuler DNA Ladder Mix (#SM1173)” kullanılmıştır.



Şekil 3.2: Thermo Scientific O'GeneRuler DNA Ladder Mix.

3.1.9 Tampon ve çözeltiler

3.1.9.1 Büyütme medyumları

➤ LB (Luria Bertani) broth besiyeri

Sigma-Aldrich firmasından alınan besiyerinin içerisinde 10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L maya ekstraktı bulunur. 1 L LB besiyeri hazırlanırken 1 L distile su üzerine 20 g LB broth tozu eklenip 120°C'de 20 dakika otoklav ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan stok çözelti daha sonraki kullanımlar için buzdolabına (+4°C) kaldırılmıştır.

➤ LB (Luria Bertani) -Ampisilin agar

Ampisilin içeren LB agar medyumunu hazırlanırken sıcaklığı yaklaşık 55°C'ye düşmüş 200 mL LB agar üzerine 200 µL ampisilin ilave edilir. Hafifçe karışması sağlandıktan sonra eşit hacimlerde steril petri kaplarına dökülmüştür. Donarak katı forma geçen medyumlar daha sonra kullanılmak üzere buzdolabına (+4 °C) kaldırılmıştır.

➤ **Ampisilin stok çözeltisi**

100 mg/mL ampisilin distile su içerisinde çözdürülerek stok çözelti hazırlanır. Hazırlanan stok çözelti filtreden geçirildikten sonra 1,5 mL'lik küçük hacimlere ayrılır. Daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuya (-20°C) kaldırılmıştır.

➤ **%10 FBS besiyeri**

%10 FBS (Fetal bovine serum), %89 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (4.5 g/Lglukoz) %1 Penisilin/Streptomisin kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri kullanılana kadar buzdolabında (+4 °C) bekletildi.

3.1.9.2 Agaroz jel elektroforezi çözeltileri

➤ **10X TAE (Tris Aceticacid Edta) tamponu**

48.4 g Tris [tris(hydroxymethyl)aminomethane] bazı, 3.7 g EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit), 11.4 mL glasiyal asetik asit (17.4 M) 1 L distile su içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin pH değeri 8,4 olarak ayarlanır.

➤ **%1 agaroz jel çözeltisi**

1 g agaroz tartılarak 100 mL TAE tamponunda çözdürülmüştür. Üzerine 1 µL etidyum bromür eklenerek hazırlanmıştır.

➤ **1 Molar (M) Tris pH 8,8**

81,65 g Tris base 800 mL distile su içerisinde karıştırıcı yardımıyla çözdürülür. Çözdürme işleminden sonra pH değeri 1 milimolar (mM) HCl ile 8,8'e ayarlanır. Ph ayarlamasının ardından üzerine 1 olacak şekilde distile su ile tamamlanır.

➤ **6X Loading tamponu**

%60 gliserol, % 0,03ksilen siyanol FF, 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), %0,03 bromofenol mavisi ve 60 mM EDTA içeren boyadır. Elektroforez sırasında DNA ile birlikte jel kuyucuklarına yüklenir.

3.1.9.3 Nanopartikül sentezinde kullanılan çözeltileri

➤ Tween 80 çözeltisi

19 mL DEPC (dietilpirocarbonat) su içerisinde 1 mL twen-80 homojenizatörde karıştırılarak stok çözelti hazırlanmıştır.

➤ % 2(W/V)'lik PVA (Polivinil alkol) çözeltisi

100mL DEPC (dietilpirocarbonat) su içerisinde 2 gr PVA eklenerek ultrasonik banyoda 60°C 'de çözdürülerek hazırlanmıştır.

➤ Tris-EDTA (TE Buffer) stok çözeltisi pH 8,8

0,5 M pH 8 1 mL EDTA ve 1 M pH 8,8 5 mL Tris kullanılarak son pH 8,8 olacak şekilde hazırlanır. Hazırlanan çözeltinin üzerine 496 mL DEPC (dietilpirokarbonat) su eklenerek hazırlanmıştır.

➤ BSA (Bovine serum albumin)-Tris-EDTA stok çözeltisi (1 mL)

7,2 mg BSA (Bovine serum albümin) 1 mL Tris-EDTA (pH 8,8) içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır.

➤ RNase-free Su

2 lt dH₂O içerisine 2 mL DEPC (Diethyl pyrocarbonate) eklenerek çeken ocak altında 24 saat bekletilmiştir. Hazırlanan %2(w/v) Diethyl pyrocarbonate (DEPC)-H₂O tüm deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.9.4 Sitotoksosite testinde kullanılan çözeltiler

➤ %20 TCA (Trikloroasetik Asit)

20 gr TCA tartılarak 100 mL ddH₂O içerisinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

➤ %1 Asetik asit çözeltisi

1 mL asetik asit 99 mL dH₂O üzerine dikkatlice eklenerek hazırlanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 PCR primeri tasarımı

Literatür taraması sonucunda primerlerin tasarımı için referans diziler ENSEMBLE ‘dan alındı.

Gene: GPR87 ENSG00000138271

Name GPR87 (HGNC Symbol)

G protein-coupled receptor 87 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4538]

Gene Synonyms: GPR95

Location: Chromosome 3: 151,294,086-151,316,952

```
//CTGTAAGGGAACCTAGTAGCCTGTGGGCATGCTTGCCAAGCACTGAAGTCCTATCTCCCACTTCTCCTA  
CAGATAACGAGCTGCACGGCCAAGAGAGTCACAATTCAGGCAACAGGAGCGACGGGCCAGGAAAGAACACCA  
CCCTTCACAATGAATTTGACACAATTGTCTTGCCGGTGCTTTATCTCATTATATTTGTGGCAAGCATCTTGC  
TGAATGGTTTAGCAGTGTGGATCTTCTTCCACATTAGGAATAAAACCAGCTTCATATTCTATCTCAAAAACA  
TAGTGGTTGCAGACCTCATAATGACGCTGACATTTCCATTTGGAATAGTCCATGATGCAGGATTTGGACCTT  
GGTACTTCAAGTTTATCTCTGCAGATACACTTCAGTTTTGTTTTATGCAAACATGTATACTTCCATCGTGT  
TCCTTGGGCTGATAAGCATTGATCGCTATCTGAAGTGGTCAAGCCATTTGGGGACTCTCGGATGTACAGCA  
TAACCTTCACGAAGGTTTTATCTGTTTGTGTTTGGGTGATCATGGCTGTTTTGTCTTTGCCAAACATCATCC  
TAACAAATGGTCAGCCAACAGAGGACAATATCCATGACTGCTCAAAACTTAAAAGTCCCTTTGGGGGTCAAAT  
GGCATAACGGCAGTCACCTATGTGAACAGCTGCTTGTGTTGTGGCCGTGCTGGTGATTCTGATCGGATGTTACA  
TAGCCATATCCAGGTACATCCACAAATCCAGCAGGCAATTCATAAGTCAGTCAAGCCGAAAGCGAAAACATA  
ACCAGAGCATCAGGGTTGTTGTGGCTGTGTTTTTTACCTGCTTTCTACCATATCATTGTGCAGAATTCCTT  
TTACTTTTAGTCACTTAGACAGGCTTTTAGATGAATCTGCACAAAAAATCCTATATTACTGCAAAGAAATTA  
CACTTTTCTTGTCTGCGTGTAATGTTTGCCGGATCCAATAATTTACTTTTTTCATGTTAGGTCAATTTTCAA  
GAAGGCTGTTCAAAAAATCAAATATCAGAACCAGGAGTGAAAGCATCAGATCAGTGCAGGAGTGTGAGAAGAT  
CGGAAGTTCGCATATATTATGATTACACTGATGTGTAGGCCTTTTATTGTTTGTGGAATCGATATGTACAA  
AGTGTAATAAATGTTTCTTTTCATTATCCTTGCTTGAGCCCATCAAAA//
```

GPR87 gen bölgesinin çoğaltılması için Primer3 programı ile uygun primerler dizayn edilmiştir. Primer dizaynı yapılırken, primerlerin 5’ ucuna restriksiyon enzimleri olarak kullanılacak olan XhoI endonüklezlarına uygun tanıma bölgeleri yerleştirilmiştir.

```
ta|ctcgAGGGAACCTAGTAGCCTGTGGGCATGCTTGCCAAGCACTGAAGTCCTATC  
TCCCACTTCTCCTACAGATAACGAGCTGCACGGCCAAGAGAGTCACAATTCAGGCA  
ACAGGAGCGACGGGCCAGGAAAGAACACCACCCTTACAATGAATTTGACACAATTG  
TCTTGCCGGTGCTTTATCTCATTATATTTGTGGCAAGCATCTTGCTGAATGGTTAG
```

CAGTGTGGATCTTCTTCCACATTAGGAATAAAACCAGCTTCATATTCTATCTCAAAA
ACATAGTGGTTGCAGACCTCATAATGACGCTGACATTTCCATTTGGAATAGTCCATG
ATGCAGGATTTGGACCTTGGTACTTCAAGTTTATTCTCTGCAGATACACTTCAGTTT
TGTTTTATGCAAACATGTATACTTCCATCGTGTTCCTTGGGCTGATAAGCtctgaga

t

Primer tasarımı yapıldıktan sonra primerlerin kontrolleri USCS-InSilico PCR ve BiSearch.enzyme biyoinformatik sayfaları kullanılarak yapıldı. Kontrolleri yapılan primerler Sentromer DNA Teknolojileri(İstanbul) firmasına sipariş verildi.

HPLC saflaştırma metoduyla üretilen primerler liyofilize olarak teslim alındı. Teslim alınan primerler son konsantrasyonları 100 pmol/µl olacak şekilde distile su ile sulandırıldı. 100 pmol/µl stok primerlerin 1/10 sulandırılması suretiyle 10 pmol/µl olacak şekilde hazırlandı. Forward ve reverse primerler PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere derin dondurucuya (-20°C) kaldırılmıştır.

GPR87 dizisi için Sentromer DNA Teknolojileri(İstanbul) firmasından satın alınan primerler Tablo 3-7’de gösterilmiştir.

Tablo 3.7: GPR87 geni için tasarlanan primerler.

	Sequence (5'->3')	Template strand	Uzunluk	Start	Stop	Tm	GC %
Forward primer	tactcgAGGGAACCTAG TAGCCTGTGGG	Plus	23	5	27	63. 32	56. 52
Reverse primer	atctcgaGCTTATCAGCC CAAGGAACACGA	Minus	23	447	425	63. 04	52. 17

3.2.2 GPR87 geninin klonlanması

3.2.2.1 GPR87 geninin eldesi ve PCR ile çoğaltılması

HEK 293T hücre hattı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyoloji anabilim dalından temin edildi. HEK 293T hücre hattı kullanılarak genomik DNA’dan PCR ile GPR87 geninin amplifikasyonu sağlandı. GPR87 genini PCR ile çoğaltmak için Phusion Flash High-Fidelity PCR Master kiti kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Amplifikasyon için gerekli bileşenler Tablo 3-8’de ve PCR döngüsü Tablo 3-9’de gösterilmiştir.

Tablo 3.8: GPR87 için PCR Prtotokolü.

Bileşen	Miktar
Master mix	10 µl
Primer (F+R)	2 µl
Genomik DNA	1 µl
dH ₂ O	7 µl
Toplam	20 µl

Tablo 3.9: GPR87 için PCR Prtotokolü.

Basamaklar	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	98°C	2 dakika	
Denatürasyon	98°C	30 saniye	
Bağlanma (annealing)	70°C	7 saniye	32 döngü
Uzama (extension)	72°C	15 saniye	
Final uzama	72°C	5 dakika	

PCR işlemi tamamlandıktan sonra hedef genin doğru şekilde çoğalıp çoğalmadığını kontrol etmek için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. %1'lik agaroz jele 5 µl DNA markörü, 3 µL DNA yükleme boyaması, 10 µL PCR ürünü yüklenerek 127 mA, 100 V'de 20 dk yürütülmüştür. Jel görüntüleme sistemi ile PCR ürünün büyüklüğü tespit edilmiştir.

3.2.2.2 PCR ürününün saflaştırılması

PCR ürünü NucleoSpin® Gel and PCR Clean- up Kit ile pürüfiye edilmiştir.

Pürifikasyon aşamasında sırasıyla aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

- DNA bağlanma koşulları ayarlandı.

Hacim < 30 µL altında ise 50–100 µL dH₂O eklenerek hacim artırıldı.

Elimizde bulunan örneğin iki katı olacak şekilde Buffer NTI eklendi.

- NucleoSpin® Gel and PCR Clean- up kolonu uygun bir vakum manifoldu üzerine yerleştirildi. Kolunun kapağı kapatılmadan 700 µL örnek eklendi. Vakum - 0.2 to - 0.4 bar arasında olmasında dikkat edildi. Yaklaşık bir dakika bekletildi.
Örnek temizleme kolonunu geçtiğinde vakum boşaltıldı.
- Temizleme kolonuna 700 µL Buffer NT3 eklendi. Tekrar vakumlanarak bufferın geçmesi sağlandı.
- Kolonda bulunan silika membranın kuruması ve Buffer NT3'den tamamen arındırılması amacıyla 11,000 x g 1 dakika santrifüjlendi.
- NucleoSpin® Gel and PCR Clean- up kolonu yeni 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Üzerine 15–30 µL Buffer NE eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 11,000 x g 1 dakika santrifüj edilerek DNA tüpte toplandı.

Elde edilen PCR ürünün miktarını ve saflığını tespit etmek amacıyla Thermo Scientific™ Multiskan™ GO ile 260-280 nm dalga boylarında ölçülmüştür.

3.2.2.3 PCR ürünü ve vektörün restriksiyon kesimi

PCR ürünü (Insert) kesimi

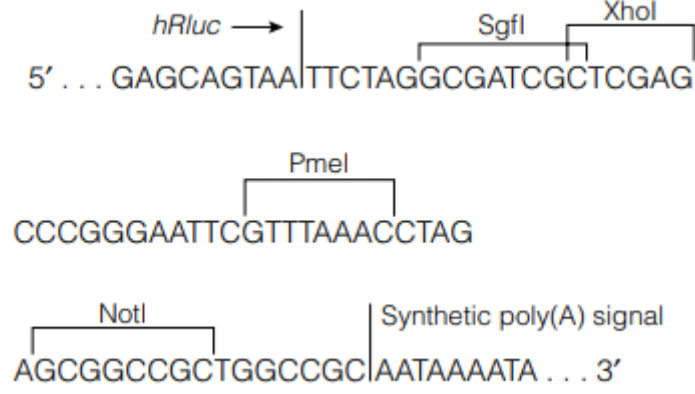
Restriksiyon enzimleri olan XhoI ile 5' ve 3' ucundan kesilerek ligasyona hazır hale getirilmiştir.

Tablo 3.10: Insert restriksiyon kesim işlemi madde miktarları.

Bileşen	Miktar
10x buffer	10
XhoI	5
dH ₂ O	45
DNA	40
Toplam	100 µl

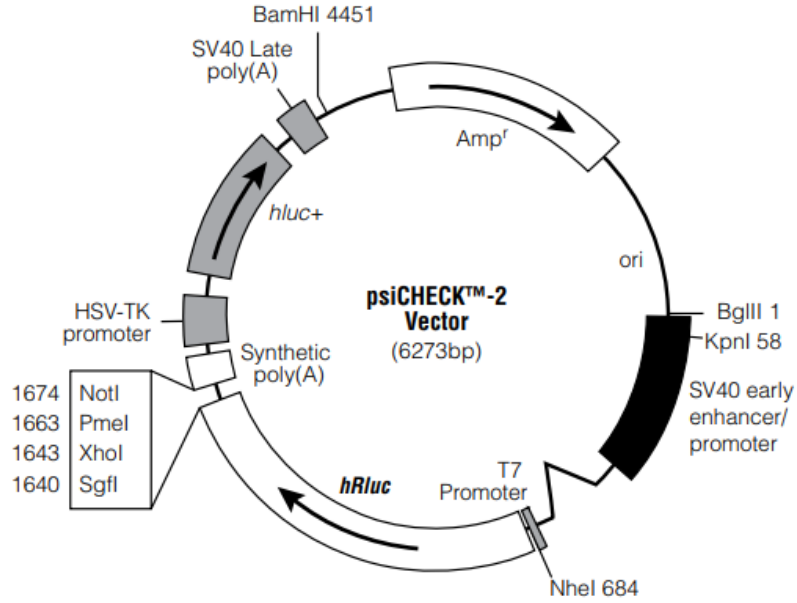
Vektör restriksiyon kesimi

psiCHECK™-2 vektörü çoklu klonlama bölgesinden restriksiyon enzimi XhoI ile kesilmiştir.



Şekil 3.3: psiCHECK™-2 vektörünün çoklu klonlama bölgesi.

psiCHECK™-2 vektörünün gen dizisi:



Şekil 3.4: psiCHECK™-2 vektörünün haritası.

Tablo 3.11: Vektör psiCHECK™-2 defosforilasyon işlemi madde miktarları.

Bileşenler	Miktar
Vektör (psiCHECK™-2)	12 µl
Enzim XhoI	1 µl
dH ₂ O	7 µl
Restriksiyon enzim Tamponu	5 µl
Toplam	25 µl

Vektör defosforilasyonu

Vektörün kendi üzerine kapanmasını engellemek için alkalen fosfataz enzimi kullanılarak 5' ucunda bulunan fosfat grupları koparılmıştır. Rapid DNA Ligation Kit içerisinde bulunan alkalen fosfataz enzimi ile defosforilasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Vektör defosforile işlemi için PCR cihazı içerisine yerleştirilip 37 °C'de 10 dakika bekletilmiştir. Sonrasında enzimin inaktivasyonu amacıyla 72°C'de 10 dakika bekletilmiştir.

Tablo 3.12: Vektör psiCHECK™-2 defosforilasyon işlemi madde miktarları.

Bileşen	Miktar
Enzim	8 µl
Tampon	12 µl
DNA	40 µl
dH ₂ O	40 µl
Toplam	100 µl

PCR ürünü ve defosforile edilen vektör yukarıdaki yöntemle NucleoSpin® Gel and PCR Clean- up Kit ile pürüfiye edilmiştir.

3.2.2.4 psiCHECK™-2 ve GPR87 geninin ligasyonu

Defosforile edilen plazmid DNA ve kesilen GPR87 geni ligasyonu yapılmıştır. Ligasyon işlemi vektör-insert molar oranı 1:1,1:3, 1:0 olarak "Rapid DNA Ligation Kit" ile üç ayrı karışım hazırlanmıştır. 1:3 oranında hazırlanan ligasyon karışımından 5 µL alınarak bir sonraki transformasyon işlemine geçilmiştir.

Tablo 3.13: Vektör psiCHECK™-2 defosforilasyon işlemi madde miktarları.

	1:1 oranı	1:3 oranı	1:0
Rapid DNA ligasyon tamponu	4 µl	4 µl	4 µl
Vektör (psiCHECK™-2)	2 µl	2 µl	2 µl
İnsert DNA (GPR87)	2 µl	6 µl	-
T4 DNA ligaz	1 µl	1 µl	1 µl
dH ₂ O	11 µl	7 µl	12 µl
Toplam	20 µl	20 µl	19 µl

psiCHECK™-2 -GPR87 baz dizisi içerisindeki kesim bölgeleri ve ligasyonu:

```
//TGAAGAACGAGCAGTAATTCTAGGCGATCGCTCgAGGGAACCTAGTAGCCTGTGG  
GCATGCTTGCCAAGCACTGAAGTCCTATCTCCCACCTTCTCCTACAGATAACGAGCT  
GCACGGCCAAGAGAGTCACAATTCAGGCAACAGGAGCGACGGGCCAGGAAAGAACAC  
CACCCTTCACAATGAATTTGACACAATTGCTTTGCCGGTGCTTTATCTCATTATATT  
TGTGGCAAGCATCTTGCTGAATGGTTTAGCAGTGTGGATCTTCTTCCACATTAGGAA  
TAAAACCAGCTTCATATTTCTATCTCAAAAACATAGTGGTTGCAGACCTCATAATGAC  
GCTGACATTTCCATTTTGAATAGTCCATGATGCAGGATTTGGACCTTGGTACTTCAA  
GTTTATTCTCTGCAGATACACTTCAGTTTTGTTTTATGCAAACATGTATACTTCCAT  
CGTGTTCCCTGGGCTGATAAGctcGAGACAACCAGCTATCACACACGGAGCGGCCGC  
TGGCCGCAATAAAATATCTTTATTTTATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGA  
GGATCTAAAT//
```

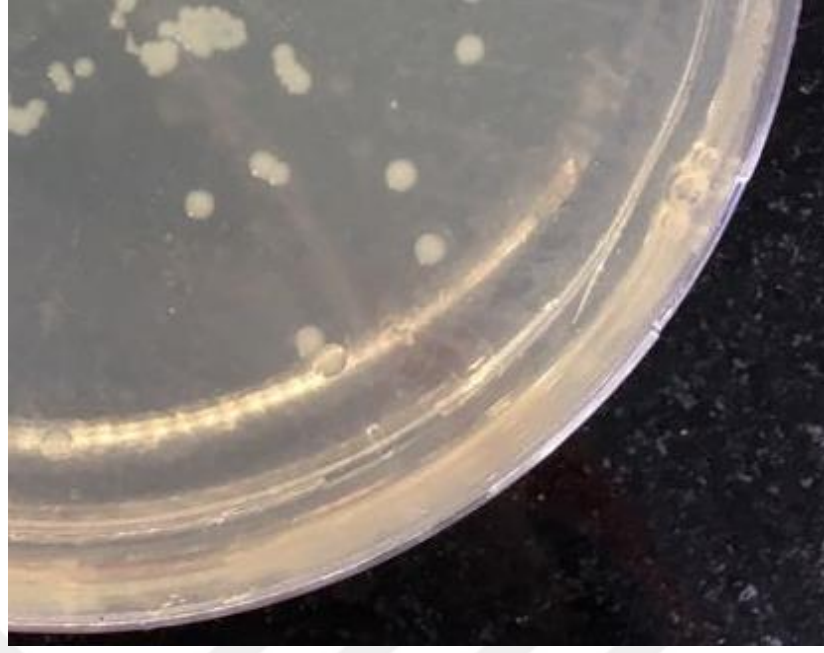
3.2.2.5 Transformasyon

PCR ürünleri ile birleştirilerek rekombinant hale getirilen psiCHECK™-2 vektörü (psiCHECK™-2+GPR87), “TransformAid Bacterial Transformation Kit” ile kompetan hale getirilmiş *E. coli One Shot® Mach1™-T1R* hücrelerine aktarılmıştır. Kit protokolünde küçük değişiklikler yapılarak aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır:

- 1.5 mL LB broth besiyerine 5 µL *E. coli* One Shot® Mach1™-T1R hücreleri transformasyondan bir gün önce steril koşullarda inoküle edilmiştir. 37°C, 260 rpm’de inkübatörlü çalkalayıcıda gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.
- Ertesi gün taze hazırlanan kültürden 150 µL alınarak 1 mL “C-medium”un olduğu başka bir tüpe inoküle edilmiştir. 37°C, 260 rpm’de yaklaşık 3 saat inkübatörlü çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Belirgin bir bulanıklığa ulaşması beklenmiştir.
- Transformasyon işlem basamaklarına başlamadan önce hazırlanan ampisilinli LB agar 37°C’deki etüvde, hazırlanan “T-solution (A)” ve “T-solution (B)” 250 µL eşit hacimlerde alınıp karıştırılarak buz üstünde inkübasyona bırakılmıştır.
- Yeteri kadar kültüre olan hücreler 15000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atılmıştır.
- Santrifüj sonrası oluşan peletin üzerine 300 µL T solüsyonu karışımı eklenip buz üzerinde 5 dakika bekletilmiştir. Sonra tekrar 15000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atılmıştır.
- Santrifüj sonrası oluşan peletin üzerine 120 µL T solüsyonu karışımı eklenmiştir. Daha sonra buz üzerinde 5 dakika bekletilmiştir.
- Buz üzerinde 3 dakika bekletilmiş ligasyon karışımından 5 µL, T solüsyonları ile muamele edilmiş hücrelerden 80 µL alınıp ayrı bir tüpte karıştırılarak buz üzerinde 30 dakika bekletilmiştir.
- Son aşamada ise, oda sıcaklığında üzerine 50 µL X-gal yayılmış ampisilinli LB agar üzerine steril koşullarda 50µL bakteri ekimi yapılmıştır. Ekimi tamamlanan petri kapları 37°C’deki etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

Koloni seçimi

Antibiyotik direnç seçiciliği ile rekombinant vektörleri hücre içerisine alan bakteriler seçilmiştir. Bu tekniğe göre, rekombinant vektörleri alarak transforme dirençli olan hücreler petride çoğalarak koloni oluşturmaktadır. Oluşturulan bu koniler Şekil 3-5’de olarak görüldüğü şekildedir.



Şekil 3.5: Rekombinant vektörü (psiCHECK™-2+GPR87) olarak transforme olan bakteri kolonileri.

İnkübasyon sonra (+) kontrol grubunda görülen sekiz koloni seçilerek ampisilinli LB broth besiyerine aktarılmıştır. 1 mL LB broth besiyerine her bir bakteri kolonisi inoküle edilmiştir. İnkübatörlü çalkalayıcıda 37°C, 260 rpm’de yaklaşık 7 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası transforme olduğu düşünülen kolonilerin gerçekten rekombinant vektörleri alıp almadığını tespit etmek amacıyla için Tablo 3-14’de belirtilen bileşenlerle PCR yapılmıştır.

Tablo 3.14: psiCHECK™-2+GPR87 plazmidlerini alan hücrelerin tespiti için yapılan PCR karışım bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Master mix	10 µl
Primer (F+ R)	0.8 µl
DNA	1 µl
dH ₂ O	8.2 µl
Toplam	20 µl

Tablo 3.15: psiCHECK™-2+GPR87 vektörü için PCR Prtotokolü.

Basamaklar	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95°C	3 dakika	
Denatürasyon	95°C	55 saniye	
Bağlanma (annealing)	68°C	10 saniye	40 döngü
Uzama (extension)	72°C	10 saniye	
Final uzama	72°C	5 dakika	

PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş jel görüntüleme sistemiyle hedef bandı veren koloni seçilmiştir.

Seçilen kolonilerdeki plazmidlerin izolasyonu “Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit” protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

Kit protokolüne göre izolasyon aşamasında aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

- LB mediumda bulunan bakteri kültüründen 600 µL alınarak 1.5 mL’lik mikrosantrifüj tüpüne koyulmuştur.
- Mikrosantrifüj tüpüne 100 µL 7X Lysis Buffer eklenerek 4-6 defa nazikçe çalkalanır. Bu işlem Lysis Bufferın mavi rengi kaybolana kadar ortalama 2 dakikada bitirilerek sonraki basamağa geçilmiştir.
- Üzerine 350 µL soğuk sarı Neutralization Buffer eklenerek çalkalanır. Örnek tekrar sarı renk alıp nötralizasyon tamamlandığında ve sarımsı bir pelet oluştuğunda çalkalama işlemi tamamlanır.
- 15,000 x g’ de 2-4 dakika santrifüj edilmiştir.
- Alt kısımda bulunan pelete dokunulmadan kitin içerisinden çıkan Zymo-Spin™ IIN kolonuna supernatant aktarılır.
- Kolon bir toplama tüpüne yerleştirilir ve 15 saniye santrifüj edilir.
- Kolonun altında biriken sıvı atılarak kolon yeni bir toplama tüpüne alınır.
- Kolona 200 µL Endo-Wash Buffer eklenir. 30 saniye santrifüjlenir.
- Kolona 400 µL Zyppy™ Wash Buffer eklenerek 1 dakika santrifüjlenir.
- Transfer kolonu 1.5 mL’lik mikrosantrifüj tüpüne alınır. Üzerine 30 µL Zyppy™ Elution Buffer2 eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika bekletilmiştir.
- Plazmidi ayırtırmak için 30 saniye santrifüj edilir.

- Santrifüj sonrası süzöntü içerisinde bulunan plazmidlerin kalitesi ve miktarı Thermo Scientific™ Multiskan™ GO spektrofotometre ile belirlenmiştir.

PCR ürünlerinin psiCHECK™-2 vektörüne ters mi düz mü girdiğini anlamak için izole edilen plazmidler PstI restriksiyon enzimi kesilmiştir. PstI restriksiyon enzimi ile kesimi Tablo 3-16’da verilen bileşenlerle 37°C’de 10 dakika inkübe edilerek gerçekleşmiştir.

Restriksiyon enzimiyle kesilen plazmidlerin agaroz jel elektroforezi (170 mA 170 V 25 dakika) ile bant büyüklüğü tespit edilmiştir. Vektöre düz bir şekilde girdiği tespit edilen rekombinant plazmidlerle çalışmalara devam edilmiştir.

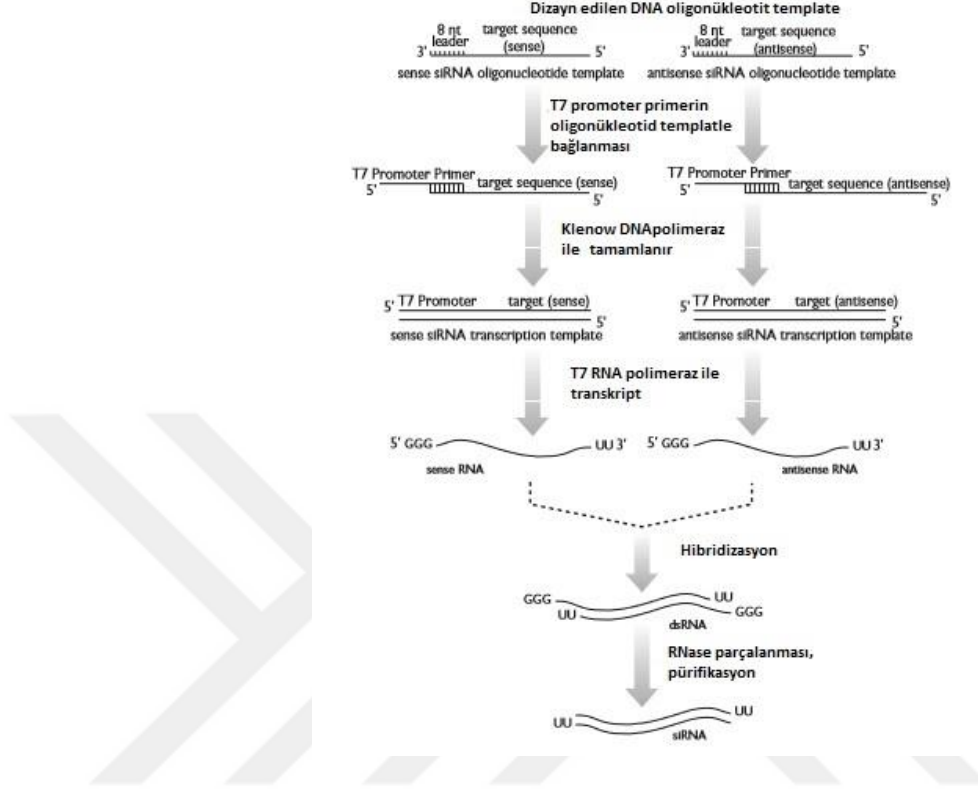
Tablo 3.16: psiCHECK™-2+GPR87 plazmidlerinin PstI restriksiyon enzimi ile kesimi.

Bileşen	Miktar
Buffer(10X)	2 µl
PstI enzimi	1.5 µl
DNA	12.5 µl
dH ₂ O	4 µl
Toplam	20 µl

PCR ürününün vektöre düz girdiği tespit edilen hücreleri çoğaltılmak amacıyla 30 µL ampisilin eklenerek hazırlanan 1 mL LB Broth besiyerine 10 µL bakteri eklenerek inkübatörlü çalkalayıcıda 37°C 200 rpm’de kültüre edilmiştir. Ertesi gün yeterince ürediği gözlenen bakterilerden “Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit” protokolüne uygun olarak plazmidlerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Plazmidlerin kalitesi, miktar ve konsantrasyonu Thermo Scientific™ Multiskan™ GO spektrofotometre ile belirlenmiştir.

3.2.3 siRNA üretimi

“Silencer® siRNA Construction Kit” protokolüne uygun olarak siRNA üretimi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6: siRNA üretim protokolü.

3.2.3.1 siRNA için Oligonükleotit kalıp tasarımı

siRNA üretimi için gerekli olan DNA oligonükleotit template Custom Dicer-Substrate siRNA (DsiRNA) programı kullanılarak tasarlanmıştır. Hedef mRNA dizisine uygun tasarlanan templatede T7 Promoter primerin bağlanması ve transkripsiyonun daha etkili olması için 3' ucuna CCTGTCTC dizisi eklenmiştir.

Sequence Strand

5' CCUUGGUACUUCAAGUUUAUUCUCT 3' +

5' AGAGAAUAAACUUGAAGUACCAAGGUC 3' -

Sequence Strand

5' CCTTGGTACTTCAAGTTTATTCTCT **CCTGTCTC** 3' + (Sense)

5' AGAGAATAAACTTGAAGTACCAAGG **CCTGTCTC** 3' - (Antisense)

Dizayn edilen siRNA hedef mRNA dizisiyle eşleştirilerek kontrolü sağlanmıştır.

GPR87 baz dizisi:

CTGTAAGGGAACCTAGTAGCCTGTGGGCATGCTTGCCAAGCACTGAAGTCCTATCTCCCCACTTCTCCTACA
GATAACGAGCTGCACGGCCAAGAGAGTCACAATTCAGGCAACAGGAGCGACGGGCCAGGAAAGAACCACC
CTTCACAATGAATTTGACACAATTGTCTTGCCGGTGTCTTATCTCATTATATTTGTGGCAAGCATCTTGCTG
AATGGTTTAGCAGTGTGGATCTTCTTCCACATTAGGAATAAAAACCAGCTTCATATTCTATCTCAAAAACATA
GTGGTTGCAGACCTCATAATGACGCTGACATTTCCATTTGGAATAGTCCATGATGCAGGATTTGGACCTTGG
TACTTCAAGTTTATTTCTCTGCAGATACACTTCAGTTTTGTTTTTATGCAAACATGTATACTTCCATCGTGTTT
CTTGGGCTGATAAGCATTGATCGCTATCTGAAGGTGGTCAAGCCATTTGGGGACTCTCGGATGTACAGCATA
ACCTTCACGAAGGTTTTATCTGTTTTGTGTTTGGGTGATCATGGCTGTTTTGTCTTTGCCAAACATCATCCTA
ACAAATGGTCAGCCAACAGAGGACAATATCCATGACTGCTCAAAACTTAAAAGTCC'TTTGGGGGTCAAATGG
CATACGGCAGTCACCTATGTGAACAGCTGCTTGT'TTGGGCCGTGCTGGTGATTCTGATCGGATGTTACATA
GCCATATCCAGGTACATCCACAAATCCAGCAGGCAATTCATAAGTCAGTCAAGCCGAAAGCGAAAACATAAC
CAGAGCATCAGGGTTGTTGTGGCTGTGTTTTTTACCTGCTTTCTACCATATCAC'TTGTGCAGAATTCCTTTT
ACTTTTAGTCAC'TTAGACAGGCTTTTAGATGAATCTGCACAAAAAATCCTATATTACTGCAAAGAAATTACA
CTTTTCTGTCTGCGTGTAATGTTTGCCTGGATCCAATAATTTACTTTTTTCATGTGTAGGTCATTTTCAAGA
AGGCTGTTCAAAAAATCAAATATCAGAACCAGGAGTGAAAGCATCAGATCACTGCAAAGTGTGAGAAGATCG
GAAGTTCGCATATATTATGATTACACTGATGTGTAGGCC'TTTTATTGTTTGTGGAAATCGATATGTACAAAG
TGTAATAAATGTTTCTTTTCATTATCCTTGCTTGAGCCCATCAAAA

Ticari olarak sentromer DNA Teknolojileri(İstanbul) firması tarafından sentezlenen DNA oligonükleotit template kit protokülüne uygun olarak son konsantrasyon 100 µM olacak şekilde nuclease-free su ile sulandırılmıştır.

Sulandırılan oligonükleotit template spektrofotometrede 260 nm okunarak miktarı ve kalitesi kontrol edilmiştir. Çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.2.3.2 Oligonükleotitlerin T7 promoter primer ile hibridizasyonu

Sentezlenen sense ve antisense siGPR87 oligonükleotitleri ayrı tüplerde T7 promoter primer ile Tablo 3-17'de gösterilen bileşenlerle önce 70°C'de 5 dakika ardından oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir.

Tablo 3.17: Oligonükleotit templatın T7 promoter primer ile hibridizasyonu.

Bileşen	Miktar
T7 Promoter Primer	2 µl
DNA Hibridizasyon Buffer	6 µl
Sense- siGPR87	2 µl
Toplam	10 µl

3.2.3.3 Klenow DNA polimeraz ile polimerizasyon

Polimerizasyon için Tablo 3-18’de gösterilen bileşenler eklemiştir.

Tablo 3.18: Klenow DNA polimeraz ile polimerizasyon.

Bileşen	Miktar
10X Klenow Reaction Buffer	2 µl
10X dNTP Mix	2 µl
Nuclease-free Water	4 µl
Exo- Klenow	2 µl
Toplam	10 µl

37°C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.3.4 dsRNA sentezlenmesi

Hazırlanan sense ve anti-sense siGPR87 tüpleri dikkatli bir şekilde birleştirilir. dsRNA sentezlenmesi için Tablo 3-19’da gösterilen maddeler kullanılarak 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Tablo 3.19: Transkripsiyon için gerekli bileşenler.

Bileşen	Miktar
Sense ve antisense siGPR87 template	3 µl
Nuclease-free Water	4 µl
2X NTP Mix	10 µl
10X T7 Reaction Buffer	4 µl
T7 Enzyme Mix	2 µl
Toplam	23 l

3.2.3.5 siRNA pürifikasyonu

Transfeksiyondan önce 5’ ucunda bulunan leader dizisinin ribonükleazlarla çıkarılması gerekir. Ayrıca üretilen siRNA’nın nükleotid, enzim, kısa oligomer ve tuzlardan arındırılması gerekir. Saflaştırma sırasında siRNA kolondan geçerken transfeksiyona hazır hale getirilmiş olur. Gece boyu 37°C’de inkübasyonda bekletilmiş olan dsRNA üzerine Tablo 3-20’de aşağıda belirtilen bileşenler eklenmiştir.

Tablo 3.20: siRNA pürifikasyon bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Digestion Buffer	6 µl
Nuclease-free Water	48.5 µl
RNase	3 µl
DNase	2.5 µl
Toplam	60 µl

Hafifçe çalkalandıktan sonra 37°C’de 2 saat bekletilmiştir.

- %100 etanol eklenerek siRNA Binding Buffer ve siRNA Wash Buffer hazırlanır. Hazırlanan siRNA Binding Buffer’den 400 µL eklenir. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek nükleazların parçalanması sağlanır.
- Önceden 75°C’ye ısıtılan ısı bloğunun üzerine 120 µL Nuclease-free Water eklenerek ısınmaya bırakılır. Bu Nuclease-free Water siRNA’yı filtreden ayrılması için kullanılacaktır.
- Kit içerisinde alınan filtre 1.5 mL’lik ependorf koyularak 100 µL siRNA Binding Buffer ile ıslatılır.
- Islatılan filtrenin üzerine siRNA koyularak 10,000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir. Süzüntünün bulunduğu toplama tüpü atılarak filtre yeni 2 mL’lik ependorf tüpüne alınır.
- Filtrenin üzerine 500 µL siRNA Wash Buffer eklenerek 10,000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.
- Toplama tüpü değiştirilerek ısı bloğundan alınan Nuclease-free Water’dan 100 µL eklenerek oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilir.
- İnkübasyon süresinden sonra 12,000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilerek siRNA saf bir şekilde elde edilmiştir. Elde edilen siRNA’nın temizliğini, miktarını ve konsantrasyonunu ölçmek için UV spektrofotometre ile 260 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuya (-20°C) kaldırılmıştır.

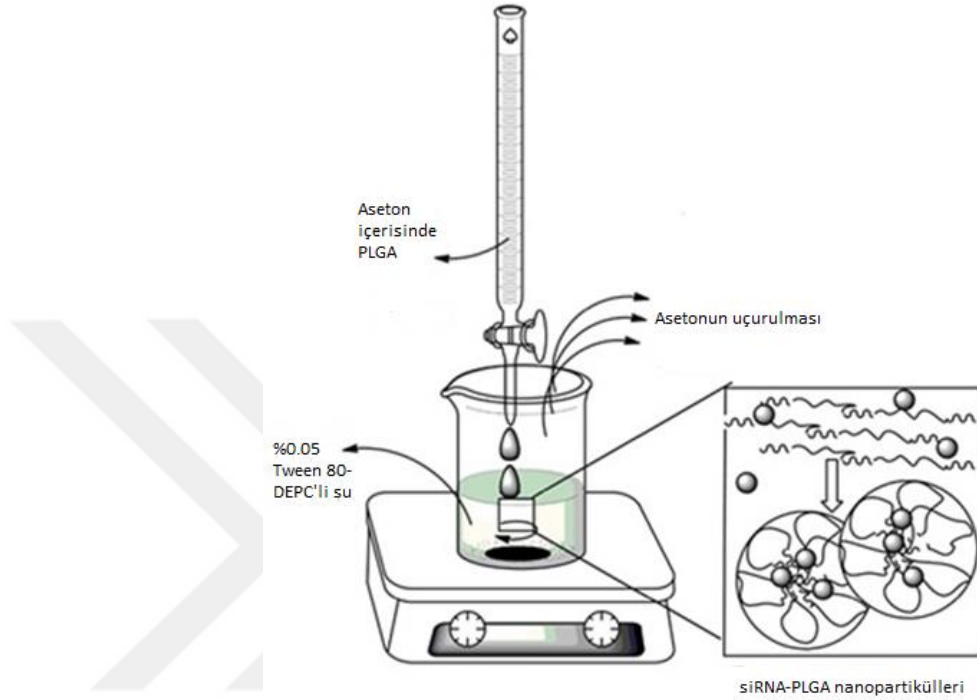
3.2.4 PLGA nanopartiküllerinin Sentezi

Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere farklı formülasyonlar kullanılarak su-yağ-su (water-oil-water (W1/O/W2)) çift emülsiyon çözücü buharlaştırılması yöntemiyle PLGA nanopartikülleri hazırlanmıştır.

En genel hatlarıyla bu yöntemde biyoaktif ajan içeren sulu çözelti polimer içeren organik faz içerisine dağıtılır. Elde edilen su/yağ (w/o) emülsiyonu dış sulu faz içerisinde emülsifiye edilerek w/o/w (water-oil-water) ikili emülsiyonu elde edilir. Elde edilen emülsiyondan çözücü difüzyon veya evaporasyonla [232] uzaklaştırıldıktan sonra terapötik maddenin sulu çözeltisini içeren nanopartikül oluşur [233].

Farklı protokoller kullanılarak hazırlanan süspansiyonlarda santrifüjleme ile saf nanopartiküller elde edilebilir. Ayrıca yıkama yapıldıktan sonra nanopartiküller liyofilize edilerek de kullanılabilir [234].

Hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyonu yapıldıktan sonra *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kullanılmıştır.



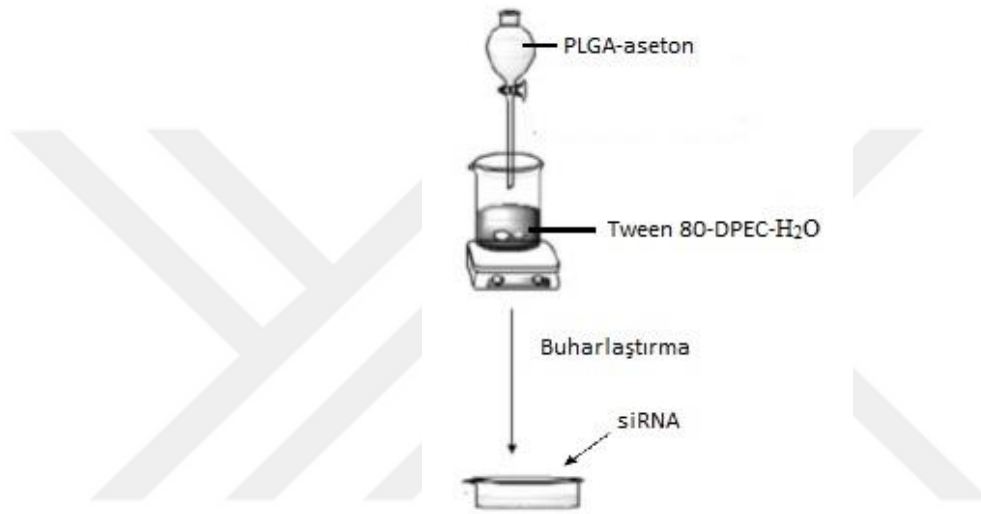
Şekil 3.7: Water-Oil-Water (W1/O/W2) ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle PLGA nanopartiküllerinin oluşumu.

3.2.4.1 siRNA'nın önceden hazırlanmış PLGA nanopartiküllerine yüklenmesi

5 mL aseton içerisinde 50 mg PLGA eklenerek ultrasonik banyoda çözülmüştür (Oil phase). Tween 80 1:20 oranında seyreltilerek stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan stok Tween 80'den 1 mL alınarak 19 ml DEPC (0.2 mg/ml)-H₂O'ya eklenmiştir (Water phase). Tween 80 ve DEPC- H₂O karışımı pipetajla homojenize edildikten sonra içerisine balık atılarak karıştırıcının üzerine alınmıştır. Hazırlanan PLGA-aseton karışımı karıştırıcının üzerinde bulunun Tween 80-DPEC- H₂O' ya yaklaşık 20 cm uzaklıktan şırıngayla damlatılmıştır.

Karıştırıcının üzerinde gece boyunca bırakılarak aseton buharlaştırılmıştır. Elde edilen nanopartikül içeren süspansiyondan 1 mL alınarak Dynamic Light Scattering (DLS) ile nanopartiküllerin boyutu ölçülmüştür.

Hazırlanan nanopartikül süspansiyonundan 1 mL alınarak 1.5 mL'lik ependorfa koyulmuştur. Buz üzerinde bekletilen siRNA'dan 8 µL alınarak ependorfa koyulmuştur. siRNA-PLGA NP- Tween 80-DPEC- H₂O süspansiyonu 2500 rpm'de 30-40 saniye şiddetli vortekslenerek 20-30 saniye buz üzerinde bekletilmiştir. Bu işlem 6 kez tekrarlandıktan sonra oda sıcaklığında yaklaşık 6 dakika bekletilerek siRNA'nın PLGA NP tarafından enkapsülasyonu sağlanmıştır. Bu yöntemle hazırlanan NP siRNA-PLGA-1 olarak adlandırılmıştır.



Şekil 3.8: Nanopartikül oluşumu.

Dynamic Light Scattering (DLS) ile nanopartiküllerin boyutu ölçülmüştür. İstenilen boyutta ve yoğunlukta elde edilen siRNA-PLGA NP'lerini içeren süspansiyon daha sonraki deneysel aşamalarda kullanılmak üzere 25°C' de saklandı.

Boş PLGA NP'leri aynı yöntemler siRNA kullanılmadan hazırlanmıştır.

3.2.4.2 PLGA Nanopartikül sentezi ve vortex ile siRNA yüklenmesi

30 mg PLGA tartılarak 500 µL DCM (Diklormetan)'da çözüldü. 360 µg BSA (Bovine serum albumin) daha önce hazırlanmış olan 50 µL Tris-EDTA (pH 8.8)'da çözüldü. Hazırlanan BSA- Tris-EDTA süspansiyonununa 50 µL (2.5 ng) siRNA eklenerek vortekslendi.

Oda sıcaklığında (25°C) bulunan BSA- Tris-EDTA-siRNA (water phase) üzerine PLGA-DCM çözeltisi (Oil phase) yavaş yavaş damlatılarak ilave edilir.

Elde edilen çözelti 2 dakika şiddetli vortekslenildi. Vortekslenen çözeltinin üzerine hazırlanmış olan %2(w/v) PVA (Polivinil alkol) çözeltisinden 2 mL alınarak 2 dakika vortekslenildi. Elde edilen karışıma 6 mL %2(w/v) PVA (Polivinil alkol) çözeltisi daha eklenmesiyle eklenmesiyle water-oil-water (W1-O-W2) çift emülsiyon çözücü buharlaştırılması yönteminin son basamağında tamamlanmış oldu. Oluşan karışım 3 saat boyunca oda sıcaklığında magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Karıştırıcı üzerinde Self-assembly yöntemiyle NP oluşumu gerçekleştirilmiş oldu. Ortamda bulunan PVA gibi çeşitli yabancı molekülleri uzaklaştırmak ve NP saf elde etmek için +4°C 18000 × g 25 dakika 3 kez santrifüj edilerek süpernant kısmı alındı. Tüpün dibinde kalan pellet haline gelmiş NP DPEC-H₂O ile re-hydrated edildi. Böylece NP oluşumu sırasında ortamda bulunan PVA gibi çeşitli atıklar uzaklaştırıldı ve NP daha saf bir şekilde elde edilmiş oldu. Bu yöntemle hazırlanan NP siRNA-PLGA-2 olarak adlandırılmıştır.

Boş PLGA NP'leri aynı yöntem kullanılarak, siRNA yüklenmeden hazırlanmıştır.

3.2.4.3 PLGA nanopartikül sentezi ve ultrasonic prob ile siRNA yüklenmesi

360 µg BSA (Bovine serum albumin) daha önce hazırlanmış olan 50 µL Tris-EDTA (pH 8.8)'da çözüldü. 30 mg PLGA tartılarak 500 µL DCM (Diklormetan)'da çözüldü. Hazırlanan BSA-Tris-EDTA süspansiyonununa 50 µL (2.5 ng) buz üzerinde siRNA eklenerek vortekslenildi.

Buz üzerinde bulunan BSA-Tris-EDTA-siRNA üzerine (water phase) PLGA-DCM çözeltisi (Oil phase) yavaş yavaş damlatılarak ilave edilir. Böylece su-yağ (W1/O) emülsiyonunun ilk basamağı tamamlandı. Elde edilen çözelti 60 saniye ultrasonik homojenizatörde (2.25MHz, Athena Technology, Titanium Probe) sonike edildi. Sonikasyondan sonra çözeltinin üzerine hazırlanmış olan %2 (w/v) PVA (Polivinil alkol) çözeltisinden 2 mL alınarak (Water phase) 60 saniye daha sonike edildi. Son olarak elde edilen karışıma 6 mL %2 (w/v) PVA (Polivinil alkol) çözeltisinin eklenmesiyle water-oil-water (W1/O/W2) çift emülsiyon çözücü buharlaştırılması yönteminin son basamağında tamamlanmış oldu. Oda sıcaklığında 3 saat boyunca magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak organik fazın uçması ve self-assembly yöntemle NP oluşumu sağlandı. Daha sonra +4°C 18000 × g 25 dakika 3 kez santrifüj edilerek süpernant kısmı alınır. Tüpün dibinde kalan pellet haline gelmiş NP

DPEC-H₂O ile re-hydrated edildi. Böylece NP oluşumu sırasında ortamda bulunan PVA gibi çeşitli atıklar uzaklaştırılır ve NP daha saf bir şekilde elde edilmiş olur. Bu yöntemle hazırlanan NP siRNA-PLGA-3 olarak adlandırılmıştır.

Boş PLGA NP'leri aynı yöntem kullanılarak, siRNA yüklenmeden hazırlanmıştır.

3.2.5 PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonu

Temelde W/O/W yöntemi kullanılarak hazırlanan NP'ler Zetasizer Nano ZSP cihazıyla Dynamic Light Scattering (DLS) Metodu kullanılarak boyut ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Lazer ışık saçılımına dayanan ölçümlerde tek kullanımlık disposable küvetler kullanılmıştır. Yapılan DLS ölçümlerinde NP'lerin boyutu, çapı, yoğunluğu ve PDI (Polydispersity index) sonuçları elde edilmiştir. Her bir örneğin ölçümü 3 kez gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerin her biri 3 dakika arayla 5 kez tekrar edildi [235]. NP'lerin mono-dispersity indeksi ve boyutu sayı (number), hacim (volume) ve yoğunluk (intensity) olarak analiz edildi.

3.2.6 Enkapsülasyon veriminin (%EE) ve yükleme veriminin (LE) Hesaplanması

siRNA-PLGA-1 NP %EE (Enkapsülasyon veriminin) ve LE (Yükleme veriminin) hesaplanması hazırlanmış NP çözeltilerinin liyofilize edilmesinden sonra hesaplanmıştır. Liyofilizasyon (Labogene Scandinavian by design Scanvac CoolSAFE) NP üretildikten ve boyut ölçümleri yapıldıktan sonra -96°C 28 saat 0.038hPa basınçta gerçekleştirilmiştir. Üç farklı yöntemle hazırlanan NP'lerin üzerine 200 µL kloroform koyularak hafifçe vortekslendi. Kloroformda PLGA'nın çözünmesi sağlandıktan sonra üzerine 800 µL Tris-EDTA (pH 8.8) eklenerek siRNA'nın nanoparikülden çıkması sağlanmıştır. Sulu fazda kalan siRNA ve organik fazın ayrılmasını sağlamak için 4°C 18,000 × g 20 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernantant kısımda kalan siRNA Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Reagent kullanılarak siRNA miktarı ölçülmüştür.

Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Reagent kit protolüne uygun olarak high-range (20 ng/mL içerisinde 1 µg/mL RNA) ve low-range (1 ng/mL içerisinde 50 ng/mL RNA) olarak iki ayrı protokol ile ölçülmüştür. 2 µg/mL RNA içeren TE buffer hazırlanmıştır. Hazırlanan RNA high-range (yüksek aralık) için Tablo 3-21 ve low-range (düşük aralık) için Tablo 3-22'de belirtilen şekillerde dilüe edilmiştir.

Tablo 3.21: Yüksek aralık standart eğrisi için hazırlanan protokol.

TE (µL)	2 µg/mL RNA Stoğu (µL)	200 defa seyreltilmiş Quant-iT™ RiboGreen® Reagent (µL)	Quant-iT™ RiboGreen® ölçümünde son RNA konsantrasyonu
0	1,000	1,000	1 µg/mL
500	500	1,000	500 ng/mL
900	100	1,000	100 ng/mL
980	20	1,000	20 ng/mL
1,000	0	1,000	blank

Tablo 3.22: Düşük aralık standart eğrisi için hazırlanan protokol.

TE (µL)	2 µg/mL RNA Stoğu (µL)	200 defa seyreltilmiş Quant-iT™ RiboGreen® Reagent (µL)	Quant-iT™ RiboGreen® ölçümünde son RNA konsantrasyonu
0	1,000	1,000	50 ng/mL
500	500	1,000	25 ng/mL
900	100	1,000	5 ng/mL
980	20	1,000	1 ng/mL
1,000	0	1,000	blank

1.5 mL'lik ependorflarda hazırlanan dilüsyonların üzerine 1 mL Quant-iT™ RiboGreen® reagent eklenmiştir. 4 dakika oda sıcaklığında ışıktan korunarak inkübasyona bırakılmıştır.

ELISA Reader, Synergy- H₁ cihazıyla floresans dalga boyu ölçülmüştür (excitation ~480 nm, emission ~520 nm). Her bir örnek üç kez ölçüldü. Konsantrasyonlar siRNA ve RiboGreen® reagent kullanılarak önceden hazırlanmış olan konsantrasyon eğrisiyle hesaplanmıştır.

Enkapsülasyon verimi(%EE) ve Yükleme verimi (LE) aşağıda gösterilen denklemler kullanılarak hesaplanmıştır [236].

$$EE\% = \frac{\text{PLGA içerisinde bulunan siRNA}}{\text{Toplam kullanılan siRNA}} \times 100$$

$$LE = \frac{\text{PLGA içerisinde bulunan siRNA (ng)}}{\text{PLGA'nın ağırlığı (mg)}}$$

3.2.7 siRNA-PLGA-1 nanopartiküllerinin in vitro salımı

Salım çalışması mono-dispersty, küçük boyutlu ve en etkili gen susturma oranına sahip olmasından dolayı siRNA-PLGA-1 NP ile yapılmıştır. 5 mL aseton içerisinde 50 mg PLGA eklenerek ultrasonik banyoda çözülmüştür. Daha önceden hazırlanmış stok Tween80'den 1 mL alınarak 19 mL DEPC (0.2 mg/mL)-H₂O'ya eklenmiştir. Tween80 ve DEPC-H₂O karışımı pipetajla homojenize edildikten sonra içerisine balık atılarak karıştırıcının üzerine alınır. Hazırlanan PLGA-aseton karışımı karıştırıcının üzerinde bulunun Tween80-DEPC-H₂O'ya yaklaşık 20 cm uzaklıktan şırıngayla damlatılmıştır.

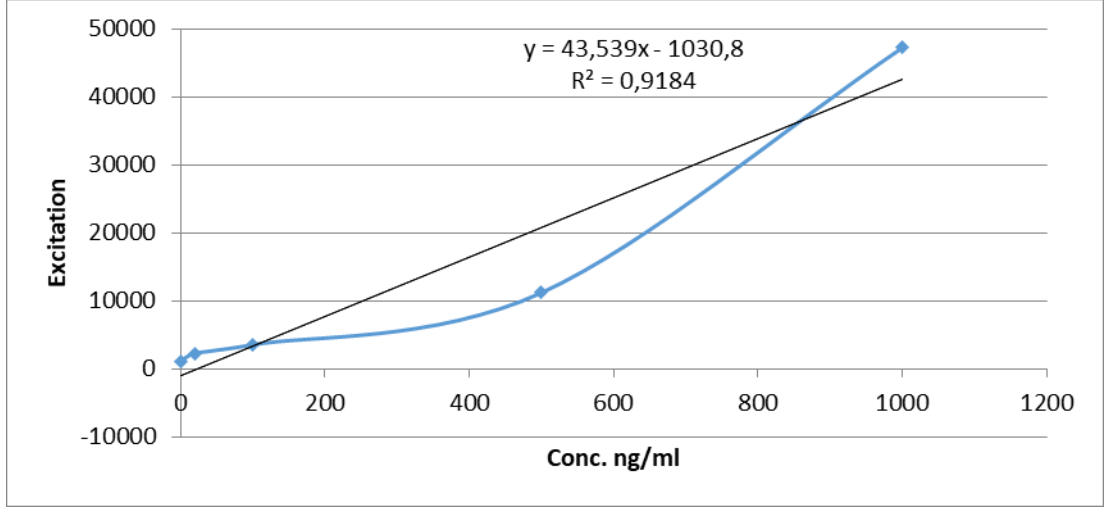
Karıştırıcının üzerinde gece boyunca bırakılarak asetonun buharlaşması sağlanmıştır. Hazırlanan 1 mL siRNA-PLGA üzerine 1 mL Tris-EDTA (pH 7.4) ilave edilerek 100 rpm ve 37 ° C'de döner çalkalayıcıda inkübe edildi. Belirlenen zaman aralıklarında, 0, 1, 2, 3, 4, 5. saatte örnekler alınarak 20,000 ×g 20 dakika 4 °C'de santrifüjlenmiştir. Deneysel çalışma üç kez tekrar edilmiştir.

Konsantrasyon eğrisi, Quant-iT™ RiboGreen™ eklenerek elde edilen siRNA örneklerinin 1000 ile 1 ng / mL arasındaki farklı konsantrasyonlardaki yoğunluğu ölçürek oluşturulmuştur. Oluşturulan konsantrasyon eğrisi kullanılarak süpernant kısımda bulunan siRNA miktarı ölçülmüştür.

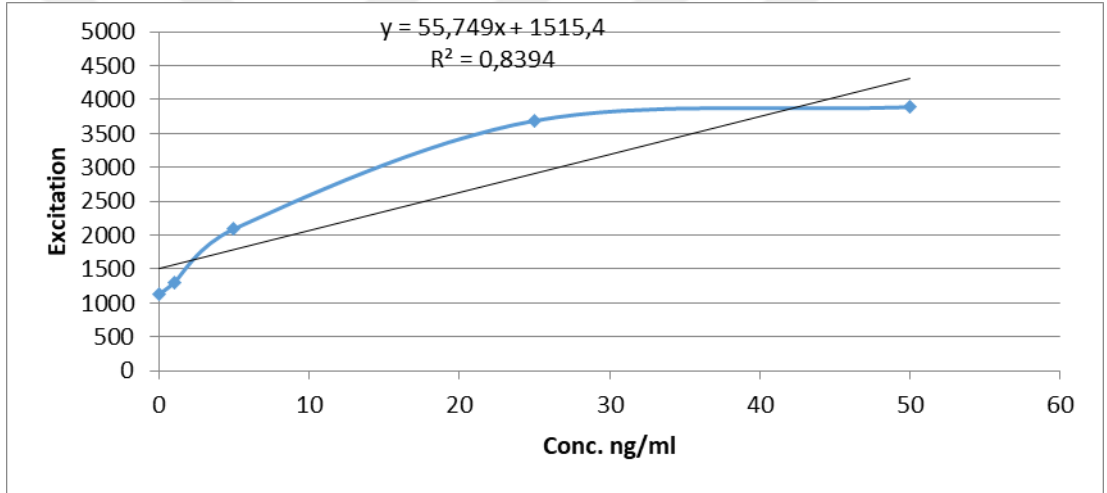
3.2.7.1 Standart konsantrasyon eğrisinin oluşturulması

Quant-iT™ RiboGreen™ kullanılarak hazırlanan çeşitli siRNA konsantrasyonları floresans ölçümü alındı.

y=ax±b denklemini kullanılarak aşağıdaki high-range ve low-range standart eğrileri oluşturulmuştur.



Şekil 3.9: Yüksek aralık standart eğrisi.



Şekil 3.10: Düşük aralık standart eğrisi.

High-range ve low-range olarak iki farklı formülasyonda hazırlanan standart eğrilerden R^2 değeri daha anlamlı çıkan high-range kullanılmıştır.

3.2.8 Sitotoksosite çalışmaları

Sulforhodamine B (SRB) yöntemi hücre temelli araştırmalarda *in vitro* sitotoksiteyi incelemek için etkili bir methoddur [237]. Bu testin temelinde SRB'nin trikloroasetik asit ile kültür plaklarına sabitlenmiş hücrelerin protein bileşenlerine bağlanır [238]. SRB, hafif asidik koşullar altında proteinlere sitokiyometrik olarak bağlanır ve daha sonra bazik koşullar kullanılarak çıkarılabilir; bu nedenle bağlı boya miktarı, hücre çoğalmasını ölçmek için ekstrapolasyonlu olabilen hücre kütlesi için bir aracı olarak kullanılabilir [239].

Sitotoksosite çalışması mono-dispersty, küçük boyutlu ve en etkili gen susturma oranına sahip olması nedeniyle siRNA-PLGA-1 NP ile yapılmıştır.

1.1B4 Pankreas hücre hattı %10 FBS (Fetal Bovine Serum) içeren besiyeri ortamını kullanarak, 6 kuyulu kültür kaplarında 37 °C %5 CO₂ %95 nem içeren inkübatörde kültüre edildi. Hücreler inverted mikroskopta incelenerek kültür kabının %80'ini konflue olduğunda Sulforhodamine B (SRB) yöntemiyle sitotoksosite ölçülmüştür. Sitotoksosite çalışmasında iki farklı siRNA-PLGA-1 (25 µL ve 50 µL) konsantrasyonu ve boş PLGA NP kullanılmıştır. 24 saat ve 48 saat kültüre edilen hücrelerin canlılık oranları Sulforhodamine B (SRB) yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

- Hücrelere zarar vermeden plakanın kenarından yavaşça %20 soğuk TCA (Trikloroasetik asit) eklenerek 4°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrası TCA dökülerek hücreler soğuk dH₂O ile yıkanmıştır. Çeker ocakta kurumaya bırakılmıştır.
- Hücrelerin üzerine 500 µL % 0.4'lük SRB (%1 asetik asitle hazırlanır) eklenerek 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- Hücreler %1 asetik asit ile 5 kez yıkanarak boyanın pembe renginin kaybolması sağlandıktan sonra kurumaya bırakılmıştır.
- Hücrelerin üzerine 1 mL 10 mM Tris (pH 10.0) buffer eklenerek 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- siRNA-PLGA-1 ile muamele edilen hücrelerin canlılık oranları ELISA Reader, Synergy-H1 cihazıyla 515 nm'de absorbans değerlerinde ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları kontrol grubuyla karşılaştırılarak hücrelerin sitotoksosite değerleri hesaplanmıştır.

3.2.9 Hücre kültürü

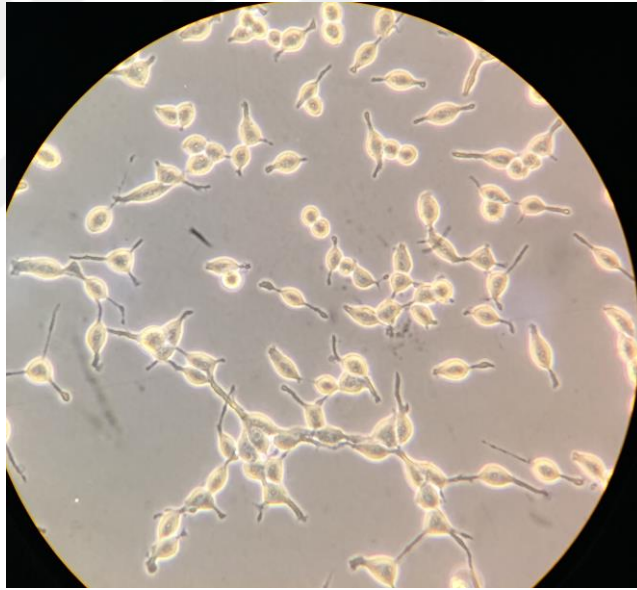
3.2.9.1 HEK 293T ve 1.1B4 Pankreas hücre hattı

HEK 293T insan embriyonik böbrek hücresi (Human Embryonic Kidney 293T Cell) ve 1.1B4 pankreas hücre hattı kullanılmıştır.

HEK 293T hücre hattı insan embriyonik böbrek hücre hattından (HEK 293) türetilmiştir. HEK 293T hücre hattı SV40 vektörü ile transfekte edilmiş ve T antijeni bulundurur [240]. HEK 293 hücre hattı epitelial kökenli olmasına rağmen biyokimyasal mekanizması sayesinde memeli veya memeli olmayan hücrelere ait

nükleik asit molekülleriyle transfekte olarak post-translasyonel üretimlerini gerçekleştirir [241]. HEK 293 hücre hattı çeşitli transfeksiyon yöntemlerine yatkın olması [242], hızlı ve kolay çoğalmaları, transfeksiyon protein üretim verimlerinin yüksek olması [243], yeni ilaçların ve hedeflerinin etkisine yönelik ayrıntılı farmakolojik ve biyofiziksel profillerin oluşturulmasında [241], sıklıkla kullanılan hücre hattıdır. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyoloji anabilim dalından temin edilerek deneysel çalışmalarda kullanılmıştır.

İstanbul üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünden alınan 1.1B4 pankreas hücre hattı pankreas duktal karsinoma hücre hattı olan PANC-1 [244], ile insan pankres β adacıklarının elektrofüzyonuyla oluşturulan bir hibrit hücre hattıdır (Cat. No. EC10012801). 1.1B4 pankreas hücre hattında bulunan β hücreleri sayesinde gen ekspresyonunun artmasını sağlar.



Şekil 3.11: 40X objektif altında HEK293T hücrelerinin görüntüsü.

3.2.9.2 Hücrelerin kültüre edilmesi

Hücreler %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 Pen-Strep (Penisilin-Streptomisin) solüsyonu içeren DMEM ((4.5 g/Lglukoz) besi yeri içerisinde steril 6 ve 24 kuyulu hücre kültür plaklarında 37⁰ C de %5 CO₂ %98 nem ortamında 4-5 gün inkübe edilmiştir.

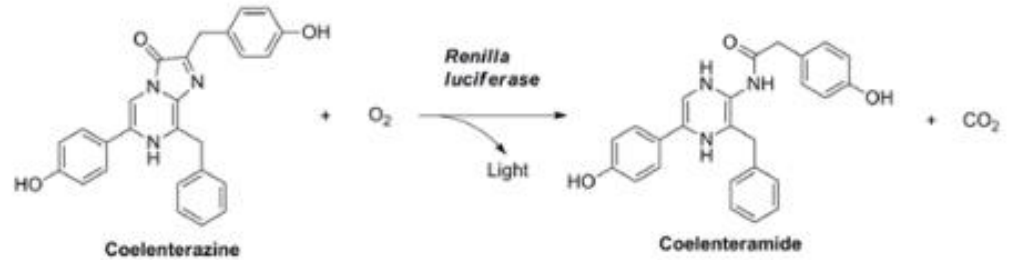
Hücreler inverted mikroskopta kontrol edilerek konfluent hale geldiğinde pasajlanarak kültürün devam etmesi sağlandı. Konfluent hale gelen hücreler

pasajlanırken kuyucuklarda bulunan besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücreler PBS (phosphate buffered saline) tamponu ile yıkandı. Yarışan hücreleri kaldırmak için 10 mL Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 5 dakika inkübe edilir. İnkübasyondan sonra plaka hafifçe sallanarak tüm hücrelerin kalkması sağlandı. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları inverted mikroskopta kontrol edildikten sonra hücreler 50 mL steril falkon tüplere aktarılmıştır. Tripsinin etkisini nötralize etmek amacıyla hücrelerin üzerilerine 10 mL taze besiyeri eklenmiştir. Hücreler 1700 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek çökmesi sağlanmıştır. Çöken hücrelerin üzerindeki supernatant aspire edilerek hücrelerin üzerine 2 mL taze besi yeri eklenir. Sayım işleminden sonra yeni bir steril 15 mL’lik Falcon tüp içine aktarılan hücreler stok süspansiyonu (20-30 hücre/100 µL) olarak hazırlanmıştır. 200 µL hücre süspansiyonu 12’lük hücre kültür plaklarına aktararak deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.10 Lusiferaz aktivitesi ile siRNA etkinliğinin kantitatif olarak belirlenmesi

3.2.10.1 Lusiferaz ile katalizlenen biyoluminesans reaksiyon

Yeşil (Green) Renilla lusiferase biyoluminesans ışması (firefly) ateş böceğine oranla daha parlak ve stabildir. Yeşil Renilla lusiferaz proteini coelenterazine tarafından okside olursa ışımaya sebep olur ($\lambda_{max} = 535nm$). Bu reaksiyon için adenosin trifosfat (ATP) veya başka bir moleküle ihtiyaç yoktur. Işıma yeşil Renilla’da bulunan promotörün ekspresyonuyla Renilla proteini üretilir, üretilen protein ışımaya miktarıyla ilişkilidir.



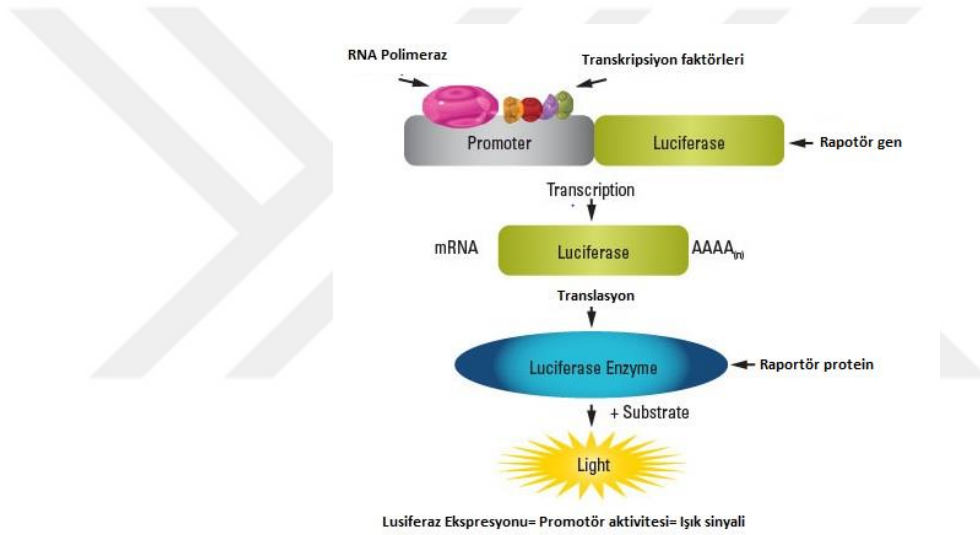
Şekil 3.12: Coelenterazine ve green Renilla lusiferazın kimyasal reaksiyonu.

Ölçümde kullanılan bir diğer lusiferaz, İtalyan ateş böceği lusiferazı *Luciola cruciata*'nın mutant formu kırmızı (red) firefly lusiferazdır. Bu lusiferaz ATP varlığında D-lusiferin oksidasyonu ile kırmızı bölgede ışımaya verir ($\lambda_{max} = 613nm$).



Şekil 3.13: Lusiferin ve kırmızı ateş böceği lusiferazının kimyasal reaksiyonu.

Green Renilla lusiferaz plazmidi red firefly ekspresyon plazmidi ile birleştirilmiş deneysel raportör gen olarak işlev görüştür. Bu raportör ve kontrol kombinasyonu, iki aşamalı substrat reaktifine veya söndürmeye gerek kalmadan, tek bir okuma deneyinde deneysel raportör ve kontrol lusiferaz aktivitesinin eşzamanlı izlenmesini sağlar.



Şekil 3.14: Lusiferaz raportörün çalışma şeması.

siRNA'nın GPR87 geninin ekspresyonu üzerindeki etkisi Thermo Scientific™ Pierce™ Renilla-Firefly Luciferase Dual Assay kit kullanılarak ölçülmüştür. psiCHECK™-2 Vektörü üzerinde bulunan lusiferaz raportör geninin translasyonu ile eklenen substrat lüminesansa neden olur.

Vektör restrüksiyon enzimleri ile kesilerek çoklu klonlama bölgesine GPR 87 geni klonlanmıştır. Klonlanan gen sentetik Renilla lusiferazın (hRluc) hemen devamında ve 3' bölgesine konulacak şekilde uygun restrüksiyon enzimi seçilmiştir.

Klonlamadan sonra hücre kültürüne transfekte edilerek lüsiferaz ekspresyonu ölçülmüştür.

3.2.10.2 Rekombinant plazmitin hücre hattına transfeksiyonu

psiCHECK™-2 vektörü RNA girişiminin (RNAi) nicel ve hızlı optimizasyonunu sağlamak için tasarlanmıştır. psiCHECK™-2 vektörünün, raportör gene kaynaşmış bir hedef genin ekspresyonundaki değişikliklerin izlenmesini sağlar. Renilla luciferase (hRluc) aktivitesindeki ölçüm azalması, RNAi etkisinin izlenmesi için uygun bir araçtır.

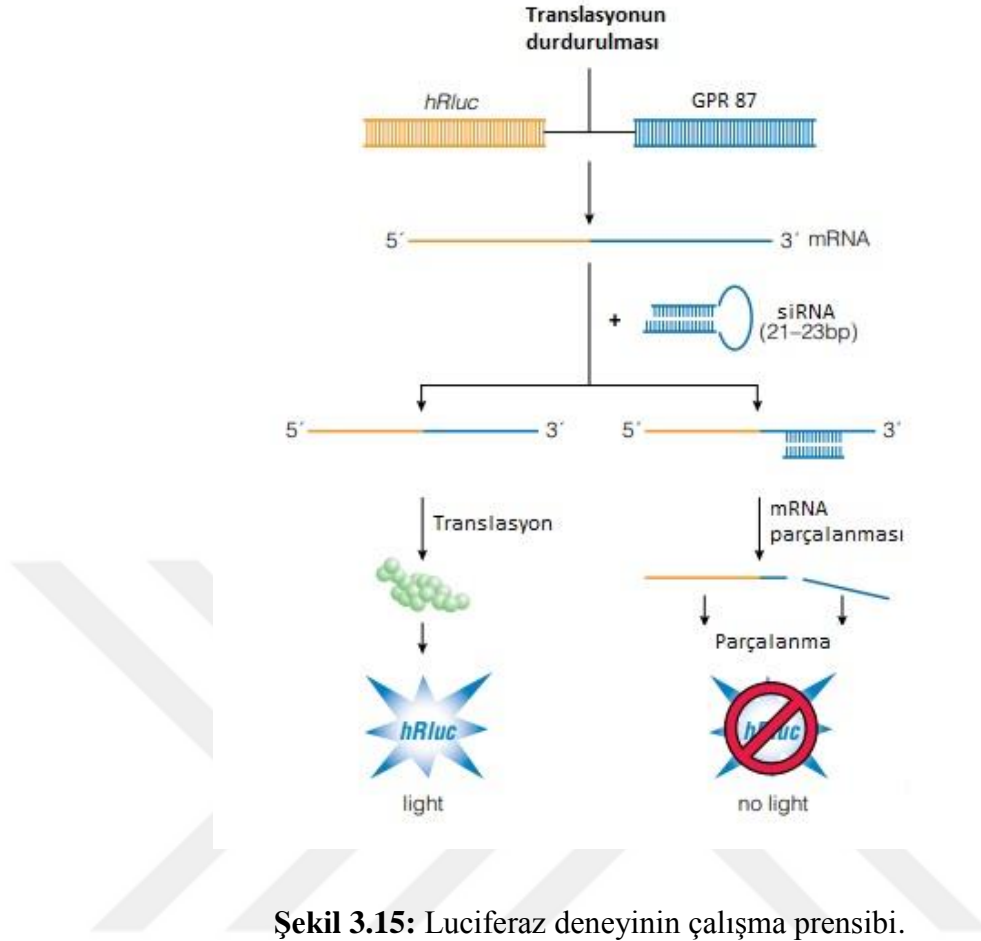
1.2×10^7 HEK 293 hücresi inkübasyona bırakılmıştır. 2-3 gün sonra inverted mikroskopta kontrol edilerek %70-80 konfluent olduğu tespit edilmiş ve bu hücreler transfeksiyon için kullanılmıştır.

Daha önce 37°C'de ısıtılmış olan Opti-MEMden 250 µL alınarak 1.5mL'lik ependorfa koyulmuştur. Üzerine 2 µg plazmit koyulmuştur. Opti-MEMden 250 µL alınarak farklı 1.5 mL'lik ependorfa koyulmuştur. Üzerine 4 µL Lentifectin™ koyulmuştur. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından her iki tüp karıştırılarak oda sıcaklığında 20 dakika bekletilerek transfeksiyon kompleksinin oluşması sağlanmıştır.

Hücrelerin mediumları alınarak 1 mL Opti-MEM ile değiştirilmiştir. Oluşan transfeksiyon kompleksi hücrelere eşit olarak paylaştırılıp inkübasyona bırakılmıştır. 5-6 saat inkübasyondan sonra hücrelerin üzerinde bulunan Opti-MEM alınmış ve yerine 2 mL %10 FBS medium koyulmuştur.

3.2.10.3 Lusiferaz assay ile siRNA etkisinin gösterilmesi

Tranfeksiyon işlemi tamamlandıktan sonra, ertesi gün hücrelere siRNA gönderilmiştir. Gönderildikten siRNA vektörde kaynaşık olarak bulunan Renilla luciferase- GPR87 transkripsiyonun ürünü mRNA'yı parçalayarak Renilla lusiferaz sinyalinini engeller. Eğer siRNA komplementer mRNA ile eşleşemezse lüminesans devam eder.



Şekil 3.15: Luciferaz deneyinin çalışma prensibi.

Thermo Scientific™ Pierce™ Renilla-Firefly Luciferase Dual Assay kit ile vektör üzerinde bulunan green Renilla luciferase ekspresyonundaki değişiklik ile siRNA'nın GPR87 geni üzerindeki susturma etkisi tespit edilmiştir. Aynı zamanda vektörde bulunan red firefly luciferase vektörün hücreye girdiğinin, sorunsuz bir şekilde deney protokolünün ilerlediğinin ve siRNA komplementer mRNA ile etkileştiğini gösteren kontrol mekanizması olarak kullanılmıştır.

Lusiferaz aktivitesinin varlığı, hücrelerde plazmit vektörün transformasyonunu doğrulamıştır. Kontrollere göre kıyaslandığında, bu lusiferaz aktivitenin baskılanma derecesi aynı zamanda siRNA'nın etkinliğinin derecesini göstermiştir.

Pierce™ Renilla-Firefly Luciferase Dual Assay Kit protokolünde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır:

- 37°C in 5% CO₂ etüvden alınan 1.1B4 ve HEK 293 hücrelerinin öncelikle sayım işlemi yapılmıştır. Sayım işlemi sonucu kültür plakalarında yaklaşık ~10,000 hücre olduğu tespit edilmiştir.
- Hücrelerin üzerlerindeki medium alındı ve 100 µL 1X DPBS buffer ile yıkandı. Ardından hücrelerin üzerine 500 µL 1X Cell Lysis Buffer koyularak çalkalayıcı inkübatörde 240 rpm’de 15 dakika bekletildi.
- ELISA Reader, Synergy- H1 cihazı lüminesans ölçüm hazırlandı.
- 2 mL’lik ependorf içresinde 750 µL Dual Assay Working Solution, 7.5 µL D-Luciferin ve 7.5 µL 10x Coelenterazine koyularak karıştırıldı. Hazırlanan çözelti ışıktan korunmuştur.
- Lizis olan hücreler 96 kuyucuklu siyah plakaya her bir kuyucuğa 20 µL olacak şekilde dağıtıldı. Hazırlanan solüsyondan her bir kuyucuğa 50 µL olacak şekilde dağıtılmıştır.
- Her bir örnek 3 tekrarlı olacak şekilde hazırlanmış ve ELISA Reader, Synergy- H1 ölçülmüştür. Ölçüm her iki dakikada bir yaklaşık 2 saat boyunca tekrarlanarak, ölçüm sonuçları kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır.

Aşağıdaki tabloda green renilla luciferase ve red firefly luciferase için ölçümde kullanılması gerek dalgaboyları verilmiştir. Kit protokolünde küçük değişiklikler yapılarak green renilla luciferaz sinyalinin baskılandığı tespit edilmiştir.

Tablo 3.23: Thermo Scientific Pierce Renilla-Firefly Luciferase Dual Assay Kit tarafından önerilen dalga boyları.

Lusiferaz	Emission aralığı (nm)	Emission Maximum (nm)
Green Renilla	450-650	535
Red Firefly	560-700	613

3.2.10.4 PLGA nanopartikülleri kullanılarak siRNA'nın hücrelere gönderilmesi

Etüvden alınan HEK293T ve 1.1B4 pankreas hücre hattına inverted mikroskopta bakılmış ve %80–90 konflue oldukları tespit edildikten sonra sayım işlemi yapılmıştır. Yaklaşık ~10,000 hücre olduğu tespit edilmiştir. Önceden hazırlanmış olan siRNA-PLGA-1, siRNA-PLGA-2 ve siRNA-PLGA-3 NP'lerinden her bir hücreye 30 µL koyulmuştur. Üç tekrarlı hazırlanan hücre kültür plaklarında kontrol amaçlı olarak kullanılan gruba siRNA-PLGA koyulmamıştır. İnkübasyon sonrası Pierce™ Renilla-Firefly Luciferase Dual Assay Kit ile kontrol grupları karşılaştırılarak GPR87 geninin ekspresyon seviyesi ölçülmüştür.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 PCR Yöntemi ile HEK 293T Hücre Hattından GPR87 Gen Bölgesi Eldesi

Çalışmada kullanılacak GPR87 geni; HEK 293T hücre hattı kullanılarak genomik DNA'dan PCR ile GPR87 geninin amplifikasyonu sağlanmıştır. GPR87 genin amplifikasyonu için ilk önce gene özgü primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler ticari olarak Sentromer DNA Teknolojileri(İstanbul) firmasına sipariş verilmiştir. Liyofilize olarak gelen primerlerin saflığı ve miktarı 260 nm dalga boyundaki absorbans değeri ile kontrol edilmiştir.

Primerler kullanılarak GPR87 geninin PCR ile optimizasyonu sağlanmıştır. Optimize edilen PCR protokolü ile GPR87 geni çoğaltılmıştır.

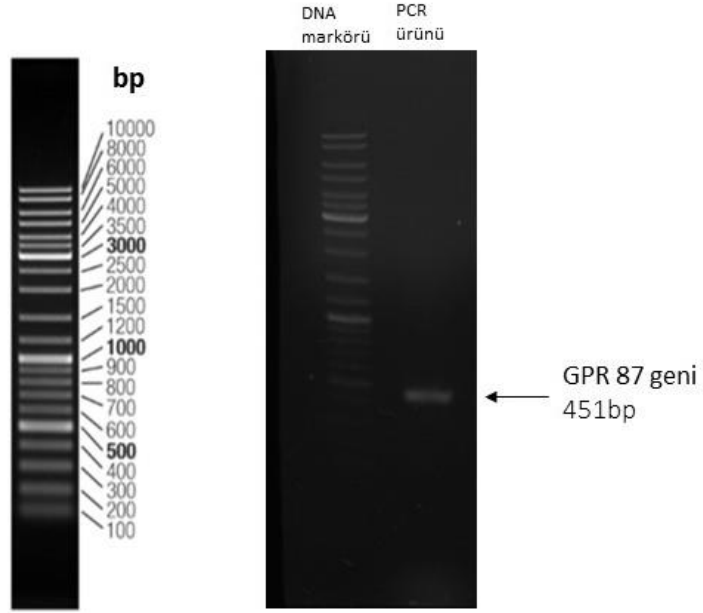
PCR ile çoğaltılan GPR87 gen bölgesi:

```
tactcgAGGGAACCTAGTAGCCTGTGGGCATGCTTGCCAAGCACTGAAGTCCTATC  
TCCCCACTTCTCCTACAGATAACGAGCTGCACGGCCAAGAGAGTCACAATTCAGGCA  
ACAGGAGCGACGGGCCAGGAAAGAACCACCCTTCACAATGAATTTGACACAATTG  
TCTTGCCGGTGCTTTATCTCATTATATTTGTGGCAAGCATCTTGCTGAATGGTTTAG  
CAGTGTGGATCTTCTTCCACATTAGGAATAAAACCAGCTTCATATTCTATCTCAAAA  
ACATAGTGGTTGCAGACCTCATAATGACGCTGACATTTCCATTTGGAATAGTCCATG  
ATGCAGGATTTGGACCTTGGTACTTCAAGTTTATTCTCTGCAGATACACTTCAGTTT  
TGTTTTATGCAAACATGTATACTTCCAATCGTGTTCCTTGGGCTGATAAGCtcgaga
```

t

PCR ile çoğaltılarak elde edilen ürün, %1' lik agaroz jelde yürütüldükten sonra görüntüleme cihazında UV görüntüsü alınmıştır.

451 baz çiftine sahip GPR87 gen dizisinin PCR ürünü beklenildiği gibi agaroz jelde ~500 bp'lik bant büyüklüğü vermiştir.



Şekil 4.1: GPR87 geninin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen ürünün UV görüntüsü.

4.2 GPR87 Geninin Pürifikasyonu

GPR87 geni PCR sırasında eklenen enzim, dNTP gibi çeşitli maddelerle bir aradadır. Geni saf olarak elde etmek için NucleoSpin® Gel and PCR Clean- up Kit ile pürifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Pürifikasyon sonucu elde edilen DNA konsantrasyonu Thermo Scientific™ Multiskan™ GO cihazıyla ölçülmüştür.

Pürifikasyonu yapılan DNA'nın saflığı O.D(260/280) göre değerlendirildi. OD260 çözeltideki DNA miktarını; OD 280 ise çözeltideki protein miktarını gösterir. Bu oranın 1,8-2.0 aralığında olması izole edilen DNA'nın saf olduğu bilgisini verir.

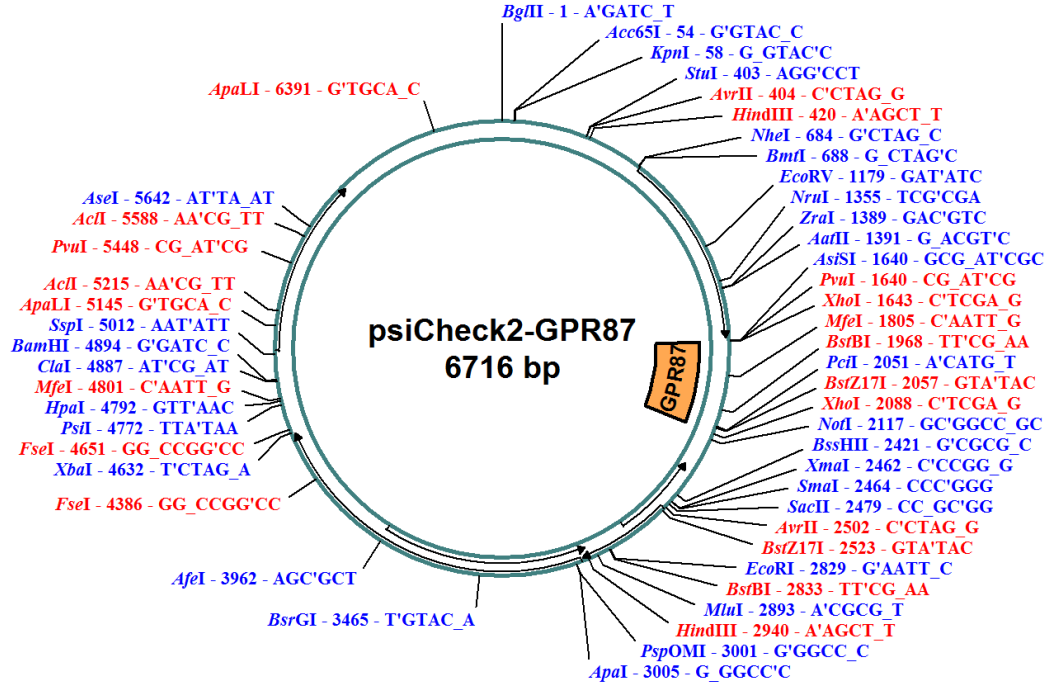
İzole edilen DNA konsantrasyonu ise aşağıda verilen denkleme göre hesaplanmıştır.

DNA konsantrasyonu= A260 X 50 X Dilüsyon faktörü Abs260*40*(10/0.52)

Dilüe edilerek ölçülen ideal konsantrasyonu 30-100 ng/µL olarak değerlendirilmiştir.

4.3 GPR87 geni-psiCHECK™-2 Vektörünün Restriksiyon Kesimi ve Ligasyonu

PCR ürünü ve psiCHECK™-2 vektörü aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Restriksiyon kesim sonucu oluşan yapışkan uçlardan GPR87 geni psiCHECK™-2 vektörünün çoklu klonlama bölgesine ligasyonu yapılmıştır.



Şekil 4.2: psiCHECK™-2 vektörüne GPR87 geninin ligasyon sonucu.

Ligasyonu gerçekleştirilen GPR87- psiCHECK™-2 vektörünün %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra görüntüleme cihazında UV görüntüsü elde edilmiştir. 451 bp uzunluğunda GPR87 geni ve 6.271 bp uzunluğunda psiCHECK™-2 vektörünün ligasyonu sonucunda ~6716 bp bir ligasyon ürünü elde edilmiştir.

4.4 Transformasyon

Transformasyon basamağında psiCHECK™-2+GPR87 vektörü “TransformAid Bacterial Transformation Kit” ile kompetan hale getirilmiş *E. coli One Shot® Mach1™-T1R* hücrelerine aktarılmıştır. Rekombinant vektörleri hücre içerisine alan bakterilerin seçilmesinde ampisilin direnç geni kullanılmıştır.

Bu teknik, ampisilin direnç geni aktivitesine bağlıdır. Ampisilin direnç geni taşıyan bakterilerin ampisilinli agarda ürerken, rekombinant vektörü taşımayan ve kompetan hale gelmemiş hücreler ampisilinli ortamda çoğalamazlar.

Bu çalışmada ligasyon ile muamele edilen kompetan hücreler ampisilin içeren LB agar besiyerine ekimi yapılmıştır. İnkübasyon sonrası oluşan kolonilerden sekiz tane koloni seçilerek ampisilinli LB broth besiyerine inoküle edilmiştir. İnkübatörlü çalkalayıcıda 37°C, 260 rpm'de yaklaşık 7 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası transforme olduğu düşünülen kolonilerin gerçekten rekombinant vektörleri alıp almadığını görmek için PCR yapılmış, jel elektroforezinde yürütülmüştür. Jel elektroforezinde yürüyen örnekler görüntüleme cihazıyla UV ışık altında görüntülenmiştir. Seçilen sekiz koloniden 6 tanesi beklenen ~6716 bp'lik bir bant göstererek pozitif sonuç vermiştir.

Seçilen kolonilerdeki plazmidlerin izolasyonu “Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit” protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Plazmitlerin miktarı UV spektrofotometrede A260 değeri, saflığı ise A260/280 oranı ile belirlenmiştir. Kolonilerin konsantrasyonları 190-175 ng/μL, saflığı ise 1.79-1.84 aralığında çıkmıştır.

Seçilen kolonilerde PCR ürünlerinin vektör içerisine düz mü ters mi girdiğini saptamak için izole edilen plazmidler PstI restriksiyon enzimi kesilmiştir. PCR ürünlerinin vektöre düz girenlerin 1566, ters girenlerin ise 1260 bandı oluşturması beklenmiştir. Seçilen 8 koloniden 6 tanesi düz giriş bandını vermiştir. Bu kolonilerden PCR ürününün vektöre düz girdiği tespit edilen hücreleri çoğaltılmak amacıyla LB Broth besiyerinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 190 ng/μL olarak tespit edilen konsantrasyonla çalışmalara devam edilmiştir.



Şekil 4.3: psiCHECK™-2-GPR87 ligasyon ürünün jel görüntüsü.

4.5 siRNA Üretimi ve Saflaştırma Bulgusu

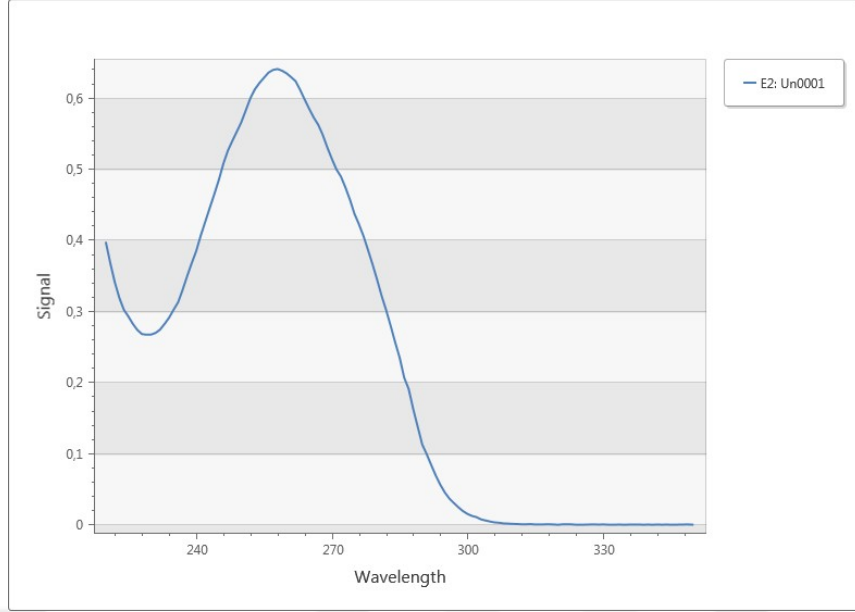
“Silencer® siRNA Construction Kit” kullanılarak siRNA üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen siRNA'nın pürifikasyonu gerçekleştirildikten sonra RNA konsantrasyonu Thermo Scientific NanoDrop Spektrofotometre ile belirlenmiştir. RNA spektrofotometrede A260 nm değeri ile miktarı, A260/230 absorbans değeri saflığı belirlenmiştir.

A260/230 oranının ~ 2.0 aralığında olması izole edilen RNA'nın saf olduğu bilgisini verir.

İzole edilen RNA konsantrasyonu ise aşağıda verilen denkleme göre hesaplanmıştır:

RNA konsantrasyonu= A260 X 40 X Dilüsyon faktörü

Pürifiye edilen RNA'nın 500ng/ μ L konsantrasyona, saflığının ise ~ 2 olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.4: Saflaştırılan siRNA UV spektrofotometre sonucu.

4.6 PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonu

Gereç ve yöntem kısmında bahsedilen farklı yöntemler kullanılarak siRNA-PLGA-1, siRNA-PLGA-2, siRNA-PLGA-3 nanopartikülleri hazırlanmıştır. Hazırlanan NP'lerin karakterizasyonu Zetasizer Nano ZSP cihazıyla Dynamic Light Scattering (DLS) Metoduyla boyut ölçümleri yapılmıştır.

4.6.1 siRNA-PLGA-1 nanopartiküllerin karakterizasyonu

Yöntem kısmında bahsedildiği şekilde üretilen siRNA-PLGA-1 NP ilk önce Dynamic Light Scattering (DLS) Metoduyla; NP'lerin boyutu, çapı, yoğunluğu ve PDI sonuçları elde edilmiştir. Ölçümlerin her biri 3 dakika arayla 5 kez tekrar edildi. NP'lerin mono-dispersity indeksi ve boyutu sayı (number), hacim (volume) ve yoğunluk (intensity) olarak analiz edilmiştir.

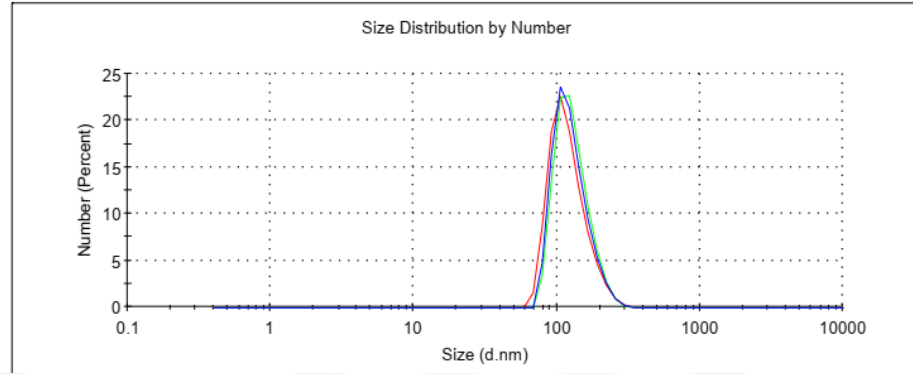
4.6.1.1 Boş PLGA-1 partiküllerin karakterizasyonu

siRNA-PLGA-1 nanopartiküllerinin siRNA yüklenmeden karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu NP'ler PLGA-1 olarak adlandırılmıştır.

Results

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 154.6	Peak 1: 121.6	100.0	37.43
Pdl: 0.075	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.938	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality Good

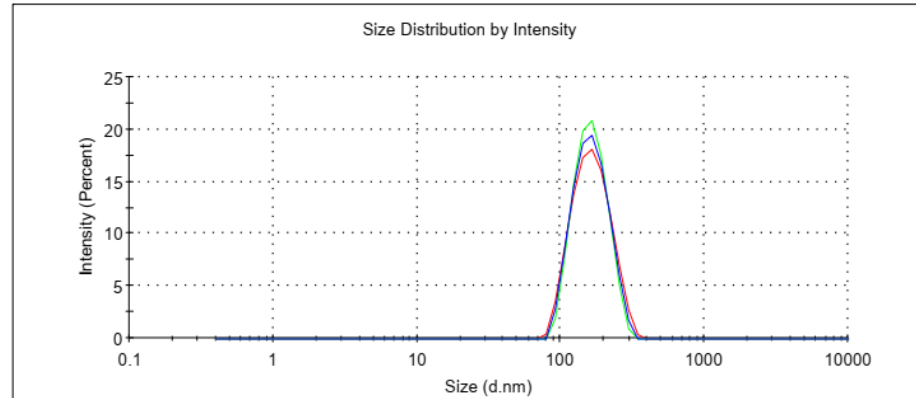


Şekil 4.5: PLGA-1 sayıca dağılım (Number).

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 154.6	Peak 1: 168.1	100.0	50.01
Pdl: 0.075	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.938	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

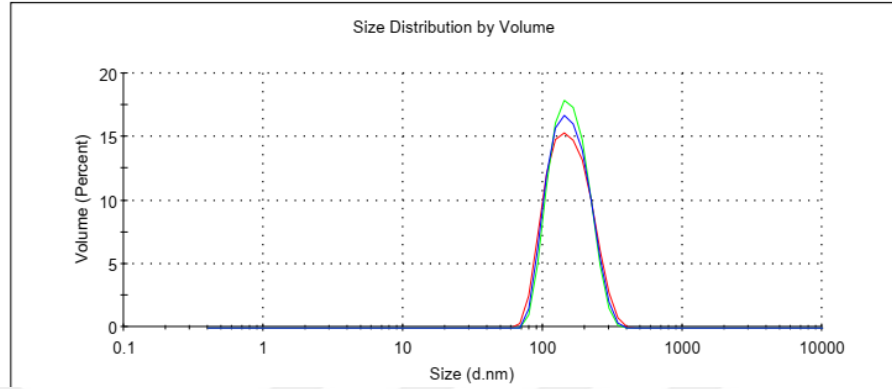
Result quality Good



Şekil 4.6: PLGA-1 şiddetçe dağılım (Intensity).

Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 154.6	Peak 1: 159.6	100.0	54.90
Pdl: 0.075	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.938	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



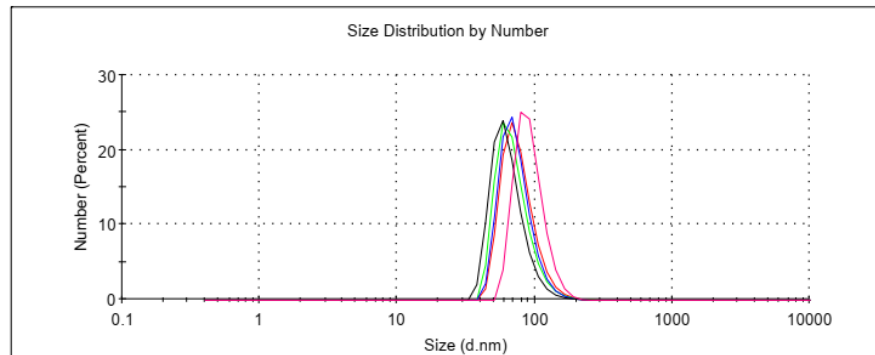
Şekil 4.7: PLGA-1 hacimce dağılım (Volume).

4.6.1.2 siRNA-PLGA-1 partiküllerin karakterizasyonu

İlk önce boş olarak hazırlanan PLGA-1 NP içerisinde yöntem kısmında bahsedildiği şekilde siRNA yüklenmiştir. siRNA yüklenen NP karakterizasyonları aşağıda gösterildiği şekildedir.

Results

	Size (d.n...)	% Number:	St Dev (d....)
Z-Average (d.nm): 112.6	Peak 1: 92.13	100.0	22.91
Pdl: 0.040	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.975	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Refer to quality report			

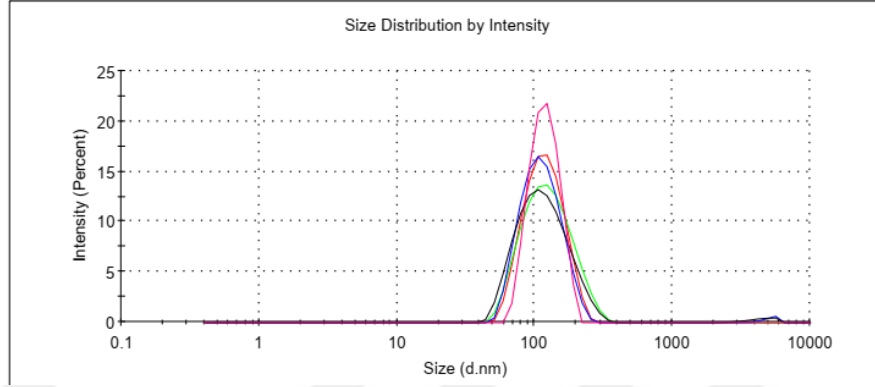


Şekil 4.8: siRNA-PLGA-1 sayıca dağılım (Number).

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 112.6	Peak 1: 120.1	100.0	28.89
Pdl: 0.040	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.975	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality Refer to quality report

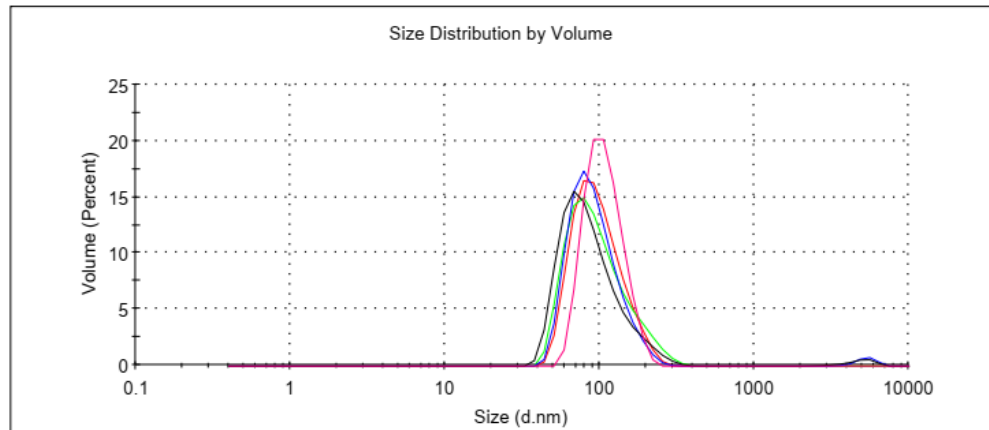


Şekil 4.9: siRNA-PLGA-1 şiddetçe dağılım (Intensity).

Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 112.6	Peak 1: 108.8	100.0	30.48
Pdl: 0.040	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.975	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality Refer to quality report



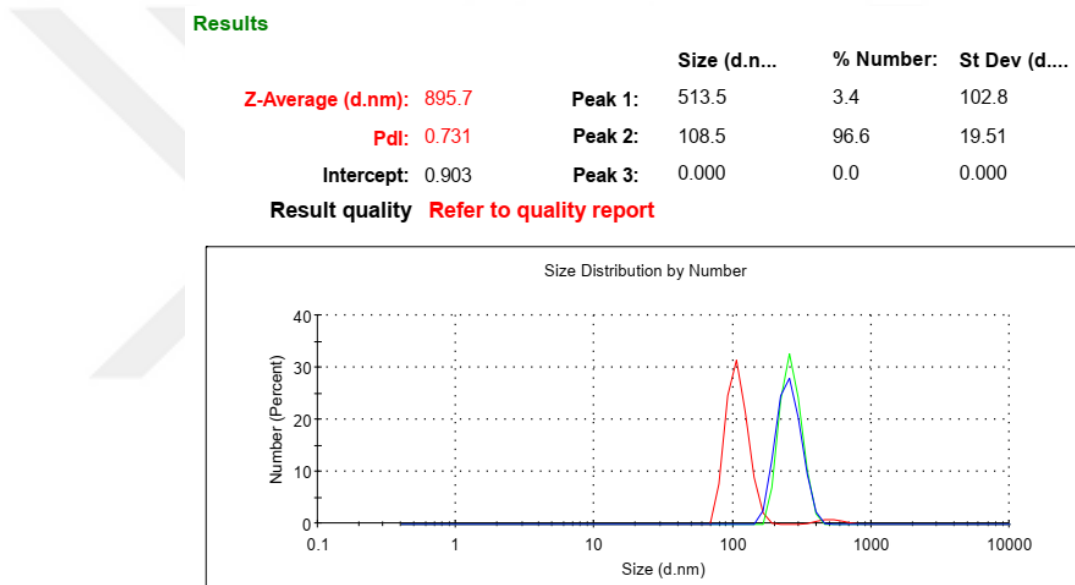
Şekil 4.10: siRNA-PLGA-1 hacimce dağılım (Volume).

4.6.2 siRNA-PLGA-2 nanopartiküllerin karakterizasyonu

Yöntem kısmında bahsedildiği şekilde üretilen siRNA-PLGA-2 NP ilk önce Dynamic Light Scattering (DLS) Metoduyla; NP'lerin boyutu, çapı, yoğunluğu ve PDI sonuçları elde edilmiştir. Ölçümlerin her biri 3 dakika arayla 5 kez tekrar edildi. NP'lerin mono-dispersity indeksi ve boyutu sayı (number), hacim (volume) ve yoğunluk (intensity) olarak analiz edilmiştir.

4.6.2.1 Boş PLGA-2 partiküllerin karakterizasyonu

siRNA-PLGA-2 nanopartiküllerinin siRNA yüklenmeden karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu NP'ler PLGA-2 olarak adlandırılmıştır.

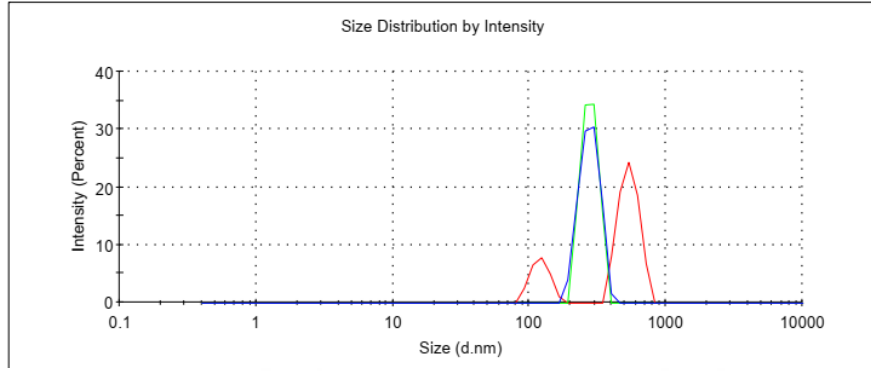


Şekil 4.11: PLGA-2 sayıca dağılım (Number).

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 895.7	Peak 1: 535.4	76.9	88.33
Pdl: 0.731	Peak 2: 120.4	23.1	18.65
Intercept: 0.903	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality Refer to quality report

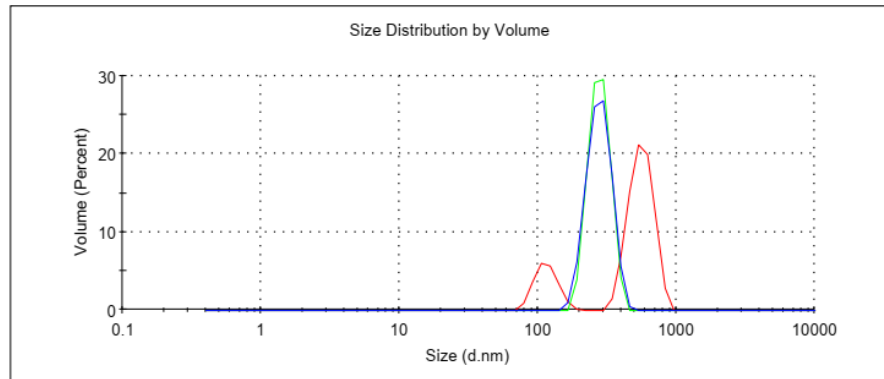


Şekil 4.12: PLGA-2 şiddetçe dağılım (Intensity).

Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 895.7	Peak 1: 559.5	79.1	110.1
Pdl: 0.731	Peak 2: 116.1	20.9	22.00
Intercept: 0.903	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality Refer to quality report



Şekil 4.13: PLGA-2 hacimce dağılım (Volume).

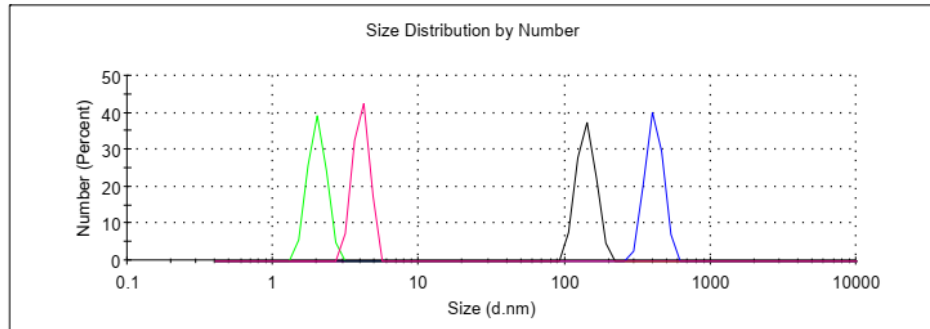
4.6.2.2 siRNA-PLGA-2 partiküllerin karakterizasyonu

siRNA-PLGA-2 olarak yöntem kısmında adlandırılmış olan NP üretim yönteminde siRNA yüklenerek karakterizasyonu yapılmıştır.

Results

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d...
Z-Average (d.nm): 3580	Peak 1: 4.038	100.0	0.4953
Pdl: 1.000	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.690	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality Refer to quality report

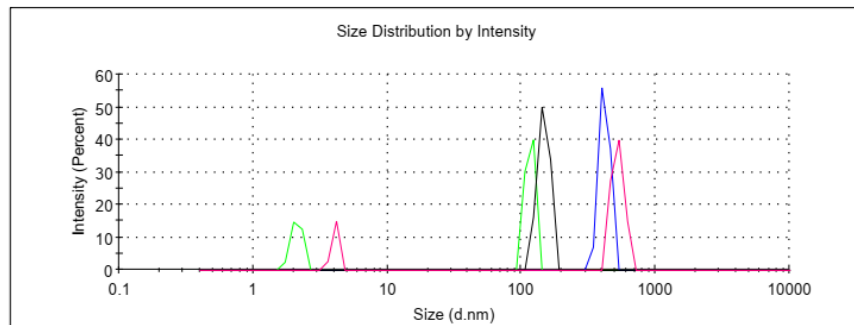


Şekil 4.14: siRNA-PLGA-2 sayıca dağılım (Number).

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 3580	Peak 1: 522.4	82.3	54.39
Pdl: 1.000	Peak 2: 4.101	17.7	0.2041
Intercept: 0.690	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality Refer to quality report

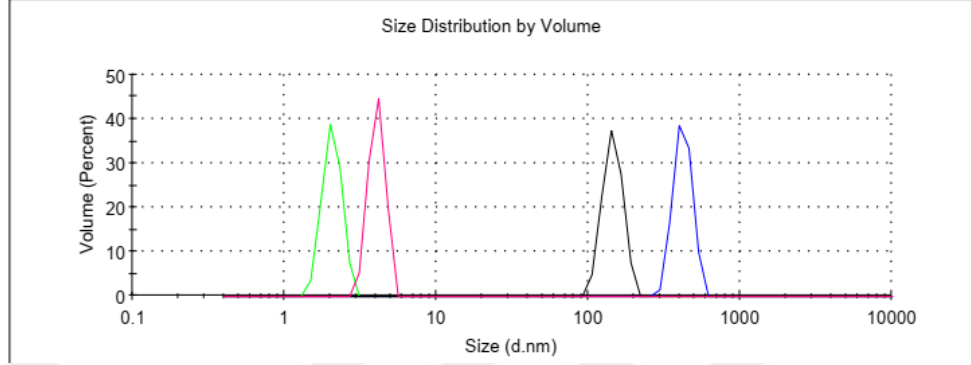


Şekil 4.15: siRNA-PLGA-2 şiddetçe dağılım (Intensity).

Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 3580	Peak 1: 532.4	0.0	79.16
Pdi: 1.000	Peak 2: 4.086	100.0	0.4858
Intercept: 0.690	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality Refer to quality report



Şekil 4.16: siRNA-PLGA-2 hacimce dağılım (Volume).

Laroui ve ark. yaptıkları çalışmada PVA'nın hidrofobik karakterinden dolayı suda çözünmediği ve bu molekülün hidrodinamik yarıçapı üzerinde bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir [245]. Bizim de çalışmamızda siRNA-PLGA-2 NP ile yaptığımız DLS ölçümleri sonucunda farkı boyutlarda partiküllerin görülmesinin nedeni PVA'nın kullanılan bu yöntemde yeterince homojenize olmadığı, PVA kalıntılarının kaldığı literatür ile uyumludur.

4.6.3 siRNA-PLGA-3 nanopartiküllerin karakterizasyonu

Yöntem kısmında bahsedildiği şekilde üretilen siRNA-PLGA-2 NP ilk önce Dynamic Light Scattering (DLS) Metoduyla; NP'lerin boyutu, çapı, yoğunluğu ve PDI sonuçları elde edilmiştir. Ölçümlerin her biri 3 dakika arayla 5 kez tekrar edildi. NP'lerin mono-dispersity indeksi ve boyutu sayı (number), hacim (volume) ve yoğunluk (intensity) olarak analiz edilmiştir.

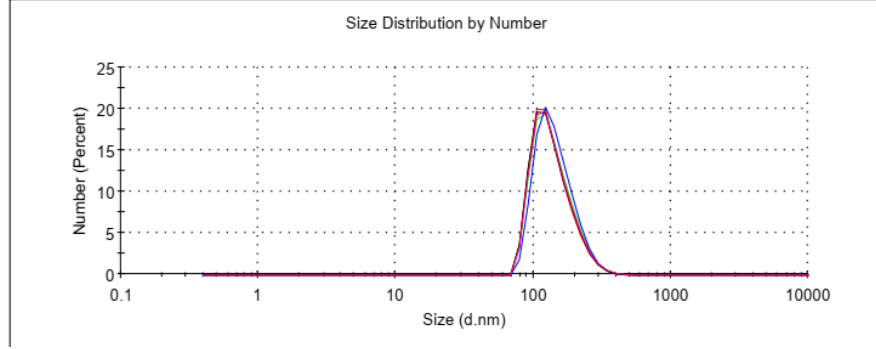
4.6.3.1 Boş PLGA-3 partiküllerin karakterizasyonu

siRNA-PLGA-3 nanopartiküllerinin yöntem kısmına belirtilen protokole uygun olarak hazırlanmış fakat siRNA yüklenmeden karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu NP'ler PLGA-3 olarak adlandırılmıştır.

Results

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 183.6	Peak 1: 140.5	100.0	49.30
Pdl: 0.099	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.955	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality Good

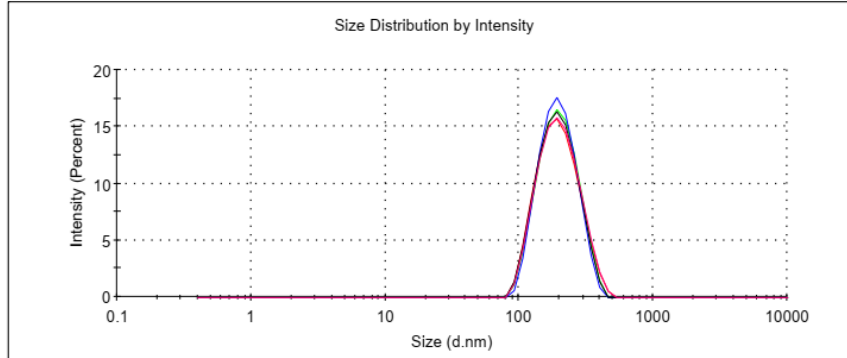


Şekil 4.17: PLGA-3 sayıca dağılım (Number).

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 183.6	Peak 1: 205.4	100.0	71.19
Pdl: 0.099	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.955	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

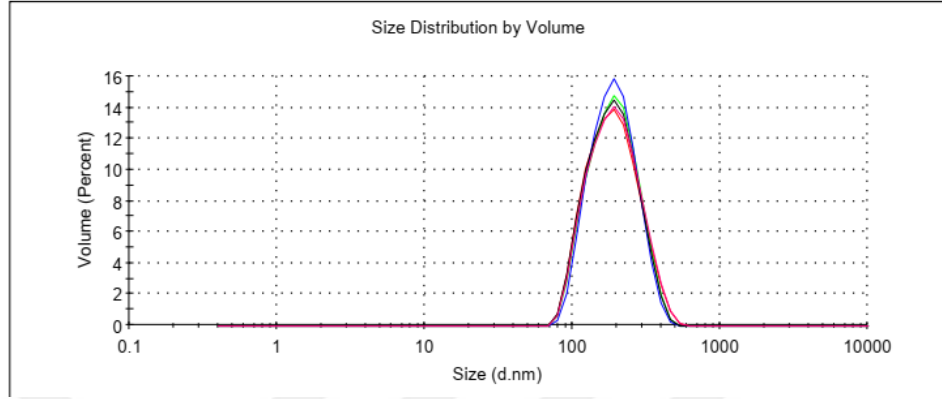
Result quality Good



Şekil 4.18: PLGA-3 şiddetçe dağılım (Intensity).

Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 183.6	Peak 1: 201.7	100.0	78.98
Pdl: 0.099	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.955	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

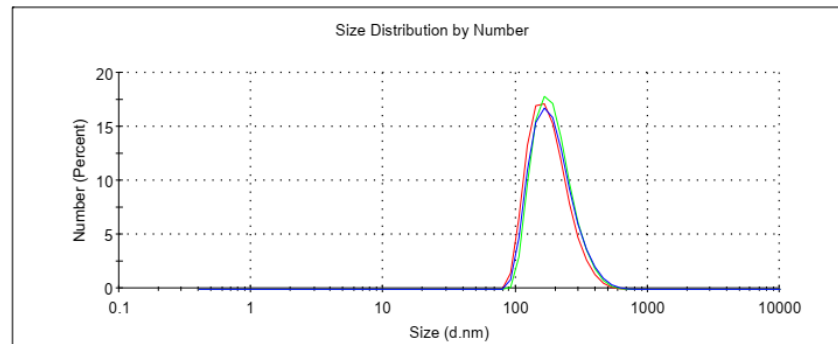


Şekil 4.19: PLGA-3 hacimce dağılım (Volume).

4.6.3.2 siRNA-PLGA-3 partiküllerin karakterizasyonu

siRNA-PLGA-3 olarak yöntem kısmında adlandırılmış olan NP üretim yönteminde siRNA yüklenerek karakterizasyonu yapılmıştır.

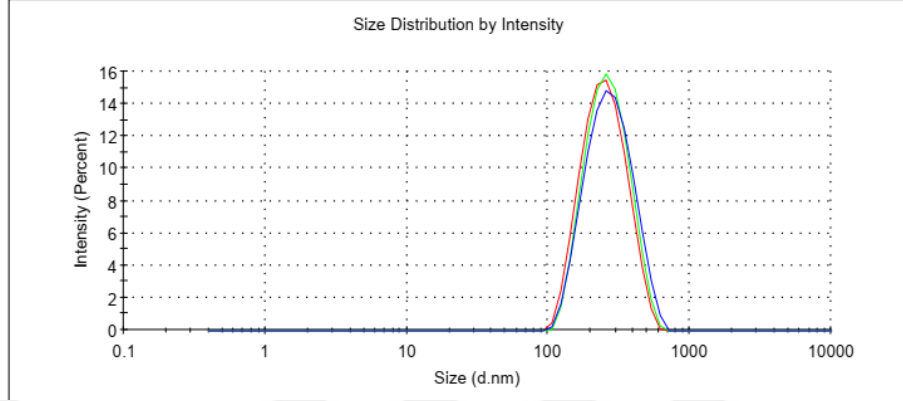
	Size (d.n...)	% Number:	St Dev (d....)
Z-Average (d.nm): 210.7	Peak 1: 196.7	100.0	75.69
Pdl: 0.274	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.950	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Refer to quality report			



Şekil 4.20: siRNA-PLGA-3 sayıca dağılım (Number).

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 210.7	Peak 1: 283.4	100.0	102.9
Pdl: 0.274	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.950	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

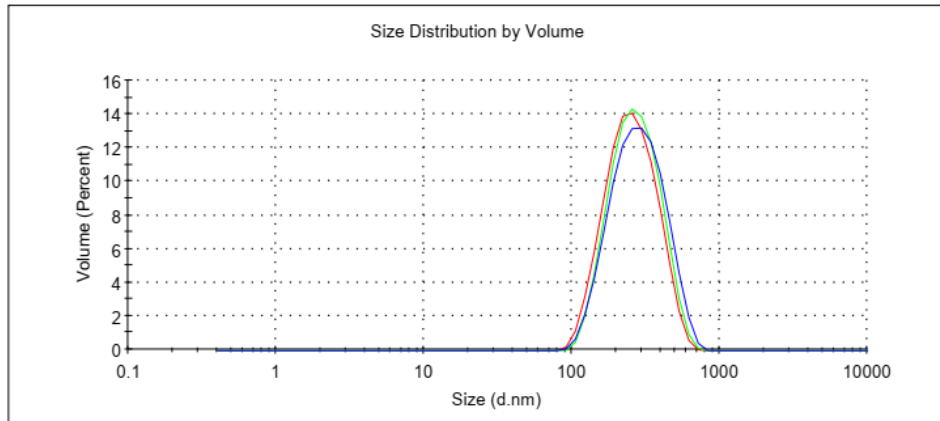
Result quality Refer to quality report



Şekil 4.21: siRNA-PLGA-3 şiddetçe dağılım (Intensity).

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 210.7	Peak 1: 297.2	100.0	117.5
Pdl: 0.274	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.950	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality Refer to quality report



Şekil 4.22: siRNA-PLGA-3-hacimce dağılım (Volume).

Aşağıdaki Tablo 4-1’de DLS çalışmalarından elde edilen üç farklı siRNA-PLGA partikülünün tüm grafiksel sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Farklı yöntemlerle üretilen siRNA-PLGA NP’lerinin DLS sonuçları.

		Partikül boyut dağılımı						
		Number	%	Intensity	%	Volume	%	PDI
Boş NP	PLGA-3	140.5	100	205.4	100	201.7	100	0.099
	PLGA-2	513.5	3.4	535.4	76.9	559.5	79.1	0.731
		108.5	96.6	120.4	23.1	116.1	20.9	
	PLGA-1	121.6	100.0	168.1	100.0	159.6	100.0	0.075
siRNA yüklenmiş NP	siRNA-PLGA-3	196.7	100.0	283.4	100.0	297.2	100.0	0.274
	siRNA-PLGA-2	4.038	100.0	522.4	82.3	532.4	0.0	1.000
				4.101	17.7	4.086	100.0	
	siRNA-PLGA-1	92.13	100.0	120.1	100.0	108.8	100.0	0.040

W/O/W yöntemi temelli kendiliğinden bileşen sistemlerle oluşturulan PLGA nanopartiküllerinin içerisine siRNA yüklenmiştir. Cun ve ark. yaptıkları benzer çalışmada siRNA biyoparçalanabilir PLGA nanopartikülleri içerisine yüksek kapsülasyon verimliliği ile yüklenmiş, PLGA NP’lerinin şekli küresel ve mono dispers olduğu tespit edilmiştir [236].

Üç farklı yöntem kullanılarak hazırlanan nanopartiküllere siRNA yüklenmiş ve nanopartiküllerin karakterizasyonu sonucu 90 ve 500 nm arasında boyutlara sahip olduğu gözlenmiştir. Farklı yöntemler kullanılarak hazırlanan PLGA NP’leri literatür ile uyumlu olarak farklı yöntemlerle farklı boyutlarda NP oluşturabileceğini göstermektedir [11].

Bhandari ve ark. yaptıkları çalışmada küresel şeklin ve küçük boyutta nano partiküllerin başarılı endositozları için en önemli kriter olduğu gösterilmiştir [246]. siRNA-PLGA NP’lerinin üretilmesinde diğer grupların önerdiği yöntemleri takip ettik ve farklı yayınlarda siRNA-PLGA partikül sentezinde kullanılan sonikasyon veya vortekslemenin partikül şekli ve dispersiyonu üzerindeki etkisini araştırdık [236, 247, 248]. Bu amaçla üretilen üç farklı siRNA-PLGA nanopartiküllerinde en küçük boyut, en yüksek gen susturma oranının elde edildiği siRNA-PLGA-1 NP’leridir. Bu NP üretilirken amacımız RNA yapısında meydana gelebilecek

bozulma riski nedeniyle sonikasyondan kaçınmaktı. Bununla birlikte, elde edilen sonuçlara dayanarak, sonikasyonun siRNA-PLGA partikülleri üretiminde gerekli bir adım olduğu sonucuna varabiliriz.

Sonikasyon olmadan vortekslemek, büyük ve poli dispersiyonlu partiküller elde edilmesine neden olurken; sonikasyon, hedeflenen kanser tedavisi için kabul edilebilir büyüklük olan yaklaşık 196 nm büyüklüğünde mono-dispersiyonlu partiküller elde etmeyi sağlar [249].

Oksijen taşıyan çözücüler içinde seyreltme tek sarmallı RNA'da konformasyon değişikliklerine neden olduğundan [23, 250], siRNA'nın formüle edilmesinde DCM gibi suda çözülebilir çözücüler kullanılması zorunluluğunu getirmiştir; bununla birlikte, su ve yağın emülsifikasyonunu sağlamak için PVA kullanılmasını gerektirir. PVA; çok hidrofilik bir polimerdir; DCM ile tamamen birleşmez, bu nedenle su formları içerisinde 100 nm'den büyük siRNA-PLGA partiküllerinin oluşmasına neden olan kısmen büyük DCM nano-damlacıkları bulunur [251, 252]. Formülasyon işlemi sırasında sonikasyon gerekliliğinin, sistemde homojenleştirilmiş boyutlara sahip daha küçük DCM partikülleri elde etmek için gerekli olduğunu varsayabiliriz. siRNA-PLGA-2 sisteminde gözlenen büyük agregatlar, siRNA'nın PLGA NP'leriyle eksik bir şekilde birleştirildiğini göstermektedir, ki bu muhtemelen siRNA'nın sulu ortamda BSA zincirleri ile toplanmasının bir sonucudur. Bu arada, küçük parçacıklar elde ederken EE% 'sini optimize etmek önemlidir.

4.7 siRNA-PLGA NP'lerinin enkapsülasyon verimi (%EE) ve yükleme verimi (%LE)

Kloroformda self-assembly metoduyla oluşan PLGA miselleri içerisinde enkapsüle edilen siRNA, su ve tampon çözeltilerinin bulunduğu ortama salım gerçekleştirir. PLGA miselleri içerisinde en kapsüle edilen siRNA gereç ve yöntem kısmında verilen enkapsülasyon verimi (%EE) formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

Yükleme verimi (%LE), nanopartikül içerisinde bulunan gereç ve yöntem kısmında verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.2: Farklı yöntemlerle üretilen siRNA-PLGA NP'lerinin %EE ve %LE sonuçları.

	PLGA	Final	Enkapsüle	İlk siRNA	EE (%)	LE
	(mg)	hacim	siRNA kons.	kons. (ng/ml)		(ng/mg NP)
		(ml)	(ng/ml)			
siR-PLGA-3	50	20	1245,55 ± 261	4000	31,14 ± 2.9	336,51± 18.1
siR-PLGA-2	30	8.115	1211,45 ± 185	4000	30,29 ± 4.1	345,99± 23.4
siR-PLGA-1	30	8.115	1110,08 ± 193	4000	27,75 ± 3.2	444,03± 31.6

Üç farklı yöntem kullanılarak hazırlanan NP'lerin enkapsülasyon ve yükleme verimlilikleri birbirinden farklı olmakla beraber çeşitli yapılan çalışmalarda enkapsülasyon ve yükleme verimi elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Cui ve ark. farklı PLGA konsantrasyonları ile yaptıkları çalışmada benzer enkapsülasyon ve yükleme verimliliği tespit etmişlerdir. Ayrıca ortama BSA'nın eklenmesi, ortalama partikül boyutu ve boyut dağılımını önemli ölçüde etkilememiştir, fakat enkapsülasyon etkinliğinde önemli bir artışa neden olmuştur. BSA eklendikten sonra iç su fazının artan viskozitesi, emülsiyonun arttırılmış stabilitesi ve arttırılmış kapsülleme verimliliğine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlarda literatür ile uyumlu sonuçlar göstermektedir [236]. Chithrani ve ark. yaptıkları çalışmada en başarılı hücre internalizasyonu ve gen susturma için istenen boyut 100 nm'den azdır [253]. Bu nedenle, düşük tanecik ebadı ile yüksek %EE 'si gerçekleştirilmelidir. Yapılan çalışmalar siR-PLGA NP'lerinin başarılı optimizasyonu için sonikasyonun en yüksek EE elde etmedeki önemini göstermiştir. Bununla birlikte, kapsülleme yüzdesindeki artış, büyük olasılıkla su içinde büyük emülsifiye edilmiş DCM damlacıklarının oluşmasından dolayı, partikül büyüklüğünün ~250 nm'ye yükselmesiyle ilişkilidir. Ayrıca, kendiliğinden bileşen sistemlerde organik çözücünün buharlaştırılması sırasında sistemde RNA'nın varlığı, oda sıcaklığında bulunan RNA'nın stabilizasyonunun bozulması bir risk faktörüdür. Mono dispers partikül oluşmasına neden olan bu yöntem RNA yapısına zarar verebilir.

Bu nedenle siRNA'nın önceden oluşturulan PLGA NP'lerine enkapsülasyonu sağlanarak, RNA yapısının bozulma olasılığı önlenmeye çalışıldı. Ayrıca PLGA NP'lerine si-RNA'nın enkapsüle edilmesi; RNA'nın optimum koşullarda inkübasyonunu sağlarken, kullanılan organik çözücü ile temasını önler. Bununla birlikte su ile karışabilen oksijen taşıyamayan çözümler kullanılarak serbest PLGA

NP'lerinin hazırlanması mümkündür ve aynı zamanda bu şekilde 100 nm'den küçük NP'ler hazırlanabilir.

Partikül büyüklüğü siRNA yüklendikten sonra 121 nm'den (sayı dağılımı ile ölçülen) 92 nm'ye düşmesi; küçülen partiküllerde PLGA'nın fonksiyonel grupları nükleotidleri kendi içerisine dahil ettiğini açıkça göstermektedir. Tüm bunlar diğer formülasyonlara kıyasla siRNA-PLGA-1'den elde edilen en yüksek gen susturma aktivitesi ve en yüksek oranda yük taşıma kapasitesinin korunduğunu gösterir.

siRNA-PLGA-2 ve siRNA-PLGA-3'de elde edilen zayıf gen susturma aktivitesi, partikül hazırlama işlemi sırasında RNA'nın stabilitesinin bozulmasının bir sonucu olabilir.

Üç farklı formülasyon için hesaplanan %EE neredeyse eşit olmasına rağmen, LE siRNA-PLGA-1 için en yüksek bulunmuştur.

Bazı çalışmalar, formülasyon bileşenlerinin %46'ya (BSA miktarını artırarak) modifiye ederek %EE değerini artırmaya devam etmişlerdir [236] , ancak siRNA-PLGA-1 kullanılarak gen susturma işleminde tam başarı, formülasyon parametrelerinde modifikasyon ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır.

4.8 Sentezlenen siRNA-PLGA NP'lerinin Gen Susturma Sonuçları

GPR87 geninin sentezlenen PLGA nanopartikülleri ile genin post transkripsiyonel susturulması Thermo Scientific™ Pierce™ Renilla-Firefly Luciferase Dual Assay kit kullanılarak ölçülmüştür. ELISA Reader cihazıyla üç farklı yöntemle sentezlenen PLGA NP'lerinin gen susturma düzeyleri ölçülmüştür. Ölçümlerde negatif ve pozitif kontroller kullanılarak floresans emisyonları karşılaştırılmıştır.

Kullanılan vektörde iki farklı dalga boyunda lüminesansa neden olan gen bölgesi mevcuttur. PsiCHECK™-2 vektöründe bulunan Green renilla lusiferaz ve Red firefly lusiferaz iki farklı dalga boyunda floresans ışımaya neden olmaktadır. 450-650nm (maksimum emisyon 535 nm) emisyon aralığında Green renilla lusiferazı, 560-700 nm (maksimum emisyon 613 nm) aralığında ise Red firefly floresans vermektedir. Vektörde bulunan green renilla bölgesinin devamında çoklu klonlama bölgesi bulunmaktadır. Çoklu klonlama bölgesine GPR87 geni klonlanmıştır. Bu bölgeye hedefli gönderilen siRNA ile post transkripsiyonel gen susturma gerçekleştiğinde bu bölgede lüminesans değerinin düştüğü veya lüminesans ışımaya hiç gözlenmez.

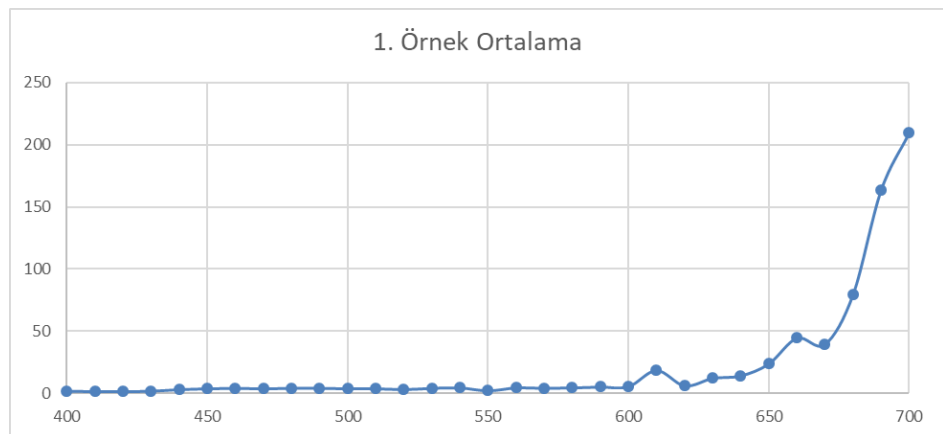
Diğer bir lüminesansa neden olan red firefly deneysel çalışmada kontrol amaçlı kullanılır. Bu bölgede lüminesans ışımının görülmesi deneysel çalışmaların sorunsuz gerçekleştiği ve gen susturmanın başarılı olduğunu göstermiştir.

Ölçümlerimiz sonucunda 490 nm'de Green Renilla'nın dalga boyundaki düşüşün GPR87 genin post transkripsiyonel susturma aktivitesiyle orantılı olduğu; 690 nm'de Red Firefly emisyonunun ise bağımsız olduğu ve tüm deneylerde sabit olduğu tespit edilmiştir.

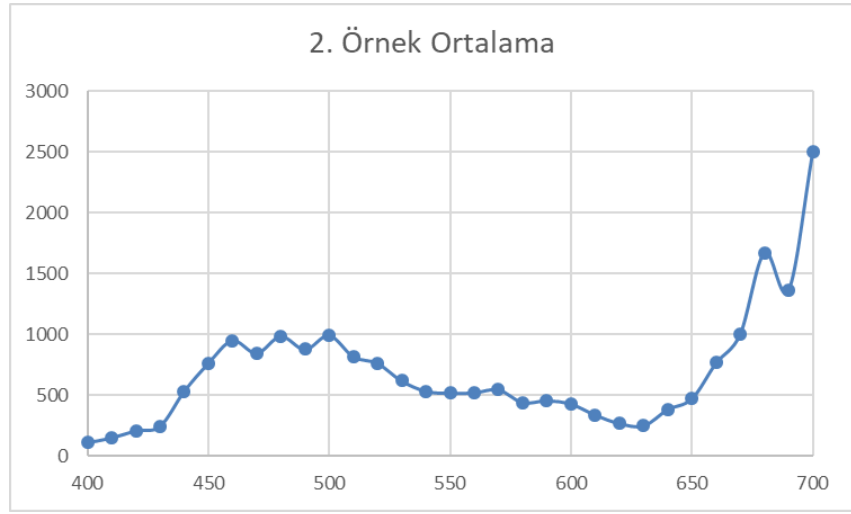
HEK293T ve 1.1B4 pankreas hücre hattı ile yapılan gen susturma çalışmalarında Negatif ve pozitif kontroller her ölçümde kullanılmıştır. Pozitif kontrol gruplarına siRNA yüklü PLGA NP kullanılmamıştır. Bu nedenle green renilla ve red firefly lüminesansın gerçekleştiği, negative kontrollerde ise siRNA etkisiyle green renilla lüminesansının azaldığı/ hiç gerçekleşmediği tespit edilmiştir.

Kontrollerin ve farklı siRNA-PLGA NP'lerin gen susturma aktivitesi, hücre ölümü nedeniyle pik yoğunluğundaki genel azalma dikkate alınarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

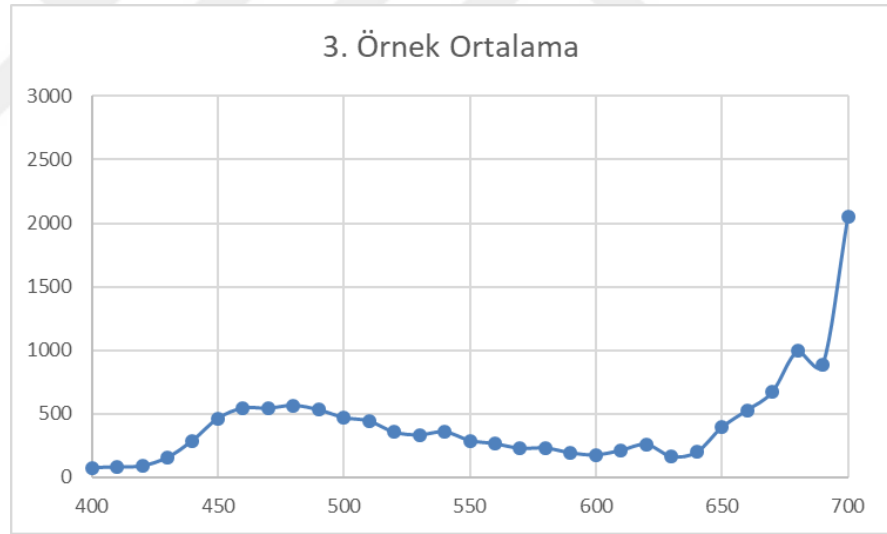
HEK293T hücre hattına gereç ve yöntem kısmında anlatılan siRNA-PLGA-1, siRNA-PLGA-2, siRNA-PLGA-3 nanopartikülleri ile gen susturma oranları şekil 4-23, 4-24, 4-25'de ayrı ayrı gösterilmiştir. Şekil 4-26'da ise üç farklı yöntemle hazırlanan nanopartiküllerin gen susturma oranları karşılaştırılarak gösterilmiştir.



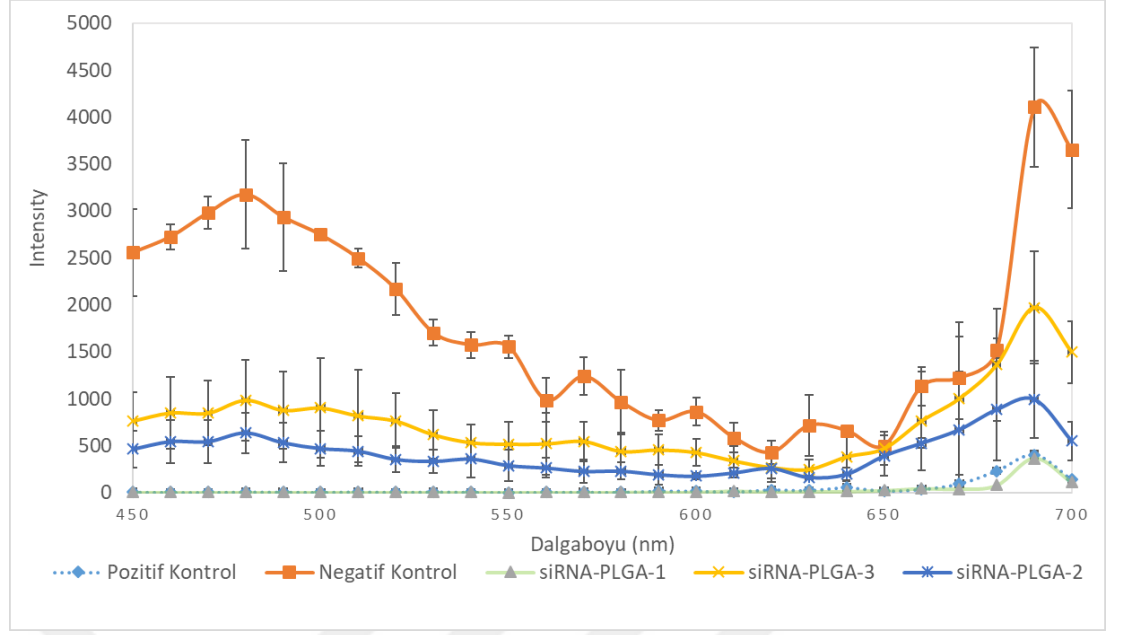
Şekil 4.23: Green Renilla ve Red Firefly floresan emisyon alanının taranması. siRNA-PLGA-1 NP ile HEK 293T hücre hattında GPR87 gen susturma sonucu.



Şekil 4.24: Green Renilla ve Red Firefly floresan emisyon alanının taranması. siRNA-PLGA-2 NP ile HEK 293T hücre hattında GPR 87 gen susturma sonucu.



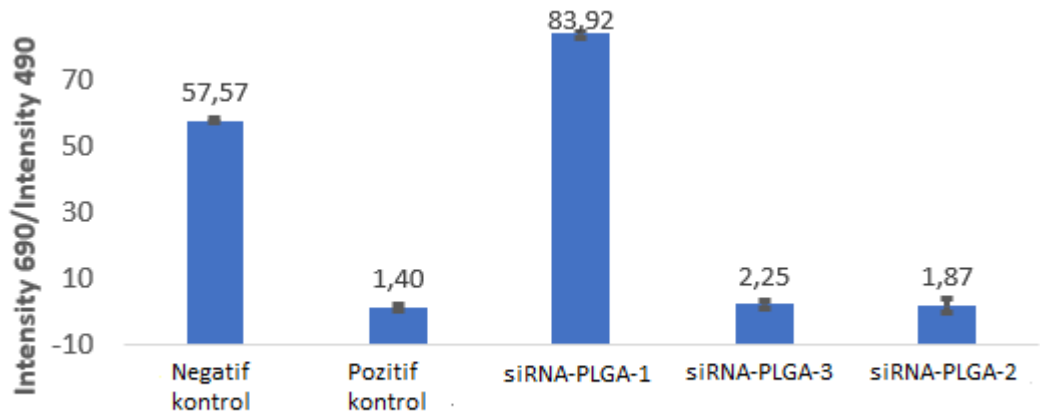
Şekil 4.25: Green Renilla ve Red Firefly floresan emisyon alanının taranması. siRNA-PLGA-3 NP ile HEK 293T hücre hattında GPR87 gen susturma sonucu.



Şekil 4.26: Green Renilla ve Red Firefly floresan emisyon alanının taranması. siRNA-PLGA-1,2 ve 3 NP ile HEK 293T hücre hattında GPR87 gen susturma sonucu.

Negatif kontrol grubunda hücrelere GPR87 geni transfesiyonu gerçekleştirilmiş fakat siRNA-PLGA NP gönderilmemiştir. Bu nedenle Green Renilla (490 nm) ve Red Firefly (690 nm) dalga boylarında floresans ışına görülmüştür. Negatif kontrol olarak “Lipofectamine® LTX and PLUS™ Reagent” kullanılmıştır. Kitin ve NP’lerin gen susturmaları oranları pozitif ve negatif kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır.

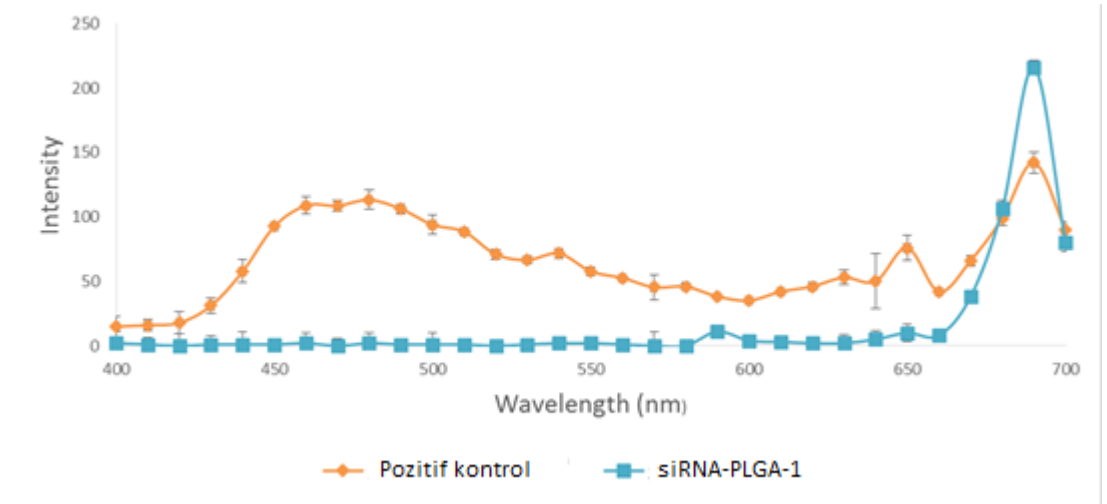
Pierre™ Renilla-Firefly Luciferase Dual Assay Kit kullanılarak 490 nm ve 690 nm’ yapılan ölçümler sonucunda üretilen üç farklı nanopartikülün gen susturmada başarılı olduğu tespit edilmiştir. Farklı formülasyonlarda hazırlanan NP’ler kendi aralarında kıyaslandığında GPR87 geninin post transkripsiyonel susturma oranlarının farklı olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.27: Pozitif ve negatif kontrol ile farklı siRNA-PLGA nanoformülasyonlarının GPR87 gen susturma aktivitesinin 490 nm ve 690 nm’de ölçüm sonuçları.

Glatt ve ark. GPR87 ekspresyonunun small interfering RNA (siRNA) ile susturulduğunu tespit etmişlerdir [27]. Bizim çalışmamızda üç farklı yöntem kullanılarak hazırlanan siRNA-PLGA NP’lerinin GPR87 genini susturmada etkili olduğu tespit edilmiştir. En etkili gen susturma siRNA-PLGA-1 NP’lerinde tespit edilmiştir.

1.1B4 pankreas hücre hattında gereç ve yöntem kısmında anlatılan siRNA-PLGA-1 nanopartikülleri ile gen susturma sonucu şekil 4-28’de gösterilmiştir.



Şekil 4.28: Green Renilla ve Red Firefly floresan emisyon alanının taranması. siRNA-PLGA NP ile 1.1B4 hücre hattında GPR 87 gen susturma sonucu.

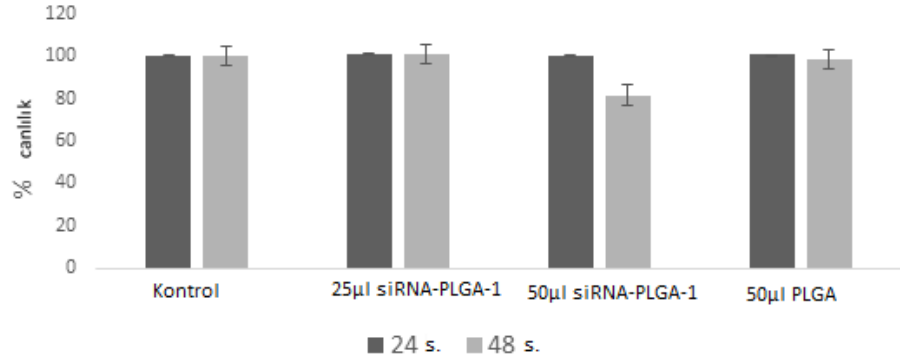
Yuan ve ark. yaptığı çalışmada si-GFP-RNA yüklü PLGA NP ile gen susturulduğu GFP proteinleri ile tespit edilmiştir [254]. Bizim çalışmamızda Green Renilla ve Red Firefly lüminesans ışması ile gen susturma tespit edilmiştir. 490 nm’de lüminesans ışmasının görülmemesi siRNA’nın komplementer diziyle tam eşleşme gösterdiği ve mRNA’nın parçalanmasına neden olarak lüminesans ışma gerçekleşmediğini göstermektedir. 690 nm’de ise lüminesans ışma devam etmektedir. Bu lüminesans ışma siRNA’nın PLGA nanopartikülleri ile hücreye girdiğini ve siRNA-psiCHECK™-2 rekombinant vektörün gen ekspresyonunun sorunsuz devam ettiğini göstermektedir. Pozitif kontrol ile karşılaştırma yapıldığında lüminesans ışmada belli bir miktar azalmasının nedeni ise siRNA 1.1B4 hücre hattında çeşitli yolları etkileyerek hücre ölümüne neden olmasından kaynaklanmaktadır. Zhang ve ark. [59] yaptıkları çalışmada GPR87 geninin ekspresyonunun engellemesi hücrelerin canlılığını etkilemekte ve P53’e bağlı DNA hasarı ile hiperaktivize edildiği gözlenmiştir. Bu ve benzeri çalışmalar bizim deney sonuçlarımızı doğrulamaktadır.

4.9 siRNA-PLGA NP ile 1.1B4 Hücre Hattında Sitotoksikite Deneyi Sonuçları

GPR87 geninin susturulması hücrede çeşitli yolları etkileyerek zamanla hücre canlılığının kaybedilmesine neden olmaktadır. Sulforhodamine B (SRB) yöntemiyle gen susturmanın hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi tespit edilmiştir.

1.1B4 pankreas hücre hattına iki farklı konsantrasyonlarda siRNA-PLGA NP verilmiştir.

Gereç ve yöntem kısmında siRNA-PLGA-1 NP şeklinde hazırlanan NP’ler; iki farklı konsantrasyonda (50 µl, final konsant. 62 ng/ml ve 25 µl, final konsant. 31 ng/ml) olmak üzere iki farklı konsantrasyonda hücrelere muamele edilmiştir. Hücrelerin canlılıklarını tespit etmek için 24 saat ve 48 saatlik farklı periyotlarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası SRB yöntemiyle hücrelerin canlılıkları ölçülmüştür.



Şekil 4.29: SRB yöntemiyle 1.1B4 hücrelerinin sitotoksosite sonucu.

Yapılan çalışmalarda kullanılan çeşitli katyonik lipitler, katyonik polimerler, hücre penetrasyon peptitleri gibi çeşitli non-viral taşıma yöntemlerinin yapılan çalışmalar sonucu toksisite, düşük serum stabilitesi, non-spesifik immün yanıt ve biyolojik olarak parçalanabilirlik eksikliği gibi çeşitli kullanımını sınırlayan ciddi kritik konular bulunmaktadır [255]. Bu nedenle biyoyumu ve biyoparçalanabilir polimerlerin kullanılması toksisite, non-spesifik immün yanıt gibi çeşitli problemleri ortadan kaldırarak hedefli kişiye özgü tedavide kullanımına imkan tanımaktadır. Garcia ve ark. yaptıkları çalışmada anal displazi ve servikal displazinin faz 2 klinik çalışmalarında kullandığı PLGA [256] düşük toksisite, biyoyumlu ve biyoparçalanabilir olduğundan terapötik maddelerin taşınmasında kullanılır. Deneysel çalışmalarımız sırasında PLGA polimeri ile oluşturduğumuz nanopartiküllere siRNA yüklenmeden hücrelere verilmiş ve hücreler 24 ve 48 saat inkübasyonda bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası herhangi bir muamele yapılmamış kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak sitotoksitesini ölçülmüştür. Literatür ile uyumlu olarak herhangi bir sitotoksik etki gözlenmemiştir.

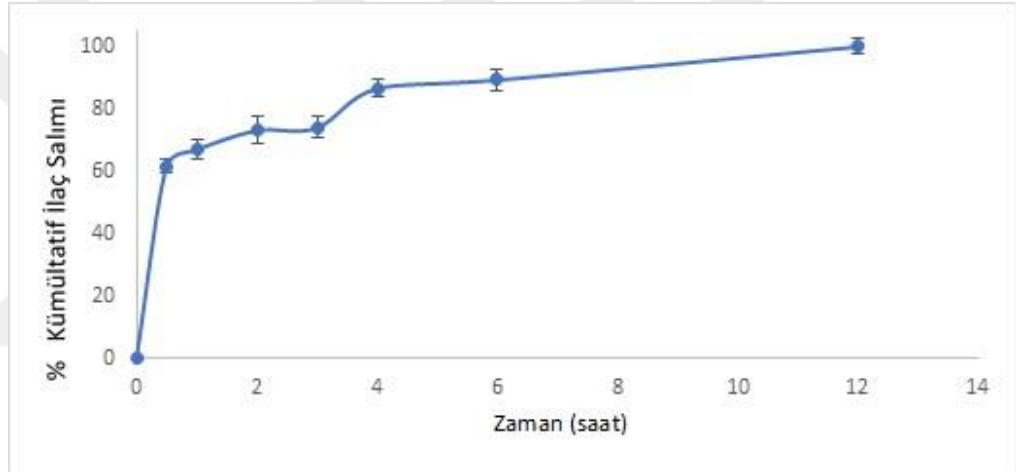
GPR87, LPA reseptör ailesiyle ilişkili GPR, çeşitli karsinomalarda aşırı ekspresyona sahiptir ve tümörün hayatta kalma süresinde önemli rol oynar [50]. Zhang ve ark. kanser hücre hattı MCF7 ve ROC ile yaptıkları çalışmada GPR87 geninin ekspresyonu tümör baskılayıcı p53 ve p53'e bağlı DNA hasarı ile düzenlendiği bildirildi [59]. Yine bu çalışmada Ad-shGPR87 kullanılarak mesane kanseri hücre hatlarında GPR87'nin baskılanmasının, anti-kanser ilaçları nedeniyle herhangi bir stres olmadığında p53 ekspresyonunda bir artışa neden olduğu, ardından da hücre proliferasyonu ve apoptozun indüksiyonu gösterilmiştir.

GPR87 genini hedefleyerek tasarladığımız siRNA-PLGA (siRNA-PLGA-1) nanopartikülleri içerisine enkapsüle edilerek iki farklı konsantrasyonda hücrelere

verilerek inkübasyona bırakılmıştır. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası toksisite sonuçları incelenmiştir. 50 µL verilen hücrelerde 25µL gönderilen hücreler göre toksik etkinin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

4.10 siRNA-PLGA-1 Nanopartiküllerinin İn Vitro Salım Sonucu

siRNA-PLGA NP'lerinin pH 7.4'de gereç ve yöntem kısmında bahsedilen periyotlarla salım miktarı tespit edilmiştir. Şekil 31'de görüldüğü gibi hızlı bir salınımın ardından sürekli bir salım gerçekleşmektedir. Salım profili en iyi 0.9184 R² değerinde tespit edilmiştir. Buda siRNA serbest bırakma oranının konsantrasyona bağlı olduğu anlamına gelir.



Şekil 4.30: siRNA-PLGA NP'lerinin salım sonucu.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Farklı yöntemlerle hazırlanan PLGA NP'leri içerisine enkapsüle edilen siRNA'nın RNAi tekniği ile gen susturma üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ayrıca hidrofilik siRNA'nın amfililik PLGA ile etkileşimi, salım süresi, mono-dispers parçacık oluşumu ve sitotoksitesi değerlendirilmiştir.

Hidrofilik ortamda kendiliğinden bileşen sistemlerle (self-assembly) oluşan mono dispers PLGA NP'leri içerisine siRNA girişi başarıyla gerçekleşmiş ve farklı protokoller kullanılarak üretilen farklı PLGA NP'leri gen susturmada başarılı olmuştur.

Çalışmanın ilk basamağında siRNA başarıyla üretilmiş; ikinci basamağında su-yağ-su (W1/O/W2) metoduyla farklı protokollerle üç farklı PLGA NP'leri üretilerek siRNA'nın bu NP'lere farklı yöntemlerle enkapsülasyonu, HEK293T ve 1.1B4 hücre hatlarında, NP hücreye girdiği ve gen susturmada başarılı olduğu biyoluminesans ışınması ile belirlenmiştir.

HEK293T hücre hattına uygulanan siRNA-PLGA-1, 2 ve 3 NP'leri hücrenin içerisine başarıyla girdiği ve GPR87 geninin post transkripsiyonel gen susturmada başarılı olduğu tespit edilmiştir.

siRNA-PLGA-1 NP'leri literatürden farklı olarak PVA gibi bir ara polimer kullanılmadan, siRNA nanopartikül sentezlendikten sonra enkapsüle edilmiştir. Partikül boyutunun ~100 nm olduğu ve en etkili gen susturma bu yöntem ile üretilen siRNA-PLGA NP'leri ile tespit edilmiştir.

siRNA-PLGA-2 NP'leri ise literatüre uygun olarak PLGA NP'leri oluşurken şiddetli vortekslenerek siRNA enkapsülasyonu sağlanmıştır. Oda sıcaklığında hazırlanan bu NP'lerin diğer protokollere oranla boyutunun daha büyük olduğu (~500 nm) ve gen susturma oranının diğer yöntemlerle hazırlananlara göre düşük olduğu tespit edilmiştir.

siRNA-PLGA-3 NP'leri ise literatüre uygun olarak PLGA NP'leri oluşurken ultrasonik prob kullanarak emülsifikasyon ve siRNA enkapsülasyonu sağlanmıştır. Kısmen buz üzerinde gerçekleştirilen bu işlemler sonucunda NP boyutu (~200 nm)

siRNA-PLGA-2'ye göre daha istenilen boyutta ve daha etkili gen susturma tespit edilmiştir.

Literatür ile uyumlu olarak sentezlenen siRNA-PLGA-2 ve 3 NP'lerine siRNA'nın enkapsüle edilmesi için literatürde PVA/PEI gibi ara polimerler kullanılmıştır. Bu ara polimerler yüzey gerilimini azaltarak (mono dispers partikül oluşmasını sağlar) ve hidrofilik ortamda siRNA'nın hücreye girişini kolaylaştırır. Ancak kullanılan PVA/PEI'nin santrifüj işlemleriyle uzaklaştırılması siRNA stabilitesini ve NP yapısı üzerinde olumsuz etkileri vardır. Ayrıca toksisiteye sebep olabilecek maddelerden arındırılması için gerçekleştirilen santrifüjleme işlemi siRNA'nın dışarı çıkmasına enkapsülasyon verimliliğinin düşmesine ve bir miktar siRNA'nın dış kısımdaki sulu ortamda kaybedilmesine neden olur. Tüm bunlara ek olarak NP hazırlanırken kullanılan diklormetan NP'lerin boyutunun büyümesine neden olmaktadır. Literatüre uygun olarak hazırlanan siRNA-PLGA-2 ve siRNA-PLGA-3 NP'lerinde etkili gen susturma tespit edilmesine rağmen uygulanan protoküllerin sınırlılıkları bulunmaktadır. Bu da hücreye alımını ve gen susturmasını etkilemektedir.

Farklı ve özgün olarak hazırlanan siRNA-PLGA-1 NP'leri ise sitotoksositeye neden olabilecek herhangi bir maddeyi uzaklaştırmak için santrifüj işlemine gereksinim duyulmaması, siRNA'nın NP oluşturulduktan sonra enkapsüle edilesi, ayrıca oluşturulan NP'lerin diğer yöntemlerle hazırlanan NP oranla boyutunun daha küçük olması gibi çeşitli avantajları vardır. Ayrıca diğer hazırlanan NP'lere oranla daha etkili gen susturma gözlenmiştir.

HEK293T hücre hattı sonuçlarına göre en etkili gen susturma ve NP boyutuna sahip siRNA-PLGA-1 NP'leri kullanılarak 1.1B4 pankreas hücre hattında da gen susturmanın başarıyla gerçekleştiği, hücreler üzerinde sitotoksik etki yaratmadığı tespit edilmiştir.

1.1B4 hücre hattı üzerinde yapılan sitotoksosite çalışması sonuçlarına göre 25 µL olarak uygulanan hücrelerin 24 saat sonucu ve kontrol gruplarına kıyasla, 50 µL uygulanan hücrelerin 48 saat sonunda canlılıklarının azaldığı tespit edilmiştir.

Yapılan salım deneyleri sonucunda edilen salım grafiğine göre siRNA'nın bir bölümünün dışarıda olduğunu hepsinin suda çözünmediğini NP içine de yüklendiğini göstermektedir. NP'ler siRNA'yı ilk önce hızlı bir salımını gerçekleştirdikten sonra

yaklaşık 6 saat boyunca enkapsüle edilen siRNA'nın zamanla tamamını bıraktığı tespit edilmiştir.

Enkapsülasyon verimi literatüre uygun olarak gerçekleşmiştir. Ancak %EE'nin istenilenden düşük olmasının nedeni, siRNA'nın santrifüj işlemleri sonucu NP'lerden ayrılmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan literatür araştırmasında siRNA-PLGA NP kullanılarak GPR87 geninin post transkripsiyonel susturulması ile ilgili çalışma tespit edilememiştir. Ayrıca yapılan literatür araştırmalarında PLGA NP'ne enkapsüle edilen siRNA'nın genellikle ticari olarak alındığı ve araştırmacılar tarafından üretiminin yok denecek kadar az olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda RNAi tekniği ile üretilen siRNA'nın, GPR87 genini in vitro koşullarda etkili bir susturduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın devamı olarak bu nanotaşıyıcı sistemlerin etkinliği geliştirilerek in vivo çalışmalarla desteklenmesi düşünülmektedir.

siRNA-PLGA-1 NP'nin GPR87 genini tamamen susturmadaki başarısı, üretim prosesinin endüstriyel üretilere uyumu nedeniyle toplu üretimi de mümkündür ve RNA makromoleküllerinin formüle edilmesinde yeni bir yöntem olarak önerilmektedir. Her ne kadar GPR87 geninin susturulması, 1.1B4 pankreas kanseri hücre hatlarında düşük hücre ölüm oranına yol açsada, bu yaklaşım pankreas kanserinin tamamlayıcı tedavisi olarak düşünülebilir. Bu nedenle, siRNA formülasyonlarının geleneksel kanser kemoterapisiyle birlikte uygulaması için daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] **Koutsogiannouli, E., Papavassiliou, A. G. ve Papanikolaou, N. A.** (2013). Complexity in cancer biology: is systems biology the answer? *Cancer Med*, 2(2), 164-177.
- [2] **Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M. ve Matrisian, L. M.** (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*, 74(11), 2913-2921.
- [3] **Danhier, F., Feron, O. ve Preat, V.** (2010). To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release*, 148(2), 135-146.
- [4] **Miller, J. A., Witherow, D. S. ve Carson, S.** (2009). A laboratory-intensive course on RNA interference and model organisms. *CBE Life Sci Educ*, 8(4), 316-325.
- [5] **Huang, C., Li, M., Chen, C. ve Yao, Q. J. E. o. o. t. t.** (2008). Small interfering RNA therapy in cancer: mechanism, potential targets, and clinical applications. *12(5)*, 637-645.
- [6] **Xie, F. Y., Woodle, M. C. ve Lu, P. Y.** (2006). Harnessing in vivo siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development. *Drug Discovery Today*, 11(1-2), 67-73.
- [7] **Colombo, S., Zeng, X., Ragelle, H. ve Foged, C.** (2014). Complexity in the therapeutic delivery of RNAi medicines: an analytical challenge. *Expert Opin Drug Deliv*, 11(9), 1481-1495.
- [8] **Bannunah, A. M., Vllasaliu, D., Lord, J. ve Stolnik, S.** (2014). Mechanisms of nanoparticle internalization and transport across an intestinal epithelial cell model: effect of size and surface charge. *Mol Pharm*, 11(12), 4363-4373.
- [9] **Patil, M. L., Zhang, M. ve Minko, T.** (2011). Multifunctional triblock Nanocarrier (PAMAM-PEG-PLL) for the efficient intracellular siRNA delivery and gene silencing. *ACS Nano*, 5(3), 1877-1887.
- [10] **Vijayanathan, V., Thomas, T. ve Thomas, T. J.** (2002). DNA nanoparticles and development of DNA delivery vehicles for gene therapy. *Biochemistry*, 41(48), 14085-14094.
- [11] **Ulery, B. D., Nair, L. S. ve Laurencin, C. T. J. J. o. p. s. P. B. p. p.** (2011). Biomedical applications of biodegradable polymers. *49(12)*, 832-864.

- [12] Gary, D. J., Puri, N. ve Won, Y. Y. (2007). Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *J Control Release*, 121(1-2), 64-73.
- [13] Honary, S. ve Zahir, F. J. T. J. o. P. R. (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). *12*(2), 265-273.
- [14] Cooper, D. L. ve Harirforoosh, S. (2014). Effect of formulation variables on preparation of celecoxib loaded polylactide-co-glycolide nanoparticles. *PLoS One*, 9(12), e113558.
- [15] Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A. ve Preat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release*, 161(2), 505-522.
- [16] Stern, M., Ulrich, K., Geddes, D. M. ve Alton, E. W. (2003). Poly (D, L-lactide-co-glycolide)/DNA microspheres to facilitate prolonged transgene expression in airway epithelium in vitro, ex vivo and in vivo. *Gene Ther*, 10(16), 1282-1288.
- [17] Lee, J. S., Green, J. J., Love, K. T., Sunshine, J., Langer, R. ve Anderson, D. G. (2009). Gold, poly(beta-amino ester) nanoparticles for small interfering RNA delivery. *Nano Lett*, 9(6), 2402-2406.
- [18] Howard, K. A. (2009). Delivery of RNA interference therapeutics using polycation-based nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, 61(9), 710-720.
- [19] Shu, D., Shu, Y., Haque, F., Abdelmawla, S. ve Guo, P. (2011). Thermodynamically stable RNA three-way junction for constructing multifunctional nanoparticles for delivery of therapeutics. *Nat Nanotechnol*, 6(10), 658-667.
- [20] Wang, J., Lu, Z., Wientjes, M. G. ve Au, J. L. (2010). Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers. *AAPS J*, 12(4), 492-503.
- [21] Liang, G. F., Zhu, Y. L., Sun, B., Hu, F. H., Tian, T., Li, S. C., ve ark. (2011). PLGA-based gene delivering nanoparticle enhance suppression effect of miRNA in HePG2 cells. *Nanoscale Res Lett*, 6, 447.
- [22] Lee, S. H., Mok, H., Lee, Y. ve Park, T. G. (2011). Self-assembled siRNA-PLGA conjugate micelles for gene silencing. *J Control Release*, 152(1), 152-158.
- [23] Nakano, S. I. ve Sugimoto, N. (2016). The structural stability and catalytic activity of DNA and RNA oligonucleotides in the presence of organic solvents. *Biophys Rev*, 8(1), 11-23.
- [24] Pantazis, P., Dimas, K., Wyche, J. H., Anant, S., Houchen, C. W., Panyam, J., ve ark. (2012). Preparation of siRNA-encapsulated PLGA nanoparticles for sustained release of siRNA and evaluation of encapsulation efficiency. *Methods Mol Biol*, 906, 311-319.

- [25] Wittenberger, T., Schaller, H. C. ve Hellebrand, S. (2001). An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors. *J Mol Biol*, 307(3), 799-813.
- [26] Wang, L., Zhou, W., Zhong, Y., Huo, Y., Fan, P., Zhan, S., ve ark. (2017). Overexpression of G protein-coupled receptor GPR87 promotes pancreatic cancer aggressiveness and activates NF- κ B signaling pathway. *16*(1), 61.
- [27] Glatt, S., Halbauer, D., Heindl, S., Wernitznig, A., Kozina, D., Su, K. C., ve ark. (2008). hGPR87 contributes to viability of human tumor cells. *Int J Cancer*, 122(9), 2008-2016.
- [28] Baykara, O. (2016). Current Modalities in Treatment of Cancer. *Balıkesir Health Sciences Journal*, 5(3), 154-165.
- [29] Pogribny, I. P. (2010). EPIGENETIC EVENTS IN TUMORIGENESIS:PUTTING THE PIECES TOGETHER. *Experimental Oncology*, 32, 132-136.
- [30] Arteaga, C. L., Adamson, P. C., Engelman, J. A., Foti, M., Gaynor, R. B., Hilsenbeck, S. G., ve ark. (2014). AACR Cancer Progress Report 2014. *Clin Cancer Res*, 20(19 Suppl), S1-S112.
- [31] Arnedos, M., Vielh, P., Soria, J. C. ve Andre, F. (2014). The genetic complexity of common cancers and the promise of personalized medicine: is there any hope? *J Pathol*, 232(2), 274-282.
- [32] Michor, F., Iwasa, Y. ve Nowak, M. A. (2004). Dynamics of cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 4(3), 197-205.
- [33] Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S. V., Hainaut, P., ve ark. (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*, 28(6), 622-629.
- [34] Eser Y. Sözmen, K. E., Taner Onat, . (2002). *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme yayıncılık
- [35] Beran YOKUŞ* , D. Ü. Ç. (2012). kanser biyokimyası. *Dicle Üniv Vet Fak Derg* 1, 7-18.
- [36] Stehelin, D. (1995). Oncogenes and cancer. *Science*, 267(5203), 1408-1409.
- [37] Lewin, B. (2004). *Gene VIII*. Pearson Prentice Hall: United States of America. .
- [38] Sakura Sakajiri, N. K., 1 Motoki Egashira, Kiyoshi Mori and Kazuo Oshimi. (October 2001). <Molecular Analysis of Tumor Suppressor Genes, Rb, p53, p16INK4A, p15INK4B.pdf>. *Jpn J Cancer Res*, 92, 1048–1056.
- [39] Ekmekçi, P. D. A. (2006). *Gen, Genetik Değişim ve Hastalıklar*. GAZİ KİTABEVİ
- [40] Negrini, S., Gorgoulis, V. G. ve Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(3), 220-228.

- [41] Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ve ark. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136(5), E359-386.
- [42] Wolfgang, C. L., Herman, J. M., Laheru, D. A., Klein, A. P., Erdek, M. A., Fishman, E. K., ve ark. (2013). Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin*, 63(5), 318-348.
- [43] KARAKAŞ, D. (2017) *PANKREAS KANSERİ ve TÜMÖR MİKROÇEVRESİNİN ÖKARYOTİK ELONGASYON FAKTÖRÜ 2 KİNAZ (EF2K) ENZİM İNHİBİSYONU ARACILIĞIYLA HEDEFLENMESİ* BURSA: ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
- [44] Ryan, D. P., Hong, T. S. ve Bardeesy, N. (2014). Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 371(11), 1039-1049.
- [45] Dr. Fikret ŞAHİN, M. T., Dr. Asuman SUNGUROĞLU. (2007). Pankreatik Kanserin Moleküler Patogenezi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 27, 560-566.
- [46] Hansel, D. E., Kern, S. E. ve Hruban, R. H. (2003). Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 4, 237-256.
- [47] Ottenhof, N. A., de Wilde, R. F., Maitra, A., Hruban, R. H. ve Offerhaus, G. J. (2011). Molecular characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Patholog Res Int*, 2011, 620601.
- [48] ŞAHİN, F., TAŞPINAR, M. ve SUNGUROĞLU, A. J. T. K. J. o. M. S. (2007). Pankreatik Kanserin Moleküler Patogenezi. 27(4), 560-566.
- [49] Maitra, A., Kern, S. E. ve Hruban, R. H. (2006). Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 20(2), 211-226.
- [50] Zhang, Y., Scoumanne, A. ve Chen, X. (2010). G Protein-Coupled Receptor 87: a Promising Opportunity for Cancer Drug Discovery. *Mol Cell Pharmacol*, 2(3), 111-116.
- [51] Park, P. S. (2012). Ensemble of G protein-coupled receptor active states. *Curr Med Chem*, 19(8), 1146-1154.
- [52] Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., ve ark. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92(4), 573-585.
- [53] Ghanemi, A. (2015). Targeting G protein coupled receptor-related pathways as emerging molecular therapies. *Saudi Pharm J*, 23(2), 115-129.
- [54] Dorsam, R. T. ve Gutkind, J. S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*, 7(2), 79-94.
- [55] Strader, C. D., Fong, T. M., Tota, M. R., Underwood, D. ve Dixon, R. A. (1994). Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem*, 63, 101-132.

- [56] Oh, D. Y., Kim, K., Kwon, H. B. ve Seong, J. Y. (2006). Cellular and molecular biology of orphan G protein-coupled receptors. *Int Rev Cytol*, 252, 163-218.
- [57] Gugger, M., White, R., Song, S., Waser, B., Cescato, R., Riviere, P., ve ark. (2008). GPR87 is an overexpressed G-protein coupled receptor in squamous cell carcinoma of the lung. *Dis Markers*, 24(1), 41-50.
- [58] Rani, M., Nischal, A., Sahoo, G. C. ve Khattri, S. J. A. P. J. o. C. P. (2013). Computational analysis of the 3-D structure of human GPR87 protein: implications for structure-based drug design. *14*(12), 7473-7482.
- [59] Zhang, Y., Qian, Y., Lu, W. ve Chen, X. (2009). The G protein-coupled receptor 87 is necessary for p53-dependent cell survival in response to genotoxic stress. *Cancer Res*, 69(15), 6049-6056.
- [60] Rozengurt, E., Sinnott-Smith, J. ve Eibl, G. (2018). Yes-associated protein (YAP) in pancreatic cancer: at the epicenter of a targetable signaling network associated with patient survival. *Signal Transduct Target Ther*, 3, 11.
- [61] Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R. ve Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*, 2(12), 751-760.
- [62] Kolosnjaj-Tabi, J., Marangon, I., Nicolas-Boluda, A., Silva, A. K. A. ve Gazeau, F. (2017). Nanoparticle-based hyperthermia, a local treatment modulating the tumor extracellular matrix. *Pharmacol Res*, 126, 123-137.
- [63] Higano, C. S., Schellhammer, P. F., Small, E. J., Burch, P. A., Nemunaitis, J., Yuh, L., ve ark. (2009). Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer*, 115(16), 3670-3679.
- [64] Mario P. Colombo, M. R. a., Wolfgang Walther, Ulrike Stein (eds.). (2000). *Gene Therapy of Cancer: Methods and Protocols*. 1 ed: Humana Press.
- [65] Park, S. H., Tish Knobf, M. ve Jeon, S. (2019). Endocrine Therapy-Related Symptoms and Quality of Life in Female Cancer Survivors in the Yale Fitness Intervention Trial. *J Nurs Scholarsh*.
- [66] Soares, P. I., Ferreira, I. M., Igreja, R. A., Novo, C. M. ve Borges, J. P. (2012). Application of hyperthermia for cancer treatment: recent patents review. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 7(1), 64-73.
- [67] Day, E. S., Morton, J. G. ve West, J. L. (2009). Nanoparticles for thermal cancer therapy. *J Biomech Eng*, 131(7), 074001.
- [68] Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*, 1(2), 1-4.
- [69] Wang, T., Zhang, Z., Jie, G., Yin, J., Renqiang, S., Bao, F., ve ark. (2014). *Synthesis of Graphene Oxide Modified Poly(sebacic anhydride) Hybrid Materials for Controlled Release Applications*.

- [70] Haag, R. ve Kratz, F. (2006). Polymer therapeutics: concepts and applications. *Angew Chem Int Ed Engl*, 45(8), 1198-1215.
- [71] Selwood, K. (2009). Side Effects of Chemotherapy. ss. 35-71):
- [72] Yang, X., Wang, Y., Huang, X., Ma, Y., Huang, Y., Yang, R., ve ark. (2011). Multi-functionalized graphene oxide based anticancer drug-carrier with dual-targeting function and pH-sensitivity. *J Mater Chem*, 21(10), 3448-3454.
- [73] Arruebo, M., Vilaboa, N., Saez-Gutierrez, B., Lambea, J., Tres, A., Valladares, M., ve ark. (2011). Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers (Basel)*, 3(3), 3279-3330.
- [74] Nieder, C., Milas, L. ve Ang, K. K. (2000). Tissue tolerance to reirradiation. *Semin Radiat Oncol*, 10(3), 200-209.
- [75] Burak Barbaros, M. D. (December-2015). kanser immünoterapisi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, s31(4), 177-181.
- [76] Özlük, A. A. (2017). Cancer immunotherapy. *Istanbul Bilim University Florence Nightingale Transplantation Journal*, 2(1), 21-23.
- [77] Beik, J., Abed, Z., Ghoreishi, F. S., Hosseini-Nami, S., Mehrzadi, S., Shakeri-Zadeh, A., ve ark. (2016). Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. *J Control Release*, 235, 205-221.
- [78] Habash, R. (2007). *Bioeffects and Therapeutic Applications of Electromagnetic Energy*. 1st Edition ed. Boca Raton: CRC Press.
- [79] Guyton, A. (1996). *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia W.B. Saunders.
- [80] Vaupel, P. (2004). Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol*, 14(3), 198-206.
- [81] Habash, R. (2008). *BIOEFFECTS AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF ELECTROMAGNETIC ENERGY*. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.
- [82] Jordan, A., Scholz, R., Wust, P., Fähling, H. ve Felix, R. (1999). *Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH): Cancer Treatment with AC Magnetic Field Induced Excitation of Biocompatible Superparamagnetic Nanoparticles*. 413-419 s.
- [83] Chen, W. R., Adams, R. L., Carubelli, R. ve Nordquist, R. E. (1997). Laser-photosensitizer assisted immunotherapy: a novel modality for cancer treatment. *Cancer Lett*, 115(1), 25-30.
- [84] Adam Chichel, J. S., Magda Kubaszewska, Marek Kanikowski. (2007). Hyperthermia – description of a method and a review of clinical application. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy* 12(5), 267-275.
- [85] O'Connor, D. M. ve Boulis, N. M. (2016). Erratum to 'Gene therapy for neurodegenerative diseases' [Trends in Molecular Medicine 21 (2015) 504-512]. *Trends Mol Med*, 22(3), 266.

- [86] Amor, D. (2001). Gene therapy. Principles and potential applications. *Aust Fam Physician*, 30(10), 953-958.
- [87] Barnes, M. N., Deshane, J. S., Rosenfeld, M., Siegal, G. P., Curiel, D. T. ve Alvarez, R. D. (1997). Gene therapy and ovarian cancer: a review. *Obstet Gynecol*, 89(1), 145-155.
- [88] Nielsen, T. O. (1997). Human Germline Gene Therapy. *McGill Journal of Medicine*, 3, 126-132.
- [89] John M. Stribley, K. S. R., Hairong Niu, Gregory M. Christman. (APRIL 2002). Gene therapy and reproductive medicine. *FERTILITY AND STERILITY*, 77, 645-657.
- [90] O'Malley, B. W., Jr. ve Ledley, F. D. (1993). Somatic gene therapy. Methods for the present and future. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 119(10), 1100-1107.
- [91] Stribley, J. M., Rehman, K. S., Niu, H. ve Christman, G. M. (2002). Gene therapy and reproductive medicine. *Fertil Steril*, 77(4), 645-657.
- [92] Van Tendeloo, V. F., Van Broeckhoven, C. ve Berneman, Z. N. (2001). Gene therapy: principles and applications to hematopoietic cells. *Leukemia*, 15(4), 523-544.
- [93] Sawamoto, K., Chen, H. H., Almeciga-Diaz, C. J., Mason, R. W. ve Tomatsu, S. (2018). Gene therapy for Mucopolysaccharidoses. *Mol Genet Metab*, 123(2), 59-68.
- [94] ÖZCAN, A. G. (2007). GEN TEDAVİSİ VE BİYOGÜVENLİK. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 64(1).
- [95] BÜYÜKKÖROĞLU, G. J. T. J. o. P. S. (2016). Development of Solid Lipid Gene Delivery System. *13(2)*, 249-258.
- [96] Fraldi, A., Serafini, M., Sorrentino, N. C., Gentner, B., Aiuti, A. ve Bernardo, M. E. (2018). Gene therapy for mucopolysaccharidoses: in vivo and ex vivo approaches. *Ital J Pediatr*, 44(Suppl 2), 130.
- [97] Gewirtz, A. M. (2007). On future's doorstep: RNA interference and the pharmacopeia of tomorrow. *J Clin Invest*, 117(12), 3612-3614.
- [98] Hammond, S. M., Caudy, A. A. ve Hannon, G. J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet*, 2(2), 110-119.
- [99] Carolyn Napoli, C. L., and Richard Jorgensen. (April 1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes In trans *The Plant Cell* 2, 279-289.
- [100] CUNNINGHAM, C. C. (2002). New modalities in oncology antisense oligonucleotides. *BAYLOR UNIVERSITY MEDICAL CENTER PROCEEDINGS* 15.
- [101] Lochmann, D., Jauk, E. ve Zimmer, A. (2004). Drug delivery of oligonucleotides by peptides. *Eur J Pharm Biopharm*, 58(2), 237-251.

- [102] **Kurreck, J.** (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem*, 270(8), 1628-1644.
- [103] **Bennett, C. F. ve Swayze, E. E.** (2010). RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 259-293.
- [104] **Tekintaş, Y., Dora, D. D. ve Hoşgör Limoncu, M.** (2016). Antisense Oligonucleotids and Antibacterial Use. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*.
- [105] **El-Aneed, A.** (2004). Current strategies in cancer gene therapy. *Eur J Pharmacol*, 498(1-3), 1-8.
- [106] **Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. ve Bartel, D. P.** (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101(1), 25-33.
- [107] **Leung, R. K. ve Whittaker, P. A.** (2005). RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther*, 107(2), 222-239.
- [108] **Guo, S. ve Kempfues, K. J.** (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 81(4), 611-620.
- [109] **Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. ve Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.
- [110] **Zeng, Y. ve Cullen, B. R.** (2002). RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA*, 8(7), 855-860.
- [111] **Ramazan GÜNDOĞDU, V. Ç.** (2009). RNA interferans. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, i25 (1-2) 34 – 47
- [112] **Blagbrough, I. S. ve Zara, C.** (2009). Animal models for target diseases in gene therapy--using DNA and siRNA delivery strategies. *Pharm Res*, 26(1), 1-18.
- [113] **Jaskiewicz, L. ve Filipowicz, W.** (2008). Role of Dicer in posttranscriptional RNA silencing. *Curr Top Microbiol Immunol*, 320, 77-97.
- [114] **Ross, J. S., Carlson, J. A. ve Brock, G.** (2007). miRNA: the new gene silencer. *Am J Clin Pathol*, 128(5), 830-836.
- [115] **Agrawal, N., Dasaradhi, P. V., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K. ve Mukherjee, S. K.** (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67(4), 657-685.
- [116] **Martineau, H. M. ve Pyrah, I. T.** (2007). Review of the application of RNA interference technology in the pharmaceutical industry. *Toxicol Pathol*, 35(3), 327-336.
- [117] **Hannon, G. J.** (2002). RNA interference. *Nature*, 418(6894), 244-251.

- [118] **Rand, T. A., Petersen, S., Du, F. ve Wang, X.** (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123(4), 621-629.
- [119] **Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N. ve Shiekhattar, R.** (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123(4), 631-640.
- [120] **Hutvagner, G.** (2005). Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Lett*, 579(26), 5850-5857.
- [121] **Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. ve Hannon, G. J.** (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363-366.
- [122] **Tijsterman, M. ve Plasterk, R. H.** (2004). Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell*, 117(1), 1-3.
- [123] **D Khanna, P. B., K Gurlovleen.** (2006). RNA interference: An Ancient Mechanism for Novel Therapeutics. *The Internet Journal of Genomics and Proteomics*, 2.
- [124] **Zhang, H.** (2004) *Biochemistry and modeling of human Dicer, a key protein involved in RNA interference*: Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel
- [125] **Szweykowska-Kulinska, Z., Jarmolowski, A. ve Figlerowicz, M.** (2003). RNA interference and its role in the regulation of eucaryotic gene expression. *Acta Biochim Pol*, 50(1), 217-229.
- [126] **Zhang, H., Kolb, F. A., Brondani, V., Billy, E. ve Filipowicz, W.** (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J*, 21(21), 5875-5885.
- [127] **Akashi, H., Miyagishi, M. ve Taira, K.** (2001). Suppression of gene expression by RNA interference in cultured plant cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 11(6), 359-367.
- [128] **SELLİ, Ç.** (2011) *TRPC İYON KANALLARININ İŞLEVSEL EKSPRESYON KALİPLERİNİN POST-TRANSKRİPSİYONEL GEN SUSTURMA İLE ARAŞTIRILMASI* izmir: EGE ÜNİVERSİTESİ
- [129] **Zahoor, K.** (2011). *Genome wide analysis for novel regulators of growth and lipid metabolism in drosophila melanogaster.*
- [130] **Tolia, N. H. ve Joshua-Tor, L.** (2007). Slicer and the argonauts. *Nat Chem Biol*, 3(1), 36-43.
- [131] **Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., ve ark.** (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106(1), 23-34.
- [132] **Lee, Y. S. ve Dutta, A.** (2009). MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*, 4, 199-227.

- [133] Zeng, Y., Yi, R. ve Cullen, B. R. (2003). MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(17), 9779-9784.
- [134] Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. ve Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404(6775), 293-296.
- [135] Caudy, A. A., Myers, M., Hannon, G. J. ve Hammond, S. M. (2002). Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev*, 16(19), 2491-2496.
- [136] Hamilton, A. J. ve Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286(5441), 950-952.
- [137] Elbashir, S. M., Lendeckel, W. ve Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15(2), 188-200.
- [138] İsmail Karaboz, C. Ç. (2007). Antisensn teknolojisi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 05, 14-37
- [139] Carthew, R. W. ve Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642-655.
- [140] Tang, G. (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci*, 30(2), 106-114.
- [141] Stefani, G. ve Slack, F. J. (2008). Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(3), 219-230.
- [142] Kawata, E., Ashihara, E. ve Maekawa, T. (2011). Kawata E, Ashihara E, Maekawa TRNA interference against polo-like kinase-1 in advanced non-small cell lung cancers. *J Clin Bioinforma* 1(1): 6. 6 s.
- [143] Rosas-Taraco, A. G., Higgins, D. M., Sanchez-Campillo, J., Lee, E. J., Orme, I. M. ve Gonzalez-Juarrero, M. (2009). Intrapulmonary delivery of XCL1-targeting small interfering RNA in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 41(2), 136-145.
- [144] ŞENEL, B. (2012) *siRNA TAŞIYICI SİSTEM GELİŞTİRME VE DEĞERLENDİRME ÇALIŞMALARI* Eskişehir: ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
- [145] Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., ve ark. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 432(7014), 173-178.
- [146] Ahmet KARAGÜZEL, E. K., Figen CELEP (2007). RNA İnterferans (RNAi): Gen Sessizleştirilmesi ve Tedavi Edici Uygulamaları *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 33 (1), 41-44.
- [147] Gupte, C. a. A. (2005). *Pharmaceutical Biotechnology*. 2nd Edition ed. M.J. Groves, editör: CRC Press

- [148] **Huang, S. ve Kamihira, M.** (2013). Development of hybrid viral vectors for gene therapy. *Biotechnol Adv*, 31(2), 208-223.
- [149] **Leong, K. W.** (2006). Polymer design for nonviral gene delivery. *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology* ss. 239-263): Springer.
- [150] **Jeong, J. H., Mok, H., Oh, Y. K. ve Park, T. G.** (2009). siRNA conjugate delivery systems. *Bioconjug Chem*, 20(1), 5-14.
- [151] **Degim, I. T. ve Celebi, N.** (2007). Controlled delivery of peptides and proteins. *Curr Pharm Des*, 13(1), 99-117.
- [152] **Moselhy, J., Sarkar, S., Chia, M. C., Mocanu, J. D., Taulier, N., Liu, F. F., ve ark.** (2007). Evaluation of copolymers of N-isopropylacrylamide and 2-dimethyl(aminoethyl)methacrylate in nonviral and adenoviral vectors for gene delivery to nasopharyngeal carcinoma. *Int J Nanomedicine*, 2(3), 461-478.
- [153] **Uprichard, S. L.** (2005). The therapeutic potential of RNA interference. *FEBS Lett*, 579(26), 5996-6007.
- [154] **GÜNDOĞDU, R. ve ÇELİK, V. J. E. Ü. F. B. E. F. B. D.** (2009). RNA İnterferans (RNAi). 25(1), 34-47.
- [155] **L. Sudarsana Reddy, V. S. a. V. R.** (2007). Future of RNAi in Medicine: A Review. *World Journal of Medical Sciences* 2 (1), 01-14.
- [156] **Masiero, M., Nardo, G., Indraccolo, S. ve Favaro, E.** (2007). RNA interference: implications for cancer treatment. *Mol Aspects Med*, 28(1), 143-166.
- [157] **KUŞÇU, L.** (2016) *Gen Tedavisi İçin Tasarlanan Ve Patent Başvurusu Yapılan Farmasötiklerin İncelenmesi Ve Değerlendirilmesi*. İstanbul: Marmara Üniversitesi
- [158] **Bender, O., Çelebi, E. ve Atalay, A. J. T. K. T. B. D.** (2016). RNA İnterferans ve Güncel Klinik Uygulamaları/RNA İnterference and Current Clinical Applications. 36(1), 53.
- [159] **Özdoğan, E., Demir, A. ve Seventekin, N. J. T. v. K.** (2006). Nanoteknoloji Ve Tekstil Uygulamaları. 16(3), 159-168.
- [160] **Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R. ve Rudzinski, W. E.** (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*, 70(1-2), 1-20.
- [161] **Lockman, P. R., Mumper, R. J., Khan, M. A. ve Allen, D. D.** (2002). Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev Ind Pharm*, 28(1), 1-13.
- [162] **Bragagni, M., Mennini, N., Ghelardini, C. ve Mura, P.** (2012). Development and characterization of niosomal formulations of doxorubicin aimed at brain targeting. *J Pharm Pharm Sci*, 15(1), 184-196.
- [163] **Wang, X., Yang, L., Chen, Z. G. ve Shin, D. M.** (2008). Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. *CA Cancer J Clin*, 58(2), 97-110.

- [164] Laroui, H., Rakhya, P., Xiao, B., Viennois, E. ve Merlin, D. (2013). Nanotechnology in diagnostics and therapeutics for gastrointestinal disorders. *Dig Liver Dis*, 45(12), 995-1002.
- [165] Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H. ve Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep*, 64(5), 1020-1037.
- [166] Kandemir CANEFE, G. D. (1994). İlaçların Seçici Taşınması ve Hedeflendirilmesi. *Ankara Ecz Fak Der* 23.
- [167] Hayat Öykünel, F. B. (2014). *Tümör Tedavisinde Hedeflendirilmiş Nanotaşıyıcılar A.Z.-.* Gürsoy, editör. İstanbul: Kontrollü Salım sistemleri derneği yayını.
- [168] Hayat ÖNYÜKSELa, F. B., Burak ÇELİKc. (2017). Hedeflendirilmiş Nanoilaçlar. *Turkiye Klinikleri Pharmacology - Special Topics*, 5(2):90-101.
- [169] Wu, N. Z., Da, D., Rudoll, T. L., Needham, D., Whorton, A. R. ve Dewhirst, M. W. (1993). Increased microvascular permeability contributes to preferential accumulation of Stealth liposomes in tumor tissue. *Cancer Res*, 53(16), 3765-3770.
- [170] Matsumura, Y. ve Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*, 46(12 Pt 1), 6387-6392.
- [171] Peter Kralchevsky, R. M., Francesca Ravera. (2013). *Colloid and Interface Chemistry for Nanotechnology*. CRC Press
- [172] Fang, J., Nakamura, H. ve Maeda, H. (2011). The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev*, 63(3), 136-151.
- [173] Haley, B. ve Frenkel, E. (2008). Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol*, 26(1), 57-64.
- [174] Islam, W., Fang, J., Imamura, T., Etrych, T., Subr, V., Ulbrich, K., ve ark. (2018). Augmentation of the Enhanced Permeability and Retention Effect with Nitric Oxide-Generating Agents Improves the Therapeutic Effects of Nanomedicines. *Mol Cancer Ther*, 17(12), 2643-2653.
- [175] Sun, T., Zhang, Y. S., Pang, B., Hyun, D. C., Yang, M. ve Xia, Y. (2014). Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*, 53(46), 12320-12364.
- [176] Sourial, M., Bamdas, J. A., Constanzo, A. ve E. Ishak, M. (2017). A Need for Greater Collaboration.
- [177] Koshkaryev, A., Sawant, R., Deshpande, M. ve Torchilin, V. (2013). Immunoconjugates and long circulating systems: origins, current state of the art and future directions. *Adv Drug Deliv Rev*, 65(1), 24-35.

- [178] **Monopoli, M. P., Aberg, C., Salvati, A. ve Dawson, K. A.** (2012). Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol*, 7(12), 779-786.
- [179] **Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. ve Farokhzad, O. C.** (2014). Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev*, 66, 2-25.
- [180] **Saha, R. N., Vasanthakumar, S., Bende, G. ve Snehalatha, M.** (2010). Nanoparticulate drug delivery systems for cancer chemotherapy. *Mol Membr Biol*, 27(7), 215-231.
- [181] **des Rieux, A., Pourcelle, V., Cani, P. D., Marchand-Brynaert, J. ve Preat, V.** (2013). Targeted nanoparticles with novel non-peptidic ligands for oral delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 65(6), 833-844.
- [182] **Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A. K. ve Zweck, A.** (2006). The emerging nanomedicine landscape. *Nat Biotechnol*, 24(10), 1211-1217.
- [183] **Iijima, M., Nagasaki, Y., Okada, T., Kato, M. ve Kataoka, K.** (1999). Core-Polymerized Reactive Micelles from Heterotelechelic Amphiphilic Block Copolymers. *Macromolecules*, 32(4), 1140-1146.
- [184] **Jae Hyung Park, S. L., Jong Ho Kim, Kyeongsoon Park, Kwangmeyung Kim, Ick Chan Kwon.** (2008). Polymeric nanomedicine for cancer therapy. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 33(1), 113-137.
- [185] **Torchilin, V. P.** (2001). Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *J Control Release*, 73(2-3), 137-172.
- [186] **Ageitos, J. M., Chuah, J.-A. ve Numata, K.** (2016). Design Considerations for Properties of Nanocarriers on Disposition and Efficiency of Drug and Gene Delivery. ss. 1-22):
- [187] **Çetin, E. Ö.** (2008) *Peridontal hastalıkların tedavisinden lokal kontrollü salım sistemlerinin incelenmesi*. İzmir: Ege Üniversitesi.
- [188] **Ravi Kumar, M. N.** (2000). Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J Pharm Pharm Sci*, 3(2), 234-258.
- [189] **S Caban, E. A., A Sahin, Y Capan*.** (2014). Nanosystems for drug delivery. *OA Drug Design & Delivery* 18;2(1):2.
- [190] **Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., ve ark.** (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*, 8(1), 102.
- [191] **Allen, T. M. ve Cullis, P. R.** (2013). Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 65(1), 36-48.
- [192] **Rajera, R., Nagpal, K., Singh, S. K. ve Mishra, D. N.** (2011). Niosomes: a controlled and novel drug delivery system. *Biol Pharm Bull*, 34(7), 945-953.
- [193] **Bahadori, F., Topcu, G., Eroglu, M. S. ve Onyuksel, H.** (2014). A new lipid-based nano formulation of vinorelbine. *AAPS PharmSciTech*, 15(5), 1138-1148.

- [194] **Torchilin, V. P.** (2007). Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res*, 24(1), 1-16.
- [195] **GEMİCİ, R.** (2011) *ÇEŞİTLİ SÜRFİKTAN KARIŞIMLARININ YÜZEY GERİLİM ÖLÇÜMLERİNİN VE DNA ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI*. Konya: SELÇUK ÜNİVERSİTESİ.
- [196] **Lim, S. B., Banerjee, A. ve Onyüksel, H.** (2012). Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers. *J Control Release*, 163(1), 34-45.
- [197] **Peter Howard Elworthy, A. T. F., Calum Brechin Macfarlane.** (1968). *Solubilization by surface-active agents and its applications in chemistry and the biological sciences*. London: Chapman & Hall.
- [198] **Lu, H., Wang, J., Wang, T., Zhong, J., Bao, Y. ve Hao, H.** (2016). Recent Progress on Nanostructures for Drug Delivery Applications. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 1-12.
- [199] **Kesharwani, P., Jain, K. ve Jain, N.** (2014). *Dendrimer as nanocarrier for drug delivery*. 268–307 s.
- [200] **Bhadra, D., Yadav, A. K., Bhadra, S. ve Jain, N. K.** (2005). Glycodendrimeric nanoparticulate carriers of primaquine phosphate for liver targeting. *Int J Pharm*, 295(1-2), 221-233.
- [201] **Chaplot, S. P. ve Rupenthal, I. D.** (2014). Dendrimers for gene delivery--a potential approach for ocular therapy? *J Pharm Pharmacol*, 66(4), 542-556.
- [202] **Sanginario, A., Miccoli, B. ve Demarchi, D.** (2017). Carbon Nanotubes as an Effective Opportunity for Cancer Diagnosis and Treatment. *Biosensors (Basel)*, 7(1).
- [203] **Mody, N., Tekade, R. K., Mehra, N. K., Chopdey, P. ve Jain, N. K.** (2014). Dendrimer, liposomes, carbon nanotubes and PLGA nanoparticles: one platform assessment of drug delivery potential. *AAPS PharmSciTech*, 15(2), 388-399.
- [204] **ERKOÇ, Ş.** (2007). *Nanobilim ve Nanoteknoloji*. Anakra: OTDÜ Yayıncılık.
- [205] **Elhissi, A. M., Ahmed, W., Hassan, I. U., Dhanak, V. R. ve D'Emanuele, A.** (2012). Carbon nanotubes in cancer therapy and drug delivery. *J Drug Deliv*, 2012, 837327.
- [206] **Marchesan, S., Kostarelos, K., Bianco, A. ve Prato, M.** (2015). The winding road for carbon nanotubes in nanomedicine. *Materials Today*, 18(1), 12-19.
- [207] **Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., ve ark.** (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*, 3(1), 95-101.
- [208] **Her, S., Jaffray, D. A. ve Allen, C.** (2017). Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements. *Adv Drug Deliv Rev*, 109, 84-101.

- [209] **Abolfazl Akbarzadeh, M. S., Soodabeh Davaran.** (2012). Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters*, 7.
- [210] **Blanco, E., Kessinger, C. W., Sumer, B. D. ve Gao, J.** (2009). Multifunctional micellar nanomedicine for cancer therapy. *Exp Biol Med (Maywood)*, 234(2), 123-131.
- [211] **Naahidi, S., Jafari, M., Edalat, F., Raymond, K., Khademhosseini, A. ve Chen, P.** (2013). Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J Control Release*, 166(2), 182-194.
- [212] **Kassae, M., Motamedi, E. ve Majdi Yazdi, M.** (2011). *Magnetic Fe₃O₄-Graphene Oxide/Polystyrene: Fabrication and Characterization of a Promising Nanocomposite*. 540-549 s.
- [213] **Sinha, V. R. ve Trehan, A.** (2003). Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release*, 90(3), 261-280.
- [214] **Eskandari, Z.** (2018) *SYNTHESIS AND OPTIMIZATION OF CURCUMIN LOADED LEVAN-PLGA NANOPARTICLES FOR TARGETED CANCER THERAPY* İstanbul: MARMARA UNIVERSITY
- [215] **Muthu, M. S.** (2009). Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 3(4).
- [216] **Makadia, H. K. ve Siegel, S. J.** (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*, 3(3), 1377-1397.
- [217] **Hines, D. J. ve Kaplan, D. L.** (2013). Poly(lactic-co-glycolic) acid-controlled-release systems: experimental and modeling insights. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 30(3), 257-276.
- [218] **Puppi, D., Federica, C., Dash, M. ve Chiellini, E.** (2011). Biodegradable Polymers for Biomedical Applications. ss. 545-604):
- [219] **Tunç, İ.** (2004) *SYNTHESIS, CHARACTERIZATION, AND THERMAL DEGRADATION OF POLY(L-LACTIDE)S*. Ankara Bilkent university.
- [220] **KUTLU, C., ve (2011) BEYİN TÜMÖRLERİNİN TEDAVİSİ İÇİN ÇİFT ETKİLİ DOKU İSKELESİ-NANOPARTİKÜL SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ** Ankara: Hacettepe Üniversitesi
- [221] **Vroman, I. ve Tighzert, L.** (2009). Biodegradable Polymers. *Materials*, 2(2), 307-344.
- [222] **Passerini, N. ve Craig, D. Q.** (2001). An investigation into the effects of residual water on the glass transition temperature of polylactide microspheres using modulated temperature DSC. *J Control Release*, 73(1), 111-115.
- [223] **TUNÇAY, M. ve ÇALIŞ, S. J. F. J. P. S.** (1999). Biyoparçalanabilir Sentetik ve Doğal Polimerler. 24, 109-123.

- [224] Yang, Y. Y., Chung, T. S. ve Ng, N. P. (2001). Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*, 22(3), 231-241.
- [225] Kumari, A., Yadav, S. K. ve Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 75(1), 1-18.
- [226] Bejjani, R. A., BenEzra, D., Cohen, H., Rieger, J., Andrieu, C., Jeanny, J. C., ve ark. (2005). Nanoparticles for gene delivery to retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis*, 11, 124-132.
- [227] Bala, I., Hariharan, S. ve Kumar, M. N. (2004). PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 21(5), 387-422.
- [228] Panyam, J. ve Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*, 55(3), 329-347.
- [229] Nobs, L., Buchegger, F., Gurny, R. ve Allemann, E. (2004). Poly(lactic acid) nanoparticles labeled with biologically active Neutravidin for active targeting. *Eur J Pharm Biopharm*, 58(3), 483-490.
- [230] Panyam, J., Zhou, W. Z., Prabha, S., Sahoo, S. K. ve Labhasetwar, V. (2002). Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J*, 16(10), 1217-1226.
- [231] Silva, G. A., Ducheyne, P. ve Reis, R. L. (2007). Materials in particulate form for tissue engineering. 1. Basic concepts. *J Tissue Eng Regen Med*, 1(1), 4-24.
- [232] Zerrin SEZGİN, N. Y., Tamer BAYKARA (2003). İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER OLARAK POLİMERİK MİSELLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU *Ankara Ecz Fak Derg* 32(2) 125-142.
- [233] Yoo, H. S., Oh, J. E., Lee, K. H. ve Park, T. G. (1999). Biodegradable nanoparticles containing doxorubicin-PLGA conjugate for sustained release. *Pharm Res*, 16(7), 1114-1118.
- [234] Wei, X., Gong, C., Gou, M., Fu, S., Guo, Q., Shi, S., ve ark. (2009). Biodegradable poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system. *Int J Pharm*, 381(1), 1-18.
- [235] Banerjee, A. ve Onyuksel, H. (2012). Human pancreatic polypeptide in a phospholipid-based micellar formulation. *Pharm Res*, 29(6), 1698-1711.
- [236] Cun, D., Foged, C., Yang, M., Frokjaer, S. ve Nielsen, H. M. (2010). Preparation and characterization of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles for siRNA delivery. *Int J Pharm*, 390(1), 70-75.
- [237] Vichai, V. ve Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112-1116.

- [238] **Bogo, D., Cepa Matos, M. d. F., Honda, N., Pontes, E., Midori Oguma, P., Santos, E., ve ark.** (2010). *In vitro Antitumour Activity of Orsellinates*. 43-48 s.
- [239] **Orellana, E. A. ve Kasinski, A. L.** (2016). Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *Bio Protoc*, 6(21).
- [240] **Sah, J., Salahuddin, M., Sayed, M., Saim, A., Al Salauddin, A. S., Sayfullah, M., ve ark.** (2015). *Transfection optimisation in HEK-293 cell line*. 121-129 s.
- [241] **Thomas, P. ve Smart, T. G.** (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 51(3), 187-200.
- [242] **Robishaw, J. D., Wang, Q. ve Schwindinger, W. F.** (2002). Ribozyme-Mediated Suppression of G Protein γ Subunits. *G Protein Pathways, Part B: G Proteins and their Regulators Methods in Enzymology*.ss. 435-451):
- [243] **Cervera, L., Gutierrez, S., Godia, F. ve Segura, M. M.** (2011). Optimization of HEK 293 cell growth by addition of non-animal derived components using design of experiments. *BMC Proc*, 5 Suppl 8, P126.
- [244] **Michael Lieber , J. M., Walter Nelson- Rees, Michael Kaplan, George Todaro.** (1975). Establishment of a continuous tumor- cell line (PANC- 1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Intenational Journal of cancer* 15(5).
- [245] **Laroui, H., Theiss, A. L., Yan, Y., Dalmaso, G., Nguyen, H. T., Sitaraman, S. V., ve ark.** (2011). Functional TNF α gene silencing mediated by polyethyleneimine/TNF α siRNA nanocomplexes in inflamed colon. *Biomaterials*, 32(4), 1218-1228.
- [246] **Bhandari, J., Mishra, H., Mishra, P. K., Wimmer, R., Ahmad, F. J. ve Talegaonkar, S.** (2017). Cellulose nanofiber aerogel as a promising biomaterial for customized oral drug delivery. *Int J Nanomedicine*, 12, 2021-2031.
- [247] **Patil, Y. ve Panyam, J.** (2009). Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing. *Int J Pharm*, 367(1-2), 195-203.
- [248] **Yuan, X., Shah, B. A., Kotadia, N. K., Li, J., Gu, H. ve Wu, Z.** (2010). The development and mechanism studies of cationic chitosan-modified biodegradable PLGA nanoparticles for efficient siRNA drug delivery. *Pharm Res*, 27(7), 1285-1295.
- [249] **Maeda, H.** (2012). Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond. *J Control Release*, 164(2), 138-144.
- [250] **Nakano, S., Wu, L., Oka, H., Karimata, H. T., Kirihata, T., Sato, Y., ve ark.** (2008). Conformation and the sodium ion condensation on DNA and RNA structures in the presence of a neutral cosolute as a mimic of the intracellular media. *Mol Biosyst*, 4(6), 579-588.

- [251] Lindfors, L., Skantze, P., Skantze, U., Westergren, J. ve Olsson, U. (2007). Amorphous drug nanosuspensions. 3. Particle dissolution and crystal growth. *Langmuir*, 23(19), 9866-9874.
- [252] Gunday Tureli, N., Tureli, A. E. ve Schneider, M. (2016). Optimization of ciprofloxacin complex loaded PLGA nanoparticles for pulmonary treatment of cystic fibrosis infections: Design of experiments approach. *Int J Pharm*, 515(1-2), 343-351.
- [253] Chithrani, B. D., Ghazani, A. A. ve Chan, W. C. J. N. I. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. 6(4), 662-668.
- [254] Yuan, X., Li, L., Rathinavelu, A., Hao, J., Narasimhan, M., He, M., ve ark. (2006). SiRNA drug delivery by biodegradable polymeric nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*, 6(9-10), 2821-2828.
- [255] Akhtar, S. ve Benter, I. (2007). Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity. *Adv Drug Deliv Rev*, 59(2-3), 164-182.
- [256] Garcia, F., Petry, K. U., Muderspach, L., Gold, M. A., Braly, P., Crum, C. P., ve ark. (2004). ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*, 103(2), 317-326.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Şeyma CEYLAN
Doğum Tarihi ve Yeri : 03.01.1989/Kale
E-posta : symaceylan@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans:** 2011, Çanakkale 18 Mart Üniversitesi, Biyoloji

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- Yıldız Teknik Üniversitesi 1. Ulusal Nanoteknoloji Kongresi poster yarışması birincilik ödülü.

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Ceylan Ş., Akbaş F., Bahadori F. "Development of a Novel Gene Specific Silencing Method by RNAi in Targeted Cells Using PLGA Nano-Particles" International IVEK BİO Congress 26-28 November 2018, Ottoman Archives Congress Center, Istanbul.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Ceylan Ş., Hız M. M., Akı C. "Nanoparticles: Great Promise for treatment of CNS disorders" Development and Function of the Nervous System 14-16 October 2011, Boğaziçi University, Istanbul. (Poster).
- Ceylan Ş., Hız M. M., Akı C. "MDR1 Gen Polimorfiziminin İlaç Metabolizması Üzerine Etkisi" 3. DETAE Günleri. 17-18 Kasım, İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi, İstanbul. (Poster).
- Ceylan Ş., "Kanser Tedavisinde Hücrel Mimikri; RNAi Terapötikler" 3. DETAE Günleri. 17-18 Kasım, İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi, İstanbul. (Poster).
- Ceylan Ş., Hız M. M., Akı C. "Altın Nanoparçacıklar ile Fototermal Terapi". I. Ulusal Nanoteknoloji Kongresi. 17-18 Haziran, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul. (Poster).