



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**ANTIAPOPTOTİK PROTEİN İNHİBİTÖRÜ YÜKLÜ
NANOPARTİKÜLLERİN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİ**

Özlem KAPLAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA**

**II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet Koray GÖK**

Eylül, 2022

İSTANBUL

Bu çalışma, 30.09.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Saadet Kevser PABUCCUOĞLU
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Ahmet Süha YALÇIN
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. İsa GÖKÇE
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi

Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FBA-2019-34211 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince beni destekleyen, yönlendiren, bilgisi ve tecrübesini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Kendisiyle tanışmaktan ve çalışmaktan dolayı şanslı hissettiğim, bilgisi, insanlığı ve tecrübesiyle daima yanımda olan değerli eş danışman hocam Doç. Dr. Mehmet Koray GÖK'e katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Lisans eğitimine başladığım tarihten bugüne kadar her an desteğini hissettiğim, beni yetiştiren, bana inanan ve daima yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesinde katkılarını esirgemeyen Tez İzleme Komitemin değerli üyeleri Prof. Dr. Ahmet Süha YALÇIN ve Prof. Dr. Saadet Kevser PABUÇCUOĞLU'na değerli yönlendirmeleri için teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın çeşitli aşamalarında bana laboratuvarlarını açan Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi'nden Prof. Dr. Cemil ALKAN'a, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi'nden Prof. Dr. İsa GÖKÇE ve Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN'a İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden Prof. Dr. Erdal CEVHER'e, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Mühendislik Fakültesi'nden Prof. Dr. Saadet Kevser PABUÇCUOĞLU ve Prof. Dr. Ali DURMUŞ'a laboratuvar imkânlarından yararlanmama fırsat tanıdıkları için teşekkür ederim.

Değerli katkılarını esirgemeyen daima bana destek olan değerli hocam Doç. Dr. Murat PEKMEZ başta olmak üzere, İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne Dr. Öğr. Üyesi Elif MERTOĞLU KAMALI ve Proteomik Laboratuvarına teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasında, farklı üniversitelerde deneyleri gerçekleştirdiğim sürelerde göstermiş olduğu anlayış ve desteklerinden dolayı İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Ercan ARICAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Beraber çalışmaktan zevk aldığım Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Rekombinant Protein Üretim Laboratuvarı'nın (RPUL) değerli üyeleri Dr. Öğr. Üyesi Sema BİLGİN, Dr. Öğr. Üyesi Rizvan İMAMOĞLU, Öğr. Gör. İbrahim İNCİR ve Öğr. Gör. Dr. Nazan GÖKŞEN TOSUN'na destekleri ve katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübeleriyle bana her zaman samimiyetle destek olan, beni ailelerine dahil eden İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa PPR Biotech araştırma grubunun değerli üyeleri kardeşlerim; Öğr. Gör. Kevser BAL, Emine Büşra EKER FİDAN ve Sema ŞENTÜRK'e katkıları ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

2211-A Genel Yurt içi Doktora Burs Programı kapsamında beni destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) kapsamında beni destekleyen Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bana her zaman inanan, destek olan aileme ve yoluma ışık tutan herkese samimiyetle teşekkür ederim.

Eylül 2022

Özlem KAPLAN



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ.....	xvii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xix
ÖZET	xxi
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. APOPTOZ.....	3
2.2. MCL-1 PROTEİNİ	6
2.3. MCL-1 İNHİBİTÖRLERİ	9
2.3.1. MCL-1 Proteinini Seçici Olmayan (Non-selektif) Şekilde Hedefleyen İnhibitörler	10
2.3.2. MCL-1 Proteinini Seçici (Selektif) Şekilde Hedefleyen İnhibitörler.....	13
2.3.2.1. BH3 Mimetik Peptidler.....	16
2.3.3. MCL-1 İnhibitörleri ve İlaç Kombinasyonları	18
2.3.4. Seçici MCL-1 İnhibitörleri ile Klinik Çalışmalar	19
2.4. KANSERDE POLİMERİK NANOPARTİKÜLER SİSTEMLER	20
2.4.1. Doğal Polimerler	21
2.4.1.1. Kitosan	22
2.4.1.2. Dekstran	23
2.4.1.3. Aljinat.....	23
2.4.1.4. Jelatin.....	23
2.4.1.5. Poli (L-lisin) (PLL).....	23
2.4.2. Sentetik Polimerler	24
2.4.2.1. Poli(laktik asit) (PLA)	24
2.4.2.2. Poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA).....	24
2.4.2.3. Poli (ε-kaprolakton) (PCL)	25
2.4.2.4. Siklodekstrinler (CD'ler)	25

2.4.2.5.	<i>Poli (β-amino ester) (PBAE)</i>	25
2.5.	POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİ HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ.....	26
2.5.1.	Çözücü Buharlaştırma Yöntemi	27
2.5.2.	Nanoçöktürme Yöntemi	27
2.5.3.	Diyaliz Yöntemi	29
2.5.4.	Süperkritik Akışkan Teknolojisi.....	29
2.5.5.	Tuz İlavesiyle/Tuzla Çöktürme Yöntemi	30
2.6.	NANOPARTİKÜLLERİN HEDEFLENDİRİLMESİ.....	30
2.6.1.	Pasif Hedefleme.....	31
2.6.1.1.	<i>Arttırılmış Geçiş ve Alıkonma Etkisi (EPR) (Enhanced Permeability Retention)</i>	31
2.6.1.2.	<i>Tümör Mikro Çevresi</i>	31
2.6.1.3.	<i>Yüzey Yüğü</i>	32
2.6.2.	Aktif Hedefleme	32
2.6.2.1.	<i>Transferrin Reseptörleri</i>	33
2.6.2.2.	<i>Folat Reseptörleri</i>	33
2.6.2.3.	<i>Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri (EGFR'ler)</i>	33
2.6.2.4.	<i>Glikoproteinler</i>	34
2.6.2.5.	<i>CXCR4</i>	34
2.7.	POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN ENDOZOMAL KAÇIŞ MEKANİZMALARI.....	37
2.8.	KENDİLİĞİNDEN KURULAN (SELF-ASSEMBLY) PEPTİD NANOPARTİKÜLER SİSTEMLER.....	39
3.	MALZEME VE YÖNTEM.....	42
3.1.	T22-MS1-MNEONGREEN PROTEİNİN REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ KULLANILARAK ÜRETİLMESİ	42
3.1.1.	T22-MS1-mNeonGreen Nükleotid Dizisinin Tasarımı	42
3.1.2.	T22-MS1-mNeonGreen Proteinin Ekspresyonu ve Saflaştırılması.....	46
3.1.2.1.	<i>pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen Plazmid DNA'sının Çoğaltılması</i>	46
3.1.2.2.	<i>pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen Plazmid DNA'sının E. coli Origami 2 Hücrelerine Transferi ve Ekspresyon Çalışmaları</i>	49
3.1.2.3.	<i>E. coli Origami 2 Hücrelerinin Parçalanması ve Proteinin Afinite Kromatografisiyle Saflaştırılması</i>	50
3.1.2.4.	<i>Saflaştırılan Proteinin SDS-PAGE'de (Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez) Analizi</i>	51
3.1.2.5.	<i>Saflaştırılan Proteinin Diyali</i>	52

3.1.2.6.	<i>Saflaştırılan Proteinin Western Blotlama ile Karakterizasyonu</i>	53
3.2.	MS1-MNEONGREEN PROTEİNİNİN ÜRETİLMESİ	54
3.2.1.	MS1-mNeonGreen nükleotid dizisinin pET22b vektörüne klonlanması	55
3.2.1.1.	<i>Restriksiyon Enzimleri ile Kesim</i>	55
3.2.1.2.	<i>DNA Ligasyonu</i>	57
3.2.1.3.	<i>Klonlamanın Doğrulanması (Doğrulama Restriksiyon Kesimi ve DNA Dizileme)</i>	57
3.2.2.	pET22b-MS1-mNeonGreen-11 Plazmid DNA'sının <i>E. coli BL21 pLysE</i> Hücrelerine Transferi ve Ekspresyon Çalışmaları	58
3.3.	T22 PEPTİDİNİN REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ	59
3.3.1.	TolA-III-T22 Nükleotid Dizisinin Tasarımı.....	59
3.3.2.	TolA-III-T22 Proteinin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	61
3.3.3.	TolA-III-T22 proteininden TolA-III peptidinin TEV proteaz enzimi ile kesim yoluyla çıkarılması	65
3.3.3.1.	<i>TEV proteaz enziminin ekspresyonu ve saflaştırılması</i>	65
3.3.3.2.	<i>TEV proteaz enzimi ile TolA-III-T22 proteininden TolA-III peptidinin çıkarılması</i>	65
3.4.	SELF-ASSEMBLY PROTEİN NANOPARTİKÜLLERİN OLUŞTURULMASI	67
3.5.	NANOPOLİMER TAŞIYICI SİSTEMLERİN OLUŞTURULMASI.....	67
3.5.1.	Poli (β -amino ester) (PBAE) sentezi	67
3.5.2.	PBAE'den Nanoçöktürme Tekniği Kullanılarak Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	68
3.5.3.	PBAE-PLGA Nanopartiküler Sistemin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	69
3.5.3.1.	<i>PBAE-PLGA nanopartiküler sistemin partikül boyut optimizasyonu</i>	70
3.6.	ÜRETİLEN NANOPARTİKÜLLERİN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ	72
3.6.1.	Hücrelerin Kültüre Alınması	72
3.6.2.	Sitotoksikite Analizleri	72
3.6.3.	Hücre Dondurma ve Stoklama İşlemleri	73
3.7.	ÜRETİLEN NANOPARTİKÜLLERİN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ.....	74
3.7.1.	Gerçek Zamanlı Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	74
3.7.2.	Western Blotlama	76
3.8.	NANOPARTİKÜLLERİN İLERİ KARAKTERİZASYONLARI.....	78

3.8.1.	Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile analizi	78
3.8.2.	Nanopartiküller Taşıyıcı Sistemlerin Stabilitelerinin Belirlenmesi.....	78
3.8.3.	Nanopartiküller Taşıyıcı Sistemlerin Serum Stabilitelerinin Belirlenmesi	78
3.8.4.	Enkapsüle olan MS1-mNeonGreen proteinin bütünlüğünün SDS-PAGE’de analizi	78
3.8.5.	Nanopartiküllerin Hücresel Alımlarının Floresan Mikroskop ile İncelenmesi	78
4.	BULGULAR.....	79
4.1.	T22-MS1-MNEONGREEN PROTEİNİN ÜRETİLMESİ.....	79
4.2.	MS1-MNEONGREEN PROTEİNİN ÜRETİLMESİ.....	82
4.3.	T22 PEPTİDİNİN REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ	87
4.3.1.	TolA-III-T22 Proteinin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	87
4.3.2.	TolA-III-T22 proteininden TolA-III peptidinin TEV proteaz enzimi ile kesim yoluyla çıkarılması	89
4.4.	SELF-ASSEMBLY PROTEİN NANOPARTİKÜLLERİN OLUŞTURULMASI	92
4.5.	NANOPOLİMER TAŞIYICI SİSTEMLERİN OLUŞTURULMASI.....	96
4.5.1.	PBAE’in FTIR Spektra.....	96
4.5.2.	PBAE’den Nanoçöktürme Tekniği Kullanılarak Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	97
4.5.3.	PBAE-PLGA Nanopartiküler Sistemin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	99
4.6.	ÜRETİLEN NANOPARTİKÜLLERİN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ	104
4.6.1.	Üretilen Nanopartiküllerin HUVEC Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi.....	107
4.6.2.	Üretilen nanopartiküllerin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi	109
4.6.3.	Üretilen nanopartiküllerin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.....	111
4.7.	ÜRETİLEN NANOPARTİKÜLLERİN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ.....	112
4.7.1.	RT-PCR	112
4.7.2.	Western Blotlama	116
4.8.	NANOPARTİKÜLLERİN İLERİ KARAKTERİZASYONLARI.....	121
4.8.1.	Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile analizi	121
4.8.2.	Nanopartiküller Taşıyıcı Sistemlerin Stabilitelerinin Belirlenmesi.....	122
4.8.3.	Nanopartiküller Taşıyıcı Sistemlerin Serum Stabilitelerinin Belirlenmesi	123

4.8.4. Enkapsüle olan MS1-mNeonGreen proteinin bütünlüğünün SDS-PAGE’de analizi	124
4.8.5. Nanopartiküllerin Hücreye Alımının Floresan Mikroskop ile Analizi.....	126
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	127
KAYNAKLAR.....	137
EKLER	156
ÖZGEÇMİŞ.....	157



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Apoptozu düzenleyen BCL-2 ailesi üyeleri (Adams ve diğ., 2019).....	4
Şekil 2.2: Çeşitli BCL-2 ailesi üyelerinin domen organizasyonu. BCL-2 homoloji (BH) ve transmembran (TM) domenleri (alanları) (Doerflinger ve diğ., 2015).....	5
Şekil 2.3: Ekstrinsik apoptoz yolu (Li ve diğ., 2013).	6
Şekil 2.4: MCL-1'in moleküler organizasyonu (Michels ve diğ., 2004).....	7
Şekil 2.5: BAX ve BAK'ın aktivasyonu için iki alternatif model.	8
Şekil 2.6: Bim BH3 ile kompleks halinde MCL-1 proteinin X-ışını kristal yapısı [protein data bank (2PQK)'dan alınmıştır. PyMOL Vierwer ile gösterilmiştir.].....	13
Şekil 2.7: Polimerik nanopartikül tiplerinin şematik gösterimi (Prabhu ve diğ., 2015). (Mavi renk, polimerik yapıyı temsil eder.).....	21
Şekil 2.8: Antikanser ilaçların salımı için kullanılan doğal ve sentetik polimerlerin kimyasal yapıları. PLL=poli (L-lisin), PLA=polilaktid, PLGA=poli (laktid-koglikolid), PCL= poli (ε-kaprolakton), PBAE=poli (β-amino-amino ester) (Karlsson ve diğ., 2018).....	22
Şekil 2.9: Polimerik nanopartiküllerin endozomal kaçışları için öngörülen mekanizmalar. (A) Endozomal kaçış kabiliyeti olmayan bir kontrol partikülü; (B) proton sünger davranışı yapabilen bir nanopartikül; (C) endozomal zar ile etkileşime giren bir nanopartikül; ve (D) pH'da bir değişiklik üzerine şişen bir nanopartikül (Cupic ve diğ., 2019).....	39
Şekil 3.1: pBAD-HisA vektörü ve çoklu klonlama bölgesi.....	42
Şekil 3.2: Tez kapsamında rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak oluşturulması planlanan proteinin şematik gösterimi. CXCR4 yüzey antijeni ligandı T22 peptidi, MCL-1 inhibitörü MS1 peptidi, mNeonGreen ve H6 içermektedir.	43
Şekil 3.3: Bu tez çalışması kapsamında tasarlanan T22-MS1-mNeonGreen yapısının nükleotid dizisi (A) ve bu dizinin kodladığı amino asit dizisi (B).	44
Şekil 3.4: T22-MS1-mNeonGreen Nükleotid Dizisinin optimize edilmiş nükleotid dizisi ile doğal nükleotid dizisinin karşılaştırılması	45
Şekil 3.5: pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen plazmidinin restriksiyon kesim bölgeleriyle birlikte gösterimi.	46
Şekil 3.6: pET22b vektörü ve çoklu klonlama bölgesi.	54

Şekil 3.7: MS1-mNeonGreen proteininin şematik gösterimi.....	55
Şekil 3.8: pET30a vektörü ve çoklu klonlama bölgesi.	59
Şekil 3.9: T22 peptidinin rekombinant olarak üretilmesi için tasarlanan nükleotid dizisinin şematik gösterimi.....	60
Şekil 3.10: T22 peptidinin rekombinant olarak üretilmesi için (A) tasarlanan nükleotid dizisi ve (B) bu dizinin kodladığı amino asit dizisi.	60
Şekil 3.11: pET30-T22 plazmidinin restriksiyon kesim bölgeleriyle birlikte gösterimi.	61
Şekil 3.12: PBAE sentezinin reaksiyon mekanizması.	68
Şekil 4.1: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan T22-MS1-mNeonGreen proteini (A) ve UV ışık altında görünümü (B).	79
Şekil 4.2: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan T22-MS1-mNeonGreen Proteinin %12'lik SDS-PAGE'de Analizi (A) ve jelin UV ışık altındaki görüntüsü (B) 1-5., 6-8. Kuyucuklar kolondan 300 mM imidazol içeren elüsyon tamponunun geçirilmesiyle elde edilen elüsyonlar M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II).	80
Şekil 4.3: Saflaştırılan T22-MS1 mNeonGreem proteinin western blot ile analizi M. Protein Marker (C.B(Comassie boyama, W.B.(western blotlama).	80
Şekil 4.4: İleri saflaştırılması yapılan T22-MS1-mNeonGreen proteinin %12'lik SDS-PAGE'de analizi. M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II) 1. İleri saflaştırılması yapılan T22-MS1-mNeonGreen proteini (A) ve UV ışık altındaki görünümü (B).	81
Şekil 4.5: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan ve diyaliz edilen T22-MS1-mNeonGreen proteinin örneğin %10'luk doğal jel elektroforezinde analizi (A) ve jelin UV ışık altındaki görünümü (B) 1. Protein Marker (Biorad precision plus protein standards-all blue) 2. Diyaliz öncesi T22-MS1-mNeonGreen proteini 3. Diyaliz sonrası T22-MS1-mNeonGreen proteini.	82
Şekil 4.6: NdeI ve XhoI restriksiyon enzimleriyle kesilen pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen plazmidinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü, 1, 2. NdeI ve XhoI restriksiyon enzimleriyle kesilen pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen plazmidi, M. DNA marker (Bioline HyperLadderTM 1kb).	83
Şekil 4.7: XbaI ve XhoI restriksiyon enzimleriyle yapılan doğrulama kesim sonucunun %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 1-11. kuyucuklar sırasıyla 1-11. plazmitlere ait restriksiyon enzim kesim reaksiyonları M. DNA marker (Bioline HyperLadderTM 1kb).	83
Şekil 4.8: pET22b-MS1-mNeonGreen-11 plazmidinin DNA dizilemesine ait kromatogram görüntüsü.....	84

Şekil 4.9: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan MS1-mNeonGreen proteini (A) ve UV ışık altında görünümü (B).....	85
Şekil 4.10: Saflaştırılan MS1-mNeonGreen Proteinin %12'lik SDS-PAGE'de Analizi. 1-7. kuyucuklar sırasıyla kolondan 300 mM imidazol içeren elüsyon tamponunun geçirilmesiyle elde edilen elüsyonlar M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II).	85
Şekil 4.11. Saflaştırılan MS1 mNeonGreen proteinin western blot ile analizi M. Protein Marker (C.B(Comassie boyama, W.B.(western blotlama).....	86
Şekil 4.12: İleri saflaştırılması yapılan MS1-mNeonGreen proteinin %12'lik SDS-PAGE'de analizi. M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II) 1. İleri saflaştırılması yapılan MS1-mNeonGreen proteini.....	87
Şekil 4.13: Saflaştırılan TolA-III-T22 Proteinin %12'lik SDS-PAGE'de Analizi 1. IPTG ile indüksiyon sonrası <i>E. coli BL21 plySE</i> hücreleri, 2. İlk santrifüj sonrası pelet, 3. İlk santrifüj sonrası süpernatant, 4. Ultrasantrifüj sonrası süpernatant, 5. Ultrasantrifüj sonrası pelet, 6. Kolona yüklenen örnek 7. Kolondan imidazolsüz yükleme tamponu geçirilmesiyle aşağı akan süzüntü, 8-9. Kolondan 300 mM imidazol içeren elüsyon tamponunun geçirilmesiyle elde edilen elüsyonlar M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II).....	87
Şekil 4.14: İnklüzyon cisimciklerinden TolA-III-T22 proteinin yeniden kazanımı için kullanılan 1. prosedürün %12'lik SDS-PAGE'de analizi. 1. Sonikatör işlemi sonrası protein örneği 2. Sonikasyon işlemi öncesi protein örneği 3. Santrifüj sonrası pelet örneğinin resüspansiyonu ile elde edilen çözelti, 4. Resüspansiyon işlemi sonrası santrifüjle elde edilen pelet, 5. Resüspansiyon işlemi sonrası santrifüjle elde edilen süpernatant 6. 8M Üre içeren tampon ile muamele sonrası santrifüjle elde edilen süpernatant 7. 8M Üre içeren tampon ile muamele sonrası santrifüjle elde edilen süpernatant 8. Refolding işlemi sonrası elde edilen pelet, 9. Refolding işlemi sonrası elde edilen süpernatant M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II).	88
Şekil 4.15: İnklüzyon cisimciklerinden TolA-III-T22 proteinin yeniden kazanımı için kullanılan 2. prosedürün %12'lik SDS-PAGE'de analizi. 1. IPTG ile indükleme öncesi <i>E. coli BL21 plySE</i> hücreleri, 2. IPTG ile indükleme sonrası <i>E. coli BL21 plySE</i> hücreleri 3. Lizis, yıkama ve ekstraksiyon işlemlerinden sonra elde edilen ve kolona yüklenen süpernatant örneği 4-9. Kolondan 300 mM imidazol içeren elüsyon tamponunun geçirilmesiyle elde edilen elüsyonlar M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II).	89
Şekil 4.16: Saflaştırılan TEV proteaz enziminin %12'lik SDS-PAGE'de analizi 1. IPTG ile indükleme işleminden önce <i>E.coli BL21 PlySE</i> hücreleri, 2. IPTG ile indükleme işleminden sonra <i>E.coli BL21 PlySE</i> hücreleri, 3. Sonikatör ile parçalama sonrası ilk santrifüj işlemi ile elde edilen süpernatant örneği 4. Ultrasantrifüj işlemi sonrası elde edilen süpernatant 5-9. Kolondan 300 mM imidazol içeren elüsyon tamponunun geçirilmesiyle elde edilen elüsyonlar, M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II).....	90

Şekil 4.17: TolA-III-T22 proteininin TEV proteaz enzimi ile kesiminin %15'lik SDS-PAGE'de analizi M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II), 1-8. Tablo 3.4'te verilen sırasıyla 1-8 numaralı tüplerde gerçekleştirilen reaksiyonlardan alınan örnekler.	91
Şekil 4.18: Saflaştırılan T22 peptidinin Tricine-SDS-PAGE'de analizi 1.TEV proteaz ile kesim sonrası kolondan saflaştırılan T22 peptidi, 2. TEV proteaz ile kesilmemiş TolA-III-T22 proteini 3. TEV proteaz ile kesim sonrası TolA-III-T22 proteini M. Protein Marker (PageRuler Unstained Protein Ladder).	91
Şekil 4.19: 166mM sodyum bikarbonat (pH:7,4) tamponu kullanılarak elde edilen nanopartiküllerin partikül boyut analizi.	93
Şekil 4.20: T22-MS1-mNeonGreen nanopartikülleri (A) ve %1 SDS ile muamele sonrası partikül boyut analizi (B).	93
Şekil 4.21: Jel geçirgenlik kromatografisi kullanılarak ayrılan nanopartikül fraksiyonlarının sırasıyla partikül boyut analizleri.	94
Şekil 4.22: MS1-mNeonGreen proteinin oluşturduğu self-assembly nanopartiküllerin (A) ve bu partiküllerin %1 SDS ile muamelesi sonrası partikül boyutlarının (B) analizi.	95
Şekil 4.23: Sitotoksite çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlanan T22-MS1-mNeonGreen self-assembly nanopartiküllerin partikül boyut analizi.	95
Şekil 4.24: Sentezlenen PBAE'e ait FTIR spektra.	96
Şekil 4.25: PBAE nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan nanopartikülün partikül boyutu (A) ve zeta potansiyeli (B).	97
Şekil 4.26: MS1-mNeon proteinin DMSO eklenmesiyle absorbansında (A_{280}) meydana gelen değişim.	98
Şekil 4.27: MS1-mNeonGreen proteininin PBAE polimeri ile enkapsülasyonun %12'lik SDS-PAGE'de analizi M. PageRuler Unstained Protein Ladder 1-5. Sırasıyla tablo 3.6'ya göre hazırlanan 1, 2, 3, 4 ve 6. tüplerin santrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatant örnekleri, 6. tablo 3.6'ya göre hazırlanan 5. tüpün santrifüj işlemi öncesi 7. tablo 3.6'ya göre hazırlanan 5. Tüpün santrifüj işlemi sonrası elde edilen süpernatant, 8. tablo 3.6'ya göre hazırlanan 5. Tüpün santrifüj işlemi sonrası elde edilen pelet örneği.	98
Şekil 4.28: %2 PBAE ve %98 oranında PLGA içeren hibrit nanopartiküler sisteme ait partikül boyutu ve zeta potansiyeli.	99
Şekil 4.29: Örnek 1.3. nanopartikülüne ait partikül boyut ve zeta potansiyeli.	103
Şekil 4.30: Tez çalışmasında kullanılan nanopartiküllerin şekilsel gösterimi.	104
Şekil 4.31: Kültüre edilen hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüleri, A. HeLa, B. HUVEC, C. MDA-MB-231, D. A549.	105

Şekil 4.32: Üretilen nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerindeki 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi (Veriler, üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ SD'si olarak ifade edildi, ($p < 0,05$, $n=3$)).	106
Şekil 4.33: Üretilen nanopartiküllerin HUVEC hücreleri üzerindeki 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi (Veriler, üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ SD'si olarak ifade edildi ($p < 0,05$, $n=3$)).	108
Şekil 4.34: Üretilen nanopartiküllerin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi (Veriler, üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ SD'si olarak ifade edildi ($p < 0,05$, $n=3$)).	110
Şekil 4.35: Üretilen nanopartiküllerin A549 hücreleri üzerindeki 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi (Veriler, üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ SD'si olarak ifade edildi ($p < 0,05$, $n=3$)).	111
Şekil 4.36: Nanopartiküllere maruz bırakılan HeLa hücrelerinin 24. 48. ve 72. saatte invert mikroskop ile çekilmiş fotoğrafları.	112
Şekil 4.37: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan HeLa hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik genlerin ekspresyon seviyeleri ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n=3$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil).	113
Şekil 4.38: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik genlerin ekspresyon seviyeleri ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n=3$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil).	114
Şekil 4.39: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan A549 hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik genlerin ekspresyon seviyeleri ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n=3$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil).	115
Şekil 4.40: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan HeLa hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin Western blot yöntemi ile analizi.	116
Şekil 4.41: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan HeLa hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n=3$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil).	117
Şekil 4.42: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin Western blot yöntemi ile analizi.	118
Şekil 4.43: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n=3$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil).	119
Şekil 4.44: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan A549 hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin Western blot yöntemi ile analizi.	120

Şekil 4.45: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan A549 hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n=3$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil).....	121
Şekil 4.46: Nanopartiküllere ait SEM görüntüleri, A. PLGA-MS1 nanopartikülleri B. PLGA-PBAE-MS1 nanopartikülleri C. MS1 self-assembly nanopartikülleri (200kx) D. MS1 self-assembly nanopartikülleri (500kx).....	122
Şekil 4.47: Nanopartiküller içinde kapsüllenmiş MS1-mNeonGreen proteininin SDS-PAGE analizi: M: Protein Marker, 1. kuyucuk MS1 mNeonGreen proteini (kontrol) 2. kuyucuk PLGA nanopartikülleri 3. kuyucuk PLGA-MS1 nanopartikülleri 4. kuyucuk PLGA-PBAE hibrit nanopartiküller 5. kuyucuk PLGA-PBAE-MS1 hibrit nanopartiküller.....	125
Şekil 4.48: Tez çalışması kapsamında üretilen polimerik nanopartiküllerin 10000 rpm’de 15 dk santrifüj işlemi sonrası UV ışık altındaki görüntüsü.....	125
Şekil 4.49: Nanopartiküllerin hücreye alımının floresan mikroskop ile analizi.	126

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: MCL-1'in seçici olmayan (non-selektif) inhibisyonuna yol açan başlıca ilaçlar ve uygulandıkları hücreler.	12
Tablo 2.2: MCL-1'in seçici inhibisyonunu kullanan çalışmaların özeti.	16
Tablo 2.3: MCL-1 inhibitörleri ve ilaç kombinasyonları.	19
Tablo 2.4: CXCR4 hedefli ilaç salım sistemlerine örnekler (Wang ve diğ., 2016b).	35
Tablo 2.4 (devam): CXCR4 hedefli ilaç salım sistemlerine örnekler (Wang ve diğ., 2016b).	36
Tablo 3.1: pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen ve pET22b plasmid DNA'larının restriksiyon kesimi için gereken madde miktarları.	55
Tablo 3.2: MS1-mNeonGreen ve pET22b plasmid DNA'sının ligasyon için gereken madde miktarları.	57
Tablo 3.3: Doğrulama restriksiyon kesimi için gereken madde miktarları.	58
Tablo 3.4: TolA-III-T22 proteininin TEV proteaz enzimi ile kesim reaksiyon koşulları.	65
Tablo 3.5: Tricine SDS-PAGE bileşenleri.	66
Tablo 3.6: MS1-mNeonGreen proteininin PBAE ile enkapsülasyonu için hazırlanan karışımlar.	69
Tablo 3.7: Tez çalışması kapsamında kullanılan ikili emisyon PLGA nanopartikül hazırlama protokolleri.	71
Tablo 3.8: qRT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere tasarlanan primerler ve dizileri.	74
Tablo 3.9: cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı.	75
Tablo 3.10: PCR için hazırlanan reaksiyon karışımı.	76
Tablo 3.11: Western blotlama işlemlerinde kullanılan primer ve sekonder antikor dilüsyonları.	77
Tablo 4.1: T22-MS1-mNeonGreen füzyon proteininden self-assembly nanopartiküller üretilmesi için kullanılan tampon sistemleri ve elde edilen nanopartiküllerin özellikleri.	92

Tablo 4.2: PBAE hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutları ve zeta potansiyelleri.....	97
Tablo 4.3: PLGA-PBAE hibrit nanopartiküler sistem ve enkapsülasyon verimleri.....	99
Tablo 4.4: PVA oranlarının değiştirilmesiyle elde edilen PLGA-PBAE hibrit partiküllerinin boyut ve boyut dağılımları.....	100
Tablo 4.5: Homojenizasyon süreleri değiştirilerek elde edilen PLGA-PBAE hibrit partiküllerinin boyut ve boyut dağılımları.....	100
Tablo 4.6: Tablo 3.7’de verilen protokoller kullanılarak hazırlanan PLGA nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyelleri.	101
Tablo 4.7: PLGA ve PLGA- PBAE (core-shell) nanopartiküllerinin boyut, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon verimleri.....	102
Tablo 4.8: Farklı konsantrasyonlarda MS1-mNeonGreen proteininin PLGA ve PLGA-PBAE (core-shell) nanopartiküllerine enkapsülasyonu.....	102
Tablo 4.9: PLGA-PBAE (hibrit) nanopartiküllerinin partikül boyut, zeta potansiyel ve enkapsülasyon verimleri.	103
Tablo 4.10: Tez çalışması kapsamında üretilen nanopartiküllere ait özet veriler.	104
Tablo 4.11: Nanopartiküllerin 48 ve 72 saat sonra HeLa hücreleri üzerindeki IC ₅₀ değerleri.....	107
Tablo 4.12: Nanopartiküllerin 48 ve 72 saat sonra HUVEC hücreleri üzerindeki IC ₅₀ değerleri.....	109
Tablo 4.13: Nanopartiküllerin 48 ve 72 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki IC ₅₀ değerleri.	110
Tablo 4.14: Nanopartiküllerin 48 ve 72 saat sonra A549 hücreleri üzerindeki IC ₅₀ değerleri.....	111
Tablo 4.15: Nanopartiküllerin +4 °C’deki stabiliteleri.....	123
Tablo 4.16: Nanopartiküllerin %10 FBS içerisindeki stabiliteleri.	124

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

%	: Yüzde
<	: Küçük
µL	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
cm ²	: Santimetrekare
°C	: Derece
V	: Volt
kDa	: Kilo Dalton
g	: Gram
mg	: Miligram
sn	:Saniye

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Eden Faktör 1 (“Apoptotic Protease Activating Factor 1”)
APS	: Amonyum persülfat (“Ammonium persulfate”)
BAX	: BCL-2 ilişkili X proteini (“BCL-2-associated X protein”)
BCA	: Bikinkoninik asit
BCL-2	: B-hücre lenfoma 2 (“B-cell lymphoma 2”)
BID	: BH3 etkileşim alan ölüm agonisti (“BH3-interacting domain death agonist”)
BIM	: Bcl-2 benzeri protein 11 (“Bcl-2-like protein 11”)
BSA	: Sığır serum albumini (“Bovine Serum Albumin”)
DLS	: Dinamik ışık saçılımı (“Dynamic Light Scattering”)
DMEM	: Dulbecco’nun Modifiye Eagle Besiyeri (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”)
DMSO	: Dimetilsülfoksit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>

EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (“Epidermal Growth Factor Receptor”)
FADD	: Fas ilişkili ölüm domeni (“Fas-associated death domain”)
FBS	: Fetal sığır serumu (“Fetal Bovine Serum”)
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spektrofotometre
GAPDH	: Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz
HRP	: Yaban turbu peroksidazı (“Horseradish Peroxidase”)
HUVEC	: İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (“Human umbilical vein endothelial cells”)
IC₅₀	: Canlı hücre sayısını %50 düşüren madde konsantrasyonu
IPTG	: İzopropil β -D-1 tiyogalaktopiranozid
MCL-1	: İndüklenmiş miyeloid lösemi hücre farklılaşması proteini (“Induced myeloid leukemia cell differentiation protein”)
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolyum)
NEAA	: Esansiyel olmayan amino asitler (“Non-Essential Amino Acids”)
NOXA	: Phorbol-12-miristat-13-asetat kaynaklı protein 1 (“Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1”)
PBAE	: Poli (β -amino ester)
PLGA	: Poli (laktik asit-ko-glikolik asit)
PUMA	: p53 upregüle apoptoz modülatörü (“p53 upregulated modulator of apoptosis”)
PVDF	: Polivinilidin diflorür
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu (“scanning electron microscope”)
TBST	: Tween 20 içeren Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi (“Tris-buffered saline with Tween-20”)
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (“Vascular Endothelial Growth Factor”)

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ANTIAPOPTOTİK PROTEİN İNHİBİTÖRÜ YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Özlem KAPLAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

II. Danışman: Doç. Dr. Mehmet Koray GÖK

Apoptozdan kaçınma, kanser hücrelerinin ayırt edici bir özelliğidir. Miyeloid lösemi hücre farklılaşma proteini (MCL-1), hücrel apoptozu düzenleyen B-hücreli lenfoma 2 (BCL-2) ailesinin anti-apoptotik bir proteinidir. MCL-1 ekspresyonu, kanser hücrelerinin hayatta kalmasında anahtar bir rol oynamaktadır ve bu nedenle kanser tedavisinde umut verici bir hedeftir. MCL-1 ve diğer antiapoptotik BCL-2 proteinlerinin korunmuş BH3 domenlerini hedef alan BH3 mimetik peptidler oldukça spesifik MCL-1 inhibitörleridir. Ancak peptidlerin, metabolik olarak kararsızlıkları, hücrel proteazlara bağlı bozunmaları, hücrel zarlardan geçişlerinin zor olması gibi nedenlerle kullanımları sınırlıdır. Bu çalışmada, antiapoptotik protein MCL-1'in seçici inhibitörü MS1 peptidinin hücrel alımının ve stabilitesinin artırılması hedeflenmiş ve bu doğrultuda, nanobiyoteknolojik yöntemler kullanılarak MS1 peptidini içeren nanoyapılar oluşturulmuş ve bu yapıların kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Bu kapsamda, Bim BH3 mimetiği MS1 peptidi, mNeonGreen floresan proteini ve polihistidin ile füzyona uğratılmış şekilde rekombinant olarak üretilmiştir. Bu rekombinant protein kullanılarak iki nanopartiküler sistem hazırlanmıştır. Birincisi, rekombinant protein temelli kendiliğinden kurulan (self-assembly) nanopartiküler sistemlerdir. İkincisi ise bu füzyon proteinin enkapsüle edildiği polimerik nanopartiküller sistemlerdir. Nanopartiküllerin serviks kanseri (HeLa), akciğer kanseri (A549) ve meme kanseri (MDA-MB-231) hücre hatları ile sağlıklı hücre hattı (HUVEC) üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile analiz edilmiştir. Ayrıca, nanopartiküllerin apoptotik etkileri,

uygulandıkları hücrelerdeki antiapoptotik ve apoptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri RT-PCR ve Western blotlama ile belirlenerek incelenmiştir.

Sonuç olarak, kanser hücrelerine karşı spesifik olarak sitotoksik etki gösteren ve bu hücrelerde apoptozu indüklediği ortaya koyulan hedefli ilaç adayı yeni nanopartiküller geliştirilmiştir. Elde edilen veriler gelecekte, terapötik peptidlerin klinik uygulamalarda başarısını artıracak biyoteknolojik ilaç formülasyonlarının geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

Eylül 2022, 183 sayfa.

Anahtar kelimeler: MCL-1 inhibisyonu, kanser, rekombinant protein, protein bazlı nanopartiküller, hibrit polimerik nanopartiküller



SUMMARY

Ph.D. THESIS

EFFECTS OF ANTIAPOPTOTIC PROTEIN INHIBITOR-LOADED NANOPARTICLES on CANCER CELLS

Özlem KAPLAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Koray GÖK

Evasion of apoptosis is a hallmark of cancer cells. Myeloid leukemia cell differentiation protein (MCL-1) is an anti-apoptotic protein of the B-cell lymphoma 2 (BCL-2) family that regulates cellular apoptosis. MCL-1 expression plays a key role in the survival of cancer cells and is therefore a promising target in cancer therapy. BH3 mimetic peptides targeting the conserved BH3 domains of MCL-1 and other antiapoptotic BCL-2 proteins are highly specific MCL-1 inhibitors. However, the use of peptides is limited due to their metabolic instability, degradation by cellular proteases, and difficulty in passing through cellular membranes. In this study, it was aimed to increase the cellular uptake and stability of MS1 peptide, a selective inhibitor of the antiapoptotic protein MCL-1, and accordingly, nanostructures containing MS1 peptide were formed using nanobiotechnological methods and the cytotoxic and apoptotic effects of these structures on cancer cells were investigated. In this context, Bim BH3 mimetic MS1 peptide was produced recombinantly fused with mNeonGreen fluorescent protein and polyhistidine. Two nanoparticulate systems were prepared using this recombinant protein. The first is recombinant protein-based self-assembly nanoparticulate systems. The second is polymeric nanoparticle systems in which this fusion protein is encapsulated. The cytotoxic effects of nanoparticles on cervical cancer (HeLa), lung cancer (A549) and breast cancer (MDA-MB-231) cell lines and healthy cell line (HUVEC) were analyzed by MTT assay. In addition, the

apoptotic effects of nanoparticles were investigated by determining the expression levels of antiapoptotic and apoptotic proteins in the cells to which they were applied, by RT-PCR and Western blotting.

As a result, new targeted drug candidate nanoparticles have been developed that have a specific cytotoxic effect against cancer cells and have been shown to induce apoptosis in these cells. In the future, the obtained data may contribute to the development of biotechnological drug formulations that can increase the success of therapeutic peptides in clinical applications.

September 2022, 183 pages.

Keywords: MCL-1 inhibition, cancer, recombinant protein, protein-based nanoparticles, hybrid polymeric nanoparticles



1. GİRİŞ

Kanser günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir. 2020 yılında yaklaşık 19 milyon kişiye kanser teşhisi konulmuş ve 10 milyon kişi bu hastalık nedeniyle yaşamını yitirmiştir (Sung ve diğ., 2021). Kanser hücrelerinin öldürülmesinde apoptoz yollarının aktivasyonu önemli bir mekanizmadır. Birçok kanserin oluşumunda ve kanserli hücrelerin kemopetapiye direncinde antiapoptotik proteinlerin ekspresyonlarındaki artış önemli rol oynamaktadır. MCL-1 proteini, BCL-2 protein ailesinde yer alan antiapoptotik bir proteindir (Shamas-Din ve diğ., 2013). *MCL-1*'in amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu, hematolojik maligniteler ve solid tümörler (örneğin, küçük hücreli akciğer kanseri, meme kanseri, yumurtalık kanseri, prostat kanseri ve pankreas kanseri) dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde bildirilmiştir (Akgul, 2009; Labelle ve diğ., 2012; Reiner ve diğ., 2015; Young ve diğ., 2016; Zervantonakis ve diğ., 2017; Campbell ve diğ., 2018; Wei ve diğ., 2020; Wang ve diğ., 2021). Ayrıca *MCL-1*'in aşırı ekspresyonu sıklıkla antikanser ilaçlara direnç ve kötü prognoz ile de ilişkilidir (Ding ve diğ., 2007; Beroukhir ve diğ., 2010; Campbell ve diğ., 2018). *MCL-1*'in, taksol, cisplatin, erlotinib ve diğer standart antikanser ilaçlar da dahil olmak üzere çeşitli antitümör ajanların etkinliğini sınırlayan hem içsel hem de kazanılmış bir direnç faktörü olduğu gösterilmiştir (Wei ve diğ., 2008; Wertz ve diğ., 2011; Balko ve diğ., 2014). *MCL-1* ekspresyonunun azalması ise, kanser hücrelerinin ilaca karşı duyarlılığını artırmaktadır. *MCL-1* proteinini ekprese eden *MCL-1* geni susturulmuş nöroblastom hücre hatlarında, etoposid, doksorubisin ve ABT-737'ye karşı duyarlılık 2-300 kat artmıştır (Lestini ve diğ., 2009). Ayrıca, *in vitro* osteosarkom hücre hatlarında ve *in vivo* ksenograft tümörlerinde *MCL-1*'in susturulması cisplatin ve doksorubisin kemodirencini tersine çevirmiştir (Osaki ve diğ., 2016).

Kanser hücrelerinin ölüme direnci ile *MCL-1* proteini arasındaki bağlantıyı ortaya koyan çalışmaların sayısı arttıkça, oldukça spesifik bir *MCL-1* inhibitörü için tasarımın gerekliliği kaçınılmaz bir motivasyon haline gelmiştir (Sarosiek ve Letai, 2016; Bolomsky ve diğ., 2020; Denis ve diğ., 2020; Gambini ve diğ., 2021; Negi ve Murphy, 2021). *MCL-1* ve diğer antiapoptotik BCL-2 proteinleri, korunmuş BH3 domenleriyle BAK/BAX ile etkileşime girmektedir; bu yüzden, seçici inhibitörlerin çoğu BH3 mimetikleridir (Montero ve Letai, 2018; Li, 2021).

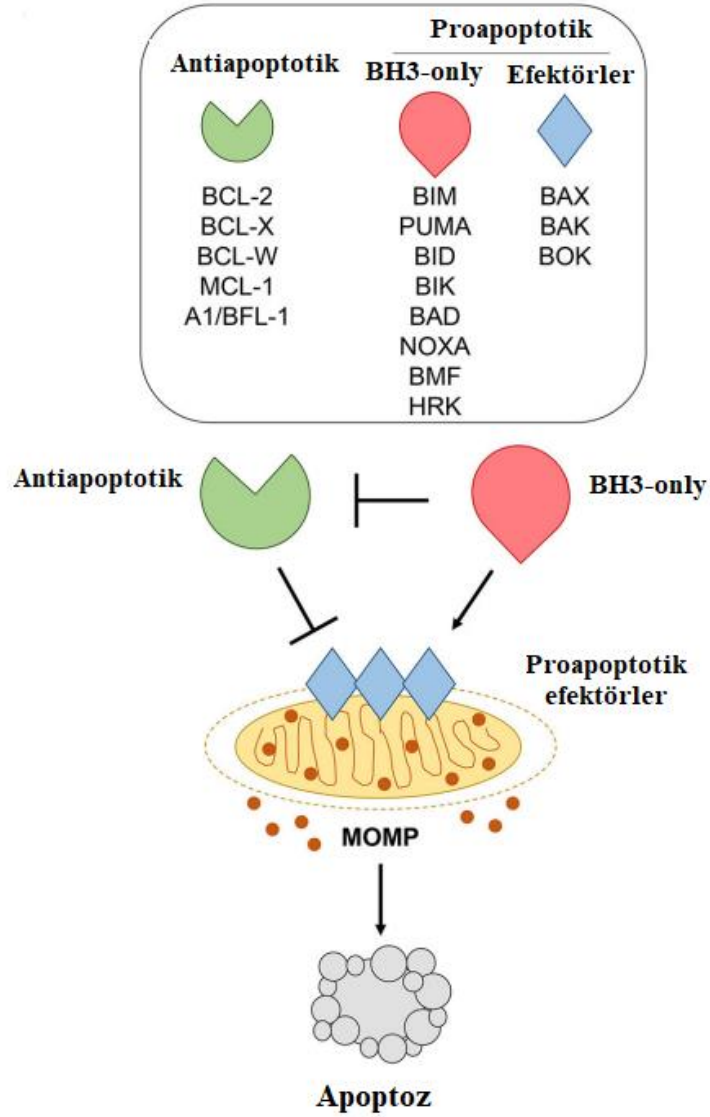
Antiapoptotik proteinlerin inhibisyonunda, proapoptotik proteinlerin BH3 domenlerini taklit ederek geliştirilen peptid inhibitörlerin (BH3 mimetik peptidler) kullanımı etkili bir yaklaşım olmuştur. BH3 mimetik peptidler oldukça spesifik antiapoptotik protein inhibitörleri olmasına karşın, bu tür peptidlerin kullanımı, metabolik kararsızlıkları, hücrel proteazlar tarafından yıkıma uğratılmaları ve hücre zarlarından geçişlerinin zayıf olması nedeniyle sınırlıdır (Gong ve diğ., 2016). Oldukça spesifik olmalarına rağmen şimdiye kadar klinik denemelere kadar ulaşabilmiş bir BH3 mimetik peptid mevcut değildir. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için, çeşitli çalışmalarda peptidler kimyasal olarak modifiye edilmiştir. Söz konusu çalışmalarda modifiye edilen peptidlerin hedef afinitelerinin ve çözünürlüğünün azaldığını görülmektedir (Okamoto ve diğ., 2013; Barile ve diğ., 2017).

Bu doktora tezi kapsamında antiapoptotik protein MCL-1'in seçici inhibitörü MS1 peptidinin hücrel alımının ve stabilitesinin artırılması için, MS1 peptidini içeren nanoyapıların oluşturulması ve bu yapıların kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, MCL-1 proteininin inhibitörü MS1 peptidini taşıyan hedefli nanoyapılar, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak (kendiliğinden kurulan peptid nanoyapılar) ve nanoteknolojik yöntemlerle (nanopolimer taşıyıcı sistemlerle) oluşturulmuştur. Oluşturulan nanoyapılar çeşitli yöntemlerle karakterize edilmiştir. Sonrasında nanoyapıların kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve apoptozu indüklemeye kapasitesi moleküler yöntemlerle ortaya koyulmuştur.

2. GENEL KISIMLAR

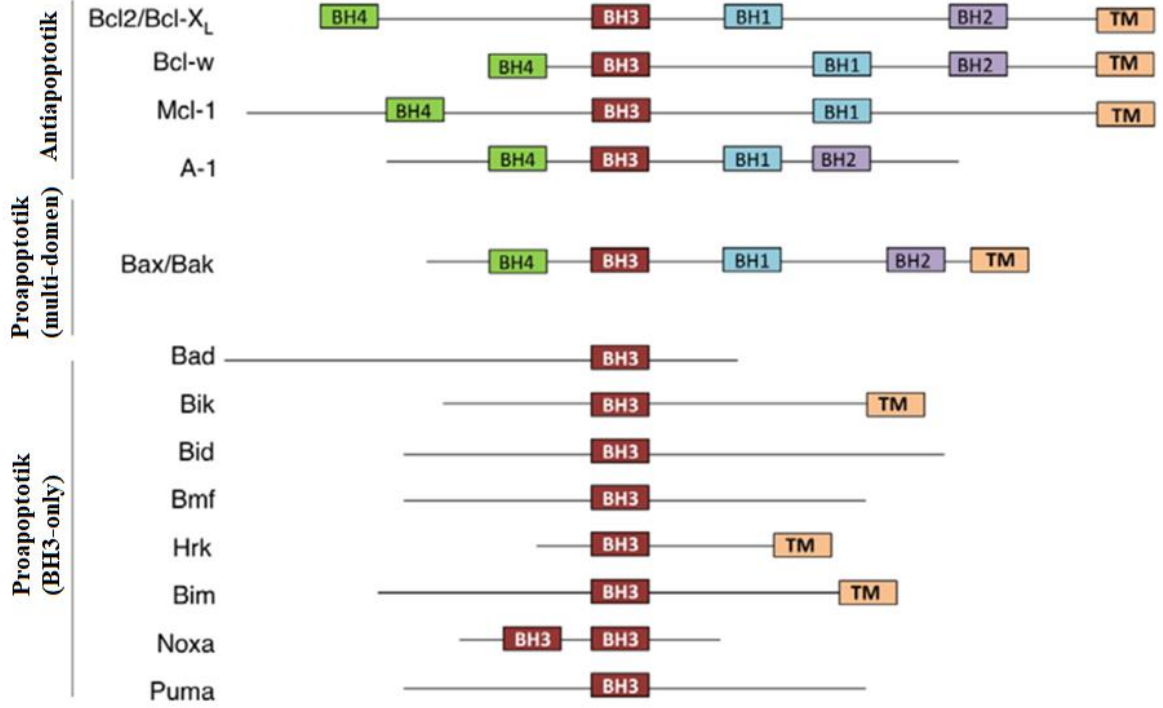
2.1. APOPTOZ

Apoptoz, bir organizmanın büyümesinin veya gelişmesinin normal ve kontrollü bir parçası olarak meydana gelen hücrel ölüm mekanizmasıdır. Memeli sistemlerinde iç (intrinsik) ve dış (ekstrinsik) olmak üzere iki apoptoz yoluğı tespit edilmiştir (Riedl ve Salvesen, 2007). Mitokondriyal yolak olarak da adlandırılan intrinsik yolak, gelişimsel olarak kontrol edilen ve genotoksik ajan aracılı apoptozda tanımlanmıştır ve BCL-2 ailesi üyeleri tarafından düzenlenmektedir. BCL-2 ailesi, proapoptotik BH3-only üyeler (BIM, BID, PUMA, NOXA, ve BAD), proapoptotik efektör moleküller (BAX ve BAK) ve antiapoptotik BCL-2 ailesi proteinleri (BCL-2, BCL-XL, MCL-1, A1 ve BCL-B) olmak üzere üç alt aileden oluşmaktadır (Czabotar ve diğ., 2014). Sağlıklı hücrelerde BAX/BAK, antiapoptotik BCL-2 ailesi üyeleri tarafından engellenmektedir. Apoptotik bir uyarana (gelişimsel işaret, büyüme veya hayatta kalma faktörü eksikliği veya genotoksik ajan) yanıt olarak, BH3-only üyeleri transkripsiyonel veya posttranskripsiyonel olarak artış göstermektedir. Aktif BH3-only proteinler BAK ve BAX üzerinde etkili olmakta veya antiapoptotik BCL-2 ailesi üyelerini antagonize etmektedir. BAX ve BAK daha sonra sitokrom c'nin mitokondriden salınımını uyarmaktadır. Sitokrom c, Apaf-1 ile, apoptozom adı verilen heptametrik bir kompleks oluşturmaktadır (Şekil 2.1) (Yuan ve Akey, 2013; Nagata, 2018). Çoğu memeli hücresinde, intrinsik apoptoz yolunu tetiklemek için mitokondriyal dış zar geçirgenliği (MOMP) ve daha sonra sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması kritik adımlardır. Sitokrom c'nin mitokondriden salınması, BAX, BAK, BIM, BID ve PUMA gibi BCL-2 ailesinin proapoptotik üyeleri tarafından uyarılmakta ve aynı ailenin BCL-2, BCL-XL, BCL-W, BCL-2-A1 ve MCL-1 gibi antiapoptotik üyeleri tarafından inhibe edilmektedir (Carneiro ve El-Deiry, 2020).



Şekil 2.1: Apoptozu düzenleyen BCL-2 ailesi üyeleri (Adams ve diğ., 2019).

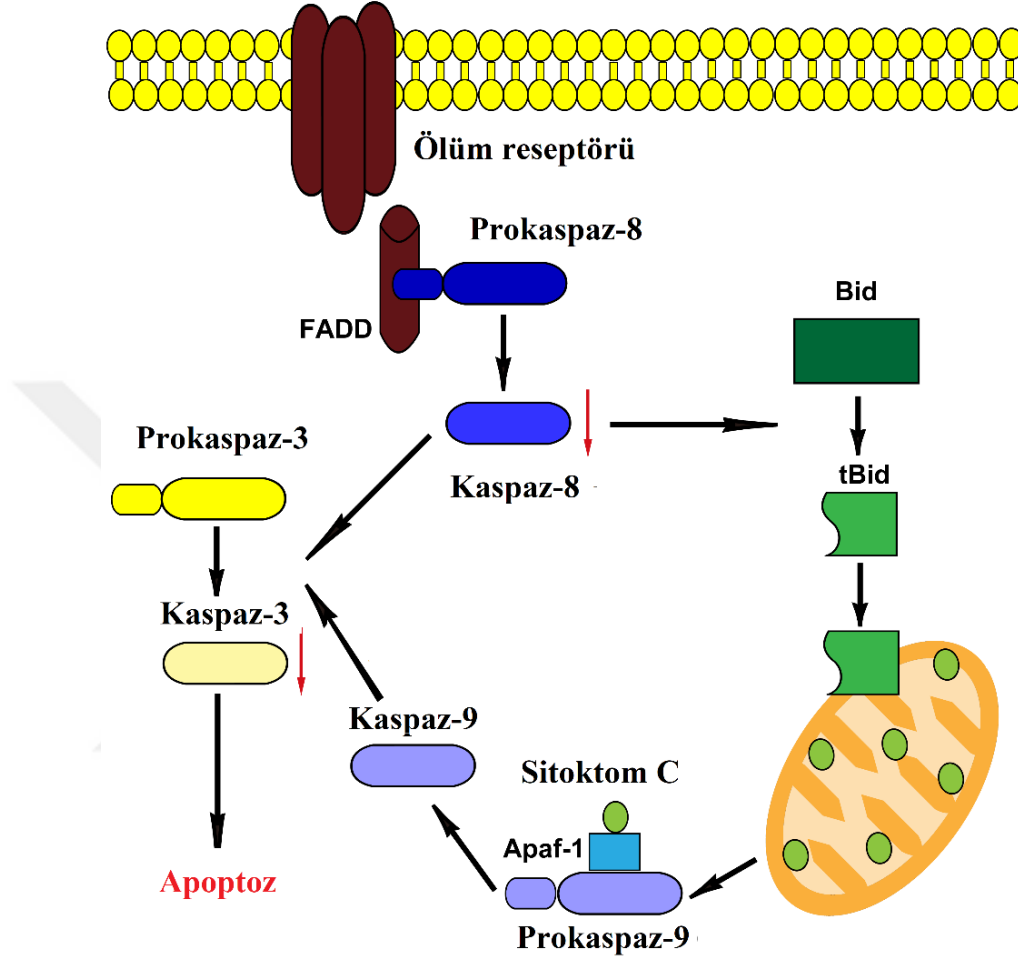
BCL-2 ailesi üyeleri, evrim yoluyla korunan mitokondriyal apoptotik yolun temel elemanlarıdır. Bu protein ailesi, sayısı aile üyeleri arasında değişebilen BCL-2 homoloji domenlerinin (alanlarının) ("BH domain") varlığı ile karakterize edilmektedir (Şekil 2.2). Hücredeki anti-apoptotik BCL-2 ailesi üyelerinin sitokiyometrisi, hücrenin yaşayıp yaşamayacağını belirlemektedir. BH3-only proteinlerinin mitokondriyal apoptotik yolun temel başlatıcıları olduğu düşünülmektedir (Doerflinger ve diğ., 2015).



Şekil 2.2: Çeşitli BCL-2 ailesi üyelerinin domen organizasyonu. BCL-2 homoloji (BH) ve transmembran (TM) domenleri (alanları) (Doerflinger ve diğ., 2015).

Ekstrinsik apoptoz yolu olarak adlandırılan ikinci apoptoz yolu, ölüm reseptörleri olarak bilinen hücre zarı proteinleri tarafından başlatılmaktadır. Proapoptotik ölüm reseptörleri arasında Fas (fizyolojik ligandı FasL olan), tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörleri (TNFR1 ve TNFR2) ve TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) reseptörleri (DR4 ve DR5) bulunmaktadır. Proapoptotik ölüm reseptörlerinin hücre içi domenleri, ölüm domeni olarak adlandırılan korunmuş bir protein-protein etkileşim bölgesini içerir. Ligand bağlanması üzerine ölüm reseptörleri, hücre zarı içinde trimerleşip birirmektedir. Bu süreci, FADD (Fas ilişkili ölüm domeni, "Fas associated death domain") gibi adaptör proteinlerin ve kaspaz 8 ve kaspaz 10 gibi başlatıcı kaspazların alınması izlemektedir. Dışsal yolda, başlatıcı kaspazlar 8 ve 10'un aktivasyonu, efektör kaspazların aktivasyonuna ve daha sonra mitokondriye taşınan BID'in bölünmesine yol açmakta, böylece sitokrom c'nin salınmasına katkıda bulunmaktadır (Şekil 2.3). BID transkripsiyonel düzeyde p53 tarafından pozitif olarak düzenlenmektedir. BID, dışsal ve içsel yollar arasında bir bağlantı olarak önerilmiştir: "Tip II" olarak adlandırılan hücrelerde (esas olarak içsel yola dayanan). BID, mitokondri yoluyla apoptoza yol açmaktadır. "Tip I" hücrelerde (esas olarak dışsal yola dayanan), ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, down stream

kaspazların etkin aktivasyonuna neden olmakta ve bu da mitokondri yoluna gerek kalmadan hücre ölümüne yol açmaktadır (Ouyang ve diğ., 2012).

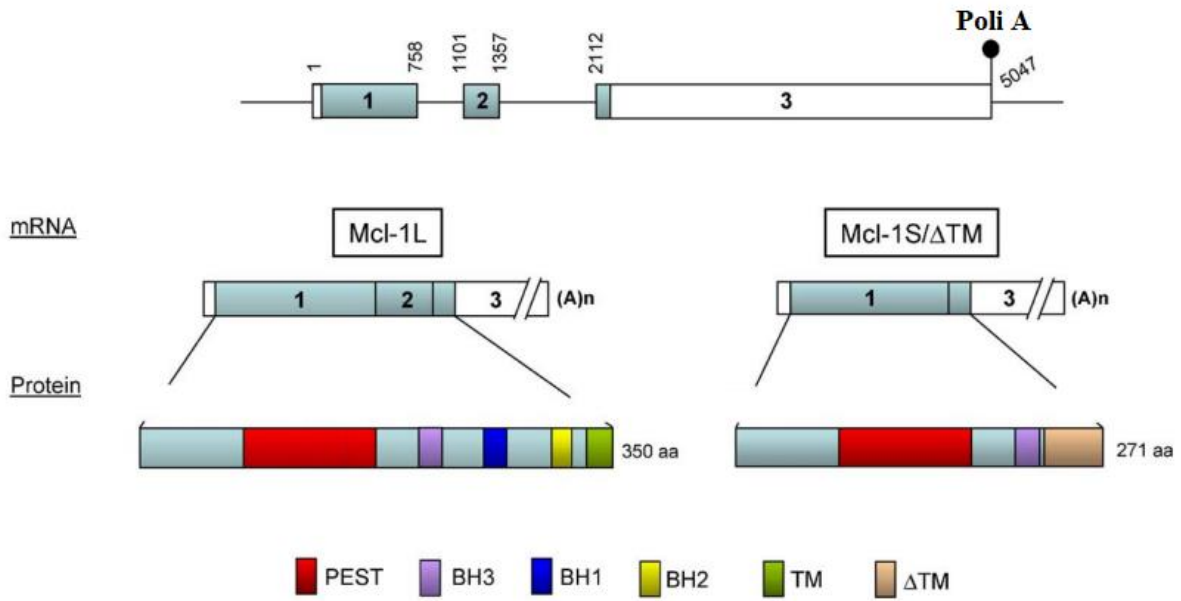


Şekil 2.3: Ekstrinsik apoptoz yolu (Li ve diğ., 2013).

2.2. MCL-1 PROTEİNİ

İnsan *MCL-1* geni, kromozom 1q21 üzerinde bulunur. MCL-1 proteini (MCL-1L olarak da bilinir) 350 amino asit kalıntısı içerir ve BH alanları olarak adlandırılan diğer BCL-2 ailesi proteinlerine benzer bölgeleri içerir. BH alanları, aile proteinleri arasındaki protein-protein etkileşimlerine aracılık eden kısa motiflerdir ve apoptoz regülasyonu için önemlidir. MCL-1, 1-3 BH alanlarını içerir, ancak BCL-2 ve BCL-XL'de bulunan N-terminal BH4 domeni içermemektedir. MCL-1 ayrıca çeşitli hücre içi zarlara, özellikle de dış mitokondriyal zara lokalize olmayı sağlayan bir C-terminal transmembran (TM) domen içerir. MCL-1'in N-terminal kısımları, prolin, glutamik asit, serin ve treonin amino asit kalıntıları bakımından

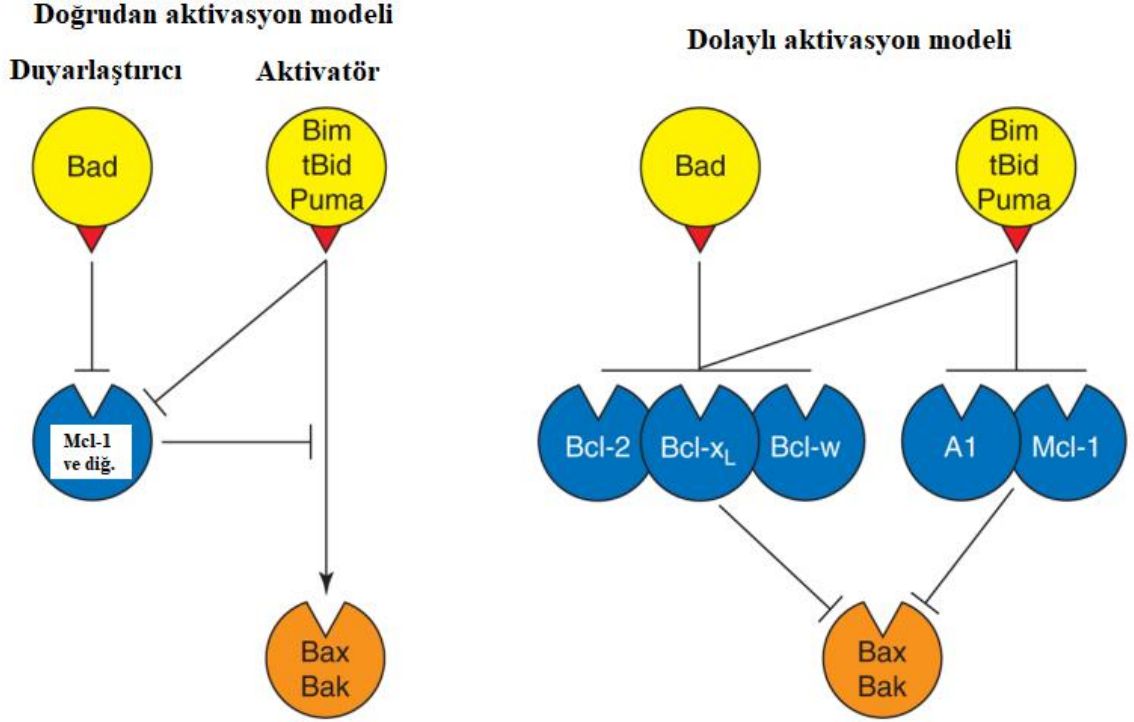
zengin iki PEST alanı içerir. PEST alanları genellikle hızla bozunan proteinlerde bulunur ve MCL-1'in hücrelerde kısa bir yarı ömrü vardır (tipik olarak bir ila birkaç saat aralığında). İkinci eksonunun atlanması yoluyla alternatif ekleme, ikinci bir protein izoformu olan MCL-1S/ Δ TM'nin oluşumuna neden olur (Şekil 2.4). Bu 271 amino asit büyüklüğündeki protein BH1, 2 ve transmembran alanlardan yoksundur. Bu izoformun önemi henüz belirlenmemiş olsa da MCL-1S/ Δ TM'nin yapısı belirli proapoptotik "BH3 only" proteinlerine benzer ve MCL-1L'nin belirgin aksine, MCL-1S/ Δ TM'nin aşırı ekspresyonu hücre ölümünü teşvik edebilir (Michels ve diğ., 2004).



Şekil 2.4: MCL-1'in moleküler organizasyonu (Michels ve diğ., 2004).

MCL-1, işlevlerine göre antiapoptotik, proapoptotik ve BH3-only proteinleri olmak üzere üç grupta sınıflandırılmış BCL-2 protein ailesinin antiapoptotik bir üyesidir (Shamas-Din ve diğ., 2013). MCL-1, dokularda yaygın şekilde eksprese edilmekte ve esas olarak hücrelerde mitokondride bulunmaktadır. MCL-1'in antiapoptotik işlevi, hücrenin hayatta kalması ve homeostazı için esastır (Peperzak ve diğ., 2013). MCL-1, proapoptotik proteinler BAK/BAX'ı hidrofobik oluk içeren BH3 domeni boyunca ayırarak antiapoptotik işlevini sergilemektedir (Glab ve diğ., 2017). BH3-only proteinleri (BIM, PUMA, BAD, NOXA ve BID), MCL-1: BAK/BAX kompleksinin bozulmasıyla BAX/BAK aktivitesi sağlamaktadır (Wei et al., 2016). Mitokondri zarına bağlanan BAK'ın aksine, BAX sitozolde bulunmaktadır. BH3 only proteini BID'nin aktivasyonundan sonra, BAX apoptotik fonksiyonunu uygulamak için mitokondriye transloke olmaktadır (Haneef ve diğ., 2012) ve BAK/BAX oligomerleri oluşmaktadır.

Oligomerler, dış membran lipid çift tabakasını kırabilmekte; ardından, sitokrom c salınımını ve başlatıcı kaspazların aktivasyonunu gerçekleştirmektedir (Mcarthur ve diğ., 2018). Bu yolak ile ilgili olarak iki mekanizma önerilmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: BAX ve BAK'ın aktivasyonu için iki alternatif model.

İlk mekanizma doğrudan aktivasyon modelidir. BH3-only proteinler BAK/BAX'a bağlanmak için, MCL-1'e karşı rekabet etmekte ve BH3-only proteinleri tarafından oluşturulan BAK/BAX kompleksleriyle apoptotik programı aktive olmaktadır. Önerilen mekanizmalara dayanarak, BH3-only proteinleri ayrıca duyarlılaştırıcılar ve aktivatörler olarak ikiye ayrılmaktadır (Elkholi ve diğ., 2011). BH3-only duyarlılaştırıcı proteinleri hücrel homeostazi korumakta ve MCL-1'e bağlanarak BAK/BAX'ı MCL-1:BAK/BAX kompleksinden ayırmaktadır. Aktivatör BH3-only proteinleri sadece MCL-1'e bağlanmakla kalmaz, aynı zamanda doğrudan mitokondriyal zar üzerinde makroporlar oluşturarak BAK/BAX oligomerizasyonunu kolaylaştırmak için BAK/BAX'a bağlanır. Bu model, HeLa hücrelerinde BIM, PUMA ve NOXA'nın BAK/BAX ile floresan kompleksinin izlenmesiyle gösterilmiştir (Vela ve diğ., 2013). İkinci önerilen mekanizma, BH3-only içeren proteinlerin BAK/BAX'ı MCL-1:BAK/BAX heterodimerinden uzaklaştırmak için MCL-1'e bağlandığı dolaylı aktivasyon modelidir. Bu model, bazı BH3-only proteinlerin MCL-1'e sıkıca bağlandığının kanıtı ile

desteklenmektedir; bazı BH3-only proteinleri MCL-1'i tutar ve BAK/BAX'a bağlanmasını önlemektedir (Shamas-Din ve diğ., 2013).

2.3. MCL-1 İNHİBİTÖRLERİ

MCL-1 proteini ve kanser hücrelerinin ölüme direnci arasındaki bağlantıyı ortaya koyan çok sayıda çalışma vardır. Bu yüzden, oldukça spesifik bir MCL-1 inhibitörü geliştirilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır ve bu durum birçok yeni MCL-1 inhibitörünün geliştirilmesine olanak sağlamıştır (Sarosiek ve Letai, 2016). Bununla birlikte, MCL-1 geninin susturulması, hematopoetik kök hücrelerde (Opferman ve diğ., 2003; Vo ve diğ., 2012) ve kalp dokusunda (Wang ve diğ., 2013) toksisite gibi çeşitli yan etkilere neden olmaktadır. Ayrıca MCL-1 mitokondriyal solunumda yer alan bir protein olarak tanımlanmıştır (Perciavalle ve diğ., 2012). Bu nedenle, MCL-1'in proapoptotik BCL-2 ailesi üyeleri ile etkileşiminin önlenmesi ve MCL-1'in mitokondri içindeki housekeeping rolünün sürdürülmesi ideal bir yaklaşım olmuştur (Sarosiek ve Letai, 2016). Herhangi bir hastalık durumunda belirli bir proteinin ilaç hedefi olarak tanımlanması upstream elementlerin tanımlanması ve etki mekanizmasının derinlemesine araştırılmasına dayanmaktadır. MCL-1'in de kanserde hedef olarak tanımlanmasında derinlemesine araştırmalar yapılmıştır. Farklı kanser modellerinde yapılan kapsamlı çalışmalar MCL-1'in etki mekanizmasını ve upstream elementlerini vurgulayarak kanserde bir hedef olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Bu bağlamda, Townsend ve diğ (1998) çalışmalarında akut miyeloblastik lösemi hücre hattında ERK inhibitörünün MCL-1 ekspresyonunun pozitif regülatörü olduğunu ve ERK'in upstream bir element olduğunu ortaya koymuştur (Townsend ve diğ., 1998). Bu çalışmanın ardından MiaPaCa-2 ve AsPC-1 pankreas kanseri hücrelerinde farklı lipoksijenaz inhibitörleri kullanılarak lipoksijenazın MCL-1'in upstream pozitif efektörü olduğu tanımlanmıştır (Tong ve diğ., 2002). Multipl miyelomda vasküler endotel büyüme faktörünün (VEGF) apoptoza karşı dirençte MCL-1'in upstream regülasyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir (Le Gouill ve diğ., 2004). Multipl miyelomda RNA polimeraz II'nin siklin bağımlı kinaz inhibitörü seliciclib tarafından inhibe edilmesinin, MCL-1 downregülasyonu yoluyla apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Maccallum ve diğ., 2005). CLL ve foliküler lenfoma örneklerinin mikroarray analizi, MCL-1'in bu tümörlerde apoptotik kusurlara aracılık eden kritik noktalardan biri olduğunu ortaya koymuştur (Hui ve diğ., 2006). İnsan endometriyal ve rahim ağzı kanseri dokularında STAT3 (sinyal transdüseri ve transkripsiyon 3 aktivatörü) aktivasyonunun, artan

MCL-1 ekspresyonu ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (Chen ve diğ., 2007a; Weerasinghe ve diğ., 2007). Bir antiapoptotik BCL-2 aile üyesi olarak MCL-1'e atfedilen etki mekanizmasını vurgulayan çalışmalar, MCL-1'in kanserde umut verici bir hedef olduğu görüşünü desteklemektedir. Bu yaklaşımın önemli ve ilk örneklerinden birisi BCL-2 antagonisti olan ABT737'nin kullanıldığı bir çalışmadır. Bu çalışmada ABT737'ye maruz kalan U937 monositik lösemi hücrelerinde MCL-1 downregülasyonu bu hücreleri ölüme duyarlı hale getirmiştir (Chen ve diğ., 2007b; Kohl ve diğ., 2007). HCT-116 kolon karsinom hücrelerinde *MCL-1* ekspresyonunun susturulmasıyla TRAIL'in (tümör nekroz faktörü ligand süper aile üyesi 10) hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir. Multipl miyelomda yapılan çalışmada bir proteazom inhibitörü olan bortezomibin, MCL-1'in parçalanmasını sağlayarak apoptoza aracılık ettiği gösterilmiştir (Podar ve diğ., 2008). Bütün bu araştırmalar, araştırmacıların MCL-1'in, kanser hücrelerinin ölüme karşı direnç göstermesinde kritik aktörlerden biri olarak değerlendirilebileceğini ve kanserde kullanılabilecek bir ilaç adayı tarafından hedef alınma potansiyelinin yüksek olduğunu ortaya koymuştur.

2.3.1. MCL-1 Proteinini Seçici Olmayan (Non-selektif) Şekilde Hedefleyen İnhibitörler

İlk aşamalarda geliştirilen MCL-1 inhibitörlerinin çoğu MCL-1'e karşı seçici değildir (Tablo 2.1). MCL-1'in kanserdeki rolüne ilişkin çalışmaların ardından seçici olamayan (non-selektif) fakat MCL-1'in direkt hedeflendiği ilk çalışma Nguyen ve diğ. tarafından 2007 yılında yayımlanmıştır. Bu çalışmada Obatoclax adını verilen küçük bir molekül tanımlanmıştır. Bu molekül SKMel5 melanoma hücre hattında 1, 5 ve 10 μ M konsantrasyonda MCL-1 ve BAK arasındaki etkileşimi ortadan kaldırmıştır. Ancak, bu etki MCL-1'e spesifik değildir; aynı çalışmada BCL-2 ile BIM'in de etkileşimini bozduğu gösterilmiştir (Nguyen ve diğ., 2007). Daha sonrasında 50-100 nM konsantrasyondaki Obatoclax tedavisi ile meme kanseri hücre hatlarında benzer sonuçlar elde edilmiştir (Mitchell ve diğ., 2010). Bir Obatoclax analogu olan SC-2001, hepatosellüler karsinoma hücre hatlarında BCL-XL ve MCL-1'in downregülasyonunun yanı sıra BCL-2 ailesi protein etkileşimlerinin ortadan kaldırılmasıyla da ilişkili bulunmuştur. Bu durum Obatoclaxda gözlemlenen önceki nonspesifikliği doğrulamaktadır (Su ve diğ., 2014). Benzer şekilde SC-2001 BRAF, mutant olan A375, 1205-Lu, HT144 melanom metastatik hücre hatlarına 2.5 μ M'in üzerindeki konsantrasyonlarda uygulandığında hücre sağkalım oranını düşürmüştür (Mukherjee ve diğ., 2016). Obatoclax ayrıca MCL-1 ekspresyonu yüksek olan Kras^{G12D}, p53^{-/-} primer tiroid hücrelerinde 500 nM konsantrasyonda yoğun hücre ölümüne neden olmuştur (Champa ve diğ., 2014). Obatoclax

(200 nM), AsPC-1, HPAC, BxPC-3, PANC-1, CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hatlarında BCL-2, BCL-XL ve MCL-1'in downregülasyonunu sağlamanın yanı sıra bu hücre hatlarında apoptozu indükleyen kuvvetli bir ajan olarak sunulmuştur (Wang ve diğ., 2014). Bütün bunlar, Obatoclast ve analogu SC-2001'in çeşitli kanser modellerinde MCL-1'e karşı aktif olduğunu göstermektedir, ancak bu aktivite MCL-1'e spesifik olmaktan çok uzaktır. Seçici olmayan bir başka inhibitör olan AT-101 (R-(-)-gossipol enantiyomeri), pamuk tohumlarında bulunan proapoptotik BCL-2 ailesi üyesi mimetiği bir polifenoldür. BCL-2, BCL-XL ve MCL-1'in BH3 alanlarını hedefleyebilmektedir. Ayrıca kanserde güçlü bir ilaç molekülü olarak önerilmiştir (Loberg ve diğ., 2007). AT-101 (5 ve 10 μ M) VCaP insan prostat kanseri hücrelerinde, hem MCL-1 hem de BCL-2'nin ekspresyonunda bir düşüşe yol açmıştır. Benzer etki multipl miyelomun prelinik modellerinde de gözlemlenmiştir (Paulus ve diğ., 2014). Tek başına bir ajan olarak veya standart kemoterapilerle kombine halde AT-101, farklı kanser türlerinde 20'den fazla Faz I ve II klinik denemesinde değerlendirilmiştir. AT-101, klinik denemelerde değerlendirilmiş güçlü anti-MCL-1 aktivitesine sahip ilk küçük moleküldür (Xiang et al., 2018). Apogospol (kısaca ApoG2; gossipol türevli semisentetik bir molekül) BCL-2 ailesinin antiapoptotik üyelerinin (büyük çoğunlukla BCL-2, BCL-XL ve MCL-1) BH3-only proapoptotik proteinleri ile etkileşimini hedefleyen bir ilaçtır (Arnold ve diğ., 2008; Banerjee ve diğ., 2010). ApoG2'nin (3.5 μ M) foliküler küçük hücreli lenfoma hücre hattında intrinsik apoptotik belirteçler olan kaspaz-3 ve kaspaz-9'un upregülasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir (Arnold ve diğ., 2008). İnsan pankreatik karsinom hücre hattında 20 μ M ApoG2'nin MCL-1-BAX ve BCL-2-BIM'in etkileşimlerini azalttığı ve bunların hepsinin apoptotik cevap ile korele olduğu gösterilmiştir (Banerjee ve diğ., 2010). Bir BCL-XL, BCL-2 ve MCL-1 inhibitörü olan ApoG2 türevi Sabutoclast, 1 ve 2 μ M konsantrasyonda, H357, SCC-4, SCC-9 oral skuamöz hücreli karsinom hücre hatları ve FaDU insan farenks skuamöz hücreli karsinom hücre hattında NOXA ekspresyonunu artırmıştır (Maji ve diğ., 2015). BI97D MCL-1'i hedefleyen bir başka ApoG2 türevidir. Bu ApoG2 türevinin OCI-AML3 (Ontario Cancer Institute-Acute Myeloid Leukemia-3) hücre hattına 100 nM konsantrasyonda uygulandığında MCL-1-BIM etkileşimini azalttığı gösterilmiştir (Pan ve diğ., 2015). Bir kinaz inhibitörü olan Sorafenib, hepatoselüler karsinomlu hastalarda sağkalım oranını arttıran ve seçici olmayan bir MCL-1 inhibitörü olarak rol oynamaktadır (Gauthier ve Ho, 2013). Sorafenib hücre siklusunu durdurmasının yanı sıra düşük siklin D1 seviyelerine yol açan RAF serin/treonin kinazlarını da inhibe etmektedir (Chen ve diğ., 2010a). Geniş ölçüde çalışılmış olan Obatoclast, gossypol

türevleri ve Sorafenib dışında, seçici olmayan inhibisyon metodolojilerini içeren başka çalışmalar da vardır. Örneğin DBTRG05MG glioblastoma hücre hattında BCL-2 ve MCL-1 ekspresyonunu azaltmada miRNA-153 mikroRNA'sı kullanılmıştır (Xu ve diğ., 2010).

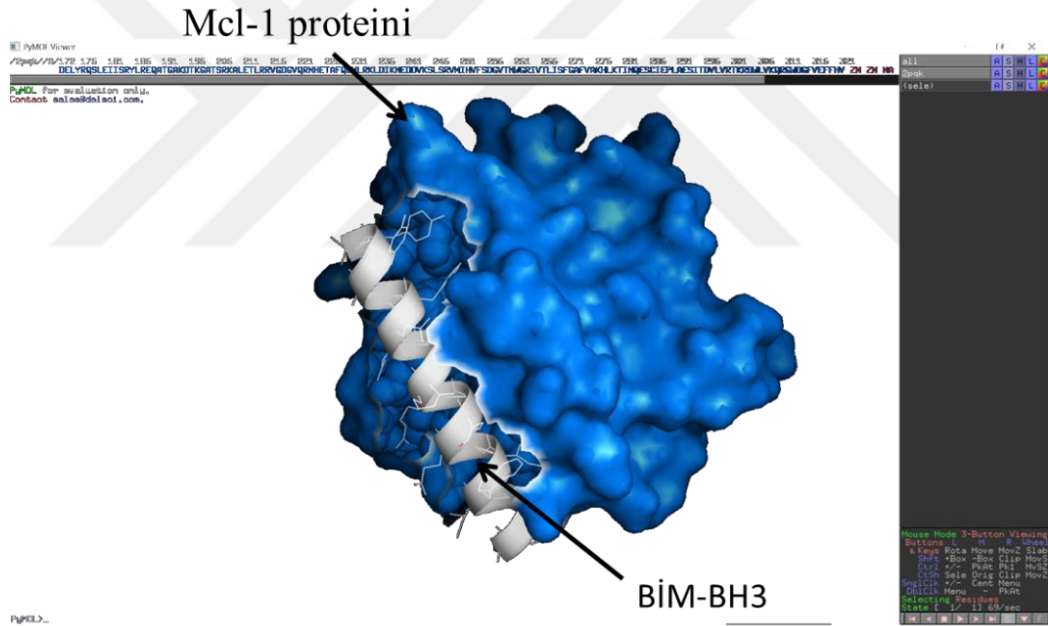
TW-37, BCL-XL'ye göre MCL-1 ve BCL-2'ye daha yüksek bir afinite ile bağlanan BCL-2 proteinlerindeki BH3 domenini hedefleyen rasyonel olarak tasarlanmış küçük bir moleküldür (Mohammad ve diğ., 2007). TW-37, normal periferik kan lenfositleri üzerinde önemli bir etki göstermeden *de novo* kemoresistant lenfoma hücrelerinde güçlü antiproliferatif etki göstermiştir. Mekanik olarak, TW-37, BAX ve MCL-1 veya BCL-2 arasındaki heterodimer komplekslerini bozarak apoptotik hücre ölümünü tetiklemektedir. Lenfoma hücrelerinin TW-37'ye önceden maruz bırakılması hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak siklofosamid-doksorubisin-vinkristin-prednizon rejiminin antitümör aktivitesini önemli ölçüde arttırmıştır (Ashimori ve diğ., 2009).

Tablo 2.1: MCL-1'in seçici olmayan (non-selektif) inhibisyonuna yol açan başlıca ilaçlar ve uygulandıkları hücreler.

İlaç	Hücre hattı	Konsantrasyon	Referanslar
Obatoclax	SK-Mel5 melanoma hücre hattı	1–10 M	(Nguyen ve diğ., 2007).
Obatoclax	Meme kanseri hücre hatları	50–100 nM	(Mitchell ve diğ., 2010).
SC-2001 (Obatoclax analogu)	BRAF-mutant A375, 1205-Lu, HT144 melanoma metastatik hücre hatları	>2.5 µM	(Mukherjee ve diğ., 2016).
Obatoclax	Kras ^{G12D} , p53 ^{-/-} primer tiroid hücreleri	500 nM	(Champa ve diğ., 2014).
Obatoclax	AsPC-1, HPAC, BxPC-3, PANC-1, CFPAC-1 ve MIA PaCa-2 pankreatik kanser hücre hatları	200 nM	(Wang ve diğ., 2014)
AT-101	VCaP insan prostat kanser hücreleri	5–10 µM	(Loberg ve diğ., 2007)
ApoG2	Foliküler küçük hücreli lenfoma hücre hattı	3,5 µM	(Arnold ve diğ., 2008)
ApoG2	BxPC-3 insan pankreatik karsinom hücre hattı	20 µM	(Banerjee ve diğ., 2010)
Sabutoclax	H357, SCC-4, SCC-9 oral skuamöz hücreli karsinom hücre hatları ve FaDU insanı farinks skuamöz hücreli karsinom hücre hattı	1–2 µM	(Maji ve diğ., 2015)
BI97D6	OCI-AML3 akut miyeloid lösemi hücre hattı	100 nM	(Pan ve diğ., 2015)
miRNA-153	DBTRG-05MG glioblastoma hücre hattı	100 nM transfeksiyon	ile (Xu ve diğ., 2010)
FL118	PC3 prostat kanser hücreleri ve HCT-8 kolon kanser hücreleri	10–100 nM	(Ling ve diğ., 2012)

2.3.2. MCL-1 Proteinini Seçici (Selektif) Şekilde Hedefleyen İnhibitörler

MCL-1 ve diğer antiapoptotik BCL-2 proteinleri, korunmuş BH3 domenleriyle BAK/BAX ile etkileşime girmektedir. BH3-only proteinleri, BAK/BAX'ın yerini almak için aynı bölgeyi kullanarak MCL-1'e bağlanmaktadır (Şekil 2.6). Bununla birlikte, BH3-only proteinlerinin farklı antiapoptotik BCL-2 proteinlerine seçiciliği mevcuttur (Montero ve Letai, 2018). Örneğin, BIM ve PUMA, düşük nanomolar K_d değerindeki tüm antiapoptotik BCL-2 proteinlerine ayırt edici şekilde bağlanmaktadır. BAD'ın, MCL-1'e bağlanmazken BCL-2, BCL-XL ve BCL-W'ye sıkıca bağlandığı bilinmektedir. BID, mikromolar düzeydeki MCL-1'e bağlanmaktadır ve bir BAX aktivatörüdür. NOXA, BCL-2 ve BCL-XL'ye mikromolar konsantrasyonlara kadar anlamlı bir bağlanma olmadan nanomolar konsantrasyonda MCL-1'e seçici olarak bağlanmaktadır (Haschka ve diğ., 2015).



Şekil 2.6: Bim BH3 ile kompleks halinde MCL-1 proteinin X-ışını kristal yapısı [protein data bank (2PQK)'dan alınmıştır. PyMOL Vierwer ile gösterilmiştir.].

BH3-only proteinlerinden türetilen BH3 mimetikleri, prosurvival proteinler tarafından tutulan BAK/BAX'ı serbest bırakabilmekte; bu nedenle, kanser hücrelerinde apoptoza yol açmaktadır. Her BH3 mimetiği, antiapoptotik BCL-2 proteinlerine karşı ana BH3-only proteinine benzer bir seçicilik spektrumuna sahiptir (Happo ve diğ., 2012). Örneğin, NOXA mimetikleri BCL-2, BCL-XL ve BCL-W'ye karşı MCL-1 seçiciliğini gösterirken, BIM ve PUMA mimetikleri pan-BCL-2 ailesi (Tüm BCL-2 ailesi) inhibitörleridir (Chen ve Fletcher, 2017). Doğal olarak ortaya

çıkan, yüksek oranda seçici MCL-1 inhibitörü olan NOXA, apoptotik hücrelerde zaten mevcuttur (Willis ve diğ., 2005). Bu bağlamda, NOXA aracılı MCL-1 inhibisyonu ile ilgili moleküler bilgiler, farklı kanser hücrelerinde yürütülen çok çeşitli çalışmalardan toplanmıştır. Bir BH3-only protein olarak NOXA'nın CLL (kronik lenfositik lösemi) hücrelerinde ve insan SCLC (küçük hücreli akciğer kanseri) hücrelerinde BCL-2 ailesinin proapoptotik üyeleri ile MCL-1'in etkileşimini önlediği gösterilmiştir (Baou ve diğ., 2010). NOXA-MCL-1 etkileşimi ile ilgili veriler doğrultusunda, doğal bir proteazom inhibitörü olan Celastrol (1 ve 2 μ M), PC-3 insan prostat kanseri hücre hattında NOXA regülasyonu ile MCL-1'in degradasyonuna neden olmuştur (Dai ve diğ., 2010). Bu çalışmanın ardından, spesifik olarak MCL-1'i hedefleyen stabilize MCL-1 BH3 heliksinin (20–40 μ M) OPM2 multipl miyelom ve Jurkat T-hücreli lösemi hücre hatlarında daha düşük hücre sağkalımına neden olduğu ve apoptoza karşı duyarlılığa yol açtığı ortaya çıkarılmıştır (Stewart ve diğ., 2010). Hidrokarbon grubu eklenmiş MCL-1 BH3 heliksleri ve MCL-1 arasındaki etkileşimi bozmayı hedefleyen yaklaşık 70000 küçük ligandın analiz edildiği bir çalışmada da MIM1 (MCL-1 inhibitör molekülü 1) MCL-1'i hedefleyen seçici küçük bir molekül olarak tanımlanmıştır (Cohen ve diğ., 2012). BH3 bölgesinin taklidine dayanan bütün bu çalışmalar, NOXA gibi BH3-only proteinlerinden elde edilen peptid türevlerinin MCL-1 inhibitörleri olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bir prosurvival BCL-2 inhibitörü olan TW37 (10 μ M), H1299 hücre hattında NOXA bağımlı MCL-1 inhibisyonu ortaya koymuştur. NB4 lösemi hücre hattında, BCL-2 ve BCL-XL'i inhibe etmek için önerilen potansiyel bir BH3 mimetiği olan gosipolün, 2.5-40 μ M uygulandığında NOXA ekspresyonunu arttırdığı ortaya koyulmuştur (Soderquist ve diğ., 2014). Genel olarak, mevcut verilere bakıldığında NOXA'nın oldukça seçici, özgün bir MCL-1 inhibitörü olarak kullanılabileceği görülmektedir. Ayrıca NOXA aracılı MCL-1 inhibisyonu, moleküler taklit temelli yaklaşımlarla yenilikçi tasarımlar için büyük bir potansiyele sahiptir.

İntrinsik MCL-1 inhibisyonunu sağlayabilen NOXA temelli yoldan bağımsız olarak MCL-1'i spesifik olarak hedefleyen çalışmalar başlangıçta miRNA'lara odaklanmıştır. Bu çalışmalarda MCL-1'i inhibe etmeyen bir BCL-2 ailesi inhibitörü olan Navitoclax'a karşı hücreleri duyarlı hale getirmek için HCT-116 kolon kanseri hücre hatlarında MCL-1'i doğrudan hedefleyen birkaç farklı miRNA tanımlanmıştır (Lam ve diğ., 2010). miR-193b'nin doğrudan MCL-1'in 3 UTR'sine bağlanarak, melanom hücre hatlarını ABT-737'ye duyarlılaştırdığı ortaya koyulmuştur (Chen ve diğ., 2011). Tüm bu çalışmalar birlikte ele alındığında, kanserde MCL-

1 aktivitesini seçici olarak hedeflemek için RNA bazlı susturma içeren bir perspektif de ortaya koyulabileceği anlaşılmaktadır.

Maritoclax (diğer adıyla marinopirol A), MCL-1'i seçici şekilde inhibe eden doğal bir üründür. Bir biyokimyasal analizde MCL-1 ile BIM arasındaki etkileşimi bloke ettiği bildirilmektedir (Doi ve diğ., 2012). Ayrıca, proteazom sistemi yoluyla MCL-1 bozulmasını indüklemektedir (Doi ve diğ., 2014).

Yüksek verimli tarama yoluyla elde edilen bir diğer seçici MCL-1 inhibitörü ise UMI-77'dir. UMI-77, MCL-1/BAX ve MCL-1/BAK'ın hücrelerde heterodimerizasyonunu durdurarak MCL-1 fonksiyonunu antagonize etmektedir. UMI-77, hücre büyümesini inhibe etmekte ve pankreas kanseri hücrelerinde apoptozu indüklemektedir. Pankreas kanseri hücre hattı BxPC-3 ksenograft fare modelinde, UMI-77, toksisite göstermeden tümörün inhibisyonunu sağlamıştır. UMI-77 ayrıca, üçlü negatif meme kanseri hücre hattı MDA-MB-468 ksenograft fare modelinde de tümörün inhibisyonunu sağlamıştır (Abulwerdi ve diğ., 2014).

A-1210477, K_i ve IC_{50} değerleri sırasıyla 0,454 ve 26,2 nM olup, oldukça güçlü ve seçici bir MCL-1 inhibitörüdür. Diğer BCL-2 ailesi üyeleri üzerinde 100 kattan fazla seçicilik sağlamaktadır (Leverson ve diğ., 2015). A-1210477, apoptozu kuvvetle indüklemekte ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında MCL-1'e bağlı hücre sağkalımını inhibe etmektedir. Dahası, A-1210477, çeşitli kanser hücrelerini öldürmede Navitoclax (ABT-263) ile sinerjik etki göstermiştir. SKBR3 meme kanseri hücrelerinde, A-1210477, MCL-1:BIM etkileşimini inhibe ederek intrinsik apoptozu indüklemiştir (Xiao ve diğ., 2015).

Stephen Fesik'in Vanderbilt Üniversitesi'ndeki grubu, pikomolar ve düşük nanomolar bağlanma afinitelerine sahip bir dizi güçlü ve seçici MCL-1 inhibitörü tanımlamıştır. Bu bileşikler MCL-1'in hidrofobik oluğuna bağlanmakta ve MCL-1'e bağımlı hücre hatlarında *in vitro* olarak hücre öldürme aktivitesi sergilemektedir (Friberg ve diğ., 2013; Pelz ve diğ., 2016; Zhao ve diğ., 2017). MCL-1'in seçici (selektif) inhibitörleri Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2: MCL-1'in seçici inhibisyonunu kullanan çalışmaların özeti.

İlaç	Hücre hattı/doku	Konsantrasyon	Referanslar
miR-101, miR-148, miR-153, miR-193a, miR518, miR-582, miR-681, miR-876-3P, miR-886-3P, miR-892b	HCT-116 kolon kanseri hücre hattı	50 nM ile transfeksiyon	(Lam ve diğ., 2010)
miR-193b	Malme-3 M, MeWo, SK-MEL-2, and SK-MEL-28 melanoma hücre hatları	5 nM ile transfeksiyon	(Chen ve diğ., 2011)
Bileşik 6	SMMC-7721 insan karaciğer kanseri hücre hattı ve MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattı	10 µM	(Zhang ve diğ., 2011)
Maritoclax	K562, Raji ve çok ilaca dirençli HL60/VCR kanser hücre hatları	1–2 µM	(Doi ve diğ., 2012)
Maritoclax	HL60 akut miyeloid lösemi hücre hattı	2 µM	(Doi ve diğ., 2014)
UMI-77	BxPC3 pankreas kanseri hücre hattı	4 µM	(Abulwerdi ve diğ., 2014)
A-1210477	NCI-H929 miyelom hücre hattı ve NHL BCL-2High hücre hatları	3–10 µM	(Levenson ve diğ., 2015)
S63845	Hematolojik kanser kaynaklı hücre hatları, <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> akut miyeloid lösemi modelleri, solid tümör türevi hücre hatları ve farelerin tümör hücrelerine karşı	10 nM-10 µM <i>in vitro</i> ve 12,5-25 mg/kg <i>in vivo</i>	(Letai, 2016)

2.3.2.1. BH3 Mimetik Peptidler

Amino asit sayısı 14'ten fazla olan BH3 peptidleri, α -sarmal bir yapıdadır. Hücre dışı deneylerde, bu peptidler antiapoptotik proteinlerin hidrofobik oluklarına bağlanarak, proapoptotik ve antiapoptotik BCL-2 ailesi proteinleri arasında oluşan kompleksleri bozar (Letai ve diğ., 2002). BH3-only proteinlerine benzer şekilde BH3 peptidleri, BAX ve BAK'ın oligomerizasyonunu, mitokondriyal membranın permeabilizasyonunu ve sitokrom c'nin salınmasını indükler (Letai ve diğ., 2002; Chen ve diğ., 2005; Kuwana ve diğ., 2005). Bu ilkenin kanıtlanması için yapılan çalışmalarına rağmen, BH3 peptidlerinin terapötik ajanlar olarak kullanımı, zayıf hücresel

geçirgenlik, biyoyararlanım, çözünürlük ve *in vivo* metabolik stabilite dahil olmak üzere olumsuz farmakolojik özellikleri ile sınırlıdır (Denicourt ve Dowdy, 2004). Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. BH3 peptidlerinin hücre içi alımı, *Drosophila antenapedia* proteininden veya insan immün yetmezlik virüsü-1 (HIV-1) TAT proteininden peptid transdüksiyon domenleri ile etiketlenerek artırılmıştır (Shangary ve Johnson, 2003). BH3 peptidlerini optimize etmek için kimyasal modifikasyonlar da kullanılabilir. Örneğin, peptidin α -sarmal konformasyonunu korumak için kimyasal bir hidrokarbon grubunun eklenmesi modifiye edilmiş bir Bid BH3 peptidinin farmakolojik özelliklerini çok geliştirmiştir; yapısal olarak daha kararlıdır, proteazlar tarafından bozunmaya karşı dirençlidir ve hücre zarlarına nüfuz etme kabiliyeti ve BCL-2 ailesi proteinlerine bağlanma afinitesi artmıştır (Walensky ve diğ., 2004). Ayrıca BAX'ı doğrudan aktive edebilir ve *in vitro* ve *in vivo* lösemi hücrelerinde apoptozu indükleyebilir (Walensky ve diğ., 2006). Bir BAK BH3 peptidinin α -sarmal konformasyonu, doğal olmayan amino asit kalıntıları kullanılarak da stabilize edilebilir (Sadowsky ve diğ., 2007). Bu yaklaşımlar genel olarak farklı BH3 peptidlerinin yanı sıra stabilite ve iletimi iyileştirmek için biyolojik olarak aktif peptidlere de uygulanabilir (Bernal ve diğ., 2007).

Stewart ve diğ. (2010) hidrofobik modifikasyonlar ile stabilize edilmiş farklı proapoptotik ve antiapoptotik BCL-2 proteinlerinden türetilen BH3 peptidlerini test etmişler ve MCL-1'den türetilen BH3 sarmalının, test edilen peptidler arasında MCL-1 için yüksek seçicilik gösteren tek peptid olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca yüksek oranda korunmuş BH3 pozisyonları ve MCL-1 proteini arasındaki spesifik etkileşimlerle bu seçiciliği açıklamışlardır. Foight ve diğ. (2014) yüksek düzeyde MCL-1'e özgü Bim bazlı BH3 peptidi tasarlamışlar ve BH3 profil oluşturma deneylerinde kullanışlı olduğunu göstermişlerdir. Hidrofobik hidrokarbon grup ekleme taraması, yüksek afinite ile MCL-1'e seçici bağlanma sağlayan hidrokarbon grup ekleme konumlarını optimize etmeye yardımcı olmuştur (Rezaei Araghi ve diğ., 2018). Bu peptid yapıların, proteaz aktivitesine direnç gösterdiği ve hücrelere penetre olabildiği gösterilmiştir. Spesifik antiapoptotik proteinlerle kompleks halinde tasarlanmış peptidlerin yapısal karakterizasyonu bu çalışmaların birçoğunda gerçekleştirilmiştir (Jenson ve diğ., 2017; Jenson ve diğ., 2018; Frappier ve diğ., 2019).

BH3 mimetik peptidler oldukça spesifik antiapoptotik protein inhibitörleri olmasına karşın, bu tür peptidlerin kullanımı, metabolik kararsızlıkları, hücresel proteazlara bağlı bozunmaları, hücre zarlarından geçişlerinin zayıf olması gibi nedenlerle sınırlıdır (Gong ve diğ., 2016).

MCL-1 inhibisyonunda sentetik peptidler, protein-protein etkileşimlerinin doğal inhibitörleri olarak muazzam bir potansiyele sahiptir. Foight ve diğ. (2014), yaptıkları çalışmada BH3 mimetik yapıların, seçici olarak MCL-1 ile etkileşime girdiğini ve fonksiyonel analizlerde antiapoptotik aktivitesini bloke ettiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada, MCL-1'e oldukça spesifik olarak bağlanan Bim BH3 mimetiği olan MS1 peptidini tanımlamışlar ve bu peptidin BCL-XL, BCL-2, BCL-W ve BFL-1 proteinlerine oranla en az 40 kat daha spesifik olduğunu göstermişlerdir (Foight ve diğ., 2014). Bununla birlikte böylesine bir spesifikliğe rağmen, modifiye edilmemiş peptidler, *in vivo* proteolize duyarlılıkları ve hücrelere girme kapasitelerinin sınırlı olması nedeniyle zayıf terapötik adaylardır. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için, çeşitli çalışmalarda peptidler kimyasal olarak modifiye edilmiştir. Örneğin, stabilize etmek için hidrokarbonların ilave edildiği BH3 mimetik peptidlerin (SAHB) insan lösemi ksenograftlarında *in vivo* çoğalmayı inhibe ettiği gösterilmiştir (Del Gaizo Moore ve Letai, 2013). Ancak, Barile ve diğ. (2017), hidrokarbon ekleyerek modifiye ettikleri BH3 mimetik peptidlerde çözünürlüğün azaldığını ve bunların hücre denemelerinde kullanılamadığını rapor etmişlerdir (Barile ve diğ., 2017). Ayrıca, Okamoto ve diğ. (2012) yaptıkları çalışmada, modifiye edilen peptidlerin hedef afinitelerinin ve çözünürlüğünün azaldığını göstermişlerdir (Okamoto ve diğ., 2013).

2.3.3. MCL-1 İnhibitörleri ve İlaç Kombinasyonları

Anormal MCL-1 ekspresyonu hemen hemen her tümör tipinde antikanser ilaç direnciyle ilişkilendirilmiştir. MCL-1 aracılı ilaç direncinin üstesinden gelmek, MCL-1 inhibitörlerinin diğer antikanser ilaçlarla kombinasyon halinde uygulanmalarını gerektirmektedir (Tablo 2.3). ABT-199'e dirençli akut miyelom lenfoma hücre hattında, ABT-199 ile birlikte MCL-1 seçici inhibitörü A-1210477'nin kullanılması, bu hücrelerde apoptotozu indüklemiştir (Brinkmann ve diğ., 2017). A-1210477 (Lian ve diğ., 2018), UMI-77 (Wei ve diğ., 2015), AMG176 (Caenepel ve diğ., 2018) ve S63845 (Kotschy ve diğ., 2016) diğer antikanser ilaçlarla sinerjetik etki göstermiştir.

Tablo 2.3: MCL-1 inhibitörleri ve ilaç kombinasyonları.

MCL-1 inhibitörü	İlaç/Tedavi	Model Sistem	Amaç	Referans
Maritoklaks	ABT-737	Hematolojik kanser hücre hatları	İlaça direncin üstesinden gelmek	(Doi ve diğ., 2012)
A-1210477	ABT-199	Akut miyeloid lösemi hücreleri	İlaça direncin üstesinden gelmek	(Luedtke ve diğ., 2017)
A-1210477	ABT-263	Rahim ağzı kanseri hücre hatları	Sinerjistik etki	(Lian ve diğ., 2018)
UMI-77	Işınlama	BxPC-3 ve Panc-1 hücreleri	Sinerjistik etki	(Wei ve diğ., 2015)
AMG176	Seçici BCL-2 inhibitörleri, MAPK yolu inhibitörleri, proteazom inhibitörleri	Hücre bazlı analiz	Sinerjistik etki	(Caenepeel ve diğ., 2018)
S63845	Docetaxel, lapatinib, trastuzumab	Üçlü negatif ve HER2 ile güçlendirilmiş meme kanseri hücre hatları ve PDX fare modeli	Sinerjistik etki	(Kotschy ve diğ., 2016)
AZD5991	Standart bakım kemoterapötik ajanlar	Fare modelli	Sinerjistik etki	(Tron ve diğ., 2018)

2.3.4. Seçici MCL-1 İnhibitörleri ile Klinik Çalışmalar

Son zamanlarda klinik araştırmalarda üç yeni ve seçici MCL-1 inhibitörü araştırılmaya başlanmıştır. MCL-1'in BH3 bağlama oluğunu hedef alan seçici inhibitörlerden biri olan AMG176, BAK ve MCL-1 arasındaki etkileşimi bozarak intrinsik apoptotik yolağı aktive etmektedir. Farelerde yapılan çalışmalarda 20-60 mg/kg aralığındaki dozlar, tümör büyümesinin önlenmesi ve gerilemesiyle sonuçlanmıştır. Bu araştırmacılar AMG176'nın yapısal bir homoloğu olan A bileşiğini kullanarak, MCL-1 multipl miyelom ve AML hücre hatlarında MCL-1'e bağlı hızlı apoptotik indüksiyon ve azalmış hücre sağkalımını göstermişlerdir. AMG176 nüks veya refrakter multipl miyelom (NCT02675452) için klinik araştırma altındadır. Bir başka seçici MCL-1 inhibitörü AZD5991'in, düşük nanomolar aralıkta MCL-1'e bağımlı hücre hatlarında etkili bir apoptotik tepkiye neden olduğu gösterilmiştir. AZD5991 MCL-1 ve BAK etkileşimini spesifik olarak hedeflemektedir ve *in vivo* koşullarda yüksek aktivite göstermiştir. Ksenograft modellerde yüksek tümör gerilemesi gözlenmiştir. AZD5991 birincil tümör numunelerine uygulanan *ex vivo* çalışmalarda, klinik çalışmalar için yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Bu doğrultuda nüks veya refrakter hematolojik maligniteler için klinik araştırma altındadır (NCT03218683). Diğer seçici MCL-1 inhibitörü MIK665 (S64315) ise refrakter veya relaps lenfomalı veya multipl miyelomlu hastalarda ve

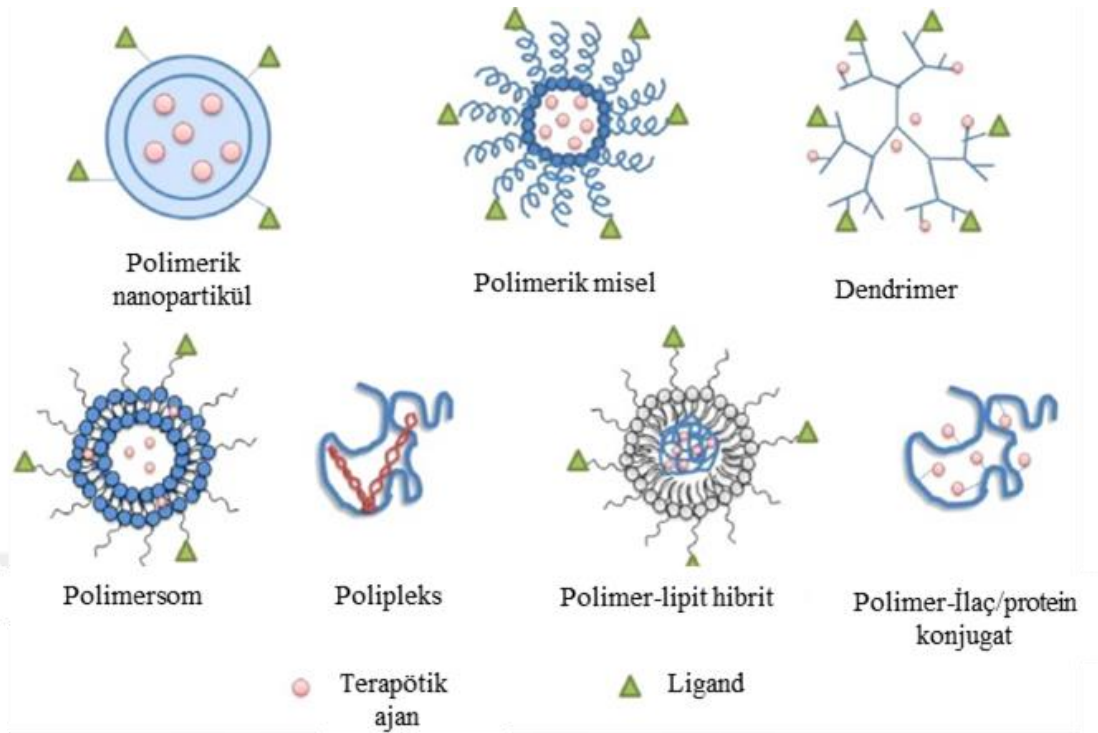
AML veya miyelodisplastik sendromlu hastalarda (NCT02979366, NCT02992483) araştırılmaktadır (Timucin ve diğ., 2019).

2.4. KANSERDE POLİMERİK NANOPARTİKÜLER SİSTEMLER

Kanser, kontrolsüz büyümesi ve anormal hücrelerin yayılması ile karakterize bir hastalıktır. Kemoterapi, hastalığın tedavisi için büyük bir strateji oluşturmaktadır. Konvansiyonel kemoterapi ilacı kanserli hücrelere hedeflemede spesifik değildir ve normal sağlıklı hücrelerin ilacın istenmeyen etkilerine karşı savunmasız kalmasına neden olmaktadır. Bu, ilacın izin verilen maksimum dozunu önemli ölçüde engellemektedir. Ayrıca, hızlı eliminasyon ve hedeflenen organlara ve dokulara spesifik dağılım, yüksek dozda ilaç verilmesini gerektirmektedir. Bu durum ekonomik değildir ve çoğu zaman istenmeyen toksisite sorunlarına yol açmaktadır. Nanopartiküller, sağlıklı hücreleri korurken, tercihen büyük dozlarda kemoterapötik ajanları veya terapötik genleri, malignant hücrelere hedefleyebilen özel ilaç salım vektörleridir (Haley ve Frenkel, 2008). Kanser terapötikleri için hali hazırda çok sayıda nanopartikül sistemi kullanılmaktadır. Şu anda kanser terapötik uygulamaları için araştırılan nanopartikül türleri, dendrimerler, lipozomlar, polimerik nanopartiküller, miseller, protein, lipid, seramik, viral, metalik nanopartiküller ve karbon nanotüpler olarak sıralanabilmektedir (Byrne ve diğ., 2008).

Uygun tasarıma sahip nanopartiküller, kanserde etkili bir tedavi için antikanser ajanların etkinliğini artırmada ve hedefli salımlarını gerçekleştirmek için muazzam bir potansiyele sahiptir. Biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, fizyolojik koşullarda parçalandıkları için özellikle ilgi çekicidirler; bu makromolekülün potansiyel toksisitesini azaltır ve ilacın salımını kolaylaştırır (Gupta ve diğ., 2016).

Biyobozunur polimerik nanopartiküller, katı nanopartiküller, core-shell (çekirdek-kabuk) yapıları, polimerik miseller ve polipleksler gibi çeşitli formülasyonlar halinde tasarlanabilir (Şekil 2.7). Tercih edilen nanopartikül formülasyonu ve sentez yöntemi, seçilen polimerin ve etken maddenin özelliklerine bağlıdır. Ancak polimerik nanopartiküller, genellikle kendiliğinden-kurulan veya emülsiyon yoluyla oluşturulur. Kendi kendine kurulma yöntemlerinde, spontan misel oluşumunun yanı sıra katyonik polimerlerin, polipleksleri oluşturmak üzere anyonik nükleik asitlerle kompleks oluşturması gibi polimer ile etken madde arasında moleküller arası ve molekül içi etkileşimler oluşur (Mccall ve Sirianni, 2013).

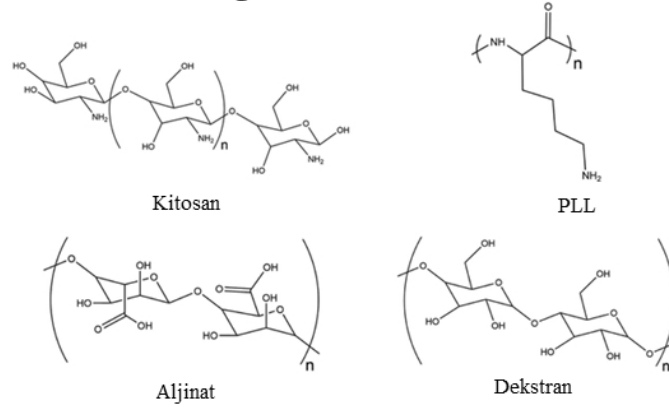


Şekil 2.7: Polimerik nanopartikül tiplerinin şematik gösterimi (Prabhu ve diğ., 2015). (Mavi renk, polimerik yapıyı temsil eder.).

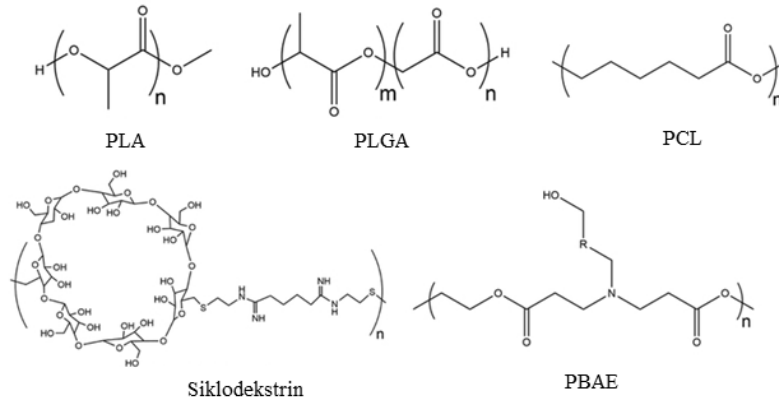
2.4.1. Doğal Polimerler

Doğal olarak elde edilen polisakarit ve protein bazlı polimerler (Şekil 2.8), çeşitli gıda, kozmetik ve tıbbi uygulamalar için uzun bir süre önce onay almıştır. Vücutta kolayca metabolize olan peptidlere veya polisakaritlere enzimatik bozunma ile parçalandıkları için mükemmel biyoyoumluluk sergilerler ve bu bozunma hızı istenen bir salım profili için ayarlanabilir. Bununla birlikte, bu polimerler her üretim partisinde değişkenlik gösterir, genellikle nano taşıyıcıların daha etkili olması için kimyasal modifikasyon gerektirir ve immünojeniteyi önlemek için çok iyi saflaştırılmaları gerekir (Dang ve Leong, 2006).

Doğal Polimerler



Sentetik Polimerler



Şekil 2.8: Antikanser ilaçların salımı için kullanılan doğal ve sentetik polimerlerin kimyasal yapıları. PLL=poli (L-lisin), PLA=polilaktid, PLGA=poli (laktid-ko-glikolid), PCL= poli (ϵ -kaprolakton), PBAE=poli (β -amino-amino ester) (Karlsson ve diğ., 2018).

2.4.1.1. Kitosan

Böceklerin ve kabukluların dış iskeletinde bulunan bir doğal biyopolimer olan kitinden elde edilen yarısentetik bir polisakarittir. Kitosan, kitinin deasetilasyonu ile sentezlenir, bu işlem farklı deasetilasyon derecesine sahip serbest primer amin gruplarını içeren kitosan molekülünü oluşturur ve seyreltik asidik çözeltilerde kitosan molekülünün katyonik hale gelmesini sağlar (Rampino ve diğ., 2013). Bu nedenle kitosan negatif yüklü bileşikler ve makromoleküller ile elektrostatik olarak etkileşime girer ve bunlarla polipeks denilen kompleks yapıları oluşturur. Kitosanın pozitif yükü, hücre alımını ve negatif yüklü mukozal yüzeylere yapışmayı artırarak oral ilaç salımı için uygun olmasını sağlar (Hong ve diğ., 2017). Değişen moleküler ağırlık, deasetilasyon derecesi ve kimyasal modifikasyonlarla bozunma hızı ayarlanabilir ve biyomedikal uygulamalar için optimize edilebilir (Kean ve Thanou, 2010).

2.4.1.2. Dekstran

Glikosidik bağlarla birleştirilen basit tekrarlı α -d-glikoz ünitelerinden oluşan dallanmış bir polisakarittir. Dekstran hidrofilik ve suda çözünür ancak bir hidrofobik polisakarit (AcDex) oluşturmak için asetillenebilir. İlaç salımı için, tipik olarak bir hidrojel veya kaplama oluşturmak üzere çapraz bağlayıcılarla reaksiyona girebilir. Ayrıca, dekstran, hidrofobik ilaçların yüklenebildiği amfifilik miseller oluşturmak için blok kopolimer olarak poli(etilen glikol) (PEG), poli (ϵ -kaprolakton) (PCL) veya poli(laktik asit) (PLA) gibi bir hidrofilik polimerle de bağlanabilir (Fonte ve diğ., 2015; Breitenbach ve diğ., 2017).

2.4.1.3. Aljinat

Alglerden saflaştırılmış ucuz, doğal kökenli bir hidrofobik polimerdir. β -1,4-bağlı-mannuronik asit ve α - (1-4) bağli guluronik asit altbirimlerinden oluşur. Aljinatlar anyoniktir ve kalsiyum gibi iki değerli katyonlar ile çapraz bağlanarak jel yapılar oluşturabilir. Omurgadaki hidroksil ve karboksil grupları nedeniyle kolayca modifiye edilebilir, böylece kimyasal ve biyolojik özellikleri ayarlanabilir. Aljinat, biyolojik olarak uyumludur, immünojenik değildir ve gıda katkılarından yara sargılarına kadar çeşitli FDA onaylı ürünlerde kullanılır (Jain ve Bar-Shalom, 2014).

2.4.1.4. Jelatin

Hayvan kollajeninin kısmi hidrolizinden türetilen peptid ve proteinlerin bir karışımıdır. Biyouyumludur, immünojenik değildir, gıda ve kozmetik ürünlerinde yaygın olarak kullanılır. Bu nedenle, jelatin nanopartiküller hem nükleik asit hem de küçük moleküllü ilaçların kanser terapide ilaç salımında kullanım açısından araştırılmıştır. Doğal jelatin, ilaç salım uygulamaları için kimyasal olarak modifiye edilmektedir. Karboksil ve hidroksil grupları, gen taşımada bağlanma afinitesini arttırmak ve redoksa duyarlı jelatin bazlı malzemeler oluşturmak için tiyol gruplarının eklenmesi gibi çeşitli modifikasyonlara imkan sağlar. Ayrıca, jelatinin molekül ağırlığı ve çapraz bağ yoğunluğu, ilaç salımını kontrol etmek için değiştirilebilir (Santoro ve diğ., 2014).

2.4.1.5. Poli (L-lisin) (PLL)

Doğal enzimatik bozunabilirlik için L stereokimyasına sahip katyonik bir amino asit olan lizinin polimerize edilmiş şeklidir. Polimerin yüksek pozitif yük yoğunluğu, PLL'nin negatif yüklü moleküllere bağlanma kapasitesinin yüksek olmasına imkan sağlar. Ayrıca, pozitif yükü

partikül alımını arttırır, dolayısıyla PLL genellikle core-shell nanopartiküller üzerinde bir kaplama olarak kullanılır. PLL doğrusal ve dendritik formlarda sentezlenebilir, dendritik PLL yüksek tamponlama kabiliyeti ve nükleik asit salımı sergiler (Yamagata ve diğ., 2007).

2.4.2. Sentetik Polimerler

Sentetik polimerler, belirli taşıyıcı sistemler (kargolar), salım yolları ve hastalık hedefleri için optimize edilmiş yük, hidrofobiklik ve bozunma profili gibi istenen özelliklere göre tasarlanır. Sentez üretimden üretime değişkenlik göstermez ve büyük ölçekli üretim mümkündür. Bununla birlikte, istenmeyen bozunma ürünleri veya metabolitler, sentetik polimerlerin sitotoksik veya immünojenik olmasına neden olabilir (Karlsson ve diğ., 2018).

2.4.2.1. Poli(laktik asit) (PLA)

Hidroksi karboksilik asit yapıdaki ve optik olarak L- ve D- formunda bulunan laktik asidin kondenzasyon polimeridir. Polimerdeki yapı ester yapı olup laktit bağlarını içerdiğinden polilaktit yapıdaki bir polimerdir. İlaç salım sistemleri için poli (L-laktit) (PLLA) çok yavaş bir bozulmaya sahiptir. Bu nedenle poli (DL-laktit) (PDLLA) daha hızlı bozunma hızı nedeniyle tercih edilen adaydır. PLA, molekülünde içerdiği ester bağlarının hidrolize hassas olması nedeniyle kolayca hidrolitik bozunmaya uğrar ve partikül halindeki taşıyıcı sistem olarak kullanıldığında etken madde molekülünü kolayca serbest bırakır (Acharya ve Sahoo, 2011).

2.4.2.2. Poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA)

PLGA laktik asidin (LA) glikolik asit (GA) ile belirli oranlardaki polikondenzasyonu ile oluşmuş poli(laktik asit-ko-glikolik asit) yapısında biyobozunur /biyoyumlu FDA onaylı bir kopolimerdir. Moleküler yapısında PLA'deki gibi ester bağlarının hâkim olduğu laktit ve glikolit yapılar bulunmaktadır. PLGA, yüksek stabilitesi, düşük toksisitesi, LA ve GA monomerlerinin oranlarını değiştirerek kolayca ayarlanabilen bozunma hızı nedeniyle çok yönlü bir ilaç salım kopolimeridir. PLGA nanopartikülleri tipik olarak emülsiyon yöntemleri ile sentezlenir (Hasan ve diğ., 2012). PLGA nanopartikülleri, nöronal/serebral bozukluklar, kanser tedavisi, anti-inflamatuar, kardiyovasküler veya bağışıklık tedavisi gibi geniş bir aralıkta biyoaktif moleküllerin (farklı ilaçlar proteinler, aşılar, nükleik asitler) kapsüllenmesi gibi çeşitli uygulamalar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu nanopartiküller, en iyi uygulama yolunu seçme imkanı sunan sistemik (parenteral), oral ve inhalasyon (pulmoner) uygulamalar için formüle edilebilir. PLGA esaslı nanopartiküllerin ilaç salım uygulamalarındaki

ilerlemeleri, literatürde sunulan sayısız araştırma çalışmasının yanı sıra klinik araştırma altında bulunan veya hali hazırda farmasötik teknolojilerde sunulan çok sayıda mikro/nanoformülasyonda kullanılmaktadır ve bu sistemler FDA tarafından da onaylanmaktadır (Maghrebi ve diğ., 2019).

2.4.2.3. Poli (ϵ -kaprolakton) (PCL)

Yüksek ilaç bağlama kapasitesine sahip hidrofobik, yarı-kristalin biyobozunur bir polimerdir. PCL, biyolojik bir sıvı içinde yüksek koloidal stabilite, endositoz ile kolay hücre alım, *in vitro* ve *in vivo* düşük toksisite ve kontrollü ilaç salımı sergiler. Bu nedenle, bu polimer doku iskelelerinde, biyomedikal cihazlarda ve implante edilebilir ilaç salım sistemlerinde kullanılmıştır. PCL, bozulma oranını hızlandırmak için sıklıkla diğer biyobozunur polimerlerle harmanlanır. Kanserde, PEG-PCL blok kopolimerleri miseller oluşturmak için kullanılmıştır (Grossen ve diğ., 2017).

2.4.2.4. Siklodekstrinler (CD'ler)

Amfifilik bir yapıya sahip 6-8 glikoz biriminden oluşan suda çözünür sentetik karbonhidratlardır. CD'ler, hidrofilik bir dış ve hidrofobik iç kısmı olan bir nanopartikül oluşturur. CD'ler, DNA ile stabil kompleksler oluşturur ve düşük sitotoksisite ile yüksek transfeksiyon etkinliğine sahiptir (Davis ve diğ., 2004).

2.4.2.5. Poli (β -amino ester) (PBAE)

Poli (β -amino ester) (PBAE veya PAE olarak kısaltılır), polikondenzasyonla Michael katılma reaksiyonu mekanizması kullanılarak genellikle bir diakrilat ve bir diamin monomerlerini kullanılarak sentezlenen amino ester yapıdaki bir polimerdir. Yapı taşlarının çok yönlülüğü, çeşitli fizikokimyasal ve mekanik özelliklere sahip bir polimer kütüphanesi oluşumunu sağlar. Tek başına veya diğer malzemelerle birlikte kullanıldığında, PBAE'ler ilaç salımında (örneğin, gen, antikanser ilaçları ve antimikrobiyallerin verilmesi gibi) ve doğal komplekslerin taklitleri halinde (nanoşaperonlar) çeşitli gereksinimleri karşılamak için farklı formülasyonlar halinde üretilir (Liu ve diğ., 2019). Hidrolitik olarak bozunabilir ester bağları PBAE'lere mükemmel biyobozunurluk sağlar (Eltoukhy ve diğ., 2012). Sentezde kullanılan monomerlerin oranlarına ve moleküler yapılarına bağlı olarak, PBAE molekülü primer (birincil), sekonder (ikincil) ve tersiyer (üçüncül) olmak üzere farklı yapılardaki amin gruplarını içeren polimer zincirlerinden oluşabilirler. Bu amin yapılar polimer zincirlerinde ana zincirde olabildiği gibi pendant gruplarda (yan dal) veya uç gruplarda da olabilirler. Aminoester bağlarının hakim olduğu ana

polimer zincirleri dolayısıyla da hidrolitik bozunmaya hassastırlar. Bu ise PBAE molekülünü salım sistemi olarak çok yönlü ve tercih edilebilir kılar. Bu sayede PBAE molekülü negatif yüklü gen ve terapötiklerle elektrostatik olarak etkileşime girerek kompleksleri oluştururlar (Zhang ve diğ., 2016). PBA'lerin bu özellikleri, aynı zamanda endositoz, endozomal kaçış ve verimli hücre içi gen/etken madde salımını kolaylaştırır (Guerrero-Cazares ve diğ., 2014). Bunlara ilaveten, PBAE'ler çok çeşitli polimerlerle blok kopolimerler oluşturmak için de uyumludur. Örneğin PEG, (Xia ve diğ., 2011) PLA, (Zhang ve diğ., 2012) ve PCL (Liu ve diğ., 2016).

2.5. POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİ HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ

Nanopartiküllerin hücrelere alınması genellikle esas olarak boyutlarına ve yüzey özelliklerine bağlı olan endositotik süreçleri içerir (Bae ve diğ., 2012). Bu özellikler nanopartikül hazırlama yöntemi ile ayarlanabilir (Reis ve diğ., 2006). Organik fazın hazırlama yöntemine ve bileşimine bağlı olarak nanokapsüller veya nanoküreler elde edilebilir (Crucho, 2015). Bir nanokapsül şeklindeki partikül, aktif bileşiklerin bir polimer kabuğu ile sınırlandırıldığı ve çevrelendiği sulu veya yağlı bir boşluğa sahip çekirdek-kabuk (core-shell) morfolojisine sahiptir. Nanoküreler, aktif bileşiklerin ve polimerin eşit olarak dağıldığı matris benzeri bir yapıya sahiptir. Polimerik nanopartiküller, uygulama gereksinimlerine ve ilacın fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak çeşitli yöntemlerle sentezlenebilmektedir. En uygun yöntemin seçimi, belirli bir uygulama için istenen özelliklere sahip polimerik nanopartiküllerin elde edilmesi için önemli bir rol oynar. Birkaç hazırlama yöntemi geliştirilmiştir ve bunlar, monomerlerin doğrudan klasik polimerizasyonuna dayanan ve önceden oluşturulmuş polimerlerden yararlananlar olmak üzere iki gruba ayrılabilir (Crucho ve Barros, 2017). Önceden hazırlanmış olan polimerlerden nanopartikül hazırlama yöntemleri polimerin kararlı dispersiyonunun oluşturulması esasına dayanan başlıca çözücü buharlaştırma, tuz ilavesiyle çöktürme, nanoçöktürme, diyaliz ve süperakışkan teknolojisi, monomerlerin polimerizasyonu ile doğrudan nanopartikül eldesi ise emülsiyon polimerizasyonu (konvensiyonel ve yüzeyaktif madde olmadan), miniemülsiyon, mikroemülsiyon, yüzeylerarası polimerizasyon ve kontrollü/yaşayan radikalik polimerizasyon teknikleridir.

Monomerlerin polimerizasyonuna dayanan yöntemlerde farmasötik olarak kabul edilebilir bir ürün elde etmek için kapsamlı saflaştırma çalışmaları gerektiren monomerler ve başlatıcılar gibi

toksik kalıntılar olabilmektedir. Bu yöntemde, diğer bir zorluk ise polimerizasyon sırasında proteinlerin veya peptidlerin eklenmesini önleyen polimerizasyonu tetiklemek için serbest radikal polimerizasyonu veya UV ışığının gerekliliğidir (Lockman ve diğ., 2002). Polimerizasyon tekniklerinin sınırlamaları göz önüne alındığında, önceden oluşturulmuş polimerleri içeren yöntemler bu sorunların birçoğundan kaçınılmasını sağlamaktadır. Önceden oluşturulmuş polimerlerden nanopartikül sentezini içeren yöntemler aşağıda detaylarıyla anlatılmıştır.

2.5.1. Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Bu teknik önceden hazırlanmış polimerlerin dispersiyonu şeklinde nanopartikül oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde uçucu bir çözücü kullanılarak polimer çözeltisi hazırlanır ve bir emülsiyonun oluşumu sağlanır. Bilindiği üzere, bir emülsiyon, genellikle iki veya daha fazla birbiriyle karışmayan sıvının yüzey aktif maddeler veya emülgatörler adı verilen bileşiklerin az miktarlarda kullanılmasıyla kararlı bir süspansiyon oluşumu şeklinde dağılımının sağlandığı bir sistemdir. Takiben emülsiyon, içerdiği devamlı faz içinde difüzlenebilen çözücünün buharlaşması ile bir nanopartikül süspansiyonuna dönüştürülür. Dolayısıyla nanopartikül oluşumunda bir emülsiyonun oluşumu ile hem çözücü buharlaşması hem de çözücü difüzyonu meydana gelmektedir. Emülsiyondaki su fazı stabilize edicileri (yüzey aktif maddeler, emülgatörler vb. katkı maddeleri) içerirken yağ fazı denilen faz ise uygun bir organik çözücüde çözülmüş olan polimer çözeltisidir.

Klasik uygulamalarda emülsiyonun oluşumu için iki temel proseslendirme kullanılır. Birincisi tekli-emülsiyon olup su (w) içinde yağ (o) (o/w) veya yağ içinde su (w/o), diğeri ise ikili-emülsiyon olup su içinde yağ içindeki su emülsiyonu (w/o)/w şeklinde tanımlanmaktadır. Bu tekniklerde uygulamalarda genelde yüksek hızda homogenizasyon veya ultrasonikasyon takiben oda sıcaklığında devamlı manyetik karıştırma suretiyle veya düşük basınçta çözücü buharlaştırma işlemleri kullanılır. Takiben oluşan katı nanopartiküller ultrasantrifüjleme ve yüzey aktif maddeler varsa diğer emülsiyon oluşturucu katkı maddelerini uzaklaştırmak için destile su ile yıkama ile toplanabilir. Son olarak da ürün liyofilize edilir (Parasad ve diğ., 2011).

2.5.2. Nanoçöktürme Yöntemi

Polimer çözeltisi çözücü olmayan faza ilave edildiğinde polimer içeren çözücünün karışan faza difüze olmasıyla polimerin çökmesi (nanoçöktürme) gerçekleşmektedir.

Çözücü (solvent) yerdeğiştirme yöntemi olarak da adlandırılan nanoçöktürme yönteminin temel prensibi su ile karışabilen bir yarıpolar çözücünün lipofilik bir çözeltiden yer değiştirmesinden sonra polimerin yüzeylerarası birikmesi esasına dayanmaktadır. Çözücünün çözücü olmayan (nonsolvent) faza hızla difüzyonu iki faz arasındaki yüzeylerarası gerilimin azalmasına neden olur. Bu durum ise yüzey alanını arttırarak organik çözücünün küçük damlalar haline gelmesine yol açar. Bu oluşumun esası da çözücü ve çözücü olmayanın ara yüzeyinde meydana gelen başlıca akış, difüzyon ve yüzey gerilim değişmelerinden ileri gelen arayüzde karışıklıkların (türbülansların) ortaya çıkmasına neden olan “Marangoni etki” adı verilen bir prensibe dayanmaktadır. Nanoçöktürme yönteminde nanopartiküller polimer çözeltisinin çözücü olmayanı ılımlı bir karıştırma uygulanarak ilave edildiğinde çökerek koloidal süspansiyon halinde elde edilirler. Başka bir deyişle polimer içeren çözücünün karışan faza difüzlenmesiyle polimerin nanoboyutlarda çökmesinin sağlandığı bir işlemdir. Dispersiyon ortamında ilacın da bulunması durumunda ise, polimer içeren çözücünün dispersiyon ortamına difüze olması durumunda polimerik nanopartiküller ilacı da içerek şekilde oluşurlar (Mora-Huertas ve diğ., 2011). Bir nanoçöktürme sistemi üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bunlar ise sentetik yarısentetik veya doğal polimer, polimeri çözen bir çözücü ve polimer için çözücü olmayan bir çözücüdür. Polimeri çözen bir organik çözücü olarak seçilen su ile karışabilir olan ve buharlaştırma ile kolaylıkla uzaklaştırılabilen etanol, aseton, heksan, metilen klorür veya dioksan olabilir (Chang ve diğ., 2009). Çözünürlük, çözünmezlik ve karışabilirlik koşulları sağlandığı sürece iki organik faz veya iki sulu faz kullanmak da mümkündür (Mora-Huertas ve diğ., 2011). Genellikle, yüzey aktif maddeler, koloidal süspansiyonun stabilitesini sağlamak için eklenebilirler, bilhassa uzun süreli depolime koşullarında aglomerasyonu önlemek için bilhassa iyonize olmayan tipte (noniyonik) yüzey aktif maddeler kullanılabilir, ancak nanopartiküllerin oluşumunu sağlamak için bunların varlığı gerekli değildir. Elde edilen nanoparçacıklar tipik olarak, iyi tanımlanmış bir boyut ve dar boyut dağılımı ile karakterize edilir; bu, emülsifikasyon çözücü buharlaştırması ile üretilenlerden daha iyi bir prosedürdür. Bileşenlerin moleküler yapısını ve konsantrasyonunu, organik faz/sulu faz oranını, organik faz enjeksiyon hızını, akışkan dinamiğini ve karıştırma hızını dikkatle ayarlayarak polimerik nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerini kontrol etmek mümkündür. Örneğin, polimer konsantrasyonunun veya polimer molekül ağırlığının arttırılması genellikle parçacık boyutunda bir artış ile sonuçlanır. Bu bulgular, çözücü difüzyonunu engelleyen ve daha büyük nanodamlacıklarla sonuçlanan daha yüksek bir organik faz viskozitesi ile açıklanmaktadır.

2.5.3. Diyaliz Yöntemi

Dar boyut dağılımına sahip küçük polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında başarıyla uygulanmıştır (Jeon ve diğ., 2000). Daha önce nanoçöktürme tekniği için tarif edilen, ancak biraz farklı bir deney düzeneği ile benzer bir mekanizma ile üretim yapılmaktadır. Bu yöntemde, diyaliz membranları polimer için fiziksel bir bariyer olarak kullanılır. Genel olarak polimer, organik bir çözücü içerisinde çözündürülür, diyaliz membranının içine yerleştirilir ve çözücü olmayan bir maddeye karşı diyaliz edilir (Crucho ve Barros, 2017). Temel önkoşullar, çözücülerin karıştırılabilirliği ve seyreltik polimer çözeltilerinin varlığıdır. Çözücünün membran içinde yer değiştirmesi, karışımın giderek polimeri çözündürmesine neden olur. Ek olarak, arayüzey geriliminde bir artış polimer birikmesine yol açar ve nanoparçacıkların kolloidal bir süspansiyonunun oluşmasına yol açar. Elde edilen polimerik nanopartiküllerin morfolojisi ve partikül boyutu dağılımı, çözücü/çözücü olmayan çift, diyaliz membranın geçirgenliği, prosedürün gerçekleştirildiği sıcaklık, polimer konsantrasyonu ve çözücü karıştırma hızı gibi çeşitli deneysel parametrelerle ayarlanabilir (Chronopoulou ve diğ., 2009).

2.5.4. Süperkritik Akışkan Teknolojisi

Önceki bölümlerde açıklanan yöntemler, çevre ve fizyolojik sistemler için tehlikeli olan organik çözücülerin ve yüzey aktif maddelerin kullanılmasını gerektirir. Öte yandan, ilaç yüklü polimerik nanopartiküllerde artık çözücü safsızlıkları kalırsa, bunlar toksik hale gelir ve ilacı polimer matrisi içinde bozabilir (Soppimath ve diğ., 2001). Nanotıp için kolayca ölçeklendirilebilen çok yönlü ve hassas üretim yöntemleri geliştirmek için çeşitli zorluklar vardır. Bu engellerin üstesinden gelmek için araştırma çabaları polimerik nanopartiküllerin üretimi için çevreye duyarlı yöntemler geliştirmeye yönelik olmuştur. Bu amaçla, çevre dostu teknolojinin kullanımı, kolay ve tekrarlanabilir ölçeklendirme, yapısal homojenliğin kontrolü ve yüksek saflıkta nanoilaçlar üretimi için süperkritik sıvılar (SCF) çekici bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Elizondo ve diğ., 2012). Bir SCF, kritik sıcaklık (T_c) ve kritik basınç (P_c) şartlarında sıkıştırılmış ve ısıtılmış bir sıvıdır. Bu gibi durumlarda, fizikokimyasal özellikleri bir gaz ve bir sıvı arasındadır. Bu, sıvının bir gaz gibi davrandığı ve aynı zamanda bir sıvının çözücü özelliklerine sahip olduğu yeni bir durumdur. Süperkritik karbon dioksit ($scCO_2$) en yaygın kullanılanıdır. SCF hafif kritik koşullara sahip olduğu için bol, ucuz, yanıcı olmayan, toksik olmayan ve çevresel olarak iyi huyludur. SCF teknolojisi, farmasötik araştırmalarda büyük ilgi görmüştür. Süperkritik akışkan teknolojinin uygulanması, yüksek basınçlı ekipman

için yüksek bir yatırım gerektirir. Ek olarak, bir dizi süperkritik akışkanın mevcudiyetine rağmen, çoğu polimer süperkritik akışkanlarda zayıf çözünürlük ve hatta çözünmezlik gösterir ve bu teknolojinin temel dezavantajıdır (Crucho ve Barros, 2017).

2.5.5. Tuz İlavesiyle/Tuzla Çöktürme Yöntemi

Bu yöntemde emülsiyon oluşturma işleminin modifiye edilmiş şeklidir. Daha çok ilaç yüklü nanokürecik şeklindeki polimer taşıyıcıların eldesi için kullanılır. Yöntemin esası su ile karışabilen çözücünün tuzla çöktürme ajanı vasıtasıyla sulu çözeltiden arılmasına dayanır. Genellikle aseton bu özelliklere sahip olduğu için çözücü olarak tercih edilir. Tuz olarak da magnezyum klorür tek başına veya asetat tuzu ile hazırlanan elektrolitler kullanılır. Polimer ve ilaç asetonunda çözülür ve bu çözelti koloidal stabilize edici ve tuz içeren elektrolit içerisine kuvvetli bir karıştırma ile ilave edilerek emülsiyon edilir. Oluşan o/w emülsiyonu yeterli miktarda su ilavesiyle asetonun sulu faza difüzyonu sağlanarak nanoküreciklerin oluşumu sağlanır. Bu yöntem ilaveten çözücü ve tuzun ayrılması için filtrasyon gerektirir, bunu dışında lipofilik ilaçlar için uygun olmadığı için kullanımını sınırlamaktadır. Yukarıda bahsedilen yöntemlerden başka iyonik jelasyon, püskürtürerek kurutma ve koaservasyon yöntemleri de uygun polimerler durumunda tercih edilen yöntemlerdir.

2.6. NANOPARTİKÜLLERİN HEDEFLENDİRİLMESİ

Polimerik nanopartiküllerde terapötik madde, nanopartikül yüzeyine konjuge edilir veya kapsüllenir ve polimerik çekirdeğin içinde korunur. Polimerik nanopartiküller, katı, misel, konjugat, dendirik, polipleks ve polimer-lipit hibrit sistemi gibi farklı yapılarda ve fizikokimyasal özellikler ile karakterize edilir. Nanopartiküller kan dolaşımında uzun süre kalmayı, spesifik olmayan dağılımın azaltılması ve hedefleme ligandına (peptid, aptamer, antikor/antikor fragmanı, küçük molekül) sahip dokuların hedeflenebilmesini sağlayabilir (Alexis ve diğ., 2008).

Canlı vücudunda organlara, dokulara veya hücrelere olmak üzere spesifik bölgelere, seçici olarak ilaç salımının sağlanması işlemi “ilaç hedefleme” olarak tanımlanmaktadır. Bu ise uygun olarak tasarlanmış nanopartikül ilaç taşıyıcı veya salım sistemi denilen formülasyonlarla başarılmaktadır. Polimer esaslı nanopartikül formülasyonlar ise bu amaçla etkin ve başarılı olarak kullanılan taşıyıcı sistemlerdir.

Hedeflendirme pasif hedefleme ve aktif hedefleme olarak başlıca iki temel mekanizmaya göre olmaktadır. Örneğin antikanser bir ilacın hedef dokuya verilmesi de bu hedefleme yöntemlerinden birisi ile olabilmektedir. Nanopartiküller tarafından temel olarak iki yolla gerçekleştirilebilir.

2.6.1. Pasif Hedefleme

Bu hedefleme yaklaşımı geçirgen damar sistemi, pH, sıcaklık ve yüzey yükü gibi patofizyolojik koşulları kullanır. Pasif hedefleme uygun boyut ve yüzey karakteristiklerine sahip nanopartiküllerin tümör damarlarının karakteristikleri nedeniyle tümör dokusunda seçimli bir şekilde toplanması sayesinde olmaktadır.

2.6.1.1. Arttırılmış Geçiş ve Alıkonma Etkisi (EPR) (Enhanced Permeability Retention)

Nanopartikül sistemleri, pasif hedefleme için tümör damarlarının patofizyolojik özelliklerinden yararlanır. Tümör hacmi 2 mm³'ün üzerine çıktığında, beslenme alımını, atık atılımını ve oksijen dağıtımını engelleyen difüzyon sınırlaması ortaya çıkar (Byrne ve diğ., 2008). Hızla büyüyen kanser hücreleri, anjiyogenez adı verilen yeni kan damarlarının oluşmasını sağlar. Bazal membrandaki anormallikler ve endotel hücrelerini kaplayan perisitlerin eksikliği bu sürecin özellikleridir. Bu durum tümör tipine bağlı olarak 100 nm -2 µm boşluk büyüklüğünde sızdıran damarlara neden olur (Maeda, 2001). Üstelik, bu tür tümörler, tümörün çekirdeğinde, periferde olduğundan daha yüksek dokular arası basınç nedeniyle zayıf lenfatik drenaj sergilerler. Bu sızdıran damar sistemi ve zayıf lenfatik akış kombinasyonu, arttırılmış geçiş ve alıkonma (EPR) etkisine neden olur. Nanopartiküller, kanserli dokularda, tercihen lokalize olabilir ve normal dokulardan daha yüksek tutma kabiliyeti nedeniyle tümörün içinde sıkışır (Maeda, 2001; Byrne ve diğ., 2008).

2.6.1.2. Tümör Mikro Çevresi

Pasif hedefleme, normal hücrelerden farklı olan tümör hücrelerini çevreleyen mikroçevreden yararlanılarak da gerçekleştirilebilir. Hızla bölünen kanser hücreleri yüksek bir metabolik hız sergilerler. Tümör hücreleri yeterli besin ve oksijen kaynağını korumak için glikolizi kullanır, böylece asidik bir ortam oluşur. pH'a duyarlı nanopartikül sistemleri, 7.4'lük bir fizyolojik pH'da kararlı olacak şekilde tasarlanır, ancak pH, tümör hücrelerinin asidik ortamında olduğu gibi fizyolojik değerlerden daha düşük olduğunda hedef dokularda ilacı serbest bırakmak için bozunur (Pelicano ve diğ., 2006). Hipertermi, insan yumurtalık karsinomu gibi birçok patolojik

alandanda görölür. Terno-duyarlı polimerik sistem düşük kritik çözelti sıcaklığı (LCST) sergileyen polimer içerir ve bu da tümör içindeki sıcaklık LCST'nin üzerinde olduğunda, eşzamanlı olarak yükün serbest bırakılmasıyla çökelme eğilimindedir. Tümörlerde lokalize hipertermi, ultrason veya fototermal araçlar gibi fiziksel yöntemlerle uyarılabilir (Cheng ve diğ., 2010).

2.6.1.3. Yüzey Yükü

Pasif hedefleme tümörü hedeflemek için yük gibi nanopartiküllerin özelliklerini kullanmayı da gerektirir. Tümör hücreleri normal hücrelere göre nispeten yüksek negatif yüzey yüküne sahiptir, böylece katyonik nanopartikül sistemleri tarafından tercih edilen bir bağlanma sağlanır. Katyonik nanopartikül sisteminin hedeflenmesi, tümör endotel hücrelerinde eksprese edilen negatif yüklü fosfolipid gruplara elektrostatik bağlanma ile gerçekleştirilir. Polimerik nanopartiküllerin sitotoksikite potansiyeli, büyük ölçüde hücreye giriş ve nanopartiküllerin subselüler lokalizasyonuna bağlıdır. Bu durum polimerik yüzey yükünün (anyonik, katyonik veya nötr) yapısı ile yönetilir (Krasnici ve diğ., 2003).

2.6.2. Aktif Hedefleme

Bu hedefleme tipinde ilacın hedeflenmesi taşıyıcı polimere/nanopartiküle ilacın taşınacağı hedef dokuda bulunan antijenle (veya reseptörlerle) kuvvetli bir şekilde etkileşebilecek bir hedefleme komponentinin (linker/ligand) kimyasal olarak bağlanmasıyla sağlanmaktadır. Bu komponent aynı zamanda reseptör aracılı endositozla ilacın hücresel alımını da kolaylaştırmaktadır (Danhier ve diğ., 2010).

Ligand bazlı hedeflemede, ligandlar, hedef tümör bölgesinde uygun reseptörlerle bağlanmak için nanopartikül sistemine konjuge edilir. Hedefleme ligandları, tümör hücreleri tarafından yüksek oranda eksprese edilen reseptörlere bağlanacak, proteinler (antikor ve bunun fragmanları), nükleik asitler (aptamerler) veya diğer ligandlar (peptidler, vitaminler ve karbonhidratlar) olarak kategorize edilebilir. Bu hedefleme yaklaşımı, nano taşıyıcıların hücresel alımını arttırmak için tümör hücreleri tarafından aşırı eksprese edilen hücre yüzeyi reseptörlerinin hedeflenmesini içerir. En yaygın olarak çalışılan hedef reseptörler transferrin, folat, epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR'ler) ve glikoproteinlerdir (Byrne ve diğ., 2008).

2.6.2.1. Transferrin Reseptörleri

Serumda demir bağlayıcı glikoprotein olan transferrin, demiri kandan hücrelere transferrin reseptörüne bağlanarak taşır. Transferrin resöptöre bağlandığında hücrenin asidik ortamında endositozun bir sonucu olarak demir salınır. Transferrin reseptörü, demir homeostazından ve hücre büyümesinin düzenlenmesinden sorumlu önemli bir proteindir. Bu nedenle, demir ihtiyacının artması nedeniyle normal hücrelere kıyasla metastatik ve ilaca dirençli kanser hücrelerinde transferrin reseptörlerinin aşırı ekspresyonu, bu reseptörü kanser tedavisi için uygun bir hedef haline getirir (Daniels ve diğ., 2006a; Daniels ve diğ., 2006b).

2.6.2.2. Folat Reseptörleri

Folat reseptörü, glikosil-fosfatidilinositol konjuge glikoproteinidir ve tümörde araştırılmış en yaygın biyomarkördür. Bu reseptör, folik asit ve folat-ilacı konjugatlarına veya folat bağlı nano taşıyıcılara yüksek afinite ile bağlanır ve reseptör aracılı endositoz yoluyla hücrelere girişi sağlar. Folik asit, nükleotid bazların, purinlerin ve pirimidinlerin sentezi için gereklidir. Ayrıca, normal hücreler folik asidi yalnızca 5-metil-tetrahidrofolat gibi indirgenmiş formda taşır ve folat konjugatları membranları boyunca taşınmaz. Kanser hücrelerine folat konjugat girişinin ana yolu temel olarak folat reseptörleridir, çünkü bu reseptörler normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerinde anlamlı şekilde yüksektir. Yumurtalık, akciğer, beyin, baş ve boyun, böbrek hücresi ve meme kanserleri dahil olmak üzere çok sayıda tümörde folat reseptörleri aşırı eksprese edilir. Folat ligandları ucuzdur, toksik ve immünojenik değildir. Aynı zamanda yüksek bağlanma afinitesine, depolamada ve dolaşımda stabilizeye sahiptirler ve kolayca nano-taşıyıcılara bağlanabilirler (Low ve Kularatne, 2009).

2.6.2.3. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri (EGFR'ler)

Bir tirozin kinaz reseptör ailesine ait EGFR'ler, tümör hücresi yüzeylerinde yüksek oranda upregüle olur. EGFR bilinen altı endojen ligandı bağlar: EGF, transforme büyüme faktörü- α , amphiregulin, betacellulin, heparin bağlayıcı EGF ve epiregulin. EGFR'nin bu ligandlardan biri ile aktivasyonu, proliferasyon, anjiyogenez, invazyon ve metastazı içeren tümör büyümesi ve ilerlemesinde yer alan hücre içi sinyalizasyon süreçlerini uyarır. EGFR, meme, akciğer, kolorektal ve beyin kanserlerinde aşırı eksprese edilir (Lurje ve Lenz, 2009).

2.6.2.4. *Glikoproteinler*

Lektinler, tümör hücresi yüzeyi üzerinde eksprese edilen glikoproteinlerin karbonhidrat varlığını spesifik olarak tanımlayabilen ve bağlayabilen proteinlerdir. Tümör hücrelerinde eksprese edilen glikoproteinler normal hücrelerinkinden farklıdır. Lektin hedefleme, doğrudan lektin hedeflenmesi (hücre yüzeyi glikoproteini hedef alan nanosistemlerde ligand olarak bulunan lektinler) ve ters lektin hedefleme (Lektinleri hedeflemek için karbonhidrat kısmı ile konjuge nanosistemler) olarak karakterize edilmektedir (Minko, 2004).

2.6.2.5. *CXCR4*

Kemokinler, pek çok hücrel işlevi düzenleyen küçük moleküllü kemoatraktif sitokinlerin bir süperailisidir. CXC kemokin stromal türevi-faktör-1 (SDF-1 veya CXCL12), stromal hücreler de dahil olmak üzere çeşitli hücrelerde ifade edilir (fibroblastlar ve endotel hücreleri) Kemokin reseptörleri, yedi transmembran alan içeren bir G protein kaplı hücre yüzeyi reseptörlerinin (GPCR'ler) bir ailesidir. Kemokinler, lökosit trafiğinde önemli rol oynayan küçük, yapısal proteinlerdir ve korunan ilk iki sisteinin konumuna göre dört gruba (CXC, CC, C ve CX3C) ayrılır (Murphy ve diğ., 2000). Kemokin reseptörü CXCR4, CXC kemokin SDF-1 veya CXCL12'ye seçici olarak bağlanan 352 amino asit uzunluğunda Rodopsin benzeri GPCR'dir (Xu ve diğ., 2017). CXCR4, SDF-1 için fizyolojik reseptördür. CXCR4, oral kanser (Onoue ve diğ., 2006), özofagus kanseri (Wu ve diğ., 2014), mide kanseri (Han ve diğ., 2014), kolon kanseri (Lv ve diğ., 2014), karaciğer kanseri (Schimanski ve diğ., 2006), pankreas kanseri (Billadeau ve diğ., 2006), tiroid kanseri (De Falco ve diğ., 2007), meme kanseri (Dewan ve diğ., 2006), yumurtalık kanseri (Kajiyama ve diğ., 2008), prostat kanseri (Hirata ve diğ., 2007), akciğer kanseri (Cavallaro, 2013), böbrek kanseri (Jones ve diğ., 2007), beyin kanseri (Bian ve diğ., 2007), melanom (Scala ve diğ., 2005) ve lösemi (Konoplev ve diğ., 2007) dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde yüksek oranda eksprese edilir. Tümör oluşumunu ve kanserin ilerlemesini sağlayan kemotaksis, invazyon, anjiyogenez ve hücre çoğalması ile ilişkilidir.

CXCR4'e bağlanan peptid ligandları, reseptör aracılı hücrel alım yoluyla antitümör ajanlarının hücre içi salımını iyileştirmek amacıyla CXCR4'ü yüksek düzeyde eksprese eden tümör hücrelerine doğrudan ilaç salım sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu peptidler arasında en başarılı olanlarından birisi horseshoe crab polyphemusin II'den türevli bir peptid olan T22 peptididir. T22 peptidi CXCR4'e bağlanır ve hızlı bir reseptör-spesifik endozomal yolak üzerinden hedef hücrelere etkili bir şekilde nüfuz eder. T22 peptidi

nanopartiküllere konjüge edildiğinde hem hücre kültüründe hem de *in vivo* metastatik kanser modellerinde hedef hücrelere nanopartiküllerin salımı ve birikmesine aracılık eder. T22 peptidi, proteinlerin, nanopartiküllerin ve görüntüleme ajanlarının hücre içi iletimi için kullanılmıştır (Unzueta ve diğ., 2012). Gimenez ve diğ., (2015) CXCR4 hedefli taşıyıcı bir sistem tasarlamıştır. Bu sistemde azid içeren modifiye edilmiş bir T22 peptidi ile kaplanmış ve doksorubisin ile yüklenmiş mezoporöz silika nanopartiküller kullanılmıştır. T22 peptidinin, Tyr⁵, Lys⁷ ve Tyr¹² amino asit kalıntıları, B hücresi Hodgkin olmayan lenfoma hücrelerinde aşırı eksprese edilen CXCR4 reseptörüne olan afinitesini önemli ölçüde arttırmaktadır. Porlu nanopartiküllerde porların T22 peptidi ile kaplanması doksorubisin salınımını engellemiş ve CXCR4 reseptörü aracılığıyla hücre içine alımı kolaylaştırmıştır (Gimenez ve diğ., 2015). Van Hout et al. (2017) CXCR4'ü hedefleyen, peptid analogları T22, T140, TC14012 ve CTCE-9908 ve küçük moleküller AMD3100, AMD3465, AMD11070, IT1t, WZ811, Me6TREN ve gambojik asit olmak üzere toplamda 11 bileşiği karşılaştırmıştır. T22 ve türevlerinin, düşük molekül ağırlıklı bileşikler AMD3100, AMD3465, AMD11070 ve IT1t ile karşılaştırıldığında CXCR4'ün daha güçlü inhibitörleri olduğu ortaya koyulmuştur (Van Hout ve diğ., 2017). CXCR4'e bağlanan diğer peptid ve moleküller tabloda özetlenmiştir (Tablo 2.4).

Tablo 2.4: CXCR4 hedefli ilaç salım sistemlerine örnekler (Wang ve diğ., 2016b).

Hedefleyici ajan	Taşıma sistemi	Kargo	Uygulama	Kaynaklar
T22 peptid	Floresan protein nanopartikül ile füzyon halinde	Yeşil floresan protein	Kolorektal kanserde nanopartikül iletiminin artırılması (<i>in vivo</i>).	(Unzueta ve diğ., 2012)
LFC131 peptid	Kitosan ve PLGA nanopartiküller	Dosetaksel ve doksorubisin	Akciğer kanserinde antikanser ilaç iletiminin artırılması (<i>in vitro</i>)	(Chittasupho ve diğ., 2014)
DV3 peptid	Katyonik peptid transdüksiyon domaini (PTD)	Antikanser Peptidler	CXCR4 pozitif lenfoma hücrelerinin hedeflenmesi ve ölümünün artırılması	(Snyder ve diğ., 2005)
Azid içeren T22 analog peptid	Mezoporöz silika nanopartikülleri	Doksorubisin	Lenfoma hücrelerinde antikanser ilaç iletiminin artırılması (<i>in vitro</i>)	(Gimenez ve diğ., 2015)
CXCL12'nin N-terminal dizisi	Polipleksler	Raportör plazmid DNA	CXCR-pozitif insan glioblastoma ve servikal karsinom hücrelerine gen transferinin artırılması.	(Egorova ve diğ., 2014)
Peptide analog 4Fbenzoil-TE14011	Lipopleksler	Raportör plazmid DNA	Sıçan glioma hücrelerine gen transferinin artırılması.	(Driessen ve diğ., 2008)

Tablo 2.4 (devam): CXCR4 hedefli ilaç salım sistemlerine örnekler (Wang ve diğ., 2016b).

Hedefleyici ajan	Taşıma sistemi	Kargo	Uygulama	Kaynaklar
Anti-CXCR4 antikor	Radyofarmasötik	¹¹¹ In	Beyin tümörü görüntülenmesinde (<i>in vivo</i>)	(Nimmagadda ve diğ., 2009)
Ac-TZ14011 peptid	Dendrimerler	¹¹¹ In ve Cy5.5 boyası	<i>in vivo</i> olarak meme kanserinde CXCR4 ekspresyonunun görüntülenmesi	(Kuyl ve diğ., 2011)
Ac-TZ14011 peptid	Radyofarmasötik	¹¹¹ In	<i>in vivo</i> olarak metastatik pankreas tümörlerinde CXCR4 ekspresyonunun görüntülenmesi	(Hanaoka ve diğ., 2006)
X4-2-6 peptid	Self-assembly peptid nanopartiküller	Antikanser ilacı HKH-40A	<i>in vivo</i> meme tümör metastazının inhibe edilmesi	(Tarasov ve diğ., 2011)
Anti-CXCR4 antikor	Lipozomlar	Doksorubisin	Meme kanserinde antikanser ilacın iletimini ve etkinliğinin artırılması (<i>in vitro</i>)	(Guo ve diğ., 2012)
Anti-CXCR4 antikor	Lipozomlar	Anti-lipokalin-2 siRNA	Metastatik meme kanserinde hem CXCR4- hem de Lcn2 aracılı göç yollarının inhibe edilmesi (<i>in vitro</i>)	(Guo ve diğ., 2014)
AMD3100	Polipleksler	siRNA (siPLK1)	Hücre invazyonunu inhibe etmek için eşzamanlı olarak gen transferi ve CXCR4'ün bloke edilmesi (<i>in vivo</i> , <i>in vitro</i>)	(Wang ve diğ., 2015b)
AMD3100 türevi	Polipleksler	Raportör plazmid DNA	Metastazı inhibe etmek için eşzamanlı olarak gen transferi ve CXCR4'ün bloke edilmesi (<i>in vitro</i>)	(Wang ve diğ., 2015a)
Viologen dendrimers	Dendrimer polipleksler	TNFα plazmid DNA	Aynı anda CXCR4 aracılı kanser hücresi invazyonun önlenmesi ve TNFα aracılı kanser hücresi ölümünün kolaylaştırılması (<i>in vitro</i>)	(Li ve diğ., 2014)
AMD3100	Radyofarmasötik	⁶⁴ Cu	İnsan meme kanserinden türevli akciğer metastazının görüntülenmesi (<i>in vivo</i>)	(Nimmagadda ve diğ., 2010)
AMD3465	Radyofarmasötik	⁶⁴ Cu	Beyin tümörü ve kolon tümörünün görüntülenmesi (<i>in vivo</i>)	(De Silva ve diğ., 2011)

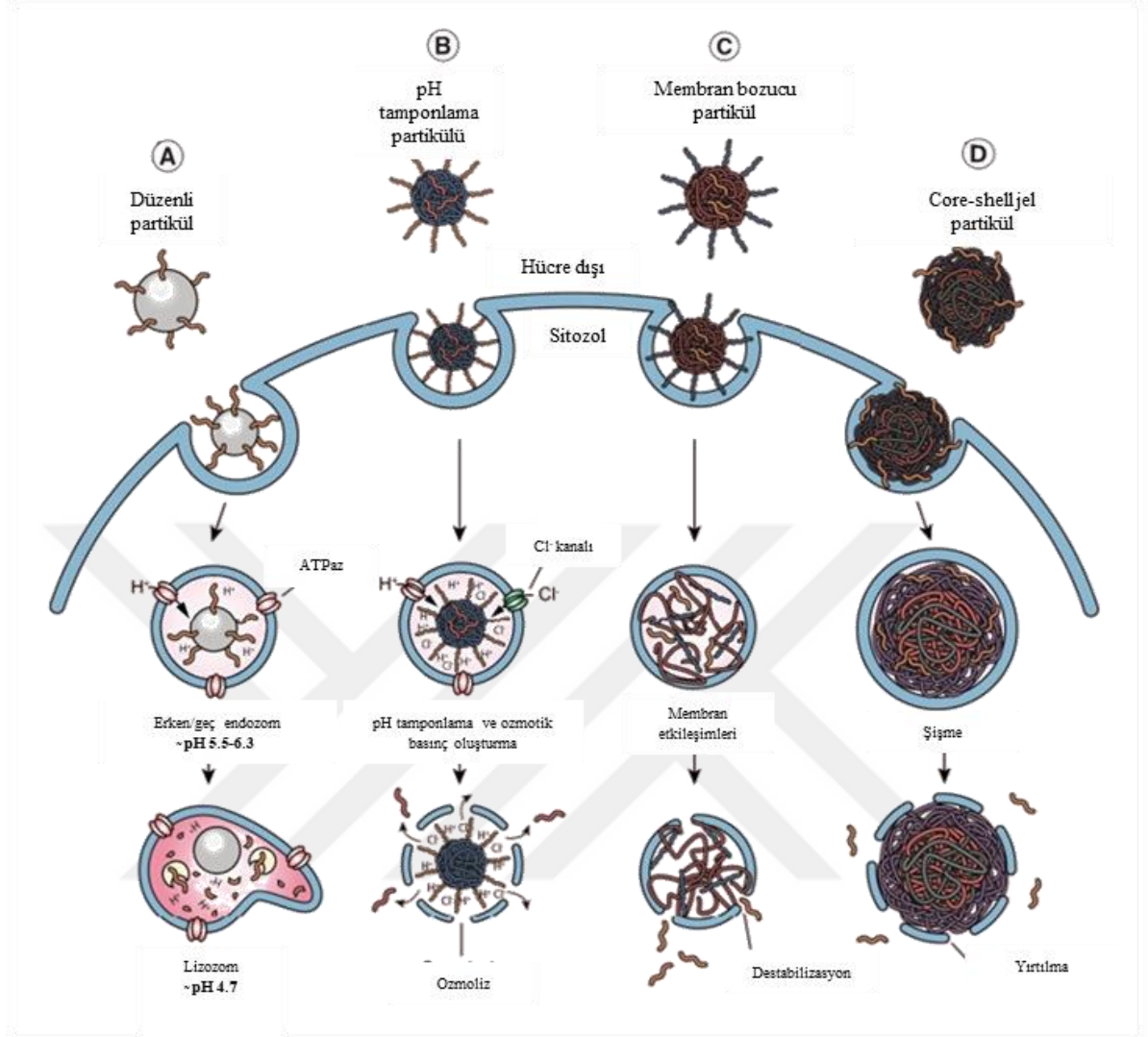
2.7. POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN ENDOZOMAL KAÇIŞ MEKANİZMALARI

Nanopartiküllerin terapötik uygulama için uygulanması, önemli bir araştırma alanıdır. Nanopartiküller, yükü bozulmadan korumak ve bir tedavi bölgesini hedeflemek için tasarlanabilir, böylece istenmeyen yan etkiler ve ilacın erken bozulması azalır (Irvine ve diğ., 2015). Bununla birlikte, etkili nanopartikül taşıyıcı sistemlerinin tasarımında hala birçok zorluk vardır. Bu tür malzemeler, vücudun doğal savunmasından kaçınmalı, bir hedef hücreye girebilmeli ve daha sonra optimum etkinlik için doğru hücresel bölmeye yönlenebilmelidir. Nanopartiküllerin tipik olarak endozomlar yoluyla hücrelere alındığı ve daha sonra lizozomlarla birleştiği iyi bilinmektedir (Such ve diğ., 2015). Nanopartiküller, endozomal kaçışı indükleyecek bir mekanizmaya sahip değilse, bu bölmelerde sıkışıp kalırlar. Endozomlar/lizozomlar terapötiklerin çoğunluğu için aktif bölge değildir. Bu nedenle bu bölümlerden salınan ilaçların etkinliğinin artırılması için önemlidir. Özellikle proteinler veya DNA gibi biyolojik metaryaller tipik olarak asidik lizozomal bölmelerde parçalanır. Bu nedenle, endozomal kaçışın nasıl etkili bir şekilde yapılacağını anlamak önemlidir (Selby ve diğ., 2017).

Birkaç nanopartikül formülasyonunun endozomal kaçışı indüklediği gösterilmiştir (Canton ve Battaglia, 2012). Bununla birlikte, yüksek düzeyde hücre canlılığını korurken, etkili endozomal kaçışa neden olmak zor olabilir. Bu nanopartikül taşıyıcı sistemlerin toksisitesini sınırlamak ve verimliliklerini artırmak için, endozomal kaçış ile ilgili mekanizmaları anlamak önemlidir. Endozomal kaçmayı indükleyen polimerik nanopartiküllerin çoğu, nanopartiküller endolizozomal yola girdiğinde pH'daki azalmaya bağlıdır. Bu pH varyasyonu nanopartikülde daha sonra kaçışa neden olan konformasyonel bir değişikliğe neden olur. Birçok kaçış mekanizması önerilmiştir (Şekil 2.9), ancak etkili endozomal kaçışın meydana gelmesi için birden fazla mekanizmanın birlikte hareket etmesi muhtemeldir. Özellikle sinerjistik olarak çalışıyorlarsa, tüm spesifik mekanizmaları karakterize etmek zordur. Ayrıca, endozomal kaçış ölçümü için yapılan analizler ölçümlerinde farklılık gösterebilir; bu nedenle, doğru biyolojik analizlerin kullanılmasını sağlayan mekanizmalar hakkında bilgi sahibi olmak önemlidir (Cupic ve diğ., 2019).

Literatürde önerilen orijinal endozomal kaçış mekanizmalarından biri proton sünger etkisidir. Bu hipotezde polimerler, protonlar ATPazlar tarafından endozomlara pompalandıkça pH'ı

tamponlama görevi görür. Klorür iyonları ayrıca, yük dengesini korumak için endozom içine pompalanır, böylece hücre endozomun pH'ını düşürmeye çalıştıkça, ozmotik basıncın birikmesi endozomal lizise neden olur. Bu mekanizmanın tartışmalarından biri, proton sünger etkisinin tam membran rüptürüne veya gözenek oluşumuna neden olup olmadığıdır (Ur Rehman ve diğ., 2013). Çok sayıda polimerik nanopartikül sisteminin bu mekanizma yoluyla endozomal kaçışı indüklediği söylenmektedir (Bieber ve diğ., 2002; Hu ve diğ., 2007; Convertine ve diğ., 2009); bununla birlikte, bazı polimerik nanopartiküllerin neden endozomlardan/lizozomlardan kaçmayı indükleyeceğini tam olarak açıklamamaktadır. Örneğin, endozomal pH aralığı içinde kuvvetli bir şekilde tamponlanan birkaç polimerin endozomal kaçış indüklediği gösterilmiştir (Funhoff ve diğ., 2004). Ayrıca lizozomal pH'ın, bu mekanizma kullanılarak kaçtığı düşünülen bir polimer olan poli (etilen imin) ilavesinden 24 saat sonra sabit kaldığı gösterilmiştir (Benjaminsen ve diğ., 2013). Bu nedenle, diğer faktörlerin polimerik nanopartiküllerin endozomal sızıntıyı indükleme yeteneğine katkıda bulunması muhtemeldir. İlişkili bir mekanizmada, pH'a duyarlı polimersomların ozmotik basınç değişiklikleri yoluyla endozomal kaçış indüklediği bildirilmiştir (Lomas ve diğ., 2008). Proton sünger etkisinin ve şişmenin membran bozulmasına katkıda bulunabileceğini savunulmaktadır (Hu ve diğ., 2007). Membran bozulması veya dengesizleşmesi, polimerik nanopartiküllerin endozomal kaçış mekanizması olarak da varsayılmıştır. Bu mekanizma, polimer hidrofobikliğinde bir artışın lipid etkileşmesine ve dolayısıyla membran bozulmasına yol açtığını ileri sürer. Polimer hidrofobikliği, pH'da bir azalma ile hidrofobik hale gelen karboksilik asit monomerleri dahil edilerek veya butil metakrilat (BMA) gibi hidrofobik monomerler kullanılarak ayarlanabilir. Membran bozulmasına, polimerlerin endozomal membran ile doğrudan etkileşimleri neden olabilir ve bu da yükün polimerler tarafından oluşturulan geçici gözeneklerden dağılmasına izin verir (Jones ve diğ., 2003).



Şekil 2.9: Polimerik nanopartiküllerin endozomal kaçışları için öngörülen mekanizmalar. (A) Endozomal kaçış kabiliyeti olmayan bir kontrol partikülü; (B) proton sünger davranışı yapabilen bir nanopartikül; (C) endozomal zar ile etkileşime giren bir nanopartikül; ve (D) pH'da bir değişiklik üzerine şişen bir nanopartikül (Cupic ve diğ., 2019).

2.8. KENDİLİĞİNDEN KURULAN (SELF-ASSEMBLY) PEPTİD NANOPARTİKÜLER SİSTEMLER

1959'da, bireysel birimleri aşağıdan yukarıya bir yaklaşımla birleştirilerek iyi organize edilmiş supramoleküller oluşturma işlemini açıklayan Feynman, ilk olarak kendiliğinden kurulan (self-assembly) moleküller kavramını önermiştir. 1960'larda supramoleküler kimya terimini ve kavramlarını tanıtan ilk kişi olan Lehn, 1987'de bu alana katkısı nedeniyle Nobel Ödülü'ne layık görülmüştür. Tıpkı doğada daha yüksek hiyerarşik biyomoleküller gibi (proteinler, DNA ve

polisakaritler gibi), çoğu kendinden kurulan molekül bireysel monomerlerin elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları, van der Waals etkileşimleri ve π - π kuvvetleri gibi zayıf, kovalent olmayan etkileşimler yoluyla oluşur (Shi ve Xu, 2015; Sun ve diğ., 2017). Bireysel kovalent olmayan kuvvetler çok zayıf olsa da birkaç kovalent olmayan kuvvetin bir arada kullanılması çok kararlı ve iyi organize edilmiş yapılar üretebilir. Kovalent kuvvetlere kıyasla kovalent olmayan bağlar aracılığıyla kendiliğinden kurulan malzemeler geliştirmenin birkaç avantajı vardır. Örneğin, polimerler gibi malzemelerde yaygın olan güçlü kovalent bağlar nedeniyle, kovalent bağlar katalizör ilave etmeden veya kapsamlı malzeme işlemesi gerçekleştirilmeden geri dönüşümlü değildir. Kovalent bağ ile karşılaştırıldığında, çok sayıda kendiliğinden kurulan malzemede mevcut olan bu kovalent olmayan kuvvetler, yüksek sentetik yakınsama, hata düzeltme, programlanmış tasarım ve kendi kendine organizasyon gibi ileri fonksiyonlara sahip, geri dönüşümlü ve dinamiktir (Hosseinkhani ve diğ., 2013; Shi ve Xu, 2015).

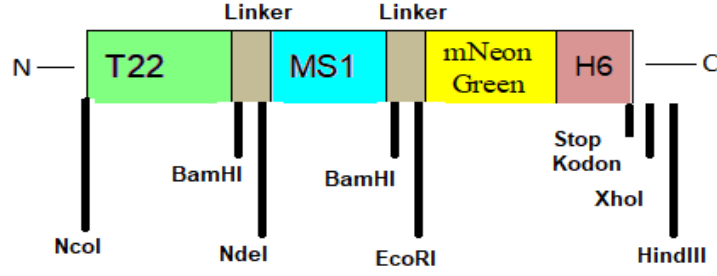
Mümkün olduğu kadar çok kovalent olmayan kuvvetlerin oluşumunu en üst düzeye çıkarmak için, kendiliğinden kurulan moleküllerin ana bileşeni hem hidrofobik hem de hidrofilik kısımları olan bir amfifilik yapıya sahiptir. Sulu bir ortama yanıt verirken, bu tür moleküller çözücünün özellikleriyle eşleşmesi için yüzeyde hidrofobik veya hidrofilik alanlara sahiptir. Günümüzde tasarlanan tüm kendiliğinden kurulan moleküller arasında, peptidler bu açıdan özellikle çekici yapı taşlarıdır. Çünkü peptid dizileri aynı yapı bloğunda hem hidrofilik hem de hidrofobik alanlara sahip olacak şekilde formüle edilebilir. Kendiliğinden kurulan peptidlerdeki bu benzersiz özellikler nedeniyle; peptid katlama, hızlı ve kolay sentez, çeşitli işlevselleştirme yöntemleri ve dış uyaranlara programlanmış cevaplar (pH değeri, iyon konsantrasyonu ve hidrofobiklik gibi) gibi çok sayıda uygulamada kullanılmışlardır (Lowik ve Van Hest, 2004; Silva ve diğ., 2004). Kendinden kurulan peptidlerin daha yüksek hiyerarşik yapısı açısından, stabiliteleri, amino asit zincirinin uzunluğu ve fonksiyonel grubun şekli monomer yapısına bağlıdır. Aynı zamanda, sıcaklık, pH, iyonik kuvvet ve mekanik kuvvet dahil olmak üzere dış ortamda kendiliğinden kurulma işlemini etkileyebilir veya tersine çevirebilir. Dolayısıyla bu özelliklere dayanarak, bilim insanları, spesifik hedefleme, kontrollü salım ve gelişmiş etkinlik gibi değişen ortamın tetikleyebileceği bir “zekâ” ile kendi kendine monte edilmiş molekülleri tasarlayabilirler.

Peptidleri ve bunların hibrid yapılarını sentezlemek için üç ana yöntem vardır: katı faz kimyasal sentezi, protein mühendisliği ve halka açılma polimerizasyon stratejisi. Genel olarak, katı-faz

peptid sentezi, oldukça hassas yapıların kısa ile orta uzunlukta peptid dizileri için kullanılır. Katı faz peptid sentezi verimi her adımda % 98'den büyük olmasına rağmen, bu yöntemin sentez sınırlaması 70 amino asit aralığındadır. İpek ve kollajen molekülleri gibi tanımlanmış bir yapıya sahip uzun bir peptid sekansını (>50 amino asit) sentezlemek için, araştırmacılar protein mühendisliğini kullanabilir. Büyük ölçekli polipeptid üretimi için, uzun bir peptid oluşturmak üzere zincir ucuna siklik monomerlerin eklendiği halka açma polimerizasyonunun kullanılması önerilir. Bununla birlikte, bu yöntem, katı faz sentezi sırasında elde edilenden daha düşük doğrulukta bir peptid birincil yapısı üretir (Klok, 2002; Schneider ve diğ., 2002).

Son yıllarda, bir grup araştırmacı, fonksiyonel peptidlerin aktif kullanımı için amino ucunda kationik bir alanın ve karboksil ucunda bir çekirdek proteini olan histidin açısından zengin bir alanın kombine kullanımını tanımlamıştır. Çekirdek proteinin orijini ve ilgilenilen amino asit dizisi ne olursa olsun, oluşturulan yapının 12 ile 100 nm arasında sadece protein içeren siklik nanopartiküllerin oluşumuyla sonuçlandığını gösterilmiştir (Rueda ve diğ., 2015; De Pinho Favaro ve diğ., 2018). Bu yaklaşımla, antimikrobiyal ajanlar (Carratala ve diğ., 2020) kanserde nanotaşıyıcılar (Falgas ve diğ., 2020) görüntüleme ajanları (Unzueta ve diğ., 2020) ve kan-beyin bariyerini geçen ajanların (Serna ve diğ., 2016) etkili olduğu kanıtlanmıştır. Üretilen rekombinant protein esaslı nanopartiküller fizyolojik pH'da oldukça kararlıdır, model hayvanlara enjeksiyondan sonra doğru bir biyolojik dağılım gösterir ve hedef hücre bölmesine verimli bir şekilde ulaştığı kanıtlanmıştır (Unzueta ve diğ., 2012; Serna ve diğ., 2016; De Pinho Favaro ve diğ., 2018; Carratala ve diğ., 2020; Falgas ve diğ., 2020; Unzueta ve diğ., 2020).

Bu tez kapsamında, pBAD-HisA vektöründe *NcoI* ve *HindIII* restriksiyon kesim bölgeleri arasına klonlanması için tasarlanan dizinin şematik gösterimi Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2: Tez kapsamında rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak oluşturulması planlanan proteinin şematik gösterimi. CXCR4 yüzey antijeni ligandı T22 peptidi, MCL-1 inhibitörü MS1 peptidi, mNeonGreen ve H6 içermektedir.

*T22: RRWCYRKCYKGYCYRKCR (Unzueta ve ark., 2012), MS1: RPEIWM TQGLRRLGEINAYYAR (Foight ve ark., 2014), Linker: GGSSRSS (Unzueta ve ark., 2012), mNeonGreen (Hostettler ve ark., 2017), H6: HHHHH. Burada T22 peptidi CXCR4 ligandıdır. Bu peptid hem nanoyapının oluşmasında hem de CXCR4 reseptörü taşıyan hücrelerin hedeflenmesinde temel bileşendir. MS1 peptidi ise yüksek afiniteli MCL-1 inhibitörüdür. Linker yapıya esneklik sağlamaktadır. mNeonGreen nanoyapının oluşturulmasında katkı sağlayacak floresan bir proteindir. H6 (6 tane histidin amino asidi) ise hem protein saflaştırmasında hem de nanoyapının oluşmasına katkı sağlar.

Öncelikle kendiliğinden kurulan peptid nanoyapıların oluşması için gerekli olan ve Şekil 3.2’de şematik olarak gösterilen yapının üretimi için gerekli olan DNA dizisi tasarlanmıştır. İlk olarak nükleotid dizisinin *E. coli* K12 suşuna göre kodon optimizasyonu yapılmıştır. Bu çerçevede nükleotid dizisinde bulunan ve *E. coli* K12 mikroorganizmasında düşük sıklıkla ifade edilen kodonlar, daha yüksek sıklıkla ifade edilen kodonlarla değiştirilmiştir. Kodon optimizasyonu için jCat kodon optimizasyon uygulaması kullanılmıştır (<http://www.jcat.de/>). Örneğin bu uygulama ile *E. coli*’de lösin amino asiti için CTA, CTC, CTT yerine CTG alanin amino asiti için GCA, GCT, GCC yerine GCG kodonu yerleştirilmiştir. Kodon optimizasyonunu etkilemeksizin dizide çeşitli bölgelere restriksiyon kesim bölgeleri eklenmiştir. Bu restriksiyon kesim bölgeleri ileride yapı üzerinde değişiklik yapılmasına, gerektiğinde başka ekspresyon plazmidlerine klonlanama yapılabilmesine imkan sağlayacaktır. Ayrıca, sıklıkla kullanılan restriksiyon kesim bölgeleri de aminoasit dizisini ve kodon optimizasyonunu etkilemeksizin değiştirilmiştir. Bu B planı olarak çalışmanın devamında primerler tasarlanarak laboratuvarda bulunan diğer vektör sistemlerine de klonlama yapma

olanağı sağlayabilmesi açısından önemlidir. Tasarlanan nükleotid dizisi ve bu dizinin kodladığı aminoasit dizisi Şekil 3.3’de verilmiştir.

A

CCATGG	GA	CGT	CGT	TGG	TGC	TAC	CGT	AAA	TGC	TAC	AAA	GGT	TAC	TGC	
TAC	CGT	AAA	TGC	CGT	GGT	GGT	TCT	TCT	CGT	TCT	TCT	GGATCC	CATATG		
CGT	CCG	GAA	ATC	TGG	ATG	ACC	CAG	GGT	CTG	CGT	CGT	CTG	GGT	GAA	ATC
AAC	GCG	TAC	TAC	GCG	CGT	GGT	GGT	TCT	TCT	CGT	TCT	TCT	GGATCC		
GAATTC	ATG	GTT	TCT	AAA	GGT	GAA	GAA	GAC	AAC	ATG	GCG	TCT	CTG	CCG	
GCG	ACC	CAC	GAA	CTG	CAC	ATC	TTC	GGT	TCT	ATC	AAC	GGT	GTT	GAC	TTC
GAC	ATG	GTT	GGT	CAG	GGC	ACC	GGT	AAC	CCG	AAC	GAC	GGT	TAC	GAA	GAA
CTG	AAC	CTG	AAA	TCT	ACC	AAA	GGT	GAC	CTG	CAG	TTC	TCT	CCG	TGG	ATT
CTG	GTT	CCG	CAC	ATC	GGT	TAC	GGT	TTC	CAC	CAG	TAC	CTG	CCG	TAC	CCG
GAC	GGT	ATG	TCT	CCG	TTC	CAG	GCG	GCG	ATG	GTT	GAC	GGT	TCT	GGT	TAC
CAG	GTT	CAC	CGT	ACC	ATG	CAG	TTC	GAA	GAC	GGT	GCG	TCT	CTG	ACC	GTT
AAC	TAC	CGT	TAC	ACC	TAC	GAA	GGT	TCT	CAC	ATC	AAA	GGT	GAA	GCG	CAG
GTT	AAA	GGC	ACC	GGT	TTC	CCG	GCG	GAC	GGT	CCG	GTT	ATG	ACC	AAC	TCT
CTG	ACC	GCG	GCG	GAC	TGG	TGC	CGT	TCT	AAA	AAA	ACC	TAC	CCG	AAC	GAC
AAA	ACC	ATC	ATC	TCT	ACC	TTC	AAA	TGG	TCT	TAC	ACC	ACC	GGT	AAC	GGT
AAA	CGT	TAC	CGT	TCT	ACC	GCG	CGT	ACC	ACC	TAC	ACC	TTC	GCG	AAA	CCG
ATG	GCG	GCG	AAC	TAC	CTG	AAA	AAC	CAG	CCG	ATG	TAC	GTT	TTC	CGT	AAA
ACC	GAA	CTG	AAA	CAC	TCT	AAA	ACC	GAA	CTG	AAC	TTC	AAA	GAA	TGG	CAG
AAA	GCG	TTC	ACC	GAC	GTT	ATG	GGT	ATG	GAC	GAA	CTG	TAC	AAA	CAC	CAC
CAC	CAC	CAC	CAC	TAA	CTCGAG	AAGCTT									

B

MG	RRWCYRKCYKGYCYRKCR	GGSSRSSSGSHM	RPEIWM	TQGLRRLGEINAYYAR	GGSSRSSSG
SEFMVSKGEEDN	MASLPATHELHIFGS	INGVDFDMVGQGT	GNPN	DGYEELNLKSTK	GDLQF
SPWILVPHIGYGF	HQYLPYPDGMSPF	QAAMVDGSGYQV	HRTMQFEDGAS	LTVNRYRYTYEGS	
HIKGEAQVKGTG	FPADGPVMTNSL	TAADWCRSKKTY	PNDKTIISTFKWS	YTTGNGKRYRST	
ARTTYTFAKPMA	ANYLKNQPMYVFR	KTELKHSKTELNF	KEWQKAFTDVMG	MDELYKHHHHH	
H-LEKL					

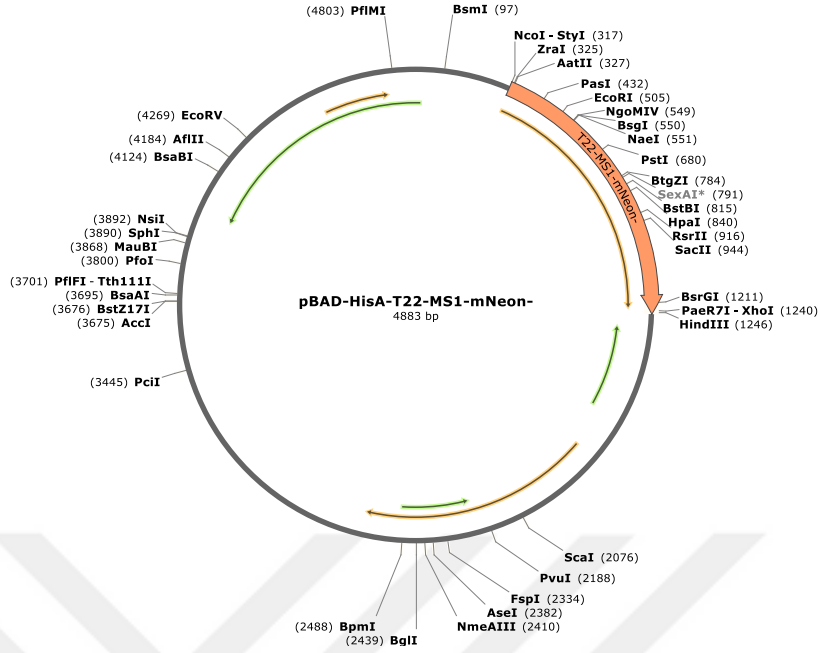
Şekil 3.3: Bu tez çalışması kapsamında tasarlanan T22-MS1-mNeonGreen yapısının nükleotid dizisi (A) ve bu dizinin kodladığı amino asit dizisi (B).

Tasarlanan nükleotid dizisinin doğal olanı ve optimize edilmiş hali Şekil 3.4’de birbirine hizalanmış olarak verilmiştir. DNA hizalama işlemi “CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment” programı kullanılarak yapılmıştır.

Doğal	CCATGGGAAGAAGTGGTGCTACAGAAAGTGTTACAAAGGCTATTGTTATCGTAAAGTGTAA	60
Optimize	CCATGGGACGTCGTTGGTGCTACCGTAAATGCTACAAAGGTTACTGCTACCGTAAATGCC	60
	***** * * ***** * * * * ***** * * * * ***** *	
Doğal	GAGGTGGTAGCAGTCGCTCATCTGGATCCCATATGCGTCCTGAGATATGGATGACACAGG	120
Optimize	GTGGTGGTTCTTCTCGTTCTTCTGGATCCCATATGCGTCCGAAATCTGGATGACCAGG	120
	* ***** * * * * ***** * * * * ***** * * * * ***** *	
Doğal	GGCTGCGACGACTTGGGGAAATTAACGCCCTACTACGCAAGAGGTGGTAGCAGTCGCTCAT	180
Optimize	GTCTGCGTTCGTCTGGTGAAATCAACGCGTACTACGCGCGTGGTGGTTCTTCTCGTTCTT	180
	* ***** * * * * ***** * * * * ***** * * * * ***** *	
Doğal	CTGGATCCGAATTCATGGTGAGCAAAGGAGAGGAAGATAACATGGCTTCGCTGCCGTCGAA	240
Optimize	CTGGATCCGAATTCATGGTTTCTTAAAGGTGAAGAAGACAACATGGCGTCTCTGCCGCGCA	240
	***** * * * * ***** * * * * ***** * * * * ***** *	
Doğal	CTCATGAGCTTCATATATTTCGGTAGCATTAATGGTGTGGATTTTGACATGGTTGGGCAAG	300
Optimize	CCCACGAACTGCACATCTTCGGTTCTATCAACGGTGTGACTTCGACATGGTTGGTCAGG	300
	* *	
Doğal	GAACAGGAACCCCAATGATGGGTACGAAGAGTTAAATCTTAAATCGACTAAAGGAGATC	360
Optimize	GCACCGGTAACCCGAACGACGGTTACGAAGAAGTGAACCTGAAATCTACCAAAGGTGACC	360
	* *	
Doğal	TTTCAAGTTTTCACCTTGGATCCTCGTCCCTCATATTGGGTACGGGTTTCACCAAGTATCTAC	420
Optimize	TGCAGTTCTCTCCGTGGATTTCTGGTTCGCACATCGGTACGGTTTCACCAAGTATCTGC	420
	* *	
Doğal	CTTACCCGGACGGTATGTCCCTCTTCAGGCAGCGATGGTAGATGGTTCTGGATACCAGG	480
Optimize	CGTACCCGGACGGTATGTCTCCGTTCCAGGCAGCGATGGTTGACGGTTCTGGTTACCAGG	480
	* *	
Doğal	TGCACCGGACAATGCAGTTTCGAAGACGGTGCAGTCTAACAGTCAACTACCGGTATACCT	540
Optimize	TTTACCGTACCATGCAGTTTCGAAGACGGTGCAGTCTAACAGTCAACTACCGGTATACCT	540
	* *	
Doğal	ACGAGGGTTCCACATCAAAGGAGAAGCGCAAGTTAAGGGGACGGGTTTCCGGCCGACG	600
Optimize	ACGAAAGTTCTCACATCAAAGGTGAAGCGCAGGTTAAGGACCGGTTTCCGGCCGACG	600
	**** *	
Doğal	GGCCCGTTCATGACGAATCTGCTAACCGCGGCTGACTGGTGTTCGCTCCAGGAAACGATC	660
Optimize	GTCCCGTTATGACCAACTCTCTGACCGCGGCGGACTGGTGCCTGTTCTAAAAAACCTACC	660
	* *	
Doğal	CCAATGATAAAACGATAATCTCTACATTCAAGTGGTCTTATACTACGGTAACGGAAGC	720
Optimize	CGAACGACAAAACCATCATCTCTACCTTCAAATGGTCTTACACCACCGGTAACGGTAAAC	720
	* *	
Doğal	GGTACCGATCCACGGCAGGACAACCTATACGTTTGCAAAAGCCAATGGCGGCTAATATC	780
Optimize	GTTACCGTTCTACCGCGGTACACCTACACCTTCGCGAAACCGATGGCGGCGAATACC	780
	* *	
Doğal	TAAAAAACAGCCAAATGTACGTGTTCCGGAAAAACCGAACTGAAGCATTCGAAAAACGAGC	840
Optimize	TGAAAAACAGCCGATGTACGTTTTCGGTAAAAACCGAACTGAAGCACTCTAAAAACGAAAC	840
	* *	
Doğal	TCAACTTTAAAGAGTGGCAAAAAGCATTCACGGACGTTATGGGCATGGATGAAGTGTACA	900
Optimize	TCAACTTCAAAGAAATGGCAGAAAGCGTTCACCGACGTTATGGGTATGGACGAAGTGTACA	900
	* *	
Doğal	AGCATCATCATCATCTTGAAGTCGAGAAGCTT	932
Optimize	AACACCAACACCACTAAGTCGAGAAGCTT	932
	* *	

Şekil 3.4: T22-MS1-mNeonGreen Nükleotid Dizisinin optimize edilmiş nükleotid dizisi ile doğal nükleotid dizisinin karşılaştırılması

Biyoinformatik araçlarla düzenlenen gen dizisi Biomatik firmasına sentez ettirilmiştir. Biomatik tarafından sentezlenip gönderilen “pBAD-HisA-T22-MS1-mNeon” plazmidinin restriksiyon kesim bölgeleriyle birlikte gösterimi Şekil 3.5’te verilmiştir.



Şekil 3.5: pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen plazmidinin restriksiyon kesim bölgeleriyle birlikte gösterimi.

3.1.2. T22-MS1-mNeonGreen Proteinin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

Firma tarafından liyofilize halde gönderilen plazmid DNA nükleaz içermeyen distile su ile final konsantrasyon 100 ng/µl olacak şekilde sulandırılmıştır. Sonrasında plazmid DNA'nın çoğaltılması için *E. coli* DH5α hücreleri kompetent hale getirilmiş ve plazmid DNA ısı şoku ile bu hücrelere transfer edilmiştir. Kompetent hücre hazırlama ve ısı şokuyla tranformasyon prosedürü aşağıda verilmiştir.

3.1.2.1. pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen Plazmid DNA'sının Çoğaltılması

Plazmit DNA'nın çoğaltılması için ilk olarak *E. coli* DH5α hücreleri kompetent hale getirilmiştir. Hücreler PİPES (piperazin-N,N'-bis (2-etanesülfonik asit))'li kompetent hücre hazırlama protokolüne uygun şekilde kompetent hale getirilmiştir.

Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması

PİPES (piperazin-N,N'-bis (2-etanesülfonik asit)) tamponunun hazırlanması

Öncelikle 0,5 M PİPES çözeltisi hazırlanmış ve bu çözelti KOH ile pH:6.8'e getirilmiştir. Sonrasında 6,92 g MnCl₂, 1,66 g CaCl₂ ve 18,64 g KCl 980 mL suda çözülüş ve üzerine 20

mL PİPES çözeltisi ilave edilerek hacim 1 L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti 0,45 µm'lik filtreden geçirilmiştir ve steril stok şişelerine bölünerek, -20°C'de saklanmıştır.

LB besiyerinin hazırlanması

10 g tripton, 10 g maya ekstraktı, 10 g NaCl 1 L suda çözülmüştür. Hazırlanan 1 L'lik çözelti 250'er mL olacak şekilde iki tane stok şişesine alınmıştır ve üzerine 3,75 g agar ilave edilip otoklavlanmıştır. Daha sonra petrilere paylaştırmak üzere +4°C'de saklanmıştır (LB agar).

Artan LB çözeltisi 50 mL olacak şekilde erlenlere ve 4 mL olacak şekilde deney tüplerine koyulmuş ve otoklavlanmıştır.

SOB besiyerinin hazırlanması

20 g tripton, 5 g maya ekstraktı, 2 mL 5 M NaCl, 2,5 mL 1 M KCl, 10 mL 1 M MgCl₂ ve 10 mL 1 M MgSO₄.7H₂O behere alınarak üzeri saf su ile 1 L'ye tamamlanmış ve otoklavlanmıştır.

100 mg/mL ampicilin stok çözeltisi

1 g ampicilin 10 mL saf suda çözülmüş ve 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek ependorf tüplerine bölünmüştür.

Prosedür

- -80°C'den alınan DH5α hücreleri LB besiyeri bulunan petrilere ekilmiş ve 37°C'de gece boyu inkübe edilmiştir.
- Gece boyu inkübasyonun sonrasında alınan petriden 1 koloni alınarak; içinde 25 mL SOB bulunan 250 mL'lik erlene inoküle edilerek, 250 rpm ve 37°C'de 6 saat inkübe edilmiştir.
- 6 saatin sonrasında kültür için, içinde 250 mL SOB besiyeri bulunan 3 tane erlen hazırlanmıştır ve 25 mL'lik DH5α kültüründen erlenlere sırasıyla 10 mL, 4 mL ve 2 mL inoküle edilmiştir.
- Hazırlanan erlenler 18°C'de 14 saat boyunca 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır ve 600 nm'deki OD değerleri ölçülerek bu değer 0,55'e ulaştığında kültür çalkalayıcıdan alınmış ve 10 dakika buzda bekletilmiştir.
- Sonrasında hücreler +4°C'de 2 500 g'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Hücrelere 80 mL soğuk PİPES'li tampon ilave edilerek, hassas bir şekilde yeniden süspansiyon haline getirilmiştir.

- Hücreler, +4°C 2500 g'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve hücelere 20 mL soğuk PİPES'li tampon ilave edilmiş ve yeniden süspansiyon hale getirilmiştir.
- 1,5 mL DMSO eklenmiş ve hafifçe karıştırılmıştır. Sonrasında buz üzerinde 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Sonrasında hücreler -80°C'de saklanmıştır.

Transformasyon

-80°C'den alınan kompetent hücreler buz üzerinde 10 dakika bekletilmiştir. Sonrasında kompetent hücrelerden 200 µL'lik kısımlar alınmış ve üzerine 0,5 µL plazmid DNA eklenmiş ve karıştırılarak 1 saat buz banyosuna gömülmüştür. 1 saatin sonrasında 42°C'de 2 dakika bekletilmiş ve tekrar buza alınarak 5 dakika bekletilmiştir. Üzerine 200 µL LB eklenmiş ve 30 dk 37 °C, 240 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra hücreler 100 µg/mL ampisilin antibiyotiği içeren LB agar bulunan petriye yayılmış ve 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır.

Sonrasında petriden alınan tek koloni 100 µg/mL ampisilin antibiyotiği içeren 4 mL'lik steril sıvı LB içerisine inoküle edildikten sonra 37°C de gece boyu inkübe edilmiştir. Bu hücrelerden plazmid DNA izolasyonu "Genaid Plasmid DNA Purification" kiti kullanarak protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Uygulanan protokol basamakları aşağıdaki gibidir:

- Gecelik kültürün 1,5 mL'si 1,5 mL tüpe transfer edilerek 1 dk 16000 g'de santrifüj yapılmıştır ve sıvı tamamen dökülmüştür.
- Hücre peleti üzerine 200 µL PD1 eklenip iyice karıştırılmıştır.
- Karışıma 200 µL PD2 eklenerek nazikçe 10 kez alt üst edildikten sonra 2 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Karışıma 300 µL PD3 eklenerek nazikçe 10 kez alt üst edilmiş ve 16000 g'de 8 dk santrifüjlenmiştir.
- Süpernatant PDH Spin kolona transfer edilmiş ve 16000 g'de 30 saniye santrifüjlenmiştir.
- Alttaki sıvı atılarak kolona 600 µL "yıkama tamponu" eklenmiş ve 16000 g'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. (Bu işlem 2 kez tekrarlanır)
- Alttaki sıvı atılarak yıkama tamponunun kalan miktarını çıkarmak için 16000 g'de 3 dk santrifüj yapılmıştır.

- Kolon 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve kolonun tam merkezine 50 µL steril saf su eklenmiş ve 50°C’de 2 dk bekletilmiştir.
- 16000 g’de 2 dk santrifüj yapılarak plazmid DNA’lar saflaştırılmıştır. Saflaştırılan plazmidin konsantrasyonu nanodropta 104 ng/µl olarak ölçülmüş ve -20°C’ye kaldırılmıştır.

3.1.2.2. *pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen Plazmid DNA’sının E. coli Origami 2 Hücrelerine Transferi ve Ekspresyon Çalışmaları*

Protein ekspresyon çalışmaları için *E. coli Origami 2* suşu kullanılmıştır. -80°C derin dondurucudan çıkarılan stok hücreler 12.5 µg/mL tetrasiklin, 50 µg/mL streptomisin içeren 4 mL’lik LB besiyerine inoküle edilerek bir gece 37°C’de 240 rpm’de yetiştirilmiştir. Daha sonra hızlı kompetent hücre hazırlama protokolüne uygun şekilde hücreler kompetent hale getirilmiştir.

Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması

FSB çözeltisi

7,24 g KCl, 7.5 g CaCl₂.2H₂O, 100 g gliserol, 10 mL 1 M (pH:7.5) KCH₃COO alınarak pH:6,5’e ayarlanmıştır ve hacim 1 L’ye tamamlanmıştır ve otoklavlanmıştır.

50 mg/mL streptomisin stok çözeltisi

0,5 g streptomisin 10 mL saf suda çözölmüş ve 0,2 µm’lik filtreden geçirilerek ependorf tüplerine bölünmüştür. Tüpler -20°C’ye kaldırılmıştır.

12,5 mg/mL tetrasiklin stok çözeltisi

1,25 g tetrasiklin 10 mL etanolde çözölmüş ve 0,2 µm’lik filtreden geçirilerek ependorf tüplerine bölünmüştür. Işıktan etkilendiği için tüpler alüminyum folyo ile sarılarak -20°C’de saklanmıştır.

%20 L-arabinoz stok çözeltisi

2 g L-arabinoz 10 mL saf suda çözölmüş ve 0,2 µm’lik filtreden geçirilerek ependorf tüplerine bölünmüştür.

Prosedür

- 50 mL steril LB (Luria Bertani) besi yeri bulunan iki tane erlene gecelik kültürden 600µl alınarak eklenmiş ve 37°C ve 240 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır.

- 600 nm’de absorbans yaklaşık olarak 0,6 olduğunda erlenler inkübatörden alınmıştır ve +4°C 5000 rpm’de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Süpernatant atılmıştır. Pelet üzerine 50 mL soğuk FSB (dondurulmuş saklama tamponu) çözeltisi eklenmiş ve vortekslenmiştir. Sonrasında 1 saat buz banyosunda bekletilmiştir.
- 1 saatin sonrasında; +4°C, 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılmıştır. Pelet üzerine 8 mL soğuk FSB çözeltisi eklenmiş hassas bir şekilde pelet süspanse hale getirilmiştir.
- Peletin tamamı çözününce üzerine 560 µL DMSO eklenerek, 3 saat buza gömülmüştür. 3 saatin sonrasında kompetent hücre hazır hale gelmiştir.

Kompetent hücrelere pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen plazmid DNA’sının transferi başlık 3.1.2.1’de anlatılan protokole göre yapılmıştır. Transformasyonun sonrasında hücreler 12.5 µg/mL tetrasiklin, 50 µg/mL streptomisin, 100 µg/mL ampicilin antibiyotiği bulunan LB Agar besiyerine yayma yöntemiyle ekilmiştir ve bir gece 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Çoğalan hücrelerden birer koloni olarak 4 mL’lik antibiyotikli LB besiyerine inoküle edilmiş ve bir gece 37°C’de 240 rpm de inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler 600 mL antibiyotikli LB bulunan 2 L’lik steril erlenlere inoküle edilmiştir. Her saat 600 nm’deki absorbansları okunmuş ve OD:05-0,6 olduğunda 600 µl L-arabinoz (%20 w/v) ilave edilerek 3 saatlik inkübasyona bırakılmış ve 1. ve 2. saatte de ek olarak 300 µl L-arabinoz eklenmiştir. 3. saatin sonrasında erlenler alınarak, 8000 rpm’de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Toplanan hücreler -20°C’de saklanmıştır.

3.1.2.3. *E. coli Origami 2 Hücrelerinin Parçalanması ve Proteinin Afinite Kromatografisiyle Saflaştırılması*

Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması

Yıkama Tamponu (Yıkama tamponu) (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8.0): 1,21 g Tris, 14,61 g NaCl, 0,34 g imidazol son hacim 500 mL olacak şekilde çözülmüştür.

Elüsyon tamponu (Elution Tampon): (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 300 mM imidazol, pH 8.0): 1,21 g Tris, 14,61 g NaCl, 10,2 g imidazol son hacim 500 mL olacak şekilde çözülmüştür.

PMSF (Fenil metil sülfonil florit) stok çözeltisi: 0,174 g PMSF 10 mL etanol ile çözülmüştür.

Benzamidin stok çözeltisi: 174,63 mg benamidin hidroklorid monohidrat son hacim 10 mL olacak şekilde saf suda çözülmüştür.

Prosedür

-20°C’de saklanan hücreler çıkarılarak buza gömülmüştür. Üzerine yıkama tamponundan 40 mL eklenerek süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyona 100 mM bezamidin ve 100 mM PMSF’den 100 µL eklenerek buz üzerine konulmuştur. Buz üzerindeki hücreler sonikatörle 45 dakika parçalanmıştır. 6000 rpm’de 10 dakika santrifüj yapılmış ve süpernatant kısım alınmıştır. Alınan süpernatant 30000 rpm ve +4°C’de 60 dk santrifüjlenerek, karışımdaki hidrofobik proteinler ve diğer hidrofobik hücre materyalleri çöktürülmüştür. Sonrasında süpernatant kısım alınmış ve afinite kromatografisine geçilmiştir.

Afinite kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak Ni-NTA agaroz rezin ve kolondan elüsyon için imidazol içeren elüsyon tamponu kullanılmıştır. Önce küçük bir polikarbonat kolon içerisine Ni-NTA agaroz (Qiagen) 500 µl konulduktan sonra, kolon yıkama tamponuyla yıkanmıştır. Santrifüj sonrasında alınan protein karışımı kolona tatbik edilmiştir ve kolondan gelen bütün fraksiyonlar toplanmıştır. Protein yüklenmiş kolon 20 mL yıkama tamponuyla yıkanarak kolonda zayıf tutunmuş diğer proteinlerin ayrılması sağlanmıştır. Sonrasında elüsyon tamponuyla kolona tutunmuş olan protein ayrı fraksiyonlar şeklinde elüe edilmiştir.

3.1.2.4. Saflaştırılan Proteinin SDS-PAGE’de (Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) Analizi

Gerekli çözeltilerin hazırlanması

SDS-PAGE Alt Jel Hazırlama Tamponu: 182 g Tris (1,5 M), 4 g SDS (%0,4) 1000 mL saf suda çözülerek pH:8,8 olarak ayarlanmıştır.

SDS-PAGE Üst Jel Hazırlama Tamponu: 60,5 g Tris (1,5 M), 4 g SDS (%0,4) 1000 mL saf suda çözülerek pH:6,6 olarak ayarlanmıştır.

SDS-PAGE Yürütme jeli: 2,7 mL %40 akrilamid, 2,25 mL alt tampon, 4 mL su, 50 µL %10 APS ve 20 µL TEMED.

SDS-PAGE Yükleme jeli: 0,35 mL %40 akrilamid, 1 mL üst tampon, 2,55 mL su, 50 µL %10 APS ve 10 µL TEMED.

SDS-PAGE Elektroforez Tamponu (1X): 3 g Tris, 14,4 g Glisin, 1 g SDS son hacim 1 L olacak şekilde saf su eklenerek hazırlanmıştır.

SDS-PAGE Örnek Yükleme Tamponu (2X): 0,6 mL 1 M Tris-HCl (pH:6,8), 5 mL gliserol (%50), 2 mL %10'luk SDS, 0,5 mL β -ME (β - Merkaptotetanol), 1 mL %1'lik Bromfenol mavisi ve 0,9 mL saf su karışımından hazırlanmıştır.

Amonyum Persülfat (APS-%10): 0,1 g APS 1 mL saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Jel boyama (Staining) Çözeltisi: 0,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 mL metanol içerisinde çözülüp filtre kâğıdından süzildükten sonra, karışımın üzerine 100 mL asetik asit ve 450 mL saf su eklenerek hazırlanmıştır

Destaining Çözeltisi: 100 mL metanol, 100 mL asetik asit ve 800 mL saf su karışımından hazırlanmıştır.

Prosedür

Öncelikle ayırma jeli hazırlanmıştır. Amonyum persülfat ve TEMED en son eklenmiştir. Solüsyon, cam plakaları arasındaki boşluğa pipetlenmiş ve üzerine izopropanol eklenmiştir ve 20 dk beklenmiştir. 20 dk sonra izopropanol uzaklaştırılmıştır. Yükleme jeli hazırlanıp cam plaka arasına pipetlenmiş ve tarak yerleştirilmiştir. 20 dk sonra jel hazır hale gelmiştir. Kolondan elüe edilen her fraksiyondan alınan 100 μ L'lik numuneler 100 μ L SDS-PAGE örnek yükleme tamponuyla karıştırılıp, 100°C'de 3 dakika denatüre edilerek önceden hazırlanan SDS-PAGE jelinin kuyucuklarına yüklenmiştir. SDS-PAGE tamamlandıktan sonra saf su ile yıkanan jel sonrasında staining çözeltisi ile boyanmıştır. Boyanan jel destain çözeltisi ile muamele edildikten sonra fotoğrafı çekilmiştir.

3.1.2.5. Safılaştırılan Proteinin Diyali

Protein örneğinin bir kısmı imidazol gibi safsızlıklardan uzaklaştırmak için gece boyu +4°C'de diyalize (Spectra/por MWCO=6-8000) bırakılmıştır. Diyaliz çözeltisi olarak 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl (pH:8,0) çözeltisi kullanılmıştır. Protein konsantrasyonu 280 nm absorbsans değeri ölçülerek hesaplanmıştır.

Safılaştırılan protein örneği ayrıca %10'luk doğal jel elektroforezinde de analiz edilmiştir.

%10'luk doğal jel için gerekli çözeltilerin hazırlanması

Yürütme jeli için: 4,275 mL, 0,375 M Tris-HCl pH:8,8, 0,67 mL Akrilamid/Bis-akrilamid (30%/0,8% w/v), 0,05 mL 10% (w/v) amonyum persülfat, 5 μ L TEMED.

Ayırma jeli için: 6,49 mL, 0,375 M Tris-HCl pH:8,8, 3.4 mL Akrilamid/Bis-akrilamid (30%/0,8% w/v), 100µL 10% (w/v) amonyum persülfat, 10µL TEMED.

Örnek tampon (2x): 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, %25 gliserol, % 1 Bromophenol Mavisi

Elektroforez Tamponu (1X): 25 mM Tris, 192 mM Glisin

Prosedür:

Öncelikle ayırma jeli hazırlanmıştır. Amonyum persülfat ve TEMED en son eklenmiştir. Solüsyon, cam plakaları arasındaki boşluğa pipetlenmiştir ve üzerine izopropanol eklenmiştir ve 20 dk beklenmiştir. 20 dk sonra izopropanol uzaklaştırılmıştır. Yükleme jeli hazırlanıp cam plaka arasına pipetlenmiş ve tarak yerleştirilmiştir. 20 dk sonra jel hazır hale gelmiştir. 10 µL örnekten alınarak 10 µL örnek yükleme tamponuyla karıştırılıp jelin kuyucuklarına yüklenmiştir. Jel tamamlandıktan sonra UV ışık altında görüntüsü alınmış ve saf su ile yıkanan jel sonrasında staining çözeltisi ile boyanmıştır. Boyanan jel destain çözeltisi ile muamele edildikten sonra fotoğrafı çekilmiştir.

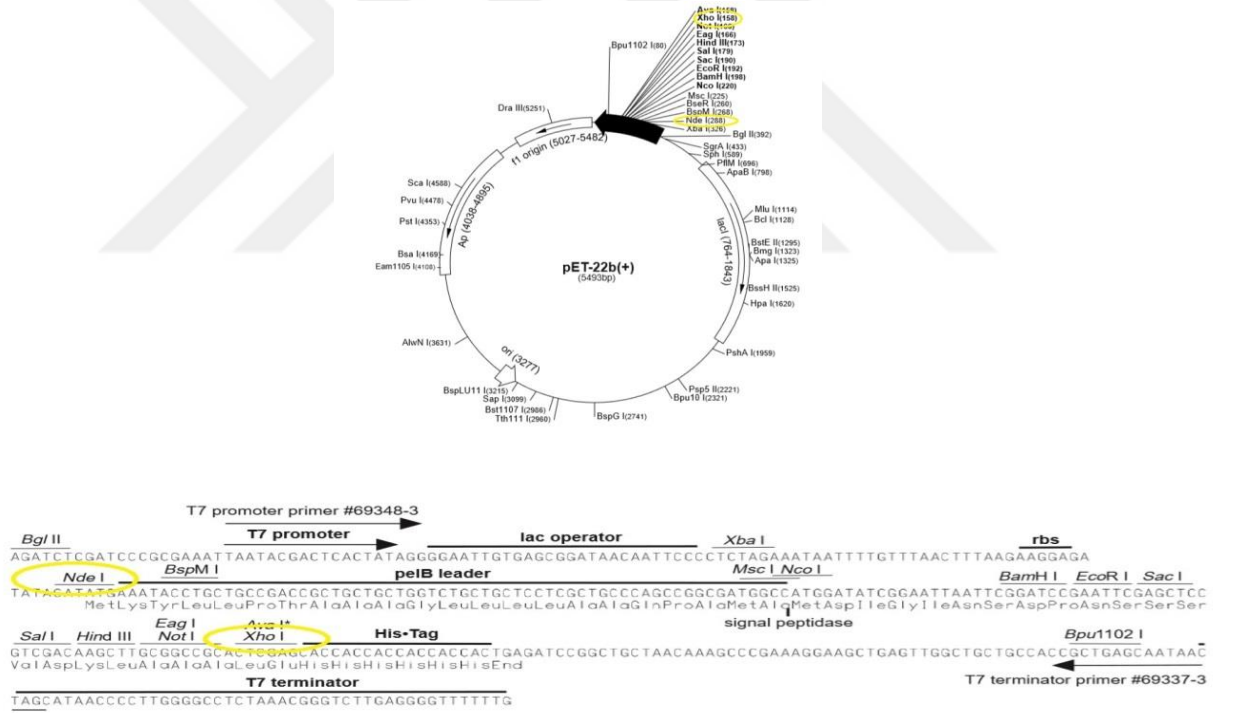
3.1.2.6. Saflaştırılan Proteinin Western Blotlama ile Karakterizasyonu

Elde edilen protein örnekleri ek olarak His tag antikoru kullanılarak western blotlama ile de analiz edilmiştir. İlk olarak protein örnekleri %12'lik SDS-PAGE'de yürütülmüştür. Jelin her kuyucuğuna 50 µg olacak şekilde eşit miktarda protein yüklenmiştir. 200V'da 60 dk yürütülen jeller alınarak PVDF membranlara aktarılmıştır. PVDF membranlara transfer BioRad Trans-Blot Turbo ile gerçekleştirilmiştir. Transfer işleminde Bjerrum Schafer-Nielsen tamponu (48 mM Tris, 39 mM Glisin, pH 9.2 ve %20 metanol) kullanılmıştır. PVDF membran 1 dk metanolda bekletildikten sonra transfer tamponu içine alınmış ve aynı tampon içerisine jel de eklenerek 15 dk bekletilmiştir. Transfer için kullanılan filtre kağıtları da işlemiden önce transfer tamponuyla ıslatılmıştır. Hazırlanan transfer sandiviçi cihaza yerleştirilmiş ve transfer 25 V, 1.3 mA ve 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir. Membranlar TBST (Tween 20 içeren Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi, "Tris buffered saline with Tween 20") içinde hazırlanmış %5 yağsız süt tozunda 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir. (TBST: (20mM Tris (pH:7,5), 150mM NaCl, %0,1 Tween20), Bloklanan membranlar gece boyu +4°C'de primer antikor 6xHisTag antikoru ile (GeneTex-GTX115045, (1:5000) ile inkübe edilmiştir. Primer antikorlar uzaklaştırılarak membranlar TBST ile 5 kez 5 er dakika yıkanmış ve sekonder antikor Goat anti-rabbit IgG H&L (Abcam-ab205718, 1:10000) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 1 saatin sonunda membranlar yeniden TBST ile yıkanmıştır.

Daha sonra membranlar kemüliminesans görüntüleme için ayrı bir yere alınarak üzerlerine karanlık ortamda geliştirilmiş kemilüminesans (ECL) substratı eklenerek 5 dk bekletildi. 5 dk sonunda asetat filmler arasına alınan membranlardaki antikora spesifik protein bantları ChemiDoc™ görüntüleme sistemi (Bio-Rad) ile görüntülenmiştir.

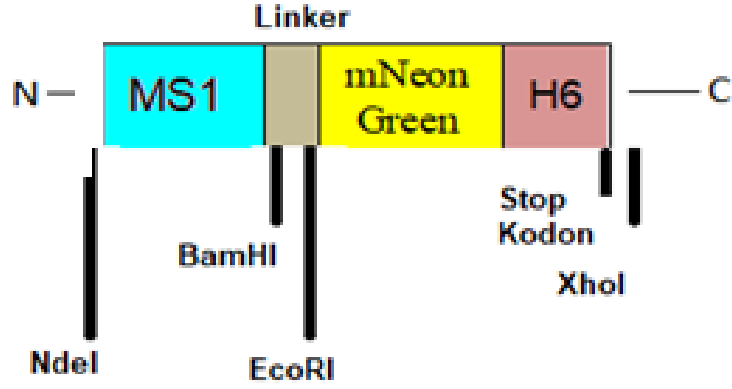
3.2. MS1-MNEONGREEN PROTEİNİNİN ÜRETİLMESİ

MS1-mNeonGreen proteinin rekombinant olarak üretilmesinde ekspresyon vektörü olarak pET22b seçilmiştir. Bu vektör pBR322 orijinlidir. IPTG (İzopropil β -D-1 tiyogalaktopiranozid) ile indüklenebilir ve ampisilin direç geni taşır. pET22b vektörü ve çoklu klonlama bölgesi Şekil 3.6’da verilmiştir. Bu vektöre istenilen nükleotid dizisinin klonlanması *NdeI* ve *XhoI* restriksiyon kesim bölgeleri arasında yapılacak şekilde dizayn edilmiştir.



Şekil 3.6: pET22b vektörü ve çoklu klonlama bölgesi.

MS1-mNeonGreen proteinin rekombinant olarak üretilmesinde, self-assembly nanoyapıların oluşturulması için tasarlanan yapı kalıp olarak kullanılmıştır. Şekil 3.2’deki yapı referans alınarak, *NdeI* ve *XhoI* restriksiyon enzim kesim bölgeleri kullanılmış ve bu dizinin pET22b vektör sistemine klonlanması gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak Şekil 3.7’de şematik olarak gösterilen proteini üretecek rekombinant plazmid oluşturulmuştur.



Şekil 3.7: MS1-mNeonGreen proteininin şematik gösterimi.

3.2.1. MS1-mNeonGreen nükleotid dizisinin pET22b vektörüne klonlanması

3.2.1.1. Restiriksiyon Enzimleri ile Kesim

Tablo 3.1'deki gibi olmak üzere, tüpler hazırlanıp vortekslenmiştir. Sonrasında 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Her 45 dk'da bir spin yapılarak 4 saat boyunca inkübasyon sürdürülmüştür.

Tablo 3.1: pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen ve pET22b plazmid DNA'larının restriksiyon kesimi için gereken madde miktarları.

pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen için Kesim		pET22b Vektörü için Kesim	
28	µl	pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen plazmid DNA	100 ng/µl
20	µl	pET22b plazmid DNA	100 ng/µl
4	µl	10X Tampon H (Takara)	
4	µl	BSA (10 mg/ml)	
2	µl	NdeI (400 U/µl)	
2	µl	XhoI (5000 U/µl)	
3	µl	10X Tampon H (Takara)	
3	µl	BSA (10 mg/ml)	
2	µl	NdeI (400 U/µl)	
2	µl	XhoI (5000 U/µl)	

4 saat sonra, pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen plazmidi için yapılan kesim %1'lik agaroz jelde analiz edilmiştir. (Agaroz Elektroforez Jeli: 1 g agaroz üzerine 100 mL 1x TAE tamponu eklenmiş ve mikrodalga fırında eritildikten sonra üzerine 1 µL etidyum bromür eklenerek kasete dökülmüştür.)

MS1-mNeonGreen (840 bç) jelden kesilerek alındıktan sonra “Biobasic Gel and PCR Clean-Up” kiti ile protokole uygun bir şekilde saflaştırılmıştır. Protokol aşağıdaki gibidir:

1. 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiş ve karışımın her 100 mg’a 300mL olacak şekilde üç katı kadar “Cleanup Solution” eklenerek, 60 °C 10 dk boyunca ara ara karıştırılarak jelin erimesi sağlanmıştır.

1. Karışım EZ-10 Spin kolona eklenmiş ve 2 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında 2 dk 10000 rpm (8000 g)’de santrifüjlenmiştir.
2. Alttaki sıvı atılır. Kolona 750 µL “Yıkama tamponu” eklenerek 2 dk 10000 rpm (8000 g)’de santrifüj yapılmıştır. Alttaki sıvı atılarak kolon aynı tüpe tekrar konulmuştur.
3. Kolona 750 µL “Yıkama tamponu” eklenmiş ve 2 dk 10000 rpm (8000 g)’de santrifüj yapılmıştır. Alttaki sıvı atılarak Yıkama tamponu’nın kalan miktarını çıkarmak için 10000 rpm de 1 dk santrifüjlenmiştir.
4. Kolon 1,5 mL temiz Eppendorf tüpüne transfer edilmiştir. Kolonun merkezine 30-50 µL “Elution Tampon” ya da su eklenerek 50°C’de 2 dk bekletilmiştir.
5. 10000 rpm (8000 g)’de 2 dk santrifüjlenmiştir.

pET22b için yapılan 4 saatlik kesim sonucunda elde edilen ürün ise “Biobasic Gel and PCR Clean-Up” kiti ile protokole uygun bir şekilde saflaştırılmıştır. Protokol aşağıdaki gibidir:

1. DNA karışımı 1,5 mL Eppendorf tüpüne transfer edilmiş ve karışımın hacminin 3 katı kadar “Cleanup Solution” eklenmiştir.
2. Karışım EZ-10 Spin kolona eklenerek 2 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında 2 dk 10000 rpm (8000 g)’de santrifüj yapılmıştır.
3. Alttaki sıvı atılmış, kolona 750 µL “Yıkama tamponu” eklenerek 2 dk 10000 rpm (8000 g)’de santrifüj yapılmıştır. Alttaki sıvı atılmış ve kolon aynı tüpe tekrar konulmuştur.
4. Kolona 750 µL “Yıkama tamponu” eklenir ve 2 dk 10000 rpm (8000 g)’de santrifüj yapılmıştır. Alttaki sıvı atılmış ve Yıkama tamponu’nın kalan miktarını çıkarmak için 10000 rpm de 1 dk santrifüj yapılmıştır.
5. Kolon 1,5 mL mikrotüpe transfer edilmiştir. Kolonun merkezine 30-50 µL “Elution Tampon” ya da su eklenerek, 50°C’de 2 dk bekletilmiş ve 10000 rpm (8000 g)’de 2 dk santrifüjlenmiştir.

3.2.1.2. DNA Ligasyonu

T4 DNA Ligaz kullanılarak ligasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ligasyon karışımı için bileşenler Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2: MS1-mNeonGreen ve pET22b plazmid DNA'sının ligasyon için gereken madde miktarları.

Ligasyon Karışımı I	Ligasyon Karışımı II
0,5 µl pET22b plazmiti 80 ng/µl	2,5 µl pET22b plazmiti 80 ng/µl
3 µl 10X T4 DNA Ligaz Tamponu (Takara)	3 µl 10X T4 DNA Ligaz Tamponu (Takara)
20,5 µl MS1-mNeonGreen 90 ng/µl	18,5 µl MS1-mNeonGreen 90 ng/µl
1 µl T4 DNA Ligaz 350 U/µL	1 µl T4 DNA Ligaz 350 U/µL

Tablo 3.2.'deki gibi hazırlanan ligasyon karışımının inkübasyonu +18°C'de gece boyu gerçekleştirildikten sonra transformasyon işlemlerinde kullanılıncaya kadar +4°C'de saklanmıştır.

Ligasyon ürünleri başlık 3.1.2.1'deki protokole uygun şekilde *E. coli DH5α* hücrelerine transfer edilmiş ve 100 µg/mL ampisilin antibiyotiği içeren LB agar besiyeri üzerine yayılmıştır. Gece boyu inkübasyonun ardından petriden 11 tane koloni alınarak 100 µg/mL ampisilin antibiyotiği içeren 4 mL'lik LB sıvı besiyerleri içerisine inoküle edilip 37°C de gece boyu inkübe edilmiştir. Bu hücrelerden plazmid DNA izolasyonu "Genaid Plasmid DNA Purification" kiti kullanarak protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.3. Klonlamanın Doğrulaması (Doğrulama Restriksiyon Kesimi ve DNA Dizileme)

Plazmidler *E. coli DH5α* hücrelerinden saflaştırıldıktan sonra istenen nükleotid dizisinin plazmide klonlanıp klonlanmadığını anlamak amacıyla doğrulama restriksiyon kesimi gerçekleştirilmiştir. Tablo 3.3'te doğrulama kesimi için kullanılan bileşenler ve miktarları verilmiştir.

Tablo 3.3: Doğrulama restriksiyon kesimi için gereken madde miktarları.

pET22b Vektör Sistemi İçin Kesim
18 µl Plazmit DNA 100 ng/µl
2,5 µl 10X Tampon M (Takara)
2,5 µl BSA (10 mg/ml)
1 µl <i>XbaI</i> (3000 U/µl)
1 µl <i>XhoI</i> (5000 U/µl)

Tablo 3.3'teki gibi olmak üzere, 11 plazmid DNA için tüpler hazırlanıp vortekslenmiştir. Sonrasında 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Her 45 dk'da bir spin yapılarak 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 2 saat sonra kesim ürünleri %1'lik agaroz jelde analiz edilmiştir.

Doğrulama kesim sonucuna göre klonlandığı düşünülen plazmid DNA'lerden 3, 10 ve 11 numaralı olanlar T7 promoter primeri ile dizi analizi yapılmak üzere DNA dizilemeye gönderilmiştir. Dizileme sonucu doğru klonlandığı görülen pET22b-MS1-mNeonGreen-11 numaralı plazmidi ile ekspresyon çalışmalarına devam edilmiştir.

3.2.2. pET22b-MS1-mNeonGreen-11 Plazmid DNA'sının *E. coli BL21 pLysE* Hücrelerine Transferi ve Ekspresyon Çalışmaları

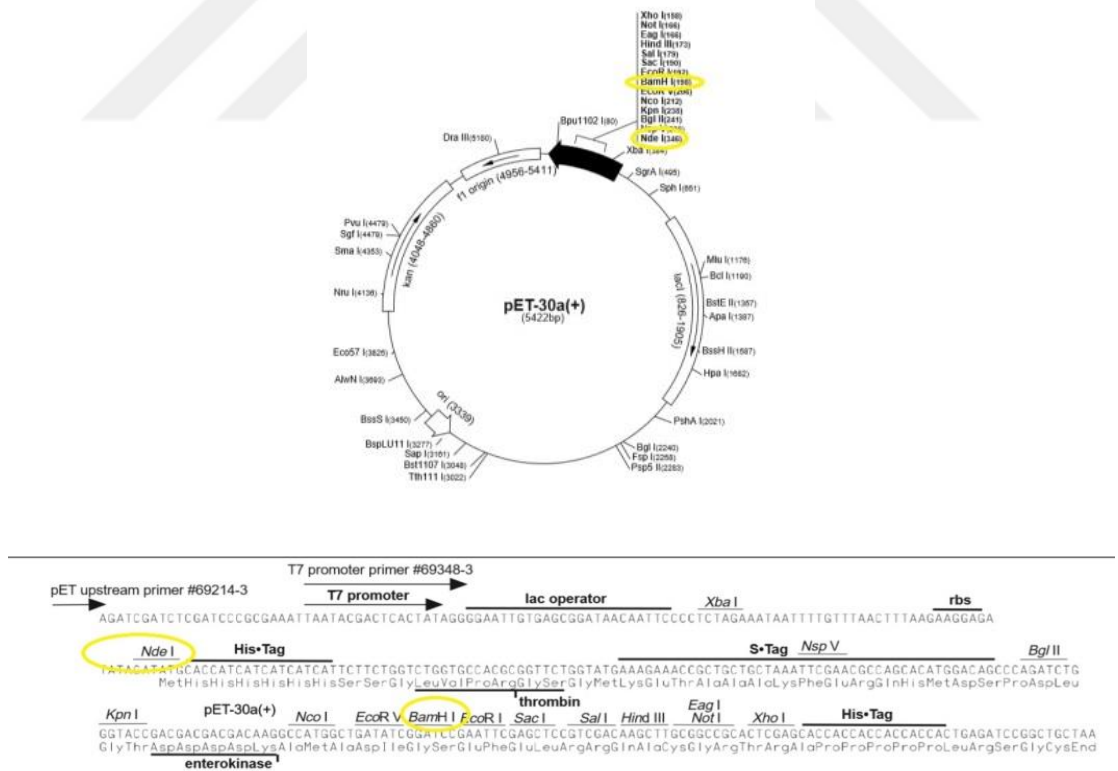
Protein ekspresyon çalışmaları için *E. coli BL21 pLysE* suşu kullanılmıştır. -80°C derin dondurucudan çıkarılan stok hücreler 34 µg/µl kloramfenikol içeren 4 mL'lik LB besiyerine inoküle edilerek bir gece 37°C'de 240 rpm'de yetiştirilmiştir. Daha sonra kompetent hücre hazırlama protokolüne uygun şekilde hücreler kompetent hale getirilmiştir. Kompetent hücrelere pET22b-MS1-mNeonGreen-11 plazmid DNA'sının transferi başlık 3.1.2.2'de anlatılan protokole göre yapılmıştır. Transformasyonun sonrasında hücreler 34 µg/µL kloramfenikol ve 100 µg/mL ampisilin antibiyotiği bulunan LB Agar besiyerine yayma yöntemiyle ekilmiştir ve bir gece 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Çoğalan hücrelerden birer koloni olarak 4 mL'lik antibiyotikli LB besiyerine inoküle edilmiş ve bir gece 37°C'de 240 rpm de inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler 600 mL antibiyotikli LB bulunan 2 L'lik steril erlenlere inoküle edilmiştir. Her saat 600 nm'deki absorbansları okunmuş ve OD₆₀₀:0,5-0,6 olduğunda 600 µl 1M IPTG ilave edilerek 3 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 3. saatin sonrasında erlenler alınarak, 8000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Toplanan hücreler -20°C'de saklanmıştır.

E. coli BL21 *pLysE* hücrelerinin parçalanması ve proteinin afinite komatografisiyle Saflaştırılması başlık 3.1.2.3'e göre yapılmıştır. Saflaştırılan protein %12'lik SDS-PAGE'de analiz edilmiştir. Daha sonra protein gece boyu +4°C'de diyalize (Spectra/por MWCO=6-8000) bırakılmıştır. Protein konsantrasyonu 280 nm absorpsans değeri ölçülerek hesaplanmıştır. Başlık 3.1.2.6'da anlatıldığı gibi elde edilen protein örnekleri ek olarak His tag antikoru kullanılarak western blotlama ile de analiz edilmiştir.

3.3. T22 PEPTİDİNİN REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ

3.3.1. TolA-III-T22 Nükleotid Dizisinin Tasarımı

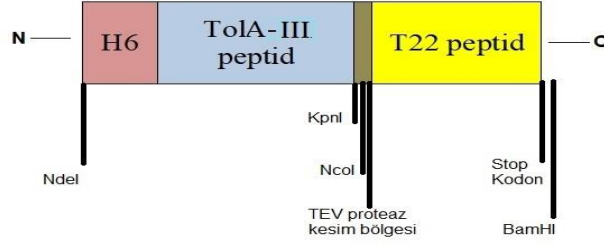
Exspresyon vektörü olarak pET30a seçilmiştir. Bu vektör IPTG ile indüklenir ve kanamisin direç geni taşır. pET30a vektörü ve çoklu klonlama bölgesi Şekil 3.8'de verilmiştir. Bu vektöre istenilen nükleotid dizisinin klonlanması *NdeI* ve *BamHI* restriksiyon kesim bölgeleri arasında yapılacak şekilde tasarlanmıştır.



Şekil 3.8: pET30a vektörü ve çoklu klonlama bölgesi.

Bu tez kapsamında pET30a vektöründe *NdeI* ve *BamHI* restriksiyon kesim bölgeleri arasında klonlanması için tasarlanan dizinin şematik gösterimi Şekil 3.9'da verilmiştir. Burada T22

peptidinin N terminal bölgesine TolA-III füzyon peptidi eklenmiştir. TolA-III füzyon peptidi, T22 peptidinin *E. coli*'nin periplasmik bölgesine yönlendirilmesi ve burada katlanmasını sağlaması amacıyla eklenmiştir. Ayrıca, protein üretimi sonrasında, TolA-III peptidinin çıkarılması için iki peptid arasına TEV proteaz kesim bölgesi eklenmiştir.



Şekil 3.9: T22 peptidinin rekombinant olarak üretilmesi için tasarlanan nükleotid dizisinin şematik gösterimi.

Şekil 3.9'da şematik olarak gösterilen yapının üretimi için gerekli olan DNA dizisi başlık 3.1.1'de anlatılan kodon optimizasyonu, restriksiyon kesim bölgeleri gibi hususlar dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan nükleotid dizisi ve bu dizinin kodladığı aminoasit dizisi Şekil 3.10'da verilmiştir.

A

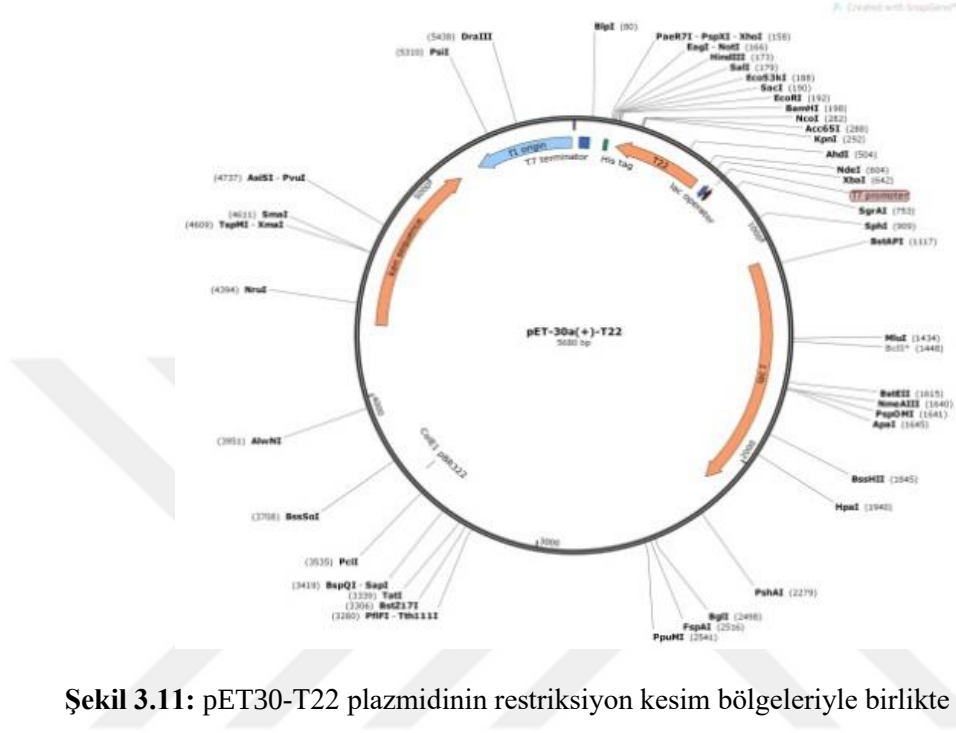
CAT	ATG	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	AAC	AAT	GGC	GCA	TCA	GGG	GCC
GAT	ATC	AAT	AAC	TAT	GCC	GGG	CAG	ATT	AAA	TCT	GCT	ATC	GAA	AGT
AAG	TTC	TAT	GAC	GCA	TCG	TCC	TAT	GCA	GGC	AAA	ACC	TCT	ACG	CTG
CGC	ATA	AAA	CTG	GCA	CCC	GAT	GGT	ATG	TTA	CTG	GAT	ATC	AAA	CCT
GAA	GGT	GGC	GAT	CCC	GCA	CTT	TCT	CAG	GCT	GCG	TTG	GCA	GCA	GCT
AAA	CTT	GCG	AAG	ATC	CCG	AAA	CCA	CCA	AGC	CAG	GCA	GTA	TAT	GAA
GTG	TTC	AAA	AAC	GCG	CCA	TTG	GAC	TTC	AAA	CCG	GGT	GGG	GGA	TCT
GGT	ACC	CCA	TGG	GAA	AAT	TTA	TAT	TTC	CAA	GGT	CGT	CGT	TGG	TGC
TAC	CGT	AAA	TGC	TAC	AAA	GGT	TAC	TGC	TAC	CGT	AAA	TGC	CGT	TGA
GGA	TCC													

B

HHHHHH	NNGASGADINNYAGQIKSAIESKFYDASSYAGKTSTLRIKLAPDGMLLDIKPEGG
DPALSQAALAAAKLAKIPKPPSQAVYEVFKNAP	LDFKPGGGSGTPWENLYFQGR
YKGYCYRKCR	RRWCYRKC

Şekil 3.10: T22 peptidinin rekombinant olarak üretilmesi için (A) tasarlanan nükleotid dizisi ve (B) bu dizinin kodladığı amino asit dizisi.

Biyoinformatik araçlarla düzenlenen gen dizisi Biomatik firmasına sentez ettirilmiştir. Biomatik tarafından sentezlenip gönderilen “pET30-T22” plazmidinin restriksiyon kesim bölgeleriyle birlikte gösterimi Şekil 3.11’de verilmiştir.



Şekil 3.11: pET30-T22 plazmidinin restriksiyon kesim bölgeleriyle birlikte gösterimi.

3.3.2. TolA-III-T22 Proteinin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

Şekil 3.11’deki plazmid kullanılarak ve başlık 3.1.2.3’teki prosedürler uygulanarak *E. coli* BL21 *plySE* hücrelerinde protein ekspresyon ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılma sonrası elde edilen fraksiyonların %12’lik SDS-PAGE’de analizi gerçekleştirilmiştir

SDS-PAGE analizinde TolA-III-T22 proteinin ultrasantrifüj sonrası süpernatantta düşük miktardadır. Proteinin büyük çoğunluğu inklüzyon cisimcikleri şeklinde pelette çökmüştür. Proteinin inklüzyon cisimciklerinden yeniden kazanımı için aşağıdaki prosedürler uygulanmıştır.

İnklüzyon cisimciklerinden proteinin yeniden kazanımı için kullanılan prosedür 1 (Melissis vd., 2010).

Gerekli çözeltilerin hazırlanması

Süspansiyon Tampon: 50mM Tris-HCl (pH:8,0), 1mM DTT, 2mM PMSF olacak şekilde distile suda çözöldü.

Resüspansiyon Tampon: 50mM Tris-HCl (pH:8,0), %2,5 Triton X-100, %20 sükröz olacak şekilde distile suda çözöldü.

Solubilizing Tampon: 50mM Tris-HCl (pH:8,0) 8M Üre pH:8,0 olacak şekilde distile suda çözöldü.

Refolding Tampon: 100mM Tris-HCl, 10mM DTT, %20 gliserol pH:8,0 olacak şekilde distile suda çözöldü.

Diyaliz Çözeltisi: 100mM NaCl içeren 20mM Tris HCl, pH:8,0 olacak şekilde distile suda çözöldü.

Prosedür:

- *E. coli BL21 plySE* hücrelerinde 37°C’de ve LB besiyerinde büyütölen hücreler OD:0,6 olduğunda 1 mM IPTG ile indüklenmiş ve indüklemeden 4 saat sonra toplanmıştır. Toplanan hücreler -20°C’ye kaldırılmıştır.
- -20°C’den alınan hücreler Tris-HCl tampon (50mM Tris, 0,1 mM DTT, 2mM PMSF pH:8,0) ile süspanse hale getirilmiştir. Süspanse hücrelere lizozim enzimi de eklenerek 90 dk sonikatörle parçalanmıştır. Parçalamanın ardından 12000 rpm de 15 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüjle elde edilen pelet 2 kez resüspansiyon tampon (50mM tris-HCl (pH:8,0), %2,5 Triton X-100, %20 sükröz) ile süspanse edilerek yıkanmış (5mL/g) ve pelet 12000 rpm de 15 dk santrifüjle toplanmıştır.
- Yıkanan pelet 8 M üre içeren 50mM Tris-HCl tampon (pH:8,0) ile (5mL/g) 5 saat nazıkçe karıştırılarak çözölmüştür. Sonrasında 12000 rpm’de 15 dk santrifüj yapılmıştır. Elde edilen süpernatant üzerine damla damla soğuk refolding tampon (100mM Tris-HCl, 10mM DTT, %20 gliserol (pH:8,0)) final protein konsantrasyonu 0,2 mg/mL’den az olacak şekilde eklenmiş ve 16 saat 4°C’de nazıkçe karıştırılmıştır. Sonrasında 12000 rpm de 15 dk santrifüj yapılmıştır. Sonrasında süpernatant alınarak 100mM NaCl içeren 20mM Tris HCl (pH:8,0) diyaliz edilmiştir.

- Diyaliz ürünü yükleme tamponuyla (100 mM Tris/HCl (pH:7.5)) yıkanmış Ni-NTA agaroz içeren kolana tatbik edilmiştir. Kolondan gelen bütün fraksiyonlar toplanmıştır. Protein yüklenmiş kolon 10 mM imidazol içeren 100 mM Tris/HCl (pH:8) tamponuyla yıkanarak kolonda tutunmuş diğer proteinlerin ayrılması sağlanmıştır. Sonrasında 300 mM imidazol içeren, 100 mM Tris/HCl (pH:8) tamponuyla kolona tutunmuş olan protein elüe edilmiştir (Melissis ve diğ., 2010). Toplanan her fraksiyondan alınan numuneler jel yükleme tamponuyla karıştırılıp, 100°C'de 2 dakika denatüre edilerek önceden hazırlanan SDS-PAGE jelinin kuyucuklarına yüklenmiştir.

Kullanılan ilk prosedürde elde edilen protein verimi düşük olduğu için, GE Healthcare tarafından önerilen prosedür kullanılmıştır.

Inklüzyon cisimciklerinden proteinin yeniden kazanımı için kullanılan prosedür 2

Gerekli çözeltilerin hazırlanması

Bağlama Tamponu: 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol, 6 M guanidin hidroklorür, 1 mM 2-merkaptoetanol pH:8,0 bileşenlerinden oluşmaktadır.

Yıkama tamponu: 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, 6 M üre, 1 mM 2-merkaptoetanol pH:8,0 bileşenlerinden oluşmaktadır.

Yeniden katlama (refolding) tamponu: 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, 1 mM 2-merkaptoetanol pH:8,0 bileşenlerinden oluşmaktadır.

Elüsyon Tamponu: 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 500 mM imidazol, 1 mM 2-merkaptoetanol pH:8,0 bileşenlerinden oluşmaktadır.

Prosedür

1. Adım Liziz

5ml/g pelet olacak şekilde 2 g hücre peleti üzerine 10 mL 20 mM Tris-HCl, 0,5M NaCl (pH:8,0) eklenir ve hücreler süspanse hale getirilir. Üzerine 100 µl PMSF ve 100 µl Benzamidin ve 10 mg lizozim eklenir. Bu üzerine alınan hücreler 9 döngü %90 güç ile 45dk sonikatör ile parçalanır. 12000 rpm'de +4°C'de 20 dk santrifüj yapılır.

2. Adım Yıkama

5ml/g pelet olacak şekilde soğuk 2 M üre, 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, %2 Triton X-100 pH:8,0 çözeltisi eklenerek buz üzerinde 4 döngü, %62 power 5 dk soniktörde tutularak süspanse

hale getirilir. 12000 rpm'de +4°C'de 20 dk santrifüj yapılır. Bu işlem 2. Kez tekrarlanır. Son kez Triton X-100 ve Üreyi uzaklaştırmak için 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl pH:8,0 tamponu ile aynı işlem tekrarlanır.

3. Adım Ekstraksiyon

5 mL/g pelet olacak şekilde, 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol, 6 M guanidin hidroklorür, 1 mM 2-merkaptoetanol pH:8,0 içinde pelet yeniden süspanse edilir. Oda sıcaklığında 30-60 dakika karıştırılır ve 12000 rpm'de +4°C'de 20 dk santrifüjlenir.

4. Adım Saflaştırma

- 1 mL Ni-NTA rezin kolona alınır ve kolon 5 mL distile su ile yıkanır.
- Kolon 10 mL ekstraksiyon tampon (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol, 6 M guanidin hidroklorür, 1 mM 2-merkaptoetanol pH:8,0) ile dengelenir.
- Santrifüjlenen örneğin süpernatantı kolona yüklenir.
- Kolon 10 mL 1. yıkama tamponu (Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol, 6 M guanidin hidroklorür, 1 mM 2-merkapto-etanol pH:8,0) ile yıkanır.
- Kolon 10 mL 2. Yıkama tamponu (20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, 1 mM 2-merkaptoetanol, 6 M üre pH:8,0) ile yıkanır.

5. Adım Refolding

Refolding işlemi için 2. yıkama tamponundan başlayarak 6-0 M üre gradienti oluşturur. 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, 1 mM 2-merkaptoetanol temelinde sırasıyla 6M, 5M, 4M, 3M, 2M, 1M ve 0M üre içeren tampondan 5'er mL olacak şekilde 0,1-1 mL/dk hızla kolondan geçirilir.

6. Adım Elüsyon

- 10 mL 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol, 1 mM 2-merkaptoetanol pH:8,0 ve 10 mL 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol, 1 mM 2-merkaptoetanol pH:8,0 tamponu kolondan geçirilir.
- Son olarak 20 mL 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 300 mM imidazol, 1 mM 2-merkaptoetanol pH:8,0 tamponu ile protein elüe edilir.

Elde edilen elüsyonlar %12'lik SDS-PAGE'de analiz edilmiştir.

3.3.3. TolA-III-T22 proteininden TolA-III peptidinin TEV proteaz enzimi ile kesim yoluyla çıkarılması

3.3.3.1. TEV proteaz enziminin ekspresyonu ve saflaştırılması

TolA-III-T22 proteininden TolA-III peptidinin çıkarılması için TEV proteaz enziminin rekombinant üretimi gerçekleştirilmiştir. TEV proteaz enzimi 27 kDa büyüklüğündedir. -80°C’de saklanan TEV proteaz üretici stok hücrelerden başlık 3.1.2.3’teki protokole uygun olarak TEV proteaz enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırılan TEV proteaz enzime ait fraksiyonlar %12’lik SDS-PAGE’de analiz edilmiştir.

3.3.3.2. TEV proteaz enzimi ile TolA-III-T22 proteininden TolA-III peptidinin çıkarılması

TEV proteaz enzimi ve TolA-III-T22 proteini 25mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 14mM 2-Merkaptoetanol pH:8 tamponuna karşı gece boyu +4°C’de diyaliz (MWCO=6-8000) yapılmıştır.

10X TEV tampon (250mM Tris-HCl, 1,5M NaCl, 140mM 2-Merkaptoetanol pH:8) taze hazırlanmıştır. 0,2 mg/mL konsantrasyonunda TolA-III-T22 proteini ve 1 mg/mL konsantrasyonunda TEV proteaz enzimi ile başlanmış ve Tablo 3.4’te verilen oranlarda karışım hazırlanmıştır.

Tablo 3.4: TolA-III-T22 proteininin TEV proteaz enzimi ile kesim reaksiyon koşulları.

	1	2	3	4	5	6	7	8
TolA-III-T22 proteini	-	180 µl	180 µl	170 µl	190 µl	188 µl	160 µl	198 µl
10 X TEV Tampon	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	-	10 µl	10 µl	-
TEV proteaz enzimi	10 µl	-	10 µl	20 µl	10 µl	2 µl	30 µl	2 µl
dH₂O	180 µl	10 µl	-	-	-	-	-	-

Tablo 3.4’e göre hazırlanan karışımlar 30°C’de inkübasyona bırakılan örneklerden 180 dk sonunda 10 µl örnek alınmış ve 10 µl SDS sample tampon ile karıştırılarak 2 dk 95°C’de kaynatılmıştır. Daha sonra örnekler %15’lik SDS-PAGE’de analiz edilmiştir. SDS-PAGE sonuçlarına göre 7 numaralı reaksiyon koşullarına göre hazırlana karışım 4 saat 30°C’de inkübasyona bırakılmıştır. 4. saatin sonunda reaksiyon ürünü Ni-NTA rezin içeren kolona

verilmiş ve kolonun aşağısına gelen fraksiyon toplanmıştır. Elde edilen numuneler Tricine SDS-PAGE’de analiz edilmiştir.

Tricine SDS-PAGE hazırlanışı: (Schägger, 2006)

Gerekli Çözeltiler

Anot tamponu (10 X) (Tankın içine koyulur): 1M Tris-HCl (pH:8.9)

Katot tamponu (10X) (Kuyucukların arasına koyulur): 1M Tris, 1M Tricine, %1 SDS pH:8.25

Jel tamponu (3X):3M Tris, %0,3 SDS pH:8,45

AB -3 stok çözeltisi (%49,5 T, %3 C karışımı): 100 mL suda 48 g akrilamid ve 1.5 g bisakrilamid çözündürülür.

AB-6 stok çözeltisi (%49,5 T, % 6 C karışımı): (küçük proteinlerin ve peptidlerin optimal çözünürlüğü için gerekli) 100 mL suda 46,5 g akrilamid ve 3 g bisakrilamid çözündürülür.

Örnek Yükleme Tamponu: %12 SDS, %6 2-merkaptoetanol, %30 Gliserol, %0,05 Coomassie blue G-250, 150 mM Tris-HCl (pH:7)

Tricine SDS-PAGE %4’lük yükleme jeli, %10’luk ara jel ve %16’lık ayırma jeli olacak şekilde hazırlanmıştır. 2 adet jel için hazırlanan jel bileşenleri Tablo 3.5’te verilmiştir.

Tablo 3.5: Tricine SDS-PAGE bileşenleri.

	%4 yükleme jeli	%10 Ara jel	%16 Ayırma Jeli
Jel Tampon (3X)	1,00 mL	1,66 mL	3,30 mL
AB-3	0,33 mL	1,00 mL	-
AB-6	-	-	3,30 mL
dH₂O	2,63 mL	2,31 mL	2.57 mL
Gliserol	-	-	0,79 mL
APS	30,00 µl	25,00 µl	33,30 µl
TEMED	3,00 µl	2,50 µl	3,30 µl

Reaksiyon ürünü Ni-NTA rezin içeren kolona verilmiş ve kolonun aşağısına gelen fraksiyon toplanmıştır. Tricine SDS-PAGE’de analiz edilmiştir.

3.4. SELF-ASSEMBLY PROTEİN NANOPARTİKÜLLERİN OLUŞTURULMASI

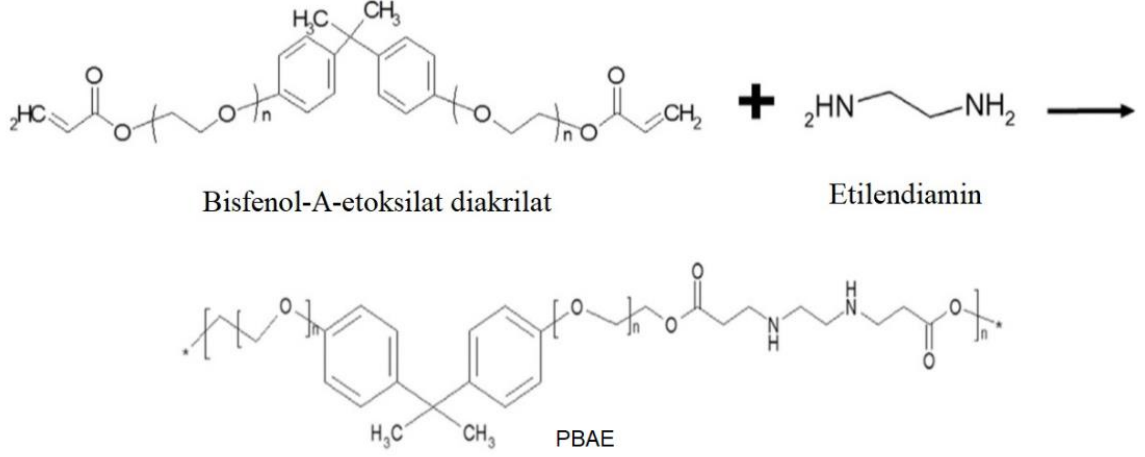
T22-MS1-mNeonGreen ve MS1-mNeonGreen proteinleri diyaliz çözeltisi olarak çeşitli tampon sistemleri kullanılarak diyalize (MWCO:6-8000 Da) bırakılmıştır. Diyaliz işlemde 250 rpm de 3 aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada oda sıcaklığında 1 saat sonrasında 16 saat +4°C’de ve son olarak da 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Diyaliz sonrası 15000 g de 15 dk santrifüj yapılarak agregatlar uzaklaştırılmıştır. Oluşturulan nanoyapıların partikül büyüklükleri, zeta potansiyelleri ve partikül boyut dağılım analizleri Zetasizer (Malvern Instruments, İngiltere) cihazında analiz edilmiştir. Nanopartiküllerin füzyon proteinlerin bir araya gelmesiyle oluştuğunu göstermek adına, nanopartiküller %1 SDS (sodyum dodesil sülfat) eklenerek 10 dk inkübasyona bırakılmış ve Zetasizer cihazında analiz edilmiştir. 166mM sodyum bikarbonat (pH:8,0) tamponuna karşı yapılan diyalizle oluşturulan nanopartiküllerin %1 SDS eklenerek 10 dk inkübasyonun ardından elde edilen partikül boyutları belirlenmiştir. Oluşturulan nanopartiküllerde monomerlere ait olan pikin varlığı görülmüştür. Monomerlerin uzaklaştırılması için jel filtrasyon kromatografisi kullanılmıştır. Jel filtrasyon kromatografisinde dolgu maddesi olarak Sefadex G-75 kullanılmıştır. 1 g Sefadex G-75 tartılıp üzerine 30 mL 166mM Sodyum bikarbonat (pH:7,4) tamponu eklenmiş ve spatül yardımıyla yavaşça karıştırılmıştır. Gece boyu +4 °C’de bekletilen karışım 166 mM Sodyum bikarbonat (pH:7,4) tamponu ile yıkanan kolona aktarılmıştır. Kolonun hacminin 2 katı kadar 166 mM Sodyum bikarbonat (pH:7,4) tamponu geçirilmiştir. Daha sonra nanopartikül karışımı kolona verilmiş ve örnek 3 fraksiyon şeklinde toplanmıştır. Daha sonra kolon 166mM Sodyum bikarbonat (pH:7,4) tamponu ile yıkanmış ve +4 °C’ye kaldırılmıştır. Elde edilen fraksiyonların boyutları Zetasizer ile analiz edilmiştir.

3.5. NANOPOLİMER TAŞIYICI SİSTEMLERİN OLUŞTURULMASI

3.5.1. Poli (β -amino ester) (PBAE) sentezi

PBAE polimeri 5 mmol bisfenol-A-etoksilat diakrilat (Sigma-Aldrich, 413550) (BFAEDA) ve 5.5 mmol etilendiamin (Sigma-Aldrich, E1521) (EDA) monomerleri kullanılarak Michael katılması reaksiyonu mekanizmasına göre gerçekleşen polikondenzasyon ile sentezlenmiştir. Monomerler 5 mL tetrahidrofuranda (THF) çözülmüş ve ortamdan azot gazı geçirerek BFAEDA üzerine EDA damla damla eklenmiştir. Daha sonra 100 rpm’de 50°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saatin sonunda polimer çözeltisi oda sıcaklığında soğutulmuş ve

soğuk eter ile çöktürülmüştür. Eter uzaklaştırılarak polimer +4°C’de saklanmıştır (Gök ve diğ., 2016). Sentezlenen PBAE’in reaksiyon mekanizması Şekil 3.12’de verilmiştir.



Şekil 3.12: PBAE sentezinin reaksiyon mekanizması.

Sentezlenen PBAE yapısı Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile analiz edilmiştir. FTIR analizi için, 1 mg polimer örneği 200 mg KBr ile iyice öğütülmüş ve tablet hazırlanmıştır. Analiz, Digilab Excalibur-FTS 3000 MX model FT-IR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve spektra 4000-400 cm⁻¹ dalga sayısında kaydedilmiştir.

3.5.2. PBAE’den Nanoçöktürme Tekniği Kullanılarak Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

1 mg/mL PBAE DMSO’da çözülmüş ve çeşitli oranlarda soğuk dH₂O’ye damla damla eklenmiş ve hızlıca 1 dk süresince vortekslenmiştir. Daha sonra nanopartiküllerin partikül büyüklükleri, zeta potansiyelleri ve partikül boyut dağılım analizleri Zetasizer cihazında analiz edilmiştir. PBAE DMSO’da çözülerek hazırlandığı için öncelikle MS1-mNeonGreen proteinin DMSO’da çökmediği konsantrasyon belirlenmiştir. Bunun için MS1-mNeonGreen proteini içerisine belirli konsantrasyonlarda DMSO eklenmiş ve 30000 g’de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatantaki protein örneğinin 280 nm dalga boyunda absorbanslarına bakılmıştır. Enkapsülasyon işlemleri için nanoçöktürme tekniği uygulanmıştır. PBAE 100 mg/mL konsantrasyonda DMSO’da çözünmüştür. Tablo 3.6’da verilen çeşitli oranlarda polimer ve protein örneği karıştırılmış hızla 1 dk vorteks yapılmıştır ve 30 dk bekletilmiştir. 30 dk sonra partiküller 20000 rpm’de 2 saat +4°C’de santrifüj yapılarak çöktürülmüştür. Süpernatant ve pelet örnekleri %12’lik SDS-PAGE’de analiz edilmiştir. SDS-PAGE görüntüsü Imagej2 programı ile analiz edilmiş ve enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır.

Tablo 3.6: MS1-mNeonGreen proteininin PBAE ile enkapsülasyonu için hazırlanan karışımlar.

	MS1-mNeon Proteini	PBAE	DMSO	25mM sodyum asetat tamponu (pH:5)
1	100 µl	-	-	100 µl
2	100 µl	-	5 µl	95 µl
3	100 µl	-	10 µl	90 µl
4	100 µl	1 µl	-	99 µl
5	100 µl	5 µl	-	95 µl
6	100 µl	10 µl	-	90 µl

3.5.3. PBAE-PLGA Nanopartiküler Sistemin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

PBAE ile nanoçöktürme tekniği kullanılarak nanopartikül hazırlanmasında enkapsülasyon verimi oldukça düşük çıkmıştır. PBAE-PLGA hibrit nanopartiküler sistem hazırlanarak enkapsülasyon verimi artırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla farklı oranlarda PLGA (Sigma-Aldrich, 719897, RG502H) ve PBAE karıştırılarak (toplam 100 mg olacak şekilde) dikloremetan (DCM) içinde çözülmüştür ve nanopartiküller ikili emülsiyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. 500 µl %2,8 polivinil alkol (PVA) içeren 1 mg/mL protein örneği, buz banyosu üzerinde bulunan ve homojenizatörle karıştırılan PBAE ve PLGA karışımının içerisine damla damla ilave edilmiştir. Sonrasında 1,5 dk 10000 rpm de homojenizatör ile karıştırmaya devam edilerek yağ içinde su (w/o) emülsiyonu hazırlanmıştır. Elde edilen emülsiyon, homojenizatörde karıştırılan 50 mL %0,4 PVA çözeltisine damla damla ilave edilerek 2,5 dk 100000 rpm de karıştırılmış w/o/w tipi emülsiyon oluşturulmuştur. Oluşan emülsiyon 100 mL %0,1 PVA içeren dilüsyon fazı ile seyreltilmiştir ve 10000 rpm'de 1,5 dk homejenizatör ile karıştırılmıştır. Elde edilen nanopartiküller manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 800 rpm de 2 saat karıştırılarak organik çözücünün uzaklaştırılması sağlanmıştır. Boş nanopartiküller hazırlanırken aynı protokol izlenmiş ve sadece 500 µl %2,8 PVA çözeltisi kullanılmıştır. Daha sonra 4000 rpm'de 4 dk santrifüj yapılarak agregatlar uzaklaştırılmış ve Zetasizer cihazında partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü yapılmıştır (Sinani ve diğ., 2017).

Enkapsülasyon veriminin hesaplanmasında 2 farklı yöntem kullanılmıştır. 1. yöntemde partiküller hazırlandıktan sonra 20000 rpm de 2 saat santrifüj edilmiş ve süpernantant alınarak süpernantanttaki serbest protein miktarı belirlenmiştir. 2. yöntemde ise partiküller içerisinde enkapsüle edilmiş protein miktarı belirlenmiştir. Bu protokole göre santrifüj ile toplanan nanopartiküller 2 kez su ile yıkandıktan sonra liyofilizatörde 24 saat tutulmuştur. İyice liyofilize

olan nanopartiküllerden 10 mg alınarak 500 µL 1N NaOH ile 15 dk sonikasyonda tutulmuş ve sonrasında 37°C’de gece boyu 180 rpm de karıştırılmaya bırakılmıştır. Gece boyu ikübasyonun ardından 1N 500 µl HCl eklenmiştir. Daha sonra protein konsantrasyonlarının belirlenmesinde “Bicinchoninic acid assay” (BCA) kiti kullanılmıştır. Bu işlem için “SMART™ BCA Protein Assay Kit” (iNtRON Biotechnology) ticari kiti kullanılmıştır. 25 µL örnek üzerine 200 µL reaktif koyularak karıştırılmıştır. Standart olarak 25, 125, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL konsantrasyonda hazırlanmış sığır serum albumini (Bovine Serum Albumin) (BSA) çözeltileri kullanılmıştır. Karışımlar 30 dakika 37°C’lık bekletilmiş ve 562 nm’de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Standart çözeltilerin absorbans değerlerinden yola çıkarak standart grafik oluşturulmuştur. Protein konsantrasyonları standart grafiğin denklemi ($y=0.001x+0.0536$, $R^2=0,997$) kullanılarak hesaplanmıştır. Enkapsülasyon verimleri hesaplanırken kontrol olarak boş nanopartiküller kullanılmıştır.

3.5.3.1. PBAE-PLGA nanopartiküler sistemin partikül boyut optimizasyonu

Başlık 3.5.3’te anlatıldığı gibi hazırlanan partiküllerde istenilen enkapsülasyon verimine ulaşılmış ancak; sistemde agregasyonların oluşumu gözlemlenmiştir. Oluşan agregatları önlemek için bu protokolda çeşitli optimizasyonlar yapılmıştır. İlk olarak PVA oranları değiştirilmiş diğer koşullar sabit tutulmuştur. Agregat oluşumu PVA oranları değiştirilerek engellenememiştir ve PVA oranları sabit tutularak homojenizasyon süreleri değiştirilmiştir. Sonuç olarak, homojenizatör ile yapılan denemelerde agregat oluşumu engellenememiştir. Bu bağlamda literatürde sonikatör ile yapılan nanopartikül hazırlama protokolleri incelenmiş ve protokollerde yapılan küçük modifikasyonlarla agregat oluşumunun en az olduğu protokol belirlenmeye çalışılmıştır. Bu protokoller de ilk aşamada sadece PLGA kullanılarak denemeler yapılmıştır. Bütün aşamalarda 1000 rpm de karışan çözeltinin içerisine emisyonlar damla damla eklenmiş sonrasında ise Tablo 3.7’de detayları verilen sonikasyon işlemleri yapılmıştır. Bütün protokollerde sonikatör (Bandelin Sonopuls HD 2070) %20 power ve 6 döngü ayarında kullanılmıştır. Kullanılan protokoller ve ayrıntıları Tablo 3.7’de verilmiştir.

Tablo 3.7: Tez çalışması kapsamında kullanılan ikili emisyon PLGA nanopartikül hazırlama protokolleri.

Protokol No	PLGA	İç PVA (%) protein çözeltilisi hacmi (mL)	1. emisyon sonikasyon süresi (sn)	2. emisyon PVA (%) -hacim(mL)	2. emisyon sonikasyon süresi (s)	Seyreltme PVA (%)-hacim(mL)	Son emisyon sonikasyon süresi (sn)	Referans
1	50 mg RG502-H (5 mL DCM içinde)	0,0 (0,5)	60,0	1,2 (10)	180,0	0,1 (40)	-	Feczko ve diğ., 2011
2	75 mg RG503-H (1 mL DCM içinde)	0,0 (1,0)	120,0	2,5 (4)	120,0	0,5 PVA (80)	-	Derman ve diğ., 2015
3	50 mg RG503 H (1 mL DCM içinde)	0,0 (1,0)	120,0	3,0 (10)	90,0	0,1 PVA (35)	-	Abamor ve diğ., 2019
4	20 mg RG502 (1 mL DCM içinde)	2,8 (0,1)	90,0	0,4 (10)	90,0	0,1 PVA (20)	-	Sinani ve diğ., 2017
5	20 mg RG502 (1 mL DCM içinde)	2,8 (0,1)	90,0	0,4 (10)	90,0	0,1 PVA (20)	30 ,0	Sinani ve diğ., 2017

Bu protokollerde ek olarak 10000 rpm 15 dk santrifüj yapılarak nanopartiküller distile su ile yıkanmış ve PVA'nın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ayrıca yıkama sonrasında da partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçülmüştür.

Daha sonra hazırlanan bu partiküllere MS1-mNeonGreen proteinin yüklenmesi ve PBAE polimerinin de yapıya katılarak hibrit nanopartikül sistemlerinin hazırlanması kısmına geçilmiştir. 4 ve 5. protokolde partikül boyutları ve hazırlama protokolü benzer olduğu için 5. protokol ileriki aşamalarda kullanılmamıştır. PLGA polimeri negatif yüklü, PBAE polimeri ve MS1-mNeonGreen proteini pozitif yüklüdür. PBAE polimerinin ve MS1-mNeonGreen proteinin her ikisinin de pozitif yüklü olması enkapsülasyon veriminin düşük olmasına neden olmaktadır. Bu yüzden PLGA ile MS1-mNeonGreen proteinin enkapsülasyonu işlemi sonrasında PBAE'nin yapıya katılmasının enkapsülasyon verimini artıracak kanaatine varılmıştır. PBAE 25mM sodyum asetat tamponunda (pH:5) 10 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Elde edilen nanopartiküller 800 rpm'de karıştırılarak organik çözücünün uçurulması aşamasında 1 saatin sonunda 300 rpm de karıştırılmış ve damla damla PBAE eklenerek 2 saat daha karıştırılmaya devam edilmiştir. Elde edilen veriler dikkate alınarak 1. ve 4. protokol de protein konsantrasyonları değiştirilerek partikül boyut ve enkapsülasyon verimleri analiz edilmiştir. Ayrıca 1. protokol temel alınarak ilk aşamada PBAE polimeri de DCM'de çözülerek PLGA-PBAE hibrit nanopartiküller hazırlanmış ve enkapsülasyon verimleri hesaplanmıştır.

3.6. ÜRETİLEN NANOPARTİKÜLLERİN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

3.6.1. Hücrelerin Kültüre Alınması

Self-assembly protein nanoyapılar ve nanopolimerlerin sitotoksik etkisinin araştırılması için HeLa (serviks kanser hücre hattı), MDA-MB-231 (meme kanseri hücre hattı), A549 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı) ve HUVEC (İnsan umbilikal ven endotel hücreleri) kullanılmıştır. Hücreler Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültür Laboratuvarından temin edilmiştir.

HeLa hücreleri ise 75 cm²'lik kültür kaplarında %10 FBS ("Fetal Bovine Serum", fetal sığır serumu), 100 U/mL penisilin, 2mM L-Glutamin, %1 non-esansiyel amino asit bulunduran EMEM besi ortamı kullanılarak çoğaltılmıştır. MDA-MB-231, A549 ve HUVEC hücreleri hücreleri 75 cm²'lik kültür kaplarında %10 FBS, 100 U/mL penisilin, 2mM L-Glutamin, bulunduran DMEM-high glucose besi ortamı kullanılarak çoğaltılmıştır.

İlk olarak hücreler için gerekli besi ortamları hazırlanmıştır. Sıvı azottan çıkartılan hücreler hızlı bir şekilde 37 °C su banyosunda çözündürülmüştür. 1 mL çözünmüş hücre 9 mL besi ortamı içerisine eklenmiştir. 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme sonrasında süpernatant atılıp 12 mL besi yeri pelet üzerine eklenerek pipetaj yapılmıştır. Daha sonra hücreler, sayılarına uygun şekilde, tek kullanımlık 75 cm² hücre kültürü flaskına aktarılmıştır. Bu işlemler tamamlandıktan sonra hücre kültürü flaskı 37°C'lık etüve kaldırılmıştır. Hücre çözöldükten 24 saat sonra hücre kültürü flaskındaki hücrelerin canlılıkları, ters faz ışık mikroskobu ile tutunma durumlarına göre kontrol edilmiştir.

3.6.2. Sitotoksosite Analizleri

Self-assembly protein nanoyapılar ve nanopolimerlerin sitotoksik etkisi MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2,5- difeniltetrazolyum) yöntemi ile belirlenmiştir (Mosmann, 1983). Bu yöntem, canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesi sonucu MTT'nin suda çözünmeyen formazan kristallerine çevirmesi ve bu kristallerin de DMSO (dimetil sülfoksit) ile çözülerek 570 nm dalga boyundaki absorbansının spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu amaçla öncelikle 75 cm²'lik hücre kültür kabı içerisindeki besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Kültür kabı içerisine 3 mL PBS eklenmiş ve yüzeydeki hücrelerin yıkanması sağlanmıştır. Daha sonra PBS ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin kültür kabı yüzeyinden kalkmalarını

sağlamak için 1,5 mL Tripsin/EDTA ilave edilerek kültür kabı inkübatöre koyulmuştur. Hücreler tamamen yüzeyden kaldırıldıktan sonra tripsin aktivitesini sonlandırmak için 8 mL serumlu besi ortamı kültür kabı içine eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Daha sonra 100 µl hücre alınarak 100 µl tripan mavisini ile karıştırılmış ve hücre sayımı Neubauer lamı ile yapılmıştır. 96 kuyucuklu kültür kaplarına 5×10^4 hücre/mL olacak şekilde 100 µl hücre ekimi yapılarak 24 saat 37°C'da ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda kültür kabındaki hücrelerden besiyortamı uzaklaştırılarak, hücrelerin üzerine farklı konsantrasyonlardaki nanopartikül içeren besi yerlerinden eklenip etüvde bekletilmiştir. Kontrol grubu için sadece besi ortamı eklenmiştir ve nanopartiküllerin içinde hazırlandığı tamponun etkisinin belirlenmesi için nanopartikül içermeyen tampon da sitotoksikite analizlerinde kullanılmıştır. Maddeler eklendikten sonraki 48. saatte ve 72. saatte hücrelerin üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 µL MTT çözeltisinden (1 mL 5 mg/mL PBS içinde MTT çözeltisinden 9 mL besi yerine eklenerek taze olarak hazırlanmıştır.) eklenmiştir. Hücreler 3 saat etüvde bekletildikten sonra, MTT çözeltisi uzaklaştırılmıştır ve her bir kuyuya 100 µL DMSO eklenmiştir. Çözelti homojen hale gelinceye kadar oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Daha sonra spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Hücrelerin canlılığı kontrol grubu hücrelerle karşılaştırılarak % cinsinden hesaplanmıştır.

$$(\% \text{ Canlılık} = (\text{Deney grubuna ait absorbans} / \text{Kontrol grubuna ait absorbans}) \times 100)$$

Daha sonra % canlılık değerleri kullanılarak GraphPad Prism 8.0.2 yazılımıyla IC₅₀ değerleri belirlenmiştir.

3.6.3. Hücre Dondurma ve Stoklama İşlemleri

Hücre pasaj sayıları artmadan dondurulmuş ve stoklanmıştır. Bu işlem için öncelikli olarak 75 cm² hücre kültür kabının içindeki besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Kültür kabına hücrelerin olmadığı yüzeyden 3 mL PBS konularak yüzey tamamen besi ortamından temizlenmiştir. PBS ortamdan uzaklaştırılmış ve 1,5 mL Tripsin/EDTA kültür kabına ilave edilmiştir. 37°C'de 2-3 dk inkübasyonun ardından hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadığı mikroskopla incelenmiş ardından tripsini inhibe etmek için üzerine 8 mL serumlu besi ortamı koyularak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve pelet üzerine 2700 µl FBS ve 300 µl DMSO koyularak pipetaj yapılmış ve 1 mL olarak 3 cryotüpe koyulmuştur. Etiketlenmesi yapılan tüpler -80°C buzdolabına koyulmuştur. 1 gece sonra sıvı azota kaldırılmıştır.

3.7. ÜRETİLEN NANOPARTİKÜLLERİN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

3.7.1. Gerçek Zamanlı Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Üretilen nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin belirlenmesi, gerçek zamanlı revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) kullanılarak apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin gen ekspresyonlarının analiziyle yapılmıştır. Bu kapsamda qRT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere tasarlanan primerler ve sekansları Tablo 3.8’de verilmiştir.

Tablo 3.8: qRT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere tasarlanan primerler ve dizileri.

Primerler	Primer sekansları
MCL-1-Foward	5’ CCAAGAAAGCTGCATCGAACCAT 3’
MCL-1-Reverse	5’ CAGCACATTCCTGATGCCACCT 3’
BCL-XL-Foward	5’ GCCACTTACCTGAATGACCACC 3’
BCL-XL-Reverse	5’ AACCAGCGGTTGAAGCGTTCCT 3’
BCL-2-Foward	5’ ATCGCCCTGTGGATGACTGAG 3’
BCL-2-Reverse	5’CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG 3’
BAX-Foward	5’ GGACGAACTGGACAGTAACATGG 3’
BAX-Reverse	5’ GCAAAGTAGAAAAGGGCGACAAC3’
P53-Foward	5’-GCCCCAACAACACCAGCTCCT-3’
P53-Reverse	5’-CCTGGGCATCCTTGAGTTCC-3’
Caspase 3-Foward	5’-ACATGGAAGCGAATCAATGGACTC-3’
Caspase 3-Reverse	5’-AAGGACTCAAATTCTGTTGCCACC-3’
Caspase 8-Foward	5’-AGAAGAGGGTCATCCTGGGAGA-3’
Caspase 8-Reverse	5’-TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC-3’
Caspase 9-Foward	5’-GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT-3’
Caspase 9-Reverse	5’-CAACGTACCAGGAGCCACTCTT-3’
CitC-Foward	5’-CGTTGTGCCAGCGACTAAAAA-3’
CitC-Reverse	5’-GATTTGGCCCAGTCTTGTGC-3’
GAPDH-Foward	5’-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3’
GAPDH-Reverse	5’-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3’

Nanopartiküllere maruz bırakılan hücreler 72. saatin sonunda bu hücrelerin üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Tripsin/EDTA kültür kabına ilave edilmiş ve 37°C’de 2-3 dk inkübasyonun ardından hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadığı mikroskopla incelenmiş ardından tripsini inhibe etmek için üzerine 8 mL besi ortamı koyulmuş ve süspanse edilmiştir. Hücre sayımı neubauer lamı ile yapılmıştır. Besi ortamı içerisindeki

hücreler 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra hücrelerden trizol ile RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Trizol ile RNA izolasyonu basamakları aşağıdaki gibidir:

- Her 10⁶ hücre için 0,35 mL Trizol eklenerek hücreler süspanse edilmiştir.
- Her 1 mL trizol için 0,2 mL kloroform eklenmiştir.
- 15 sn şiddetli bir şekilde vortekslenen örnek 3 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 12000xg’de 15 dk +4°C’de santrifüj edilmiştir.
- Üst faz alınarak her 1 mL trizol için 0,5 mL izopropanol eklenmiştir.
- 10 dakika -20 °C’de inkübe edilen örnekler 12000xg’de 10 dk +4°C’de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası süpernantant atılmış ve peletin üzerine her 1mL trizol içim 1mL %75’lik soğuk etanol eklenmiştir. Daha sonra örnekler 7.500xg’de 5 dk +4°C santrifüj edilmiş ve üst faz atılmıştır. (Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır) Pelet 10 dk oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.
- Pelet örnekleri 20 µl DEPC’li suda çözülmüştür. Daha sonra nanodrop ile RNA konsantrasyonu ve saflığı belirlenmiştir.

Elde edilen RNA örnekleri kullanılarak qRT-PCR gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak RNA örneklerinden cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 3.9’da verilmiştir.

Tablo 3.9: cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Malzemeler	Miktarları
RNA	1,0 µl
OligodT	1,0 µl
10X Revers transkripsiyon tamponu	2,0 µl
dNTP mix (10 mM)	1,0 µl
RNAz inhibitör (40U/µL)	0,2 µl
dH ₂ O	13,8 µl
Revers Transkriptaz enzimi	1,0 µl

Elde edilen cDNA’lar kullanılarak gerçek zamanlı PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. PCR için hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 3.10’da verilmiştir.

Tablo 3.10: PCR için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Malzemeler	Miktarları
Primer F	1,0 µl
Primer R	1,0 µl
10X Pfu DNA polimeraz tamponu	1,0 µl
dNTP mix (10 mM)	0,2 µl
20x Evagreen	0,5 µl
cDNA	1,2 µl
dH ₂ O	4,6 µl
Pfu DNA Polimeraz enzimi	0,5 µl

Kontrol hücrelere göre gen ekspresyonlarının relatif kantitasyonu $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduyla gerçekleştirilmiştir.

3.7.2. Western Blotlama

75 cm² flasklarda yetiştirilen hücreler IC₅₀ konsantrasyonlarında nanopartiküller ile muamele edilmiş ve 72 h sonra hücreler üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmıştır. PBS ile yıkanan hücreler tripsin muamelesi ile yüzeyden kaldırılmış ve 16000 g'de 5 dk santrifüj yapılarak toplanmıştır. Toplanan hücreler üzerine 450µl RIPA tampon eklenerek iyice vortekslenmiştir. 30 dk buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. 30 dk'lık inkübasyon süresince hücreler 10 dk aralıklarla sonik banyoda 30 sn tutulmuştur. 16000 g'de +4°C'de 20 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant ayrı bir tüpe alınarak protein konsantrasyonu BCA kiti ile belirlenmiştir. Elde edilen protein örnekleri %12'lik SDS-PAGE'de analiz edilmiştir. Jelin her kuyucuğuna 50 µg olacak şekilde eşit miktarda protein yüklenmiştir. 200V'da 60 dk yürütülen jeller alınarak PVDF membranlara aktarılmıştır. PVDF membranlara transfer BioRad Trans-Blot Turbo ile semi-dry olarak gerçekleştirilmiştir. Transfer işleminde Bjerrum Schafer-Nielsen tamponu (48 mM Tris, 39 mM Glisin, pH 9.2 ve %20 metanol) kullanılmıştır. PVDF membran 1 dk metanolda bekletildikten sonra transfer tamponu içine alınmış ve aynı tampon içerisine jel de eklenerek 15 dk bekletilmiştir. Transfer için kullanılan filtre kağıtları da işlemiden önce transfer tamponuyla ıslatılmıştır. Hazırlanan transfer sandiviçi cihaza yerleştirilmiş ve transfer 25 V, 1.3 mA ve 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir. Membranlar TBST içinde hazırlanmış %5 yağsız süt tozunda 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir. (TBST: (20mM Tris (pH:7.5), 150mM NaCl, %0,1 Tween20), Bloklanan membranlar gece boyu +4°C'de primer antikor ile inkübe edilmiştir. Primer antikorlar uzaklaştırılarak membranlar

TBST ile 5 kez 5'er dakika yıkanmış ve sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 1 saatin sonunda membranlar yeniden TBST ile yıkanmıştır. Daha sonra membranlar kemilüminesans görüntüleme için ayrı bir yere alınarak üzerlerine karanlık ortamda geliştirilmiş kemilüminesans (ECL) substratı eklenerek 5 dk bekletildi. 5 dk sonunda asetat filmler arasına alınan membranlardaki antikora spesifik protein bantları ChemiDoc™ görüntüleme sistemi (Bio-Rad) ile görüntülendi. Sonrasında, görüntülenen membranlarda normalizasyon işlemi için GAPDH protein seviyeleri belirlenmiştir. Bu işlem için membranlara bağlanan antikorlar strip işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Strip işleminde önceden ısıtılmış “stripping” (20 mL %10 SDS, 12,5 mL 0,5M Tris (pH:6,8), 67,5 mL ultrasaf su, 800 µl β-merkapto etanol) solüsyonu membranlar üzerine eklenerek ve 50°C’de 60 dk bekletilmiştir. Bu süreçte aralıklı olarak membranlar çalkalanmıştır. Membranlar 1 saat ultrasaf su ile yıkanmış ve bu işlemi takiben membranlar 5 kez 5’er dakika TBST ile yıkanmıştır. Membranlar daha önce detaylarıyla anlatıldığı gibi yeniden süt tozuyla bloklanmış ve primer antikorla muamele edilmiş ve sekonder antikorla muamele edildikten sonra görüntülenmiştir. Protein ekspresyon seviyeleri, ImageLab 6.1 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel analiz ve karşılaştırılabilir veri setleri, one-way ANOVA (Dunnett’s testi) ile GraphPad Prism 8.0.2 yazılımı kullanılarak değerlendirildi. $P < 0,05$ olasılık değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Çalışmada kullanılan primer ve sekonder antikorlar ile bunlara ait dilüsyon oranları Tablo 3.11’de verilmiştir.

Tablo 3.11: Western blotlama işlemlerinde kullanılan primer ve sekonder antikor dilüsyonları.

Antikor	Firma ve Kod	Dilüsyon
Anti-BAX	Abcam-ab53154	1:1000
Anti-BCL-2	Abcam-ab59348	1:500
Anti-MCL-1	Novus-SI16-04	1:1000
Anti-CitC	Abcam-ab90529	1:1000
Anti-pro-Cas3	Boster Bio-M00334	1:500
Anti-pro-Cas9	Boster Bio-M00080-1	1:500
Anti-P53	Abcam-ab131442	1:1000
Anti-GAPDH	Proteintech-10494-1-AP	1:5000
Goat anti-rabbit IgG H&L (HRP)	Abcam-ab205718	1:10000

3.8. NANOPARTİKÜLLERİN İLERİ KARAKTERİZASYONLARI

Hazırlanan nanopartiküllerden hücre kültür sonuçları da dikkate alınarak başarılı olanları üzerine ek analizler de gerçekleştirilmiştir.

3.8.1. Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile analizi

Bu nanopartiküllerin boyut ve morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile analiz edilmiştir. SEM (TESCAN, MAIA3XMU) analizleri Bartın Üniversitesi'nden hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.8.2. Nanopartiküller Taşıyıcı Sistemlerin Stabilitelerinin Belirlenmesi

Nanopartiküllerin fiziksel stabilitesi belirli zaman aralığında incelenmiştir. Bu amaçla hazırlanan nanopartiküller +4 °C'de bekletilmiş ve belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçülmüştür.

3.8.3. Nanopartiküller Taşıyıcı Sistemlerin Serum Stabilitelerinin Belirlenmesi

Nanopartiküllerin hücre sıvısındaki davranışlarını belirlemek için serum stabilitelerine bakılmıştır. Hazırlanan nanopartikül süspansiyonlarına %10 oranında FBS ilave edilmiş ve süspansiyonlarının belirli aralıklarla partikül boyutları ve zeta potansiyelleri ölçülmüştür.

3.8.4. Enkapsüle olan MS1-mNeonGreen proteinin bütünlüğünün SDS-PAGE'de analizi

Etkili bir formülasyon için, kargo molekülün bütünlüğünün korunması gerekir. Bu çalışmada, partiküllerin hazırlanması sırasında kullanılan yüksek sonikasyon kuvvetlerinin ve organik solventlerin etkisini belirlemek için, nanopartiküllerden salınan MS1- mNeonGreen proteininin SDS bütünlüğü %12'lik SDS-PAGE ile değerlendirilmiştir.

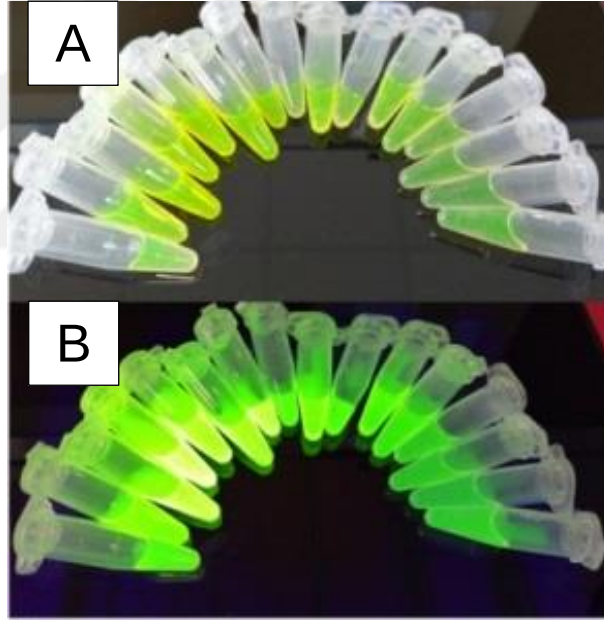
3.8.5. Nanopartiküllerin Hücresel Alımlarının Floresan Mikroskop ile İncelenmesi

Bölüm 3.6.1.'de anlatıldığı gibi kültüre alınan hücreler 24 kucuklu platelere 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat 37°C'da ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra nanopartiküller önceden belirlenen IC₅₀ dozlarında hücrelere eklenmiştir. 4 saat inkübasyonun ardından hücreler üzerindeki nanopartikül uzaklaştırılarak 1x PBS ile yıkanmıştır. Nanopartiküllerin hücreler tarafından alımları floresan mikroskop ile görüntülenmiştir.

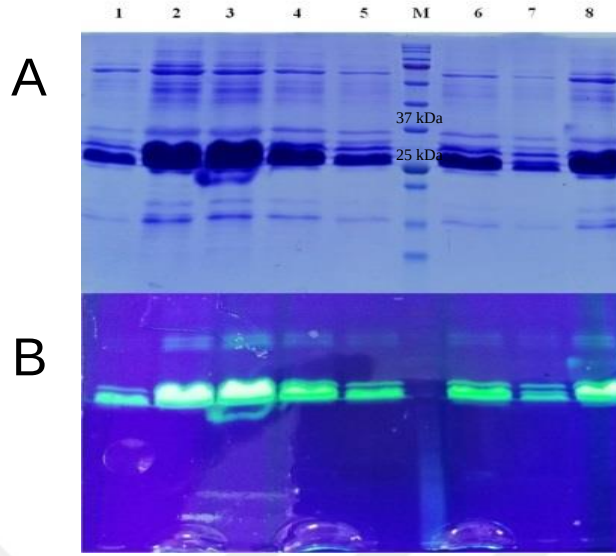
4. BULGULAR

4.1. T22-MS1-MNEONGREEN PROTEİNİN ÜRETİLMESİ

Yöntem kısmında detaylarıyla anlatılan DNA dizi tasarımı yapılan ve Biomatik firmasına sentez ettirilen pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen plazmid DNA'sı *E. coli Origami 2* hücrelerine transfer edilmiş ve protein ekspresyonu bu hücrelerde gerçekleştirilmiştir. T22-MS1-mNeonGreen proteinin hücrelerden saflaştırılmasında nikel afinite kromatografisi kullanılmıştır. Kolondan elde edilen fraksiyonlar ve bu fraksiyonların UV ışık altındaki görüntüsü Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Elde edilen fraksiyonlar daha sonra %12'lik SDS-PAGE'de analiz edilmiştir. (Şekil 4.2.)

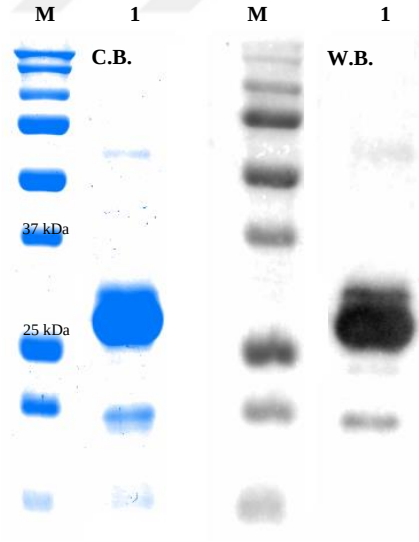


Şekil 4.1: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan T22-MS1-mNeonGreen proteini (A) ve UV ışık altında görünümü (B).



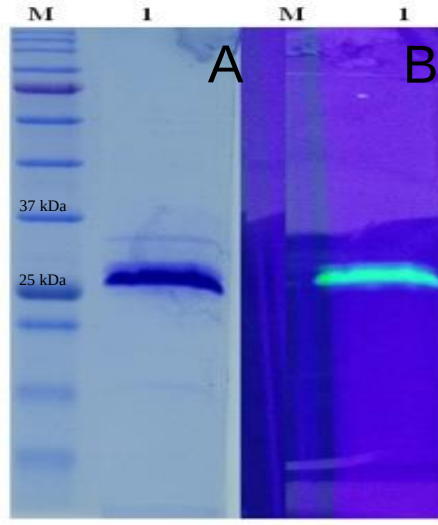
Şekil 4.2: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan T22-MS1-mNeonGreen Proteinin %12'lik SDS-PAGE'de Analizi (A) ve jelin UV ışık altındaki görüntüsü (B) 1-5., 6-8. Kuyucuklar kolondan 300 mM imidazol içeren elüsyon tamponunun geçirilmesiyle elde edilen elüsyonlar M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II).

Elde edilen fraksiyonlar toplanarak Western Blotlama ile de analiz edilmiştir (Şekil 4.3). Western Blotlama da His tag antikoru kullanılmıştır.



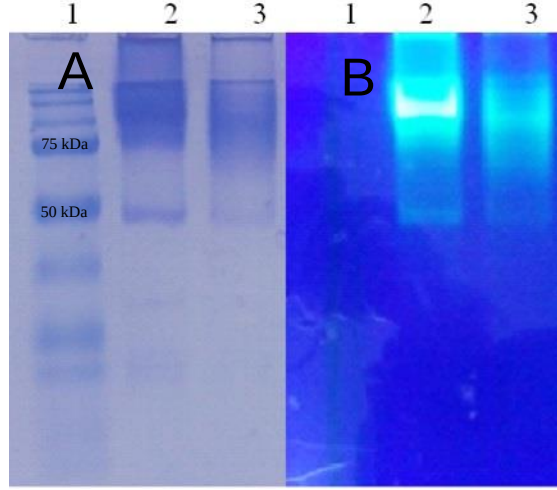
Şekil 4.3: Saflaştırılan T22-MS1 mNeonGreen proteinin western blot ile analizi M. Protein Marker (C.B(Comassie boyama, W.B.(western blotlama).

Safsızlıkların giderilmesi için elde edilen elüsyonlar birleştirilerek ilk olarak 50 cutoff, daha sonra 30 cutoff ultrafiltrasyon tüpünden geçirilmiştir. İleri saflaştırılması gerçekleştirilen T22-MS1-mNeonGreen proteini %12'lik SDS-PAGE'de analiz edilmiştir (Şekil 4.4). Daha sonra protein örneğinin bir kısmı imidazol gibi safsızlıklardan uzaklaştırmak için gece boyu +4°C'de diyalize (Spectra/por MWCO=6-8000) bırakılmıştır. Diyaliz çözeltisi olarak 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl (pH:8,0) çözeltisi kullanılmıştır. Diyaliz işleminden sonra protein konsantrasyonu 280 nm absorpsans değeri ölçülerek hesaplanmış ve toplamda 70 mg saf T22-MS1-mNeonGreen proteini elde edilmiştir.



Şekil 4.4: İleri saflaştırılması yapılan T22-MS1-mNeonGreen proteinin %12'lik SDS-PAGE'de analizi. M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II) 1. İleri saflaştırılması yapılan T22-MS1-mNeonGreen proteini (A) ve UV ışık altındaki görünümü (B).

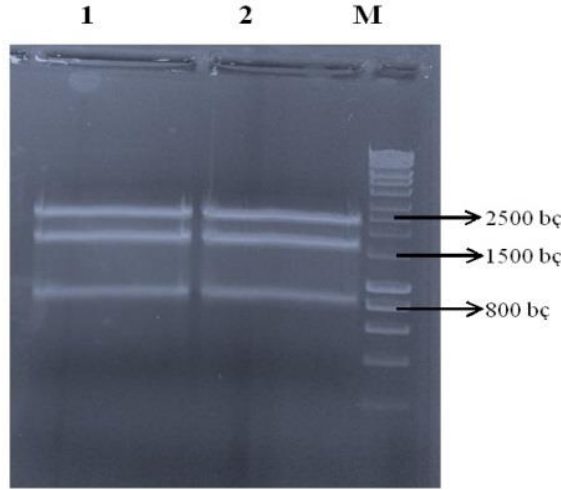
Saflaştırılan protein örneği ayrıca %10'luk doğal jel elektroforezinde de analiz edilmiştir. Jelin fotoğrafı ve yükleme sırası şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan ve diyaliz edilen T22-MS1-mNeonGreen proteinin örneğin %10'luk doğal jel elektroforezinde analizi (A) ve jelin UV ışık altındaki görünümü (B)
1. Protein Marker (Biorad precision plus protein standards-all blue) 2. Diyaliz öncesi T22-MS1-mNeonGreen proteini 3. Diyaliz sonrası T22-MS1-mNeonGreen proteini.

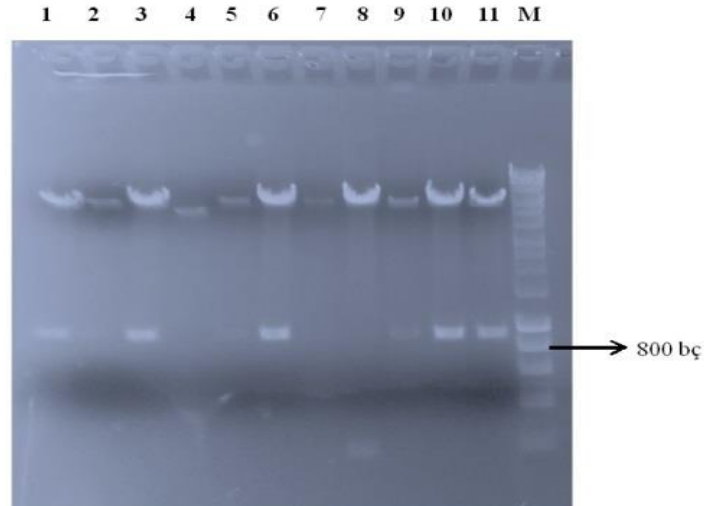
4.2. MS1-MNEONGREEN PROTEİNİN ÜRETİLMESİ

MS1-mNeonGreen proteinin üretilmesinde DNA dizi tasarımı yapılan ve Biomatik firmasına sentez ettirilen pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen plazmid DNA'sı kalıp olarak kullanılmıştır. pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen plazmidi *NdeI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleriyle kesilip saflaştırılan MS1-mNeonGreen bölgesi aynı enzimlerle kesilen pET22b plazmiyle ligasyona bırakılmıştır. *NdeI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleriyle kesilen pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen plazmidinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6: NdeI ve XhoI restriksiyon enzimleriyle kesilen pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen plazmidinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü, 1, 2. NdeI ve XhoI restriksiyon enzimleriyle kesilen pBAD-HisA-T22-MS1-mNeonGreen plazmidi, M. DNA marker (Bioline HyperLadder™ 1kb).

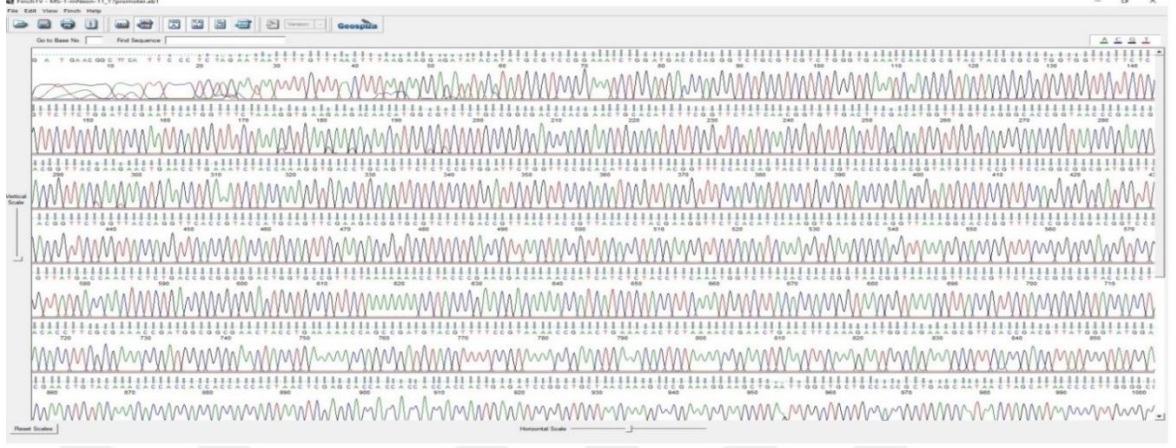
Ligasyon ürünleri *E. coli DH5α* hücrelerine transfer edilmiş ve elde edilen kolonilerden plazmid DNA izole edilerek doğrulama restriksiyon kesimi gerçekleştirilmiştir. Doğrulama kesim sonucunun %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü şekil 4.7'da verilmiştir.



Şekil 4.7: XbaI ve XhoI restriksiyon enzimleriyle yapılan doğrulama kesim sonucunun %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 1-11. kuyucuklar sırasıyla 1-11. plazmitlere ait restriksiyon enzim kesim reaksiyonları M. DNA marker (Bioline HyperLadder™ 1kb).

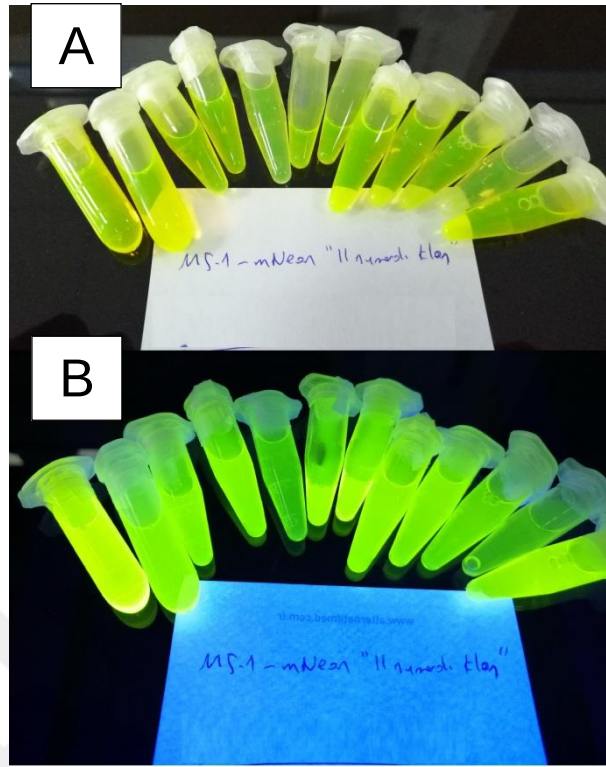
Doğrulama kesim sonucuna göre klonlandığı düşünülen plazmid DNA'lardan 3, 10 ve 11 numaralı olanlar T7 promoter primeri ile dizi analizi yapılmak üzere DNA dizilemeye

gönderilmiştir. Dizileme sonucu doğru klonlandığı görülen pET22b-MS1-mNeonGreen-11 numaralı plazmidin DNA dizilemesine ait kromatogram görüntüsü Şekil 4.8’de verilmiştir.

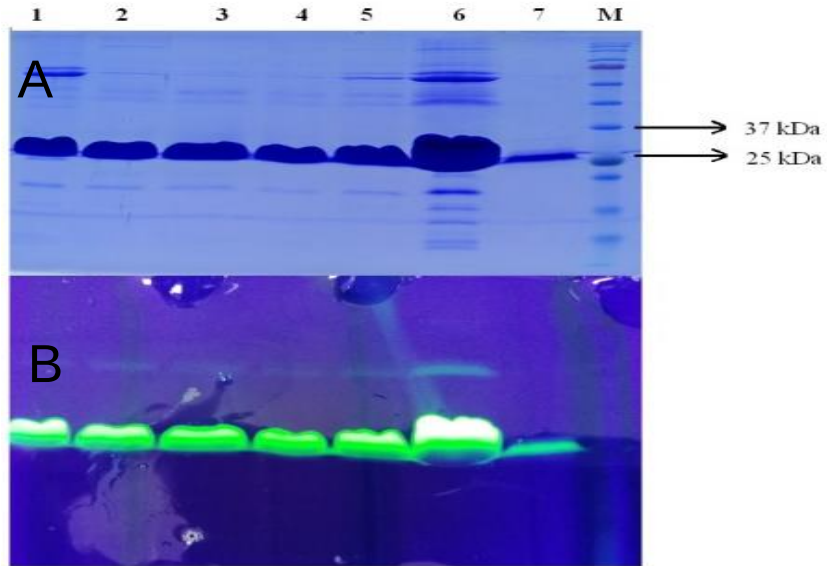


Şekil 4.8: pET22b-MS1-mNeonGreen-11 plazmidinin DNA dizilemesine ait kromatogram görüntüsü.

pET22b-MS1-mNeonGreen-11 plazmiti *E. coli BL21 pLysE* suşu’na transfer edilmiştir. Protein ekspresyonu bu hücrelerde gerçekleştirilmiş ve protein afinite kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Kolondan elde edilen fraksiyonlar UV ışık altında görünümü Şekil 4.9’de verilmiştir. Elde edilen fraksiyonlar daha sonra %12’lik SDS-PAGE’de analiz edilmiştir (Şekil 4.10).

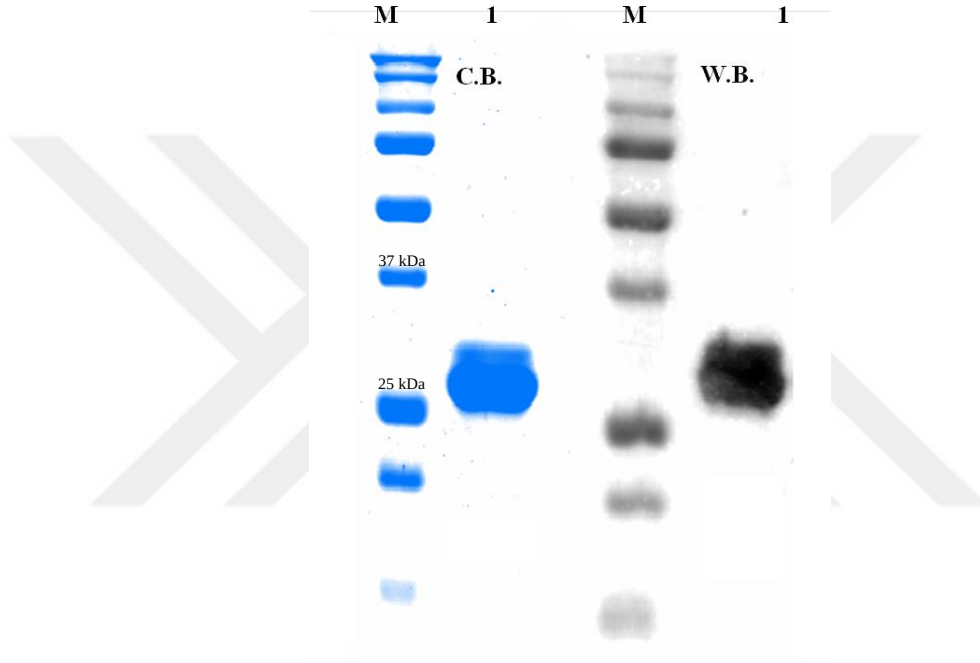


Şekil 4.9: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan MS1-mNeonGreen proteini (A) ve UV ışık altında görünümü (B).



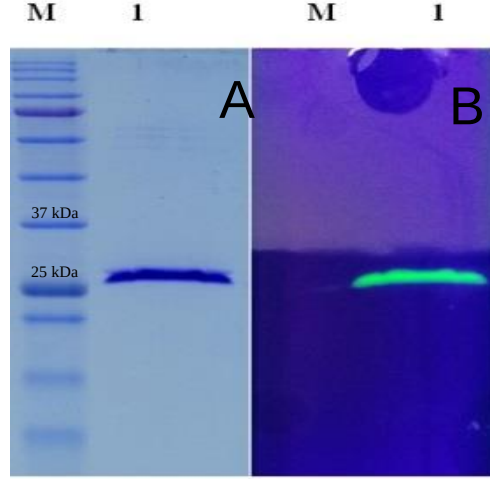
Şekil 4.10: Saflaştırılan MS1-mNeonGreen Proteinin %12'lik SDS-PAGE'de Analizi. 1-7. kuyucuklar sırasıyla kolondan 300 mM imidazol içeren elüsyon tamponunun geçirilmesiyle elde edilen elüsyonlar M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II).

Protein örneğinin bir kısmı imidazol gibi safsızlıklardan uzaklaştırmak için gece boyu +4°C’de diyalize (Spectra/por MWCO=6-8000) bırakılmıştır. Diyaliz çözeltisi olarak 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl (pH:8,0) çözeltisi kullanılmıştır. Protein konsantrasyonu 280 nm absorbsans değeri ölçülerek hesaplanmış ve toplamda 600 mg saf MS1-mNeonGreen proteini elde edilmiştir. Rekombinant olarak üretilen MS1-mNeonGreen protein örnekleri ek olarak His tag antikoru kullanılarak western blotlama ile de analiz edilmiştir. Western blotlamaya ait görüntü Şekil 4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.11: Saflaştırılan MS1 mNeonGreen proteininin western blot ile analizi M. Protein Marker (C.B.(Comassie boyama, W.B.(western blotlama).

Safsızlıkların giderilmesi için elde edilen elüsyonlar birleştirilerek ilk olarak 50 cutoff, daha sonra 30 cutoff ultrafiltrasyon tüpünden geçirilmiştir İleri saflaştırılması gerçekleştirilen T22-MS1-mNeonGreen proteini %12’lik SDS-PAGE’de analiz edilmiştir (Şekil 4.12).

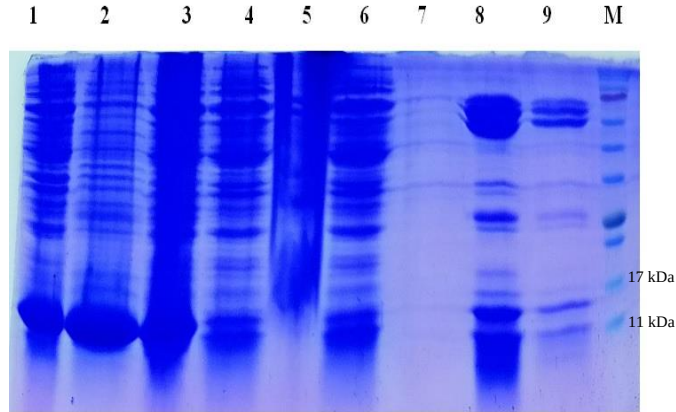


Şekil 4.12: İleri saflaştırılması yapılan MS1-mNeonGreen proteinin %12'lik SDS-PAGE'de analizi. M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II) 1. İleri saflaştırılması yapılan MS1-mNeonGreen proteini.

4.3.T22 PEPTİDİNİN REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ

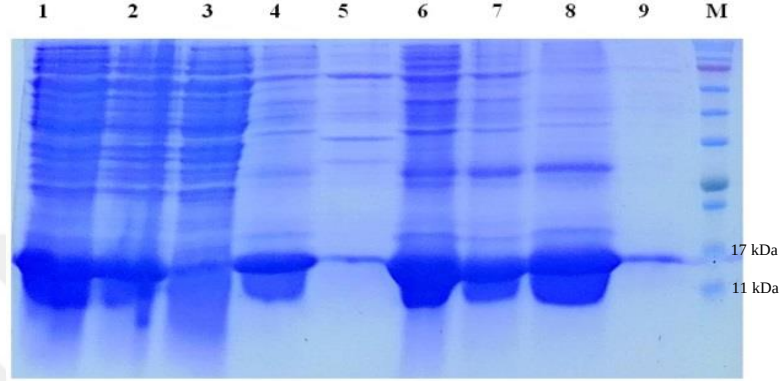
4.3.1. TolA-III-T22 Proteinin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

pET30-T22 plazmiti *E. coli BL21 pLysE* suşu'na transfer edilmiştir. Protein ekspresyonu bu hücrelerde gerçekleştirilmiştir. Protein afinite kromatografisi ile saflaştırılmış ve elde edilen fraksiyonların %12'lik SDS-PAGE'de analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.13).



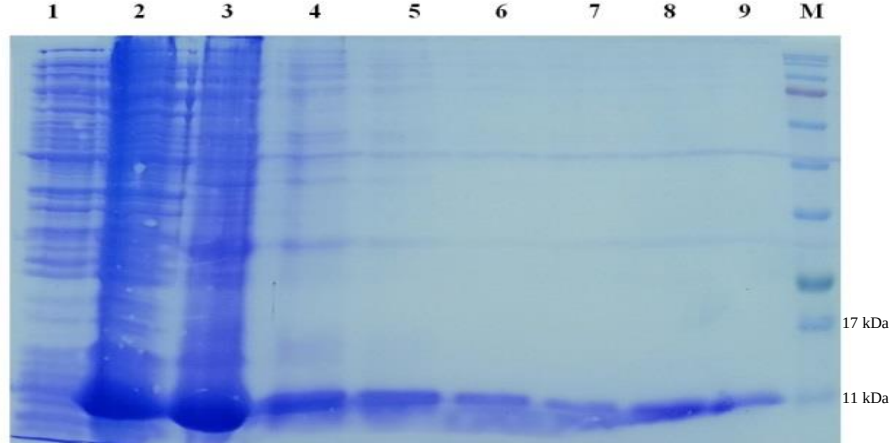
Şekil 4.13: Saflaştırılan TolA-III-T22 Proteinin %12'lik SDS-PAGE'de Analizi 1. IPTG ile indüksiyon sonrası *E. coli BL21 pLysE* hücreleri, 2. İlk santrifüj sonrası pelet, 3. İlk santrifüj sonrası süpernatant, 4. Ultrasantrifüj sonrası süpernatant, 5. Ultrasantrifüj sonrası pelet, 6. Kolona yüklenen örnek 7. Kolondan imidazolsüz yükleme tamponu geçirilmesiyle aşağı akan süzöntü, 8-9. Kolondan 300 mM imidazol içeren elüsyon tamponunun geçirilmesiyle elde edilen elüsyonlar M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II).

SDS-PAGE analizinde TolA-III-T22 proteinin ultrasantrifüj sonrası süpernatantta düşük miktardadır. Proteinin büyük çoğunluğu inklüzyon cisimcikleri şeklinde pelette çökmüştür. Proteinin inklüzyon cisimciklerinden yeniden kazanımı için iki protokol uygulanmıştır. 1. protokol (Melissis ve diğ., 2010) ile pelettenden yeniden katlanan proteinin %12'lik SDS-PAGE'de analizi şekil 4.14'te verilmiştir



Şekil 4.14: Inklüzyon cisimciklerinden TolA-III-T22 proteinin yeniden kazanımı için kullanılan 1. prosedürün %12'lik SDS-PAGE'de analizi. 1. Sonikatör işlemi sonrası protein örneği 2. Sonikasyon işlemi öncesi protein örneği 3. Santrifüj sonrası pelet örneğinin resüspanasyonu ile elde edilen çözelti, 4. Resüspanasyon işlemi sonrası santrifüjle elde edilen pelet, 5. Resüspanasyon işlemi sonrası santrifüjle elde edilen süpernatant 6. 8M Üre içeren tampon ile muamele sonrası santrifüjle elde edilen süpernatant 7. 8M Üre içeren tampon ile muamele sonrası santrifüjle elde edilen süpernatant 8. Refolding işlemi sonrası elde edilen pelet, 9. Refolding işlemi sonrası elde edilen süpernatant M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II).

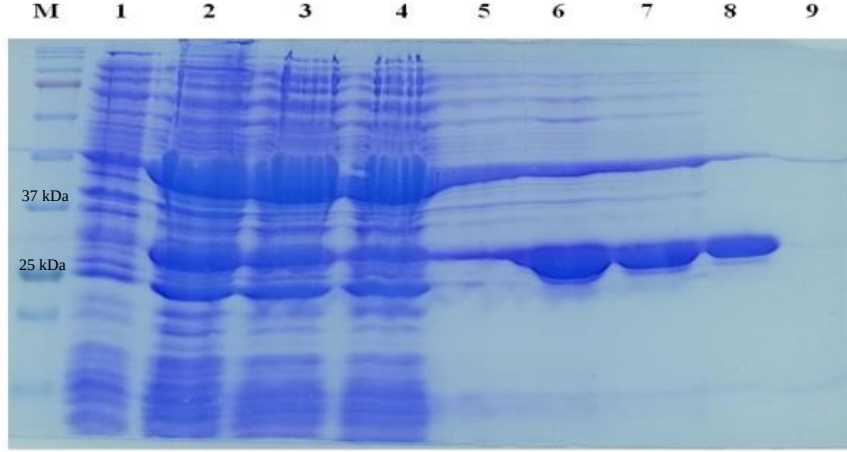
1. protokol ile elde edilen proteinin verimi düşük olduğundan refolding işlemi için ikinci bir protokol kullanılmıştır. 2. Protokol kullanılarak elde edilen TolA-III-T22 proteininin %12'lik SDS-PAGE'deki analizi şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.15: İnklüzyon cisimciklerinden TolA-III-T22 proteinin yeniden kazanımı için kullanılan 2. prosedürün %12'lik SDS-PAGE'de analizi. 1. IPTG ile indüklemeye öncesi *E. coli BL21 plySE* hücreleri, 2. IPTG ile indüklemeye sonrası *E. coli BL21 plySE* hücreleri 3. Lizis, yıkama ve ekstraksiyon işlemlerinden sonra elde edilen ve kolona yüklenen süpernatant örneği 4-9. Kolondan 300 mM imidazol içeren elüsyon tamponunun geçirilmesiyle elde edilen elüsyonlar M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II).

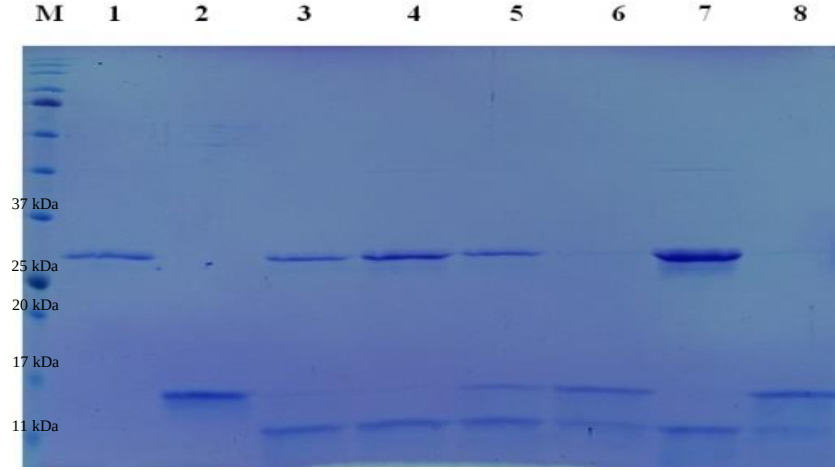
4.3.2. TolA-III-T22 proteininden TolA-III peptidinin TEV proteaz enzimi ile kesim yoluyla çıkarılması

İkinci protokole göre yüksek verimde elde edilen TolA-III-T22 proteininden TolA-III füzyonunun TEV proteaz enzimi ile çıkarılması için TEV proteaz enziminin rekombinant olarak üretilmesi gerçekleştirilmiştir. TEV proteaz üretici stok hücrelerden başlık 3.1.2.3'teki protokole uygun olarak TEV proteaz enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırılan TEV proteaz enzimine ait fraksiyonlar SDS-PAGE'de analiz edilmiştir (Şekil 4.16).



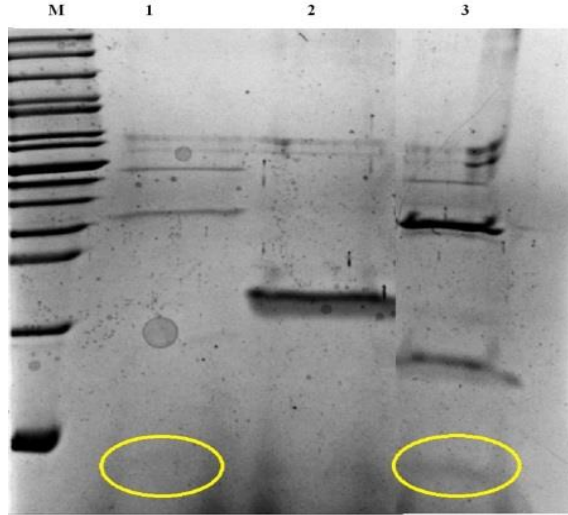
Şekil 4.16: Saflaştırılan TEV proteaz enziminin %12'lik SDS-PAGE'de analizi 1. IPTG ile indüklemeye işleminden önce *E.coli BL21 PlysE* hücreleri, 2. IPTG ile indüklemeye işleminden sonra *E.coli BL21 PlysE* hücreleri, 3. Sonikatör ile parçalama sonrası ilk santrifüj işlemi ile elde edilen süpernatant örneği 4. Ultrasantrifüj işlemi sonrası elde edilen süpernatant 5-9. Kolondan 300 mM imidazol içeren elüsyon tamponunun geçirilmesiyle elde edilen elüsyonlar, M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II).

0,2 mg/mL konsantrasyonunda TolA-III-T22 proteini ve 1 mg/mL konsantrasyonunda TEV proteaz enzimi ile başlanmış ve Tablo 3.4'te verilen oranlarda karışım hazırlanmıştır. Çizelge 4'e göre hazırlanan karışımlar 30°C'de inkübasyona bırakılan örneklerden 180 dk sonunda 10 µl örnek alınmış ve 10 µl SDS sample tampon ile karıştırılarak 2 dk 95°C'de kaynatılmıştır. Daha sonra örnekler %15'lik SDS-PAGE'de analiz edilmiştir. 180 dk sonunda alınan örneklerin SDS-PAGE'deki görüntüsü Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17: TolA-III-T22 proteininin TEV proteaz enzimi ile kesiminin %15'lik SDS-PAGE'de analizi M. Protein Marker (NZYColour Protein Marker II), 1-8. Tablo 3.4'te verilen sırasıyla 1-8 numaralı tüplerde gerçekleştirilen reaksiyonlardan alınan örnekler.

7 numaralı reaksiyon koşullarına göre hazırlanan karışım 4 saat 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 4. saatin sonunda reaksiyon ürünü Ni-NTA rezin içeren kolona verilmiş ve kolonun aşağısına gelen fraksiyon toplanmıştır. Elde edilen numuneler Tricine-SDS-PAGE'de analiz edilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18: Saflaştırılan T22 peptidinin Tricine-SDS-PAGE'de analizi 1. TEV proteaz ile kesim sonrası kolondan saflaştırılan T22 peptidi, 2. TEV proteaz ile kesilmemiş TolA-III-T22 proteini 3. TEV proteaz ile kesim sonrası TolA-III-T22 proteini M. Protein Marker (PageRuler Unstained Protein Ladder).

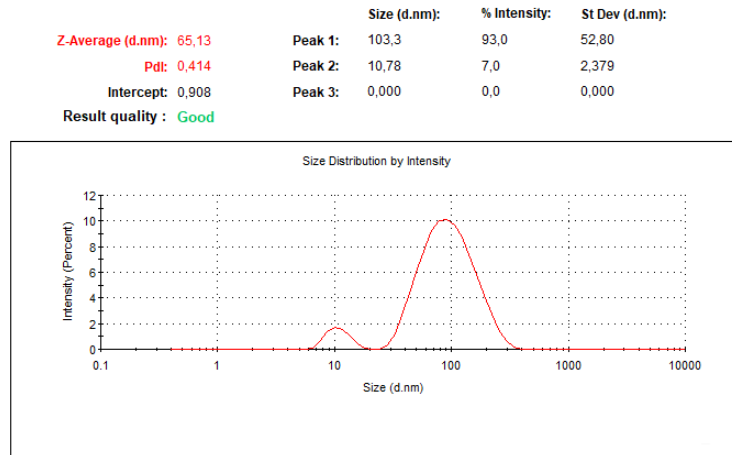
4.4.SELF-ASSEMBLY PROTEİN NANOPARTİKÜLLERİN OLUŞTURULMASI

T22-MS1-mNeonGreen proteini 0,2 µm filtreden geçirildikten sonra, diyaliz çözeltisi olarak Tablo 4.1’de verilen tampon sistemleri kullanılmış ve gece boyu +4°C’de diyalize (MWCO:6-8000) bırakılmıştır. Oluşturulan nanoyapıların partikül büyüklükleri, zeta potansiyelleri ve partikül boyut dağılım analizleri ölçülmüştür. Tablo 4.1’de kullanılan tampon sistemleri ve elde edilen nanopartiküllere ait partikül büyüklükleri, zeta potansiyelleri ve partikül boyut dağılımları özetlenmiştir.

Tablo 4.1: T22-MS1-mNeonGreen füzyon proteininden self-assembly nanopartiküller üretilmesi için kullanılan tampon sistemleri ve elde edilen nanopartiküllerin özellikleri.

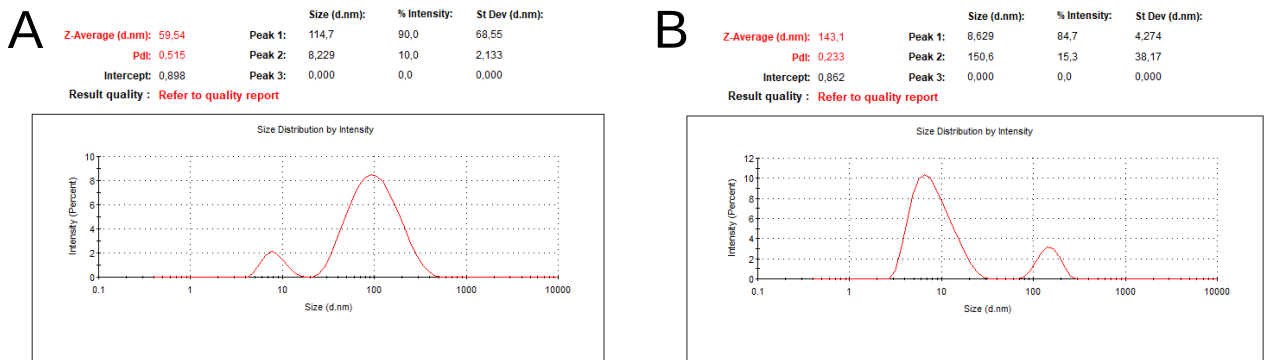
pH	Protein Konsantrasyonu (mg/mL)	Partikül Özellikleri	Tampon Sistemleri			
			166 mM Sod. Bikarb. +333mM NaCl	166 mM Sod. Bikarb.	İzotonik su (%0.09 NaCl)	20mMTris+%5 dextrose
8	1	PDI	0,50	0,42	0,50	0,20
		z average(nm)	66,00	50,00	23,94	32,64
		Nanoyapı ve monomer miktarları (%)	%90,00-%8,50	%84,20-%8,60	%55,00-%41,00	%19,00-%75,00
		zeta potansiyeli(mV)	-3,00			
8	2	PDI	0,42	0,33		
		z average(nm)	50,33	94,00		
		Nanoyapı ve monomer miktarları (%)	%84,20-%8,60	%95,00-%5,00		
		zeta potansiyeli(mV)		-11,00		
8	4	PDI		0,50		
		z average(nm)		59,00		
		Nanoyapı ve monomer miktarları (%)		%90-%10		
		zeta potansiyeli(mV)				
7,4	1	PDI	0,54	0,41		
		z average(nm)	58,00	65,00		
		Nanoyapı ve monomer miktarları (%)	%84,00-%12,00	%93,00-%7,00		
		zeta potansiyeli(mV)		-9,03		

Tablo 1’de verilen sonuçlara göre 166 mM sodyum bikarbonat (pH:7,4) tamponu kullanılarak elde edilen nanopartiküllerin hücre kültür denemelerinde kullanılmasına karar verilmiştir. Bu partiküle ait DLS piki Şekil 4. 19’ de verilmiştir.



Şekil 4.19: 166mM sodyum bikarbonat (pH:7,4) tamponu kullanılarak elde edilen nanopartiküllerin partikül boyut analizi.

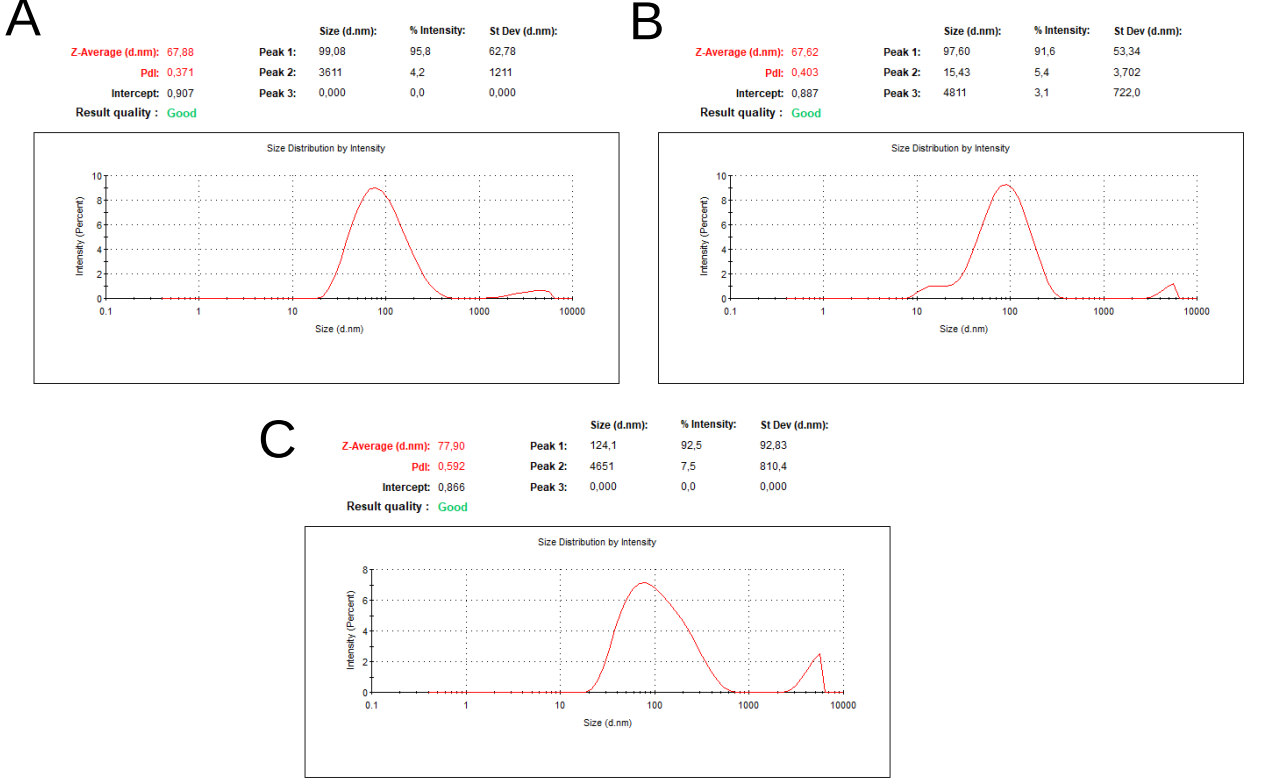
Ek olarak nanopartiküllerin füzyon proteinlerin bir araya gelmesiyle oluştuğunu göstermek adına, nanopartiküller %1 SDS (sodyum dodesil sülfat) eklenerek 10 dk inkübasyona bırakılmış ve Zetasizer cihazında analiz edilmiştir. 166mM sodyum bikarbonat tamponuna karşı yapılan diyalizle oluşturulan nanopartiküllerin %1 SDS eklenerek 10 dk inkübasyonun ardından elde edilen partikül boyutları Şekil 4.20’de verilmiştir.



Şekil 4.20: T22-MS1-mNeonGreen nanopartikülleri (A) ve %1 SDS ile muamele sonrası partikül boyut analizi (B).

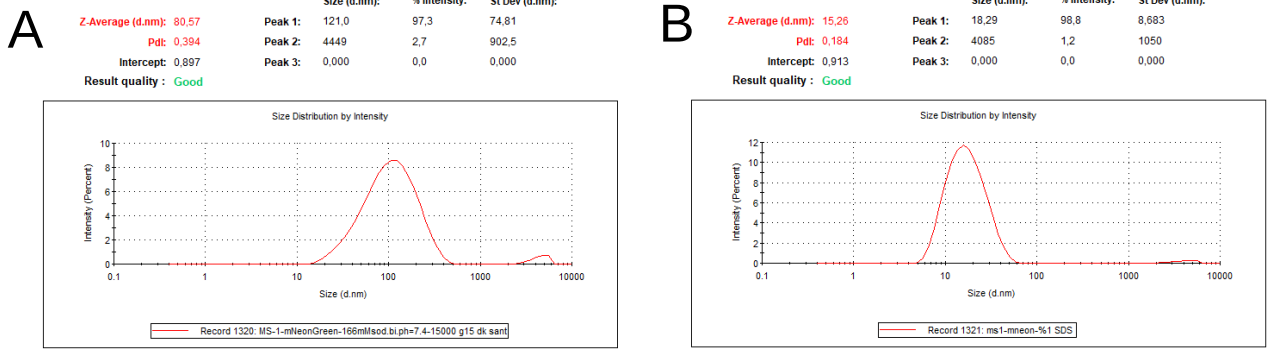
Nanopartikülde bulunan self-assembly nanopartikül oluşturmeyen monomerlerin uzaklaştırılması için jel filtrasyon kromatografisi kullanılmıştır. Kolonun hacminin 2 katı kadar 166mM Sodyum bikarbonat (pH:7,4) tamponu geçirilmiştir. Daha sonra nanopartikül karışımı

kolona verilmiş ve örnek 3 fraksiyon şeklinde toplanmıştır. Daha sonra kolon 166mM Sodyum bikarbonat (pH:7,4) tamponu ile yıkanmış ve +4°C'ye kaldırılmıştır. Elde edilen fraksiyonlar Zetasizer ile analiz edilmiştir. Fraksiyonlara ait partikül boyutları şekil 4.21'de verilmiştir.



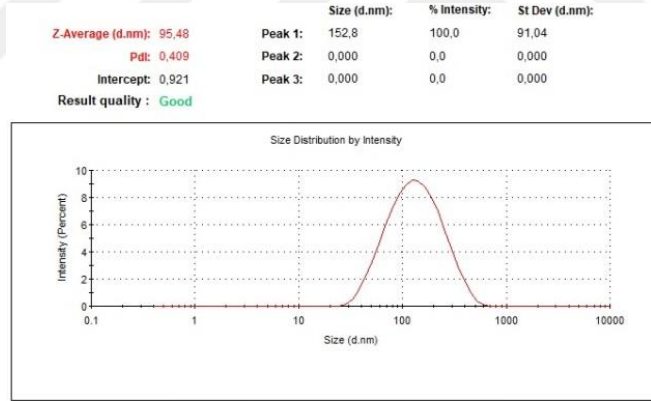
Şekil 4.21: Jel geçirgenlik kromatografisi kullanılarak ayrılan nanopartikül fraksiyonlarının sırasıyla partikül boyut analizleri.

Yukarıda ayrıntılarıyla açıklandığı gibi optimize edilen koşullarda MS1-mNeonGreen proteinden de self-assembly nanopartiküller elde edilmiştir. (MS1 mNeonGreen proteini de MS1 proteinin katyonik yapısından dolayı nanopartikül oluşumu göstermiştir). Yapının füzyon proteinlerden oluştuğunu göstermek adına ortama %1'lik SDS ilave edilmiş ve partiküllerin bozulduğu Zetasizer ile analiz edilmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22: MS1-mNeonGreen proteinin oluşturduğu self-assembly nanopartiküllerin (A) ve bu partiküllerin %1 SDS ile muamelesi sonrası partikül boyutlarının (B) analizi.

Hücre kültür çalışmalarında kullanılmak üzere yeniden hazırlanan ve optimize edilen T22-MS1-mNeonGreen self-assembly nanopartiküllerin partikül boyut analizi de Şekil 4.23'te sunulmuştur.

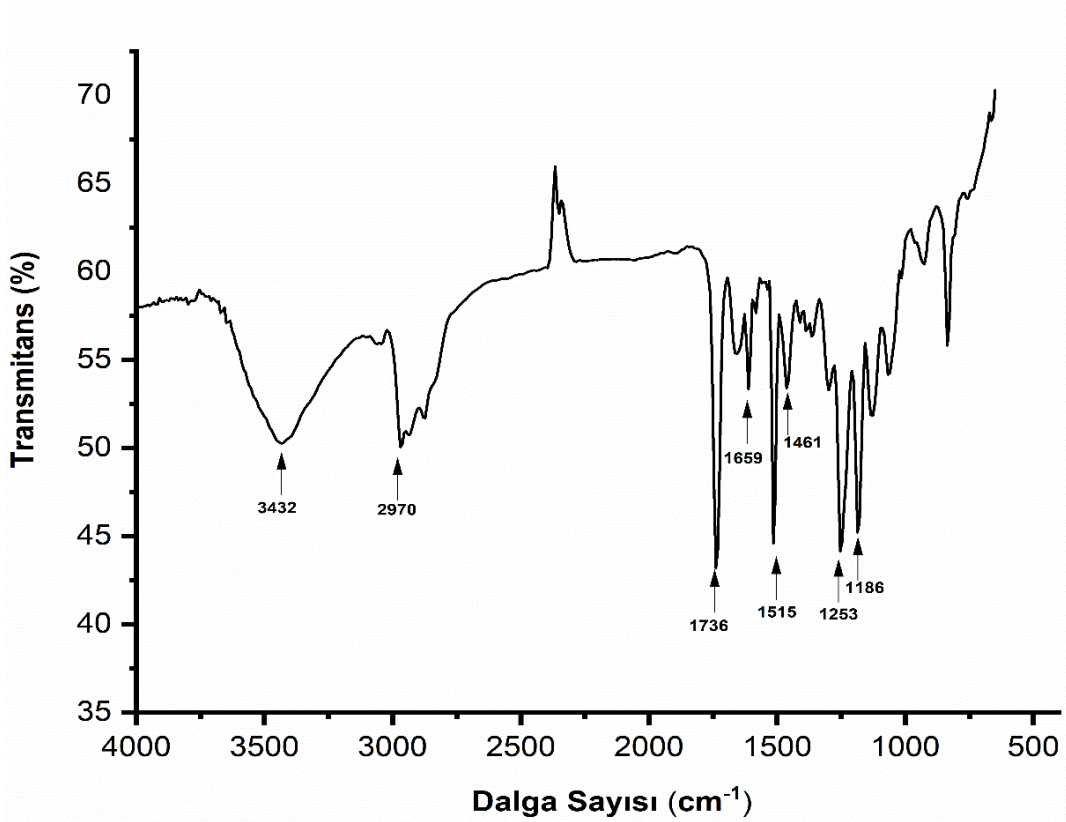


Şekil 4.23: Sitotoksite çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlanan T22-MS1-mNeonGreen self-assembly nanopartiküllerin partikül boyut analizi.

4.5. NANOPOLİMER TAŞIYICI SİSTEMLERİN OLUŞTURULMASI

4.5.1. PBAE'in FTIR Spektra

BFAEDA ve EDA monomerleri kullanılarak sentezlenen PBAE'in yapısal aydınlatılması FTIR analizi yapılmıştır. Şekil 4.24'te FTIR spektra verilmiştir.



Şekil 4.24: Sentezlenen PBAE'e ait FTIR spektra.

PBAE'nin FTIR spektrasında, yaklaşık 1600-1680 cm^{-1} bölgesinde (maksimumu 1620 cm^{-1}) diakrilat bileşiklerinde bulunan vinil gruplarındaki C=C bağının gerilme titreşiminden ileri gelen büyük keskin absorpsiyon bandının görülmemesi ile birlikte 3600-3200 cm^{-1} bölgesinde maksimumu yaklaşık 3437 cm^{-1} 'de olan sentezlenen PBAE'nin yapısındaki sekonder amin gruplarındaki (CH₂-NH-CH₂) bağının gerilme titreşiminden ileri gelen geniş ve yaygın absorpsiyon bandının görülmesi diakrilat bileşiği ile etilendiamin arasında reaksiyonun beklendiği gibi PBAE yapısının oluşumu şeklinde meydana geldiğini kanıtlamaktadır.

4.5.2. PBAE'den Nanoçöktürme Tekniği Kullanılarak Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

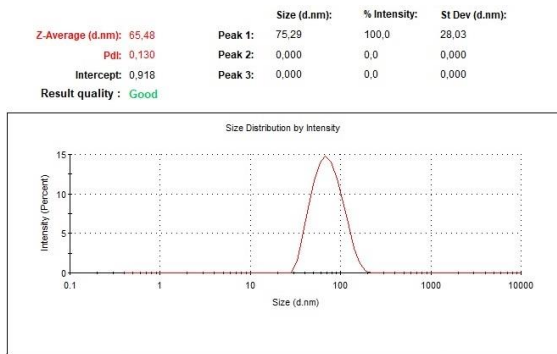
İlk olarak PBAE nanoçöktürme tekniği kullanılarak protein içermeyen nanopartiküller hazırlanmıştır. Tablo 4.2'deki oranlar çalışılarak partikül büyüklüğü, partikül boyut dağılımı ve zeta potansiyeli en uygun olan oran belirlenmiştir.

Tablo 4.2: PBAE hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutları ve zeta potansiyelleri

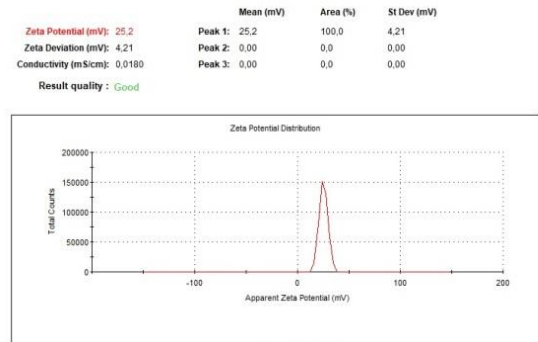
PBAE-dH ₂ O Oran (μL/μL)	PDI±SD	Partikül boyutu(nm) ±SD	2. pik varlığı	Zeta potansiyeli (mV)±SD
1. Pik				
50-1450	0,09±0,01	121,50±1,20	-	+38,10±3,39
100-1400	0,11±0,02	133,40±2,90	-	+41,8±4,45
200-1300	0,14±0,01	76,20±1,01	-	+25,70±0,70
300-1200	0,37±0,11	113,75±13,97	+	+14,90±3,20
400-1100	0,25±0,08	100,30±26,22	+	+16,00±3,40
500-1000	0,36±0,20	102,60±21,64	+	+15,70±3,60
600-900	0,27±0,06	109,40±12,01	+	+15,70±3,60

200-1300 oranı partikül boyutu, partikül boyut dağılımı ve zeta potansiyeli açısından uygun bulunmuştur (Şekil 4.25).

A



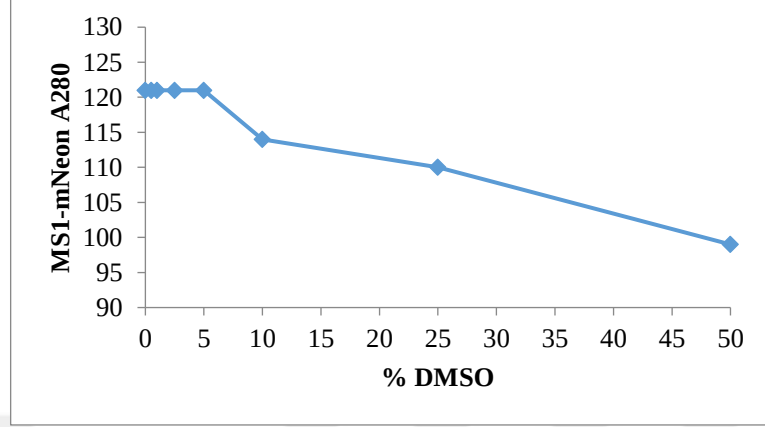
B



Şekil 4.25: PBAE nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan nanopartikülün partikül boyutu (A) ve zeta potansiyeli (B).

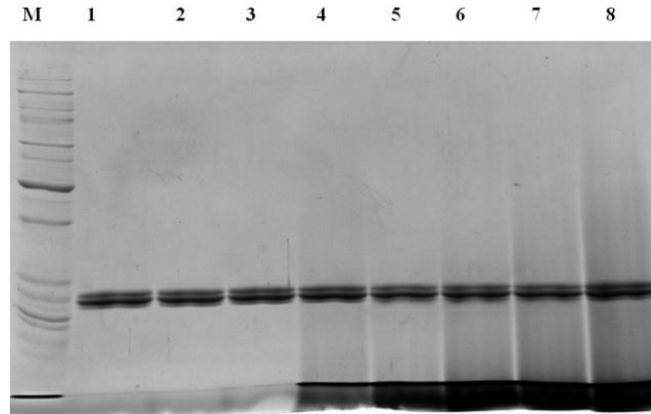
PBAE DMSO'da çözünerek hazırlandığı için öncelikle MS1-mNeonGreen proteinin DMSO'da çözmediği konsantrasyon belirlenmiştir. Proteinler DMSO gibi çözücülerden olumsuz etkilenebilmektedir. Santrifüj işleminden sonra süpernatantaki protein örneğinin 280 nm dalga

boyunda absorbanslarına bakılmıştır. MS1-mNeonGreen proteinin DMSO eklenmesiyle absorbansındaki değişim şekil 4.26’da verilmiştir.



Şekil 4.26: MS1-mNeon proteinin DMSO eklenmesiyle absorbansında (A_{280}) meydana gelen değişim.

DMSO oranı %5’i geçmeyecek şekilde hazırlanan nanopartiküllerdeki (Tablo 3.6.) MS1-mNeonGreen proteinin enkapsülasyon verimini belirlemek için partiküller santrifüjle çöktürülmüştür. Çöktürülen partiküllerdeki ve enkapsülenmeden üst sıvıda kalan proteinler %12’lik SDS-PAGE analiz edilmiştir (Şekil 4.27). SDS-PAGE görüntüsü Imagej2 programı ile analiz edilmiş ve en yüksek enkapsülasyon verimi 5. tüp için %11,8 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.27: MS1-mNeonGreen proteininin PBAE polimeri ile enkapsülasyonun %12’lik SDS-PAGE’de analizi M. PageRuler Unstained Protein Ladder 1-5. Sırasıyla tablo 3.6’ya göre hazırlanan 1, 2, 3, 4 ve 6. tüplerin santrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatant örnekleri, 6. tablo 3.6’ya göre hazırlanan 5. tüpün santrifüj işlemi öncesi 7. tablo 3.6’ya göre hazırlanan 5. Tüpün santrifüj işlemi sonrası elde edilen süpernatant, 8. tablo 3.6’ya göre hazırlanan 5. Tüpün santrifüj işlemi sonrası elde edilen pelet örneği.

4.5.3. PBAE-PLGA Nanopartiküler Sistemin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

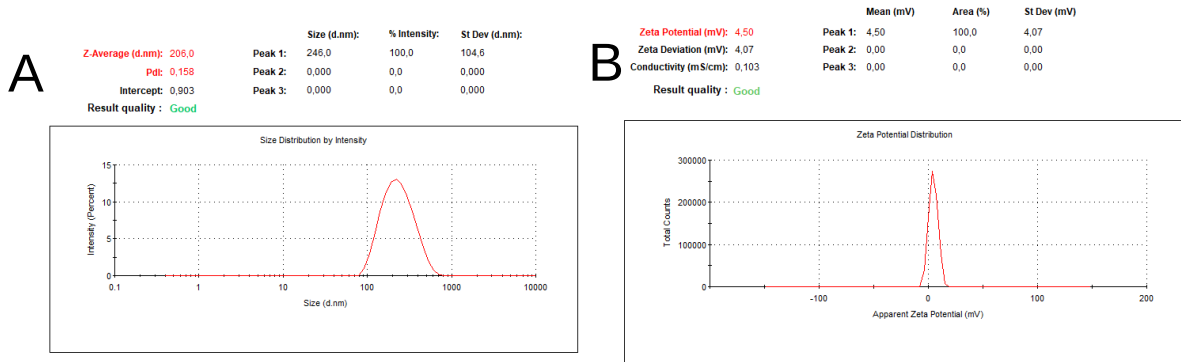
PBAE ile hazırlanan nanopartiküllerin enkapsülasyon verimleri düşük çıkmıştır. Bunun nedeni hem proteinin net yükünün hem de polimerin net yükünün pozitif olmasından kaynaklıdır. Enkapsülasyon verimini artırmak için PLGA-PBAE hibrit nanopartiküller hazırlanmıştır.

PLGA-PBAE hibrit nanopartiküller ilk olarak boş olarak homejenizatör kullanılarak hazırlanmıştır. Agregasyon oluşumu gözlemlenmiş ve oluşan agregasyonlar santrifüj ile uzaklaştırılmıştır. Bu sistemle hazırlanan nanopartiküllerin enkapsülasyon verimleri Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3: PLGA-PBAE hibrit nanopartiküler sistem ve enkapsülasyon verimleri.

	%20 PBAE %80 PLGA	%10 PBAE %90 PLGA	%4 PBAE %96 PLGA	%3 PBAE %97 PLGA	%2.5 PBAE %97.5 PLGA	%2 PBAE %98 PLGA	%1 PBAE %99 PLGA	%0,5 PBAE %99.5 PLGA	%100 PLGA	%100 PLA	%100 PLGA
z average (nm)	197,00	218,00	222,90	245,70	231,50	206,00	220,40	210,70	256,00	231,60	220,00
PDI	0,16	0,16	0,131	0,27	0,30	0,158	0,19	0,186	0,297	0,24	0,23
zeta potansiyeli (mV)	26,21	23,30	14,7	7,00	6,66	4,50	0,12	-4,38	-3,50	-3,83	-6,90
enkapsülasyon verimi (%)	23,00	26,00	38,00	62,00	66,00	70,00	90,00	93,00	97,00	97,00	protein yok

%2 PBAE ve %98 oranında PLGA içeren hibrit nanopartiküler sisteme ait partikül boyutu ve zeta potansiyeli şekil 4.28'da verilmiştir.



Şekil 4.28: %2 PBAE ve %98 oranında PLGA içeren hibrit nanopartiküler sisteme ait partikül boyutu ve zeta potansiyeli.

MS1-mNeonGreen proteini için PLGA-PBAE hibrit nanopartikülleri kullanılarak enkapsülasyon veriminin artırıldığı gözlemlenmiştir. Oluşturulan nanopartiküllerde sistemin

verimliliğini artırmak adına oluşan agregatları önlemek için bu protokolde çeşitli optimizasyonlar yapılmıştır. İlk olarak PVA oranları değiştirilmiş diğer koşullar sabit tutulmuştur. Bu kapsamda elde edilen partikül boyutları ve partikül boyut dağılımları Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4: PVA oranlarının değiştirilmesiyle elde edilen PLGA-PBAE hibrit partiküllerinin boyut ve boyut dağılımları.

Örnek no	İç PVA(%)	2. emisyon PVA (%)	seyreltme PVA (%)	Santrifüj Öncesi		Santrifüj Sonrası	
				Partikül Boyutu (nm)	PDI	Partikül Boyutu (nm)	PDI
1	1,00	0,40	0,10	3434	0,37	159,20	0,52
2	2,00	0,40	0,10	7608	0,233	65,32	1,00
3	4,00	0,40	0,10	4368	0,165	65,19	1,00
4	2,80	1,00	0,10	6311	0,43	216,3	0,27
5	2,80	2,00	0,10	6621	0,47	212,3	0,37
6	2,80	4,00	0,10	3158	1,00	199,50	0,24
7	0,00	2,80	0,10	3346	0,29	138,40	1,00
Standart	2,80	0,40	0,10	6322	0,41	220,00	0,23

Agregat oluşumu PVA oranları değiştirilerek engellenememiştir ve PVA oranları sabit tutularak homojenizasyon süreleri değiştirilmiştir. Bu kapsamda elde edilen partikül boyutları ve partikül boyut dağılımları Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5: Homojenizasyon süreleri değiştirilerek elde edilen PLGA-PBAE hibrit partiküllerinin boyut ve boyut dağılımları.

Örnek no	1. emisyon süresi (s)	2. emisyon süresi (s)	Seyreltme süresi (s)	Santrifüj Öncesi		Santrifüj Sonrası	
				Partikül Boyutu (nm)	PDI	Partikül Boyutu (nm)	PDI
1	90	90	90	8106	0,01	188,30	0,43
2	90	240	90	5424	0,59	208,60	0,25
3	90	150	150	5601	0,62	199,00	0,28
4	60	150	90	1523	0,88	201,60	0,30
5	120	150	90	8665	0,47	190,50	0,28
Standart	90	150	90	4932	0,45	196,10	0,27

Homojenizatör ile yapılan denemelerde agregat oluşumu engellenememiştir. Bu bağlamda literatürde sonikatör ile yapılan nanopartikül hazırlama protokolleri incelenmiş ve agregat oluşumunun en az olduğu protokol belirlenmeye çalışılmıştır. Bu protokoller de ilk aşamada sadece PLGA kullanılarak denemeler yapılmıştır. Bütün aşamalarda 1000 rpm de karışan çözeltinin içerisine emisyonlar damla damla eklenmiş sonrasında ise tabloda detayları verilen

sonikasyon işlemleri yapılmıştır. Bütün protokollerde sonikatör (Bandelin Sonopuls HD 2070) %20 power ve 6 döngü ayarında kullanılmıştır. Kullanılan protokoller ve ayrıntıları Tablo 3.7’de verilmiştir.

Bu protokollerde ek olarak 10000 rpm 15 dk santrifüj yapılarak nanopartiküller distile su ile yıkanmış ve PVA’nın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ayrıca yıkama sonrasında da partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçülmüştür, Ölçüm sonuçları Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.6: Tablo 3.7’de verilen protokoller kullanılarak hazırlanan PLGA nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyelleri.

Protokol No	Santrifüj Öncesi			Santrifüj Sonrası		10000 rpm 15 dk santrifüj ile iki kez yıkama sonrası		
	Partikül boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu	PDI	Partikül boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)
1	181,50	0,06	-2,24	175,50	0,05	189,30	0,04	-26,00
2	267,00	0,12	-5,45	249,00	0,10	236,70	0,07	-25,70
3	214,50	0,10	-10,4	205,00	0,09	219,40	0,04	-28,30
4	182,20	0,04	-9,44	180,70	0,08	187,30	0,03	-27,00
5	186,90	0,08	-8,28	184,50	0,06	194,60	0,03	-26,60

Daha sonra hazırlanan bu partiküllere MS1-mNeonGreen proteinin yüklenmesi ve PBAE’in de yapıya katılarak nanopartikül sistemlerinin hazırlanması kısmına geçilmiştir. 4 ve 5. protokolde partikül boyutları ve hazırlama protokolü benzer olduğu için 5. protokol ileriki aşamalarda kullanılmamıştır. PLGA negatif yüklü, PBAE ve MS1-mNeonGreen proteini pozitif yüklüdür, PBAE’in ve MS1-mNeonGreen proteinin her ikisinin de pozitif yüklü olması enkapsülasyon veriminin düşük olmasına neden olmaktadır. Bu yüzden PLGA ile MS1-mNeonGreen proteinin enkapsülasyonu işlemi gerçekleştirdikten sonra PBAE’nin yapıya katılmasının enkapsülasyon verimini artıracağı kanaatine varılmıştır ve core-shell yapıda PLGA-PBAE nanopartiküler sistemler de hazırlanmıştır.

İlk aşamada %1 protein konsantrasyonu kullanılmıştır. Bu kapsamda hazırlanan nanopartiküller ve enkapsülasyon verimleri Tablo 4.7’de verilmiştir. Enkapsülasyon verimlerinin hesaplanması başlık 3.5.3’te verilen protokole uygun olarak yapılmıştır.

Tablo 4.7: PLGA ve PLGA- PBAE (core-shell) nanopartiküllerinin boyut, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon verimleri.

PLGA+ %1 MS1-mNeonGreen			Yıkama Öncesi			Yıkama Sonrası		
Protokol No	Enkapsülasyon verimi (%)	Partikül boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	
1	99,00	215,20	0,09	-3,55	198,60	0,04	-17,70	
2	98,00	242,80	0,04	-6,40	213,80	0,06	-20,20	
3	98,00	258,90	0,09	-5,50	218,10	0,05	-17,10	
4	97,70	213,20	0,08	-2,60	211,30	0,04	-19,70	

PLGA+ PBAE+%1 MS1-mNeonGreen			Yıkama Öncesi			Yıkama Sonrası		
Protokol No	Enkapsülasyon verimi (%)	Partikül boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	
1	94,00	180,08	0,04	+13,7	165,90	0,08	+35,80	
2	96,00	218,00	0,12	+5,75	196,80	0,04	+32,40	
3	96,00	233,50	0,12	+6,64	202,60	0,05	+36,10	
4	97,00	194,60	0,07	+15,10	197,70	0,07	+33,80	

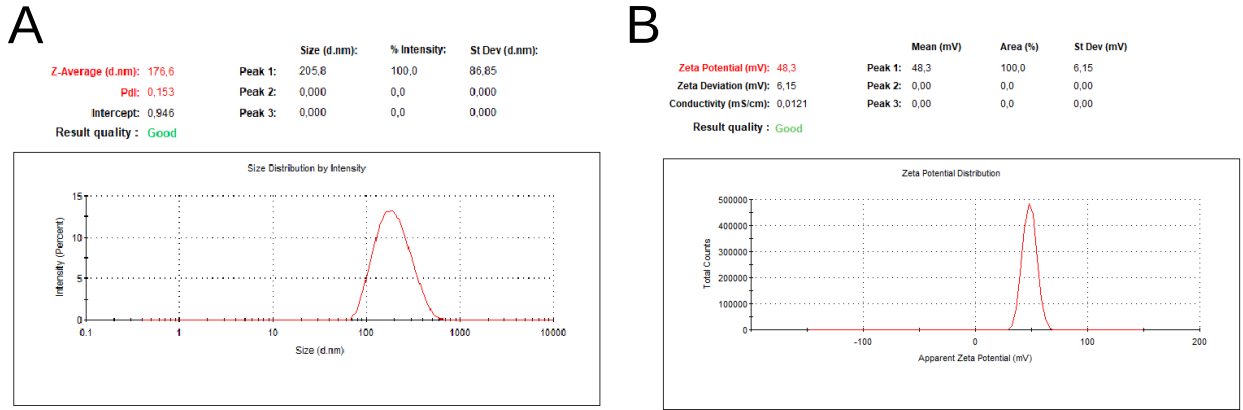
Tablo 4.7’de elde edilen veriler dikkate alınarak 1. ve 4. protokolde protein konsantrasyonları değiştirilerek partikül boyut ve enkapsülasyon verimleri analiz edilmiştir. Tablo 4.8’de bu partiküllere ait partikül boyut, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon verimleri verilmiştir.

Tablo 4.8: Farklı konsantrasyonlarda MS1-mNeonGreen proteininin PLGA ve PLGA-PBAE (core-shell) nanopartiküllerine enkapsülasyonu.

Örnek No	PLGA+MS1-mNeonGreen	Enkapsülasyon verimi (%)	Yıkama Öncesi			Yıkama Sonrası		
			Partikül boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)
1.1.	1. protokol (%1 protein)	99,00	222,50	0,04		214,90	0,10	-17,40
1.2.	1. protokol (%2 protein)	99,00	211,30	0,11		192,40	0,09	
1.3.	1. protokol (%4 protein)	97,00	179,70	0,09	-6,70	251,60	0,39	-18,40
1.4.	1. protokol (%5 protein)	98,00	191,20	0,13		218,50	0,27	
4.1.	4. protokol (%2 protein)	96,00	213,90	0,08	-1,33	223,30	0,20	-15,00
1.3 boş	1. protokol (boş)		213,20	0,04	-6,07	196,60	0,008	-20,00

Örnek No	PLGA+PBAE+MS1-mNeonGreen	Enkapsülasyon verimi (%)	Yıkama Öncesi			Yıkama Sonrası		
			Partikül boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)
1.1.	1. protokol (%1 protein)	96,00	196,60	0,11	18,50	184,90	0,18	+44,30
1.2.	1. protokol (%2 protein)	95,00	174,50	0,08		176,60	0,15	+44,70
1.3.	1. protokol (%4 protein)	87,00	164,40	0,11	24,90	176,60	0,15	+48,30
1.4.	1. protokol (%5 protein)	80,00	170,20	0,13		185,20	0,14	+48,40
4.1.	4. protokol (%2 protein)	81,00	192,10	0,11	19,30	198,40	0,13	+37,80
1.3 boş	1. protokol (boş)		182,20	0,06	14,90	162,40	0,07	+40,00

Sonuç olarak Tablo 4.8’de yer alan Örnek 1.3.’ün enkapsülasyon verimi, partikül boyutu, partikül boyut dağılımı ve zeta potansiyeli hazırlanan nanopartiküller arasında en uygunu olarak görülmüştür. Örnek 1.3. nanopartikülüne ait partikül boyut ve zeta potansiyeli Şekil 4.29’da verilmiştir.



Şekil 4.29: Örnek 1.3. nanopartikülüne ait partikül boyut ve zeta potansiyeli.

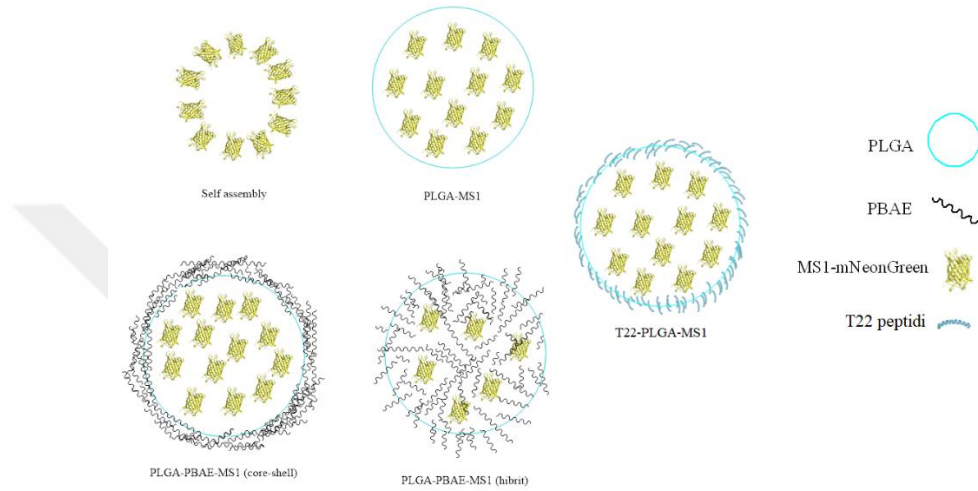
PLGA-PBAE hibrit nanopartikülleri de 1, protokol temel alınarak hazırlanmış ve enkapsülasyon verimleri hesaplanmıştır. Tablo 4.9’da bu partiküllere ait partikül boyut, zeta potansiyel ve enkapsülasyon verimleri verilmiştir.

Tablo 4.9: PLGA-PBAE (hibrit) nanopartiküllerinin partikül boyut, zeta potansiyel ve enkapsülasyon verimleri.

PLGA+PBAE+MS1-mNeonGreen	Enkapsülasyon verimi (%)	Yıkama Öncesi			Yıkama Sonrası		
		Partikül boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)
50mg PLGA+25 mg PBAE+2 mg protein	44,00	179,30	0,08	16,70	180,10	0,16	48,90
40 mg PLGA+10mg PBAE +2 mg protein	57,00	188,40	0,09	9,20	193,70	0,14	45,80
50mg PLGA+25 mg PBAE (boş)	-	180,20	0,05	24,10	176,00	0,16	45,50

4.6. ÜRETİLEN NANOPARTİKÜLLERİN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Optimize edilen nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için kullanılan partiküllere ait şekilsel gösterim (şekil 4.30) ve onlara ait boyut ve enkapsülasyon verimleri Tablo 4.10’da özetlenmiştir.

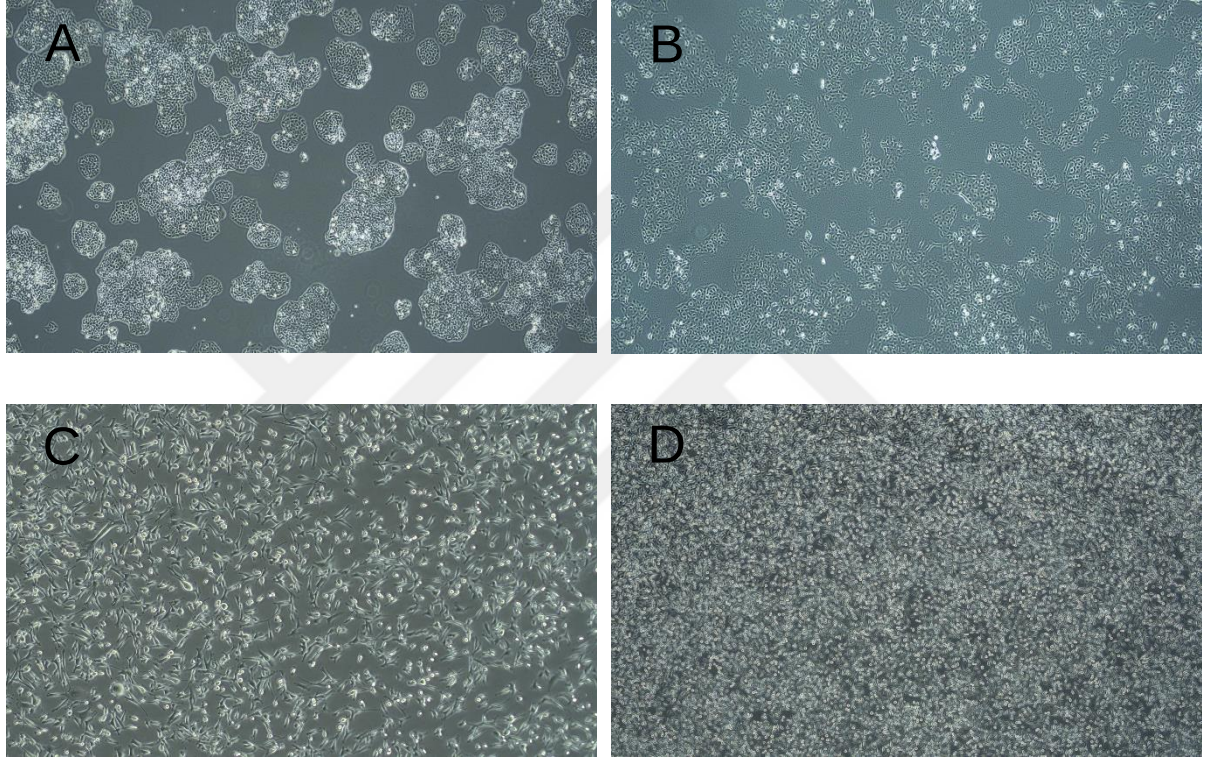


Şekil 4.30: Tez çalışmasında kullanılan nanopartiküllerin şekilsel gösterimi.

Tablo 4.10: Tez çalışması kapsamında üretilen nanopartiküllere ait özet veriler.

Nanopartikül	Enkapsülasyon verimi (%)	Yıkama Öncesi			Yıkama Sonrası		
		Partikül boyutu	PDI	Zeta potansiyeli	Partikül boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyeli (mV)
MS1-mNeonGreen self-assembly	-	80,57	0,39	-9,00	-	-	-
T22-MS1-mNeonGreen self-assembly	-	94,48	0,40	-11,00	-	-	-
50 mg PLGA+ 2 mg MS1 mNeonGreen proteini	97,00	179,70	0,09	-6,70	251,60	0,20	-18,40
50 mg PLGA	-	213,20	0,04	-6,07	196,60	0,08	-20,00
50 mg PLGA+ 2 mg T22 peptid	-	171,90	0,11	-3,20	170,50	0,11	-6,40
50 mg PLGA+ 2 mg T22 peptid+ 2 mg MS1 mNeonGreen proteini	94,00	180,20	0,13	+2,50	181,80	0,12	+18,50
50 mg PLGA+ 25 mg PBAE (core-shell) + 2 mg MS1 mNeonGreen proteini	92,00	164,40	0,11	+24,90	176,60	0,15	+48,30
50 mg PLGA+ 25 mg PBAE (core-shell)	-	182,20	0,06	+14,90	162,40	0,07	+40,00
40 mg PLGA+10mg PBAE (hibrit) +2 mg MS1 mNeonGreen proteini	50,00	188,40	0,09	+9,20	193,70	0,14	+45,80
40 mg PLGA+10mg PBAE (hibrit)	-	180,20	0,05	+24,10	176,00	0,16	+45,50

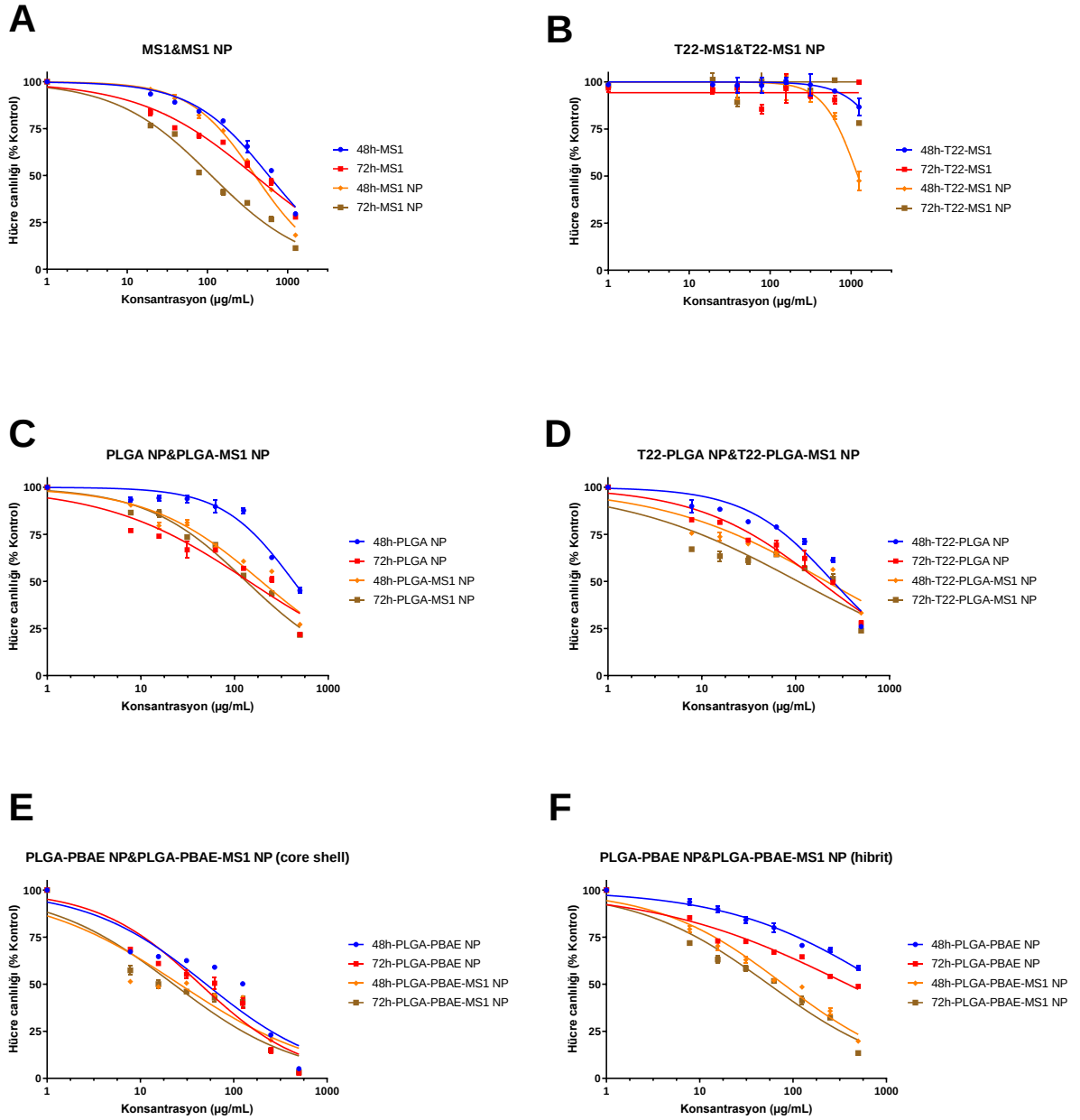
Self-assembly protein nanoyapılar ve nanopolimerlerin sitotoksik etkisinin araştırılması için HeLa (serviks kanser hücre hattı), MDA-MB-231 (meme kanseri hücre hattı), A549 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı) ve HUVEC (İnsan umbilikal ven endotel hücreleri) kullanılmıştır. Kültüre edilen hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüleri şekil 4.31’de verilmiştir.



Şekil 4.31: Kültüre edilen hücrelerin invert mikroskoptaki görüntüleri, A. HeLa, B. HUVEC, C. MDA-MB-231, D. A549.

2.3.1. Üretilen nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Üretilen nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerindeki 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi % canlılık olarak şekil 4.32’da verilmiştir.



Şekil 4.32: Üretilen nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerindeki 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi (Veriler, üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ SD'si olarak ifade edildi, ($p < 0,05$, $n=3$)).

Hazırlanan self-assembly nanopartiküllerden MS1-mNeonGreen proteinin T22-MS1-mNeonGreen proteinine göre HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin daha iyi olduğu görülmektedir. Polimerik nanopartiküllerde PLGA polimerinin PBAE ile kombinasyonu, nanopartikülün HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini artırmıştır. PLGA-PBAE core shell yapıdaki nanopartikülün daha toksik olduğu, ancak yüksek konsantrasyonlarda bu

toksisitenin içerisine protein enkapsüle edilen PLGA-PBAE core shell yapıdaki nanopartikülden farklı olmadığı görülmektedir. Ayrıca, HeLa hücreleri üzerinde tüm konsantrasyonlarda protein yüklü nanopartiküllerin yüksüz olanlara göre anlamlı bir toksisitesi mevcuttur. Ek olarak PLGA ve hedeflendirilmiş hali olan T22-PLGA nanopartiküllerinin sitotoksiteleri arasında ciddi bir fark gözlenmemiştir.

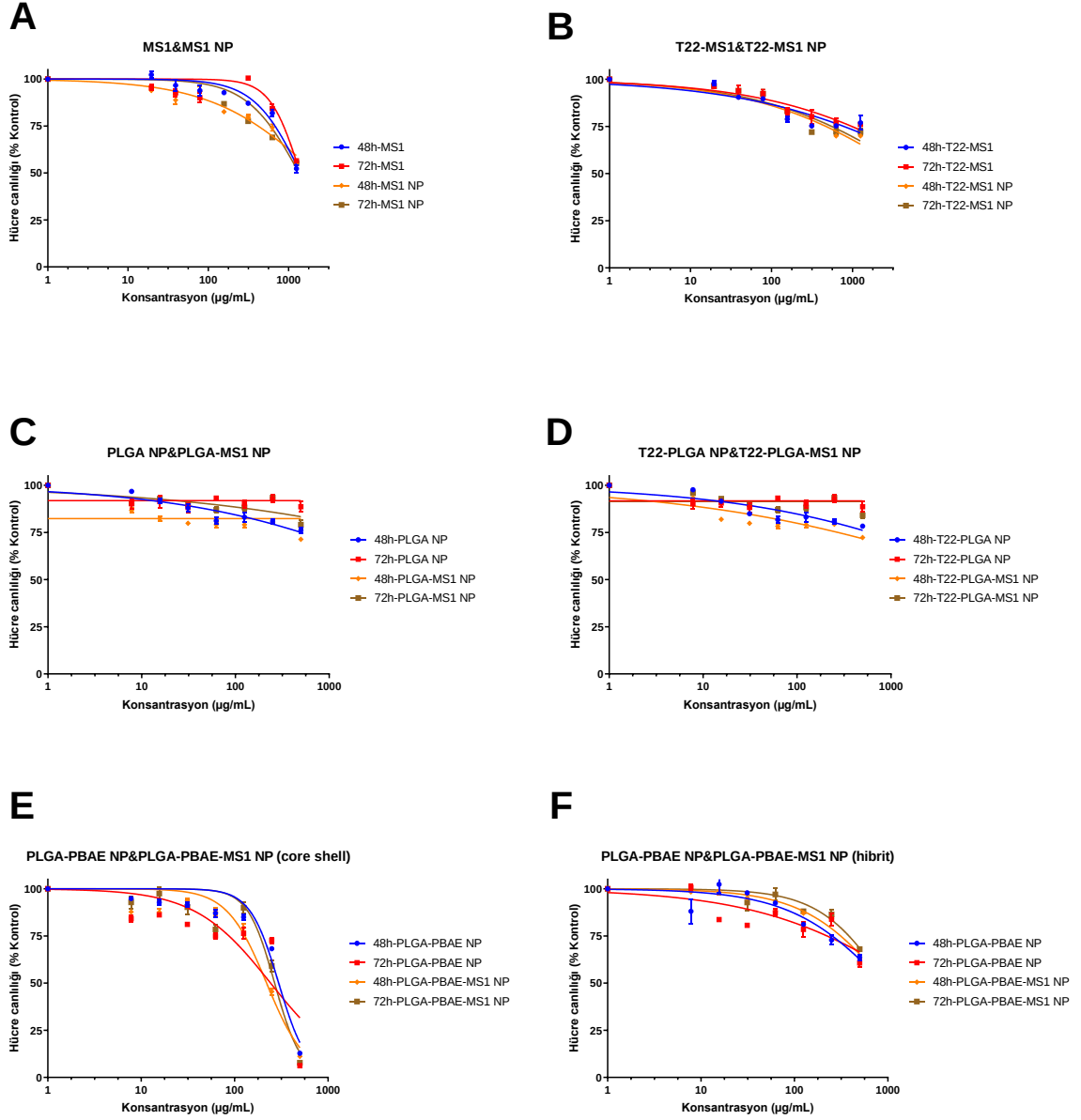
Uygulanan nanopartiküllerin IC_{50} ("half maximal inhibitory concentration") olarak ifade edilen %50 oranında hücre canlılığını inhibe edici konsantrasyonları saptanmıştır. Nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerindeki IC_{50} değerleri Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.11: Nanopartiküllerin 48 ve 72 saat sonra HeLa hücreleri üzerindeki IC_{50} değerleri.

Partikül	$IC_{50}(\mu g/mL)$ 48h	$IC_{50}(\mu g/mL)$ 72h
MS1 NP	391,20±3,60	111,50±3,90
T22-MS1 NP	1213,00±9,60	-
PLGA-MS1 NP	193,40±5,40	133,60±4,10
T22-PLGA-MS1 NP	213,30±6,50	106,30±9,40
PLGA-PBAE-MS1 NP (core-shell)	26,30±5,80	22,70±4,60
PLGA-PBAE-MS1 NP (hibrit)	79,10±4,50	54,80±5,80

4.6.1. Üretilen Nanopartiküllerin HUVEC Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Üretilen nanopartiküllerin HUVEC hücreleri üzerindeki 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi % canlılık olarak şekil 4.33'te verilmiştir.



Şekil 4.33: Üretilen nanopartiküllerin HUVEC hücreleri üzerindeki 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi (Veriler, üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ SD'si olarak ifade edildi ($p < 0,05$, $n=3$)).

Hazırlanan nanopartiküllerden PLGA-PBAE core shell yapıda olanlar dışında diğer nanopartiküllerin HUVEC sağlıklı hücre hattında ciddi bir toksisitesi gözlenmemiştir. Bu nanopartiküllerin HUVEC hücreleri üzerindeki IC_{50} değerleri Tablo 4.12'de verilmiştir.

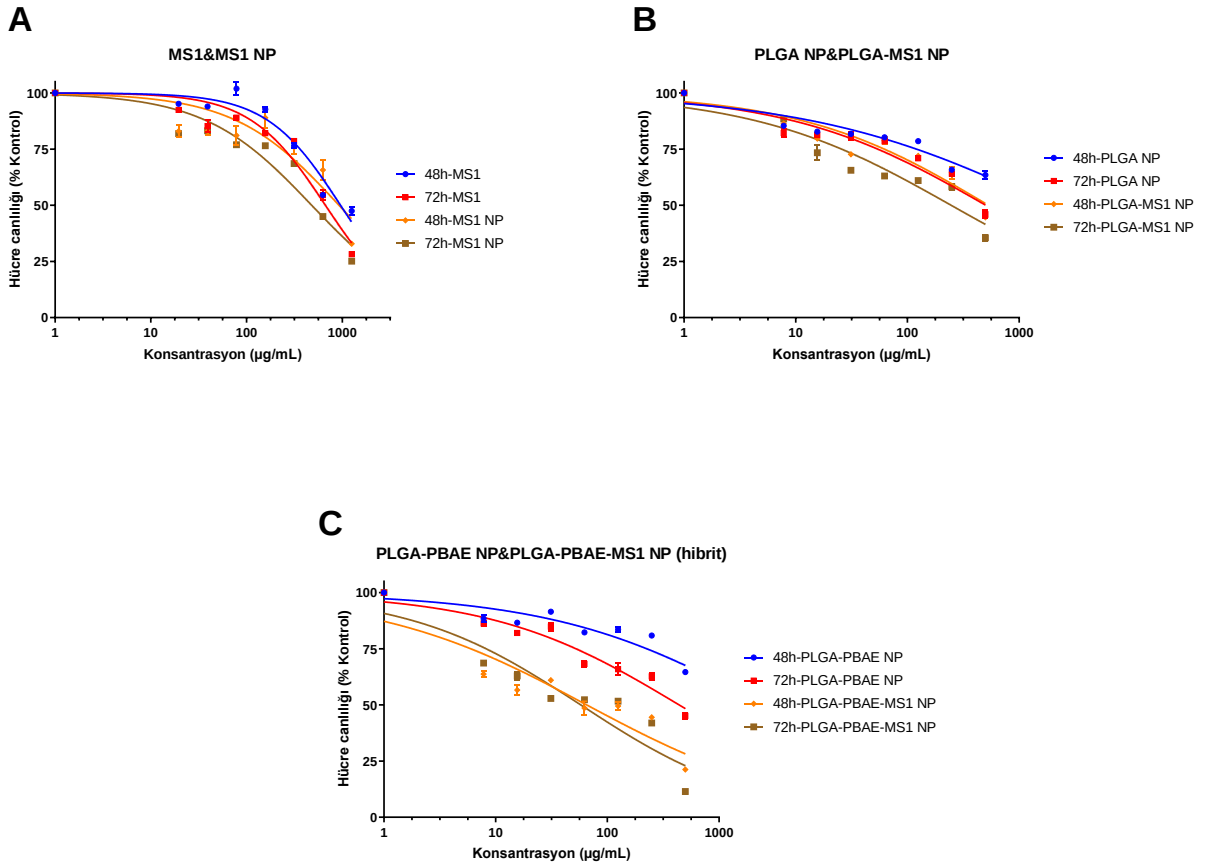
Tablo 4.12: Nanopartiküllerin 48 ve 72 saat sonra HUVEC hücreleri üzerindeki IC₅₀ değerleri.

Partikül	IC₅₀(µg/mL) 48h	IC₅₀(µg/mL) 72h
MS1 NP	2201,00±4,10	1349,00±12,40
T22-MS1 NP	4997,00±4,00	5897,00±5,10
PLGA-MS1 NP	-	-
T22-PLGA-MS1 NP	-	-
PLGA-PBAE-MS1 NP (core-shell)	219,90±7,60	268,10±10,90
PLGA-PBAE-MS1 NP (hibrit)	949,60±3,30	942,40±7,10

Nanopartiküllerin sağlıklı hücre ve kanser hücresi üzerindeki seçici toksisiteleri göz önünde bulundurulduğunda, self-assembly nanopartiküllerden MS1-mNeonGreen ve polimerik nanopartiküllerden PLGA ve PLGA-PBAE hibrit nanopartiküllerin diğer kanser hücre hatlarında da sitotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

4.6.2. Üretilen nanopartiküllerin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Üretilen nanopartiküllerin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi % canlılık olarak şekil 4.34'te verilmiştir.



Şekil 4.34: Üretilen nanopartiküllerin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi (Veriler, üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ SD'si olarak ifade edildi ($p < 0,05$, $n=3$)).

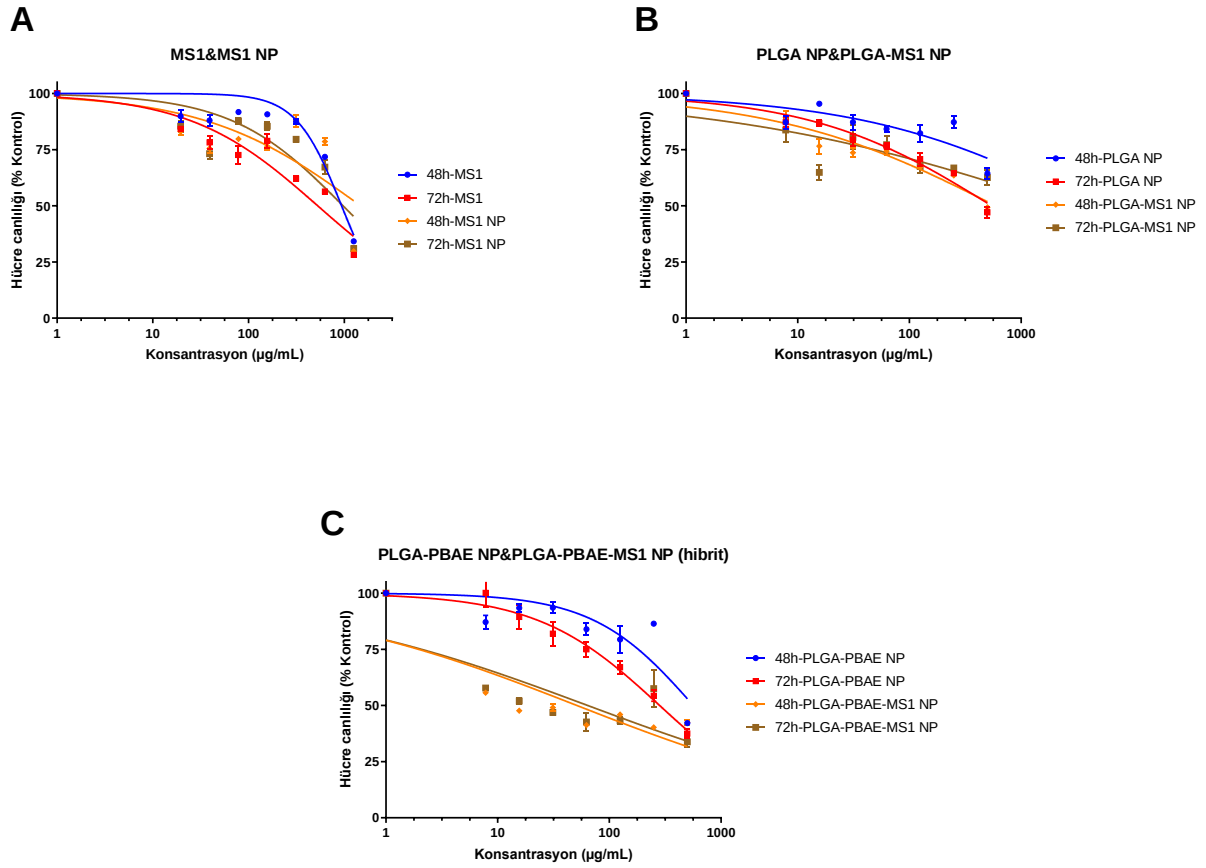
Nanopartiküllerin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki IC_{50} değerleri Tablo 4.13'te verilmiştir.

Tablo 4.13: Nanopartiküllerin 48 ve 72 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki IC_{50} değerleri.

Partikül	$IC_{50}(\mu g/mL)$ 48h	$IC_{50}(\mu g/mL)$ 72h
MS1 NP	$922,50 \pm 11,40$	$478,40 \pm 7,80$
PLGA-MS1 NP	$532,30 \pm 6,10$	$246,40 \pm 6,50$
PLGA-PBAE-MS1 NP (hibrit)	$65,37 \pm 9,10$	$57,85 \pm 9,40$

4.6.3. Üretilen nanopartiküllerin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Üretilen nanopartiküllerin A549 hücreleri üzerindeki 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi % canlılık olarak şekil 4.35’te verilmiştir.



Şekil 4.35: Üretilen nanopartiküllerin A549 hücreleri üzerindeki 48 ve 72 saatlik sitotoksik etkisi (Veriler, üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ SD'si olarak ifade edildi ($p < 0,05$, $n=3$)).

Nanopartiküllerin A549 hücreleri üzerindeki IC_{50} değerleri Tablo 4.14’te verilmiştir.

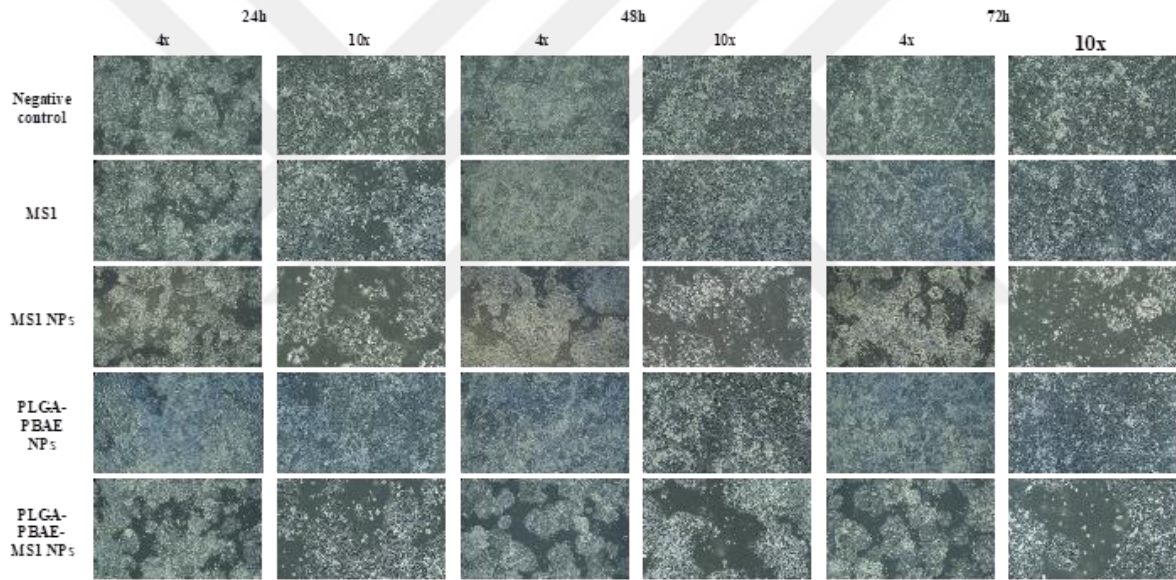
Tablo 4.14: Nanopartiküllerin 48 ve 72 saat sonra A549 hücreleri üzerindeki IC_{50} değerleri.

Partikül	$IC_{50}(\mu g/mL)$ 48h	$IC_{50}(\mu g/mL)$ 72h
MS1 NP	1482,00 $\pm$ 17,90	969,00 $\pm$ 14,76
PLGA-MS1 NP	591,20 $\pm$ 5,80	2453,00 $\pm$ 10,80
PLGA-PBAE-MS1 NP (hibrit)	51,21 $\pm$ 11,00	64,01 $\pm$ 14,40

4.7. ÜRETİLEN NANOPARTİKÜLLERİN KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

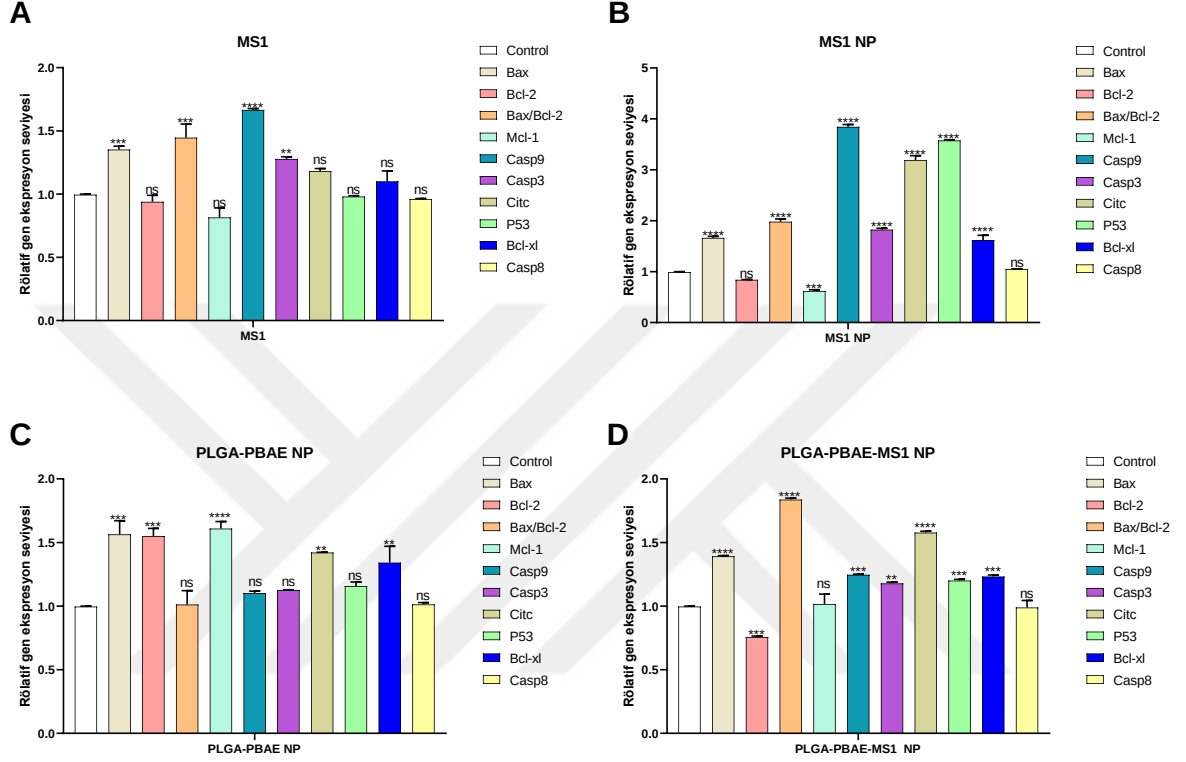
4.7.1. RT-PCR

Üretilen nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin belirlenmesi, qRT-PCR kullanılarak apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin gen ekspresyonlarının analiz edilmiştir. Nanopartiküllerin belirlenen IC₅₀ değerlerinde apoptotik etkisinin araştırılması için 25 cm² hücre kültür kabına HeLa hücreleri ekilmiştir. Hücre yoğunluğu %80 olduğunda kültür kabındaki hücrelerden besi yeri uzaklaştırılarak, hücrelerin üzerine farklı konsantrasyonlardaki nanopartikül içeren besi yerlerinden eklenip etüvde bekletilmiştir. Sonraki 24. 48. saatte ve 72. saatte hücrelerin invert mikroskop ile fotoğrafları çekilmiştir (şekil 4.36).



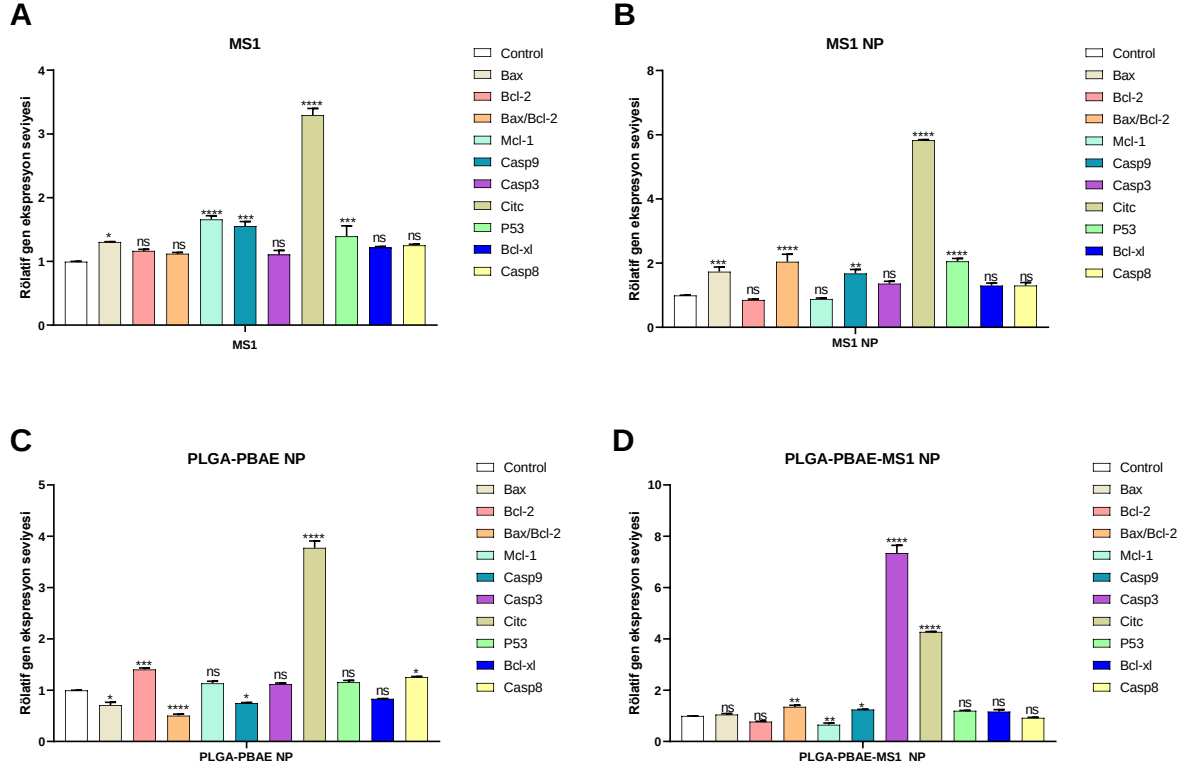
Şekil 4.36: Nanopartiküllere maruz bırakılan HeLa hücrelerinin 24. 48. ve 72. saatte invert mikroskop ile çekilmiş fotoğrafları.

Elde edilen sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile hesaplanmış ve GraphPad Prism 8.0.2 yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir (Şekil 4.37).



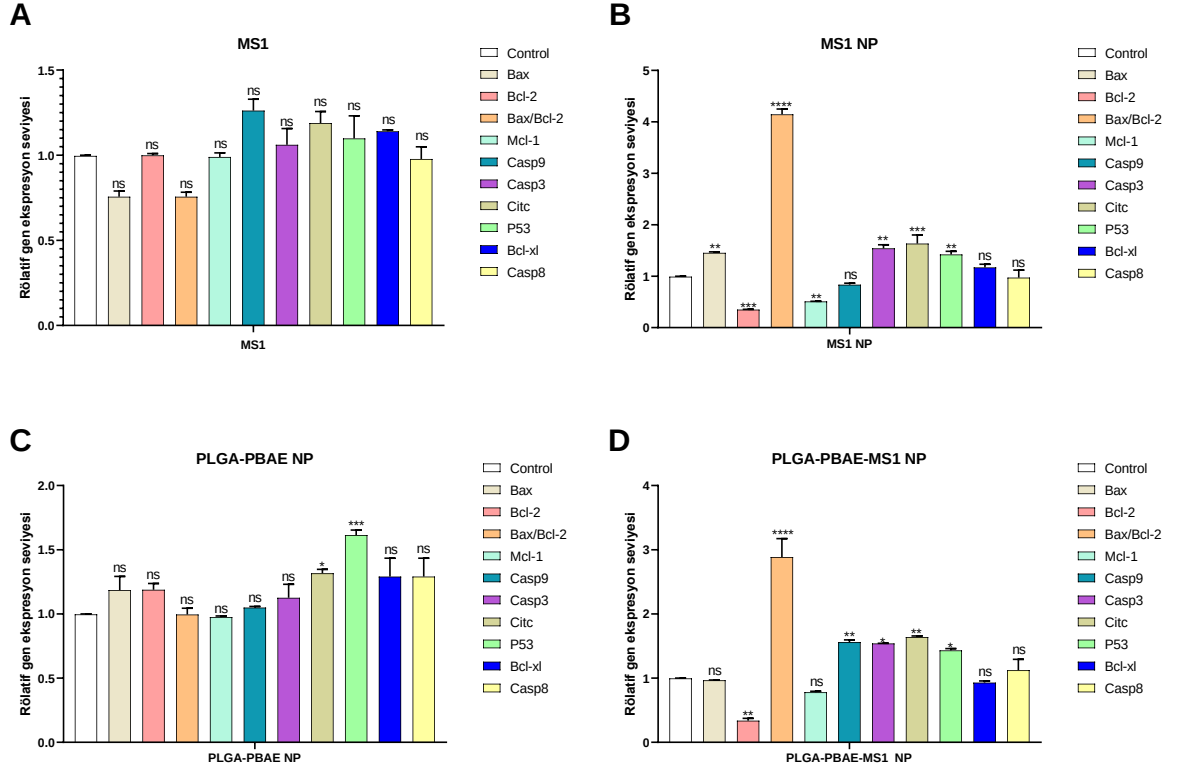
Şekil 4.37: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan HeLa hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik genlerin ekspresyon seviyeleri ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n=3$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil).

MDA-MB-231 hücreleri için qRT-PCR sonuçları $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile hesaplanmış ve GraphPad Prism 8.0.2 yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik genlerin ekspresyon seviyeleri ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 00001$, $n=3$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil).

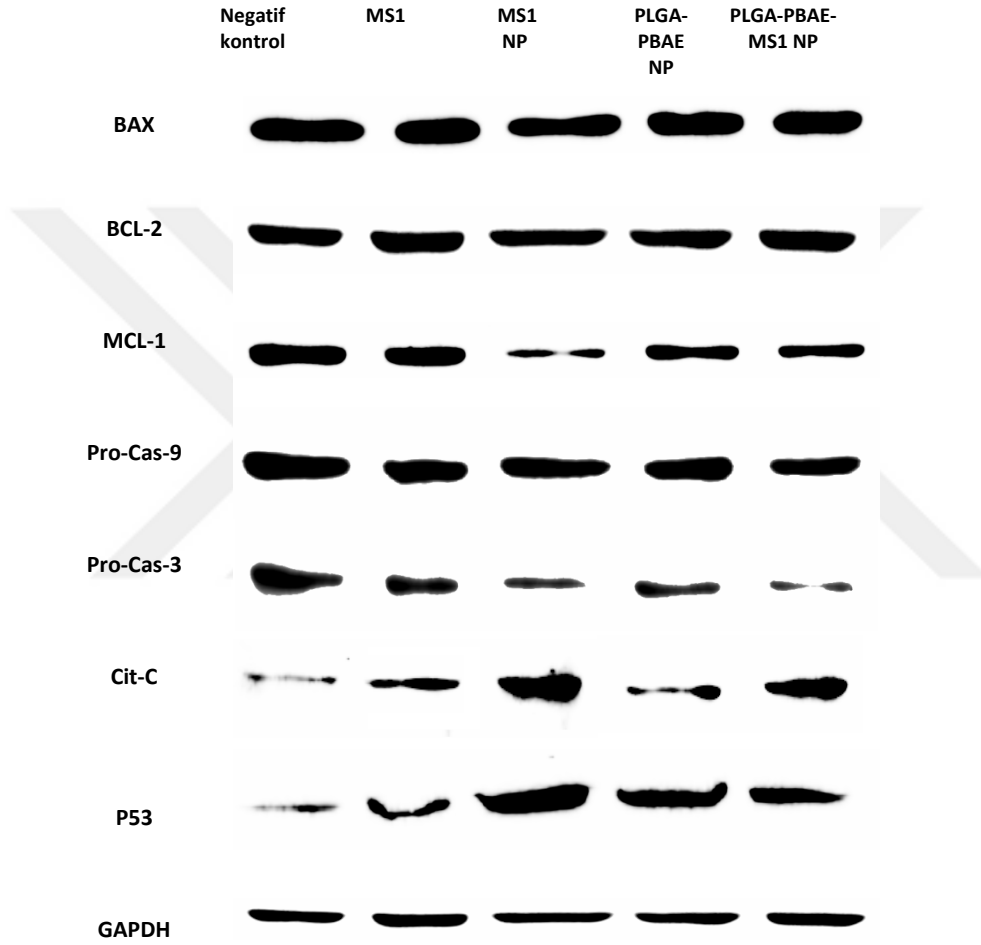
A549 hücreleri için qRT-PCR sonuçları $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile hesaplanmış ve GraphPad Prism 8.0.2 yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir (Şekil 4.39).



Şekil 4.39: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan A549 hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik genlerin ekspresyon seviyeleri ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n=3$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil).

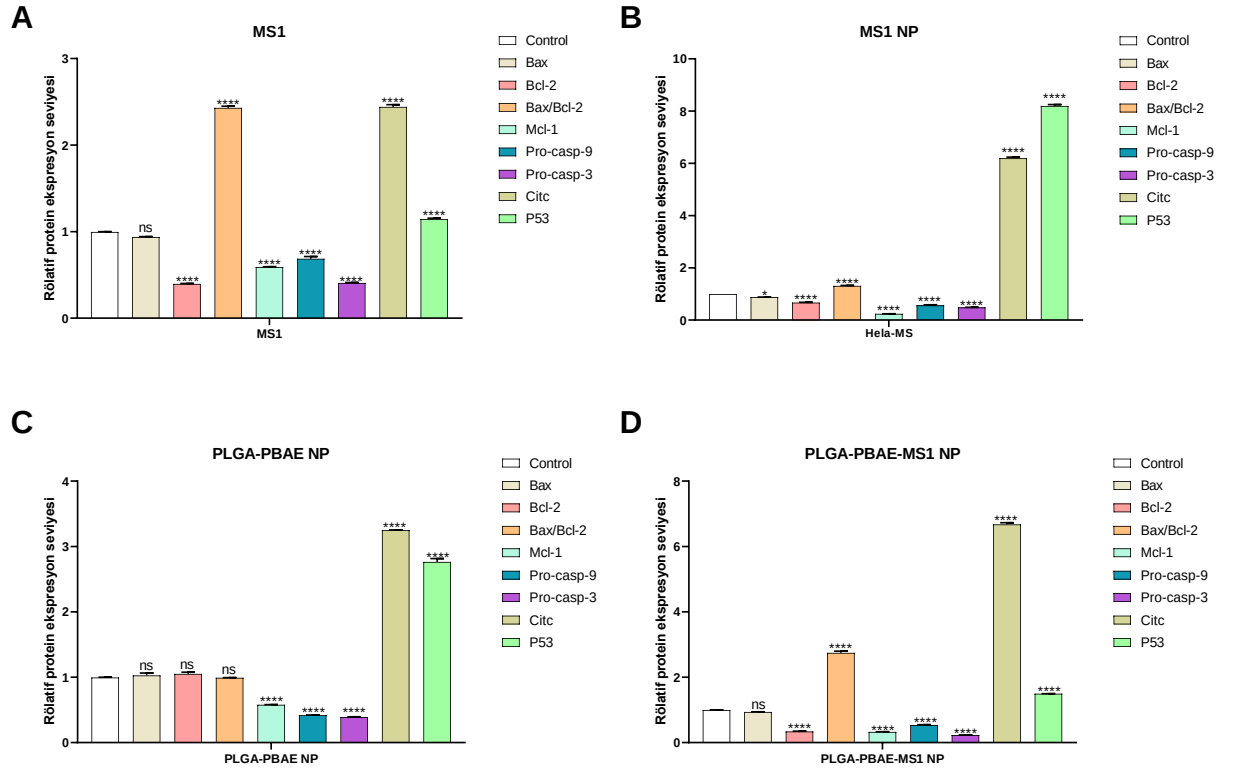
4.7.2. Western Blotlama

Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan HeLa hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri western blotlama tekniği ile belirlenmiştir. Şekil 4.40 HeLa hücrelerinde western blotlama analizine ait protein bantlarını göstermektedir.



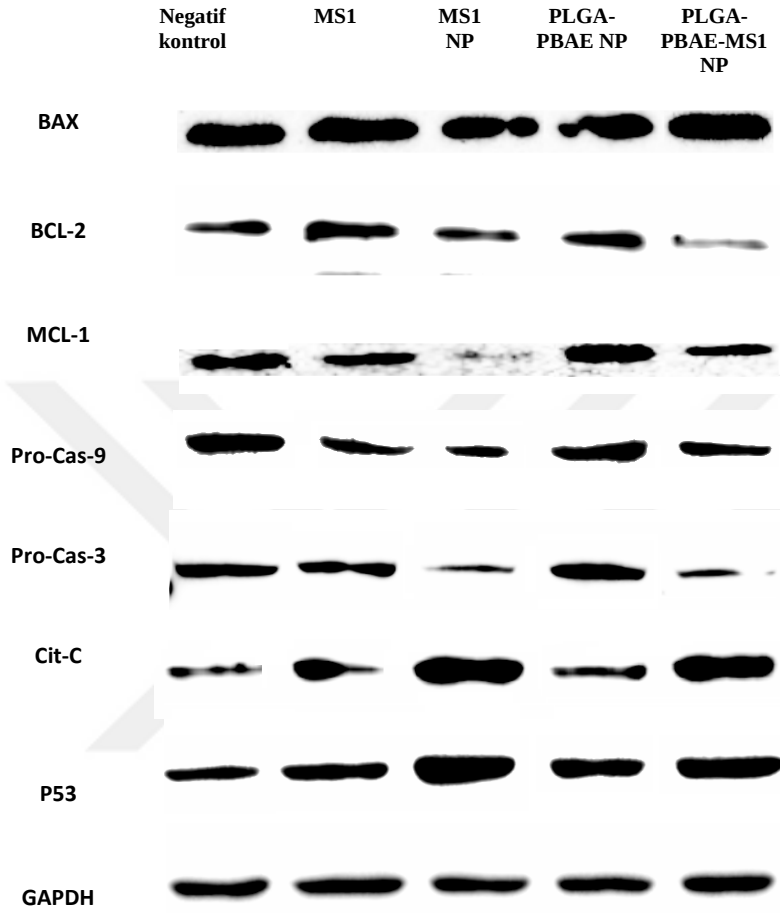
Şekil 4.40: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan HeLa hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin Western blot yöntemi ile analizi.

Protein ekspresyon seviyeleri, ImageLab 6.1 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel analiz ve karşılaştırılabilir veri setleri, one-way ANOVA (Dunnett's testi) ile GraphPad Prism 8.0.2 yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ olasılık değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (Şekil 4.41).



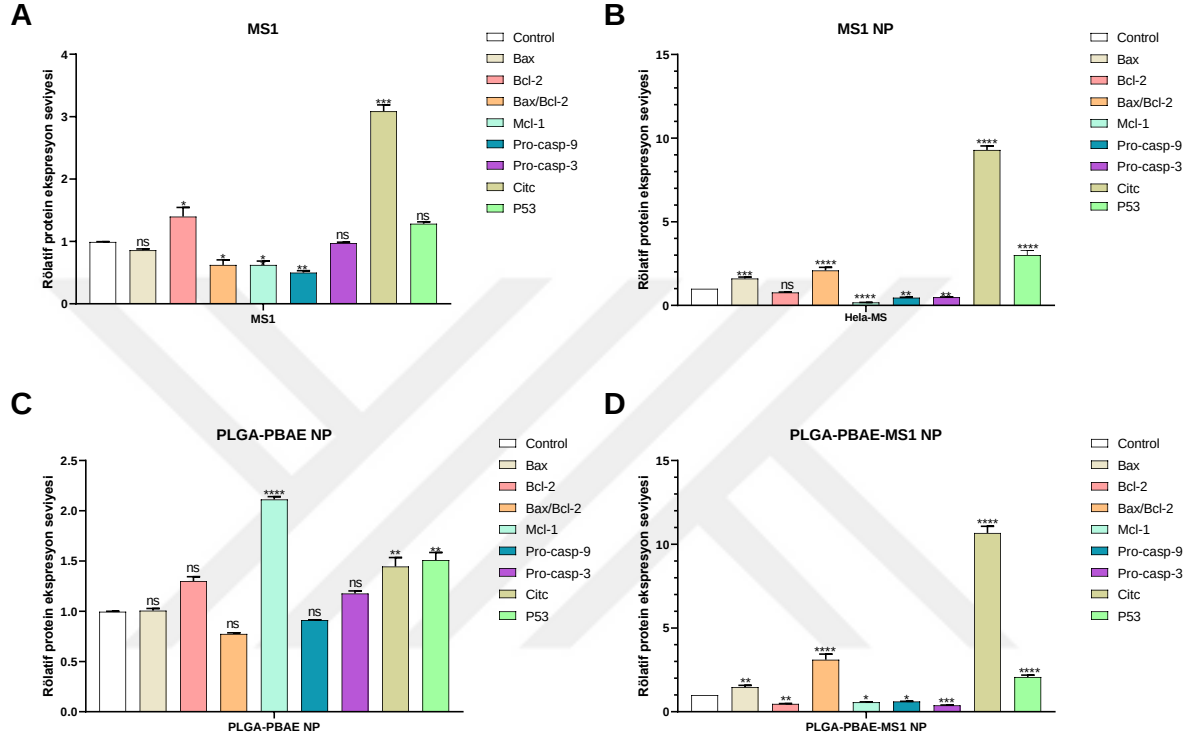
Şekil 4.41: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan HeLa hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n=3$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil).

Şekil 4.42’de MDA-MB-231 hücrelerinde western blotlama analizine ait protein bantları gösterilmiştir.



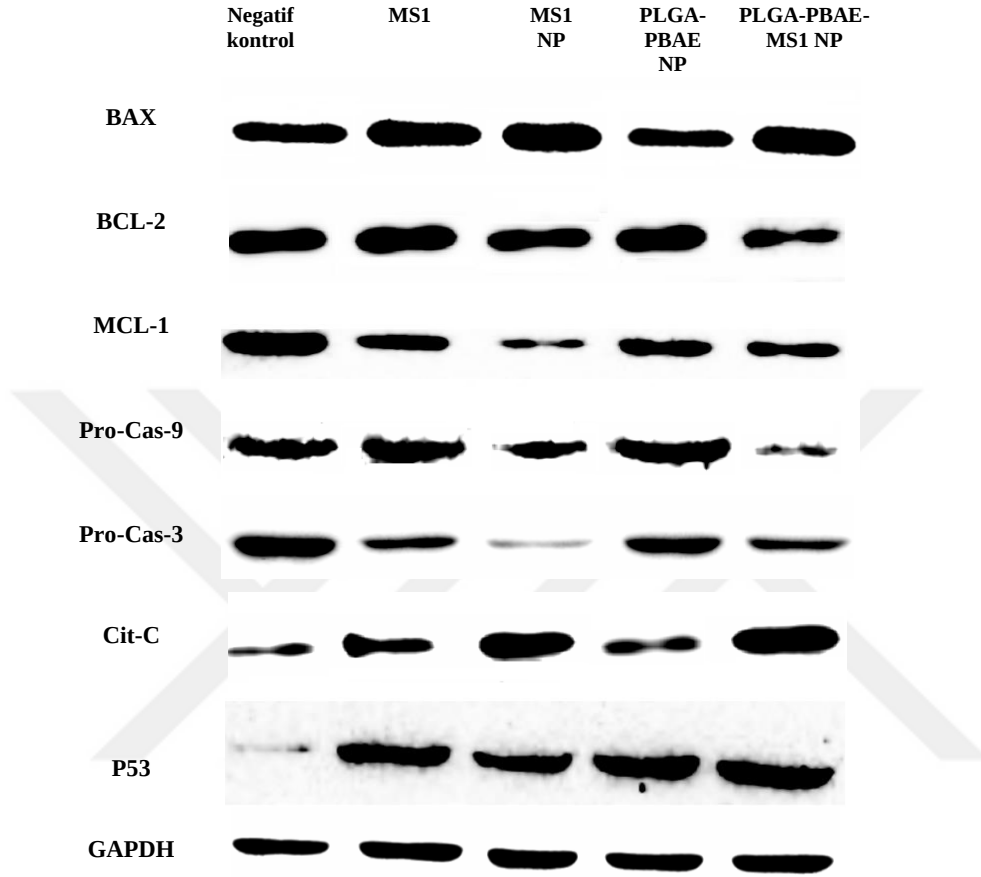
Şekil 4.42: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin Western blot yöntemi ile analizi.

Protein ekspresyon seviyeleri, ImageLab 6.1 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel analiz ve karşılaştırılabilir veri setleri, one-way ANOVA (Dunnett's testi) ile GraphPad Prism 8.0.2 yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ olasılık değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (Şekil 4.43).



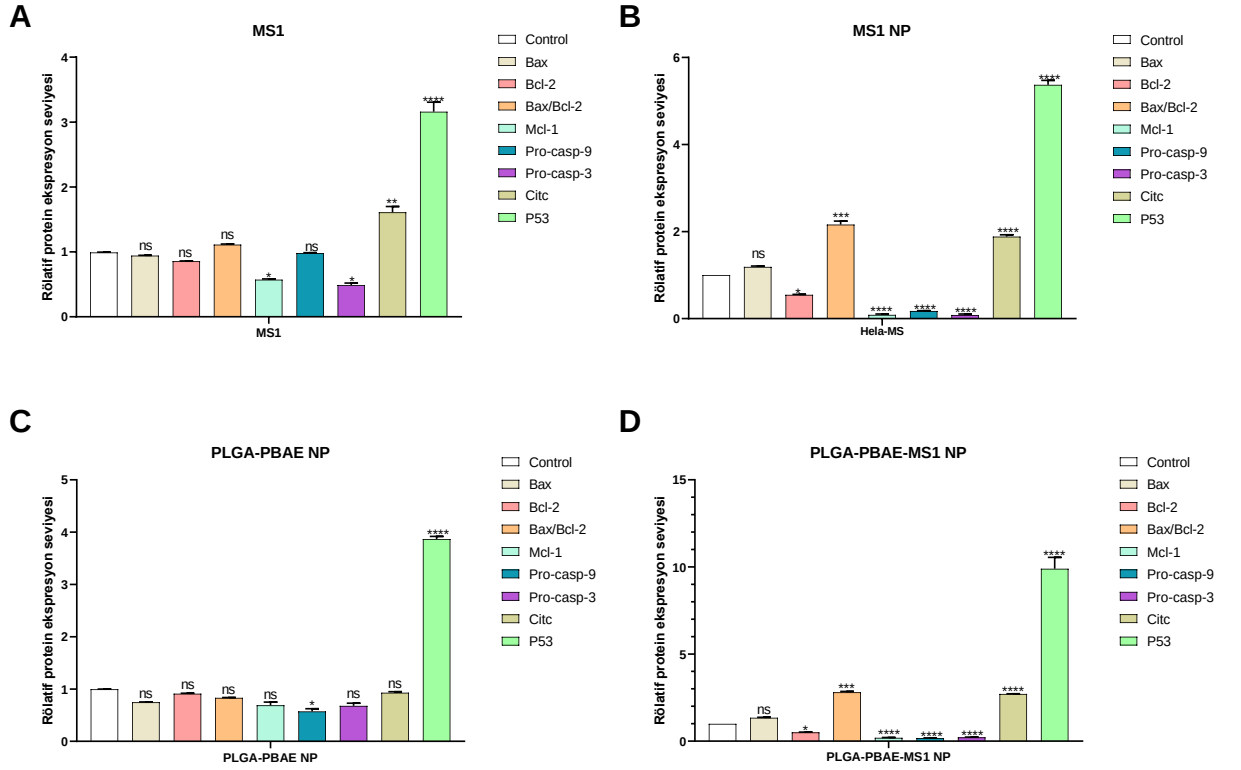
Şekil 4.43: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n=3$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil).

Şekil 4.44'te A549 hücrelerinde western blotlama analizine ait protein bantları gösterilmiştir.



Şekil 4.44: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan A549 hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin Western blot yöntemi ile analizi.

Protein ekspresyon seviyeleri, ImageLab 6.1 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel analiz ve karşılaştırılabilir veri setleri, one-way ANOVA (Dunnett's testi) ile GraphPad Prism 8.0.2 yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir $p < 0,05$ olasılık değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (Şekil 4.45).



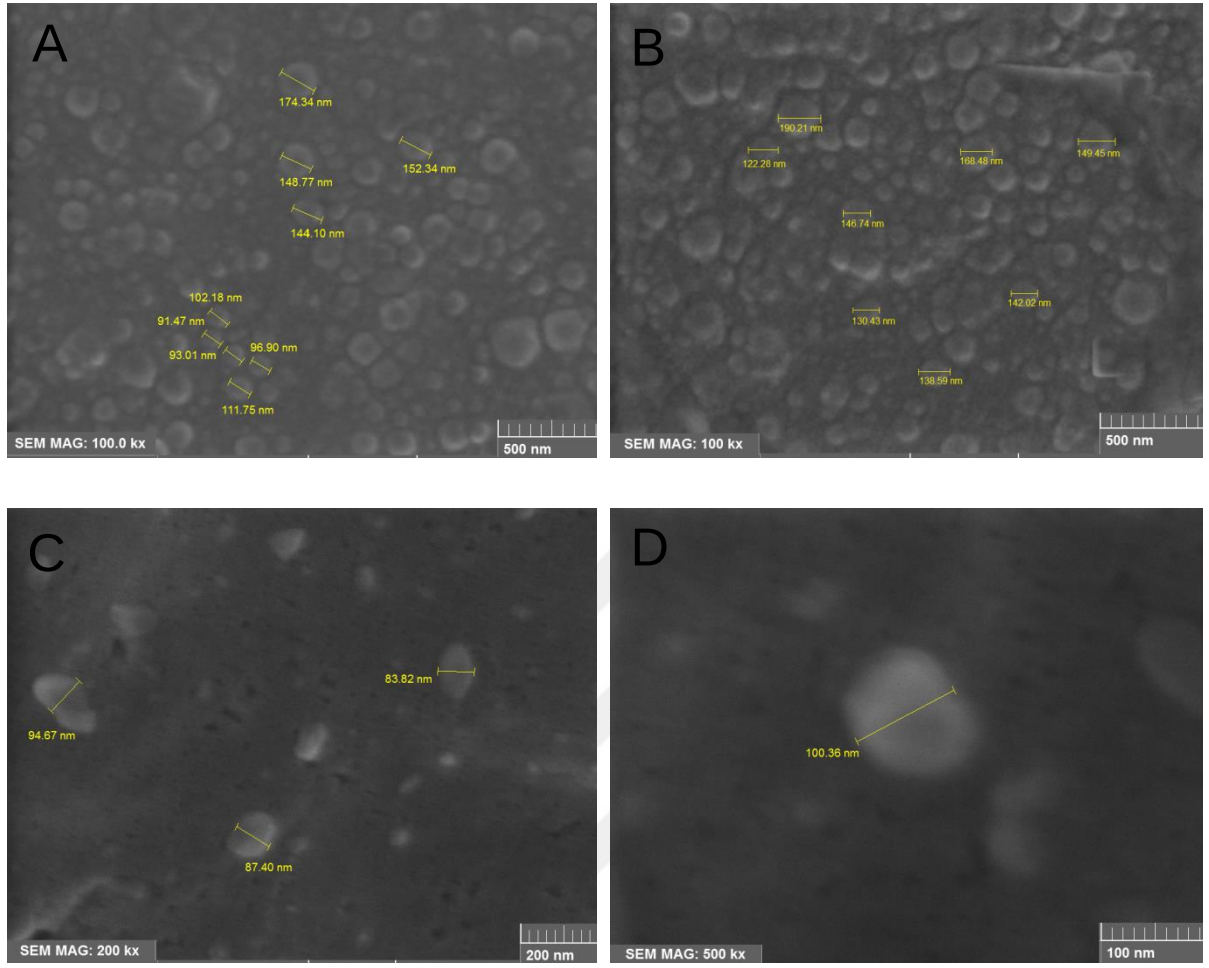
Şekil 4.45: Üretilen nanopartiküllere maruz bırakılan A549 hücrelerinde apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n=3$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil).

4.8. NANOPARTİKÜLLERİN İLERİ KARAKTERİZASYONLARI

Hazırlanan nanopartiküllerden hücre kültür sonuçları da dikkate alınarak başarılı olanları üzerine ek analizler de gerçekleştirilmiştir.

4.8.1. Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile analizi

Bu nanopartiküllerin boyut ve morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile analiz edilmiştir. SEM (TESCAN, MAIA3XMU) analizleri Bartın Üniversitesi'nden hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.46).



Şekil 4.46: Nanopartiküllere ait SEM görüntüleri, A. PLGA-MS1 nanopartikülleri B. PLGA-PBAE-MS1 nanopartikülleri C. MS1 self-assembly nanopartikülleri (200kx) D. MS1 self-assembly nanopartikülleri (500kx).

4.8.2. Nanopartiküller Taşıyıcı Sistemlerin Stabilitelerinin Belirlenmesi

Nanopartiküllerin fiziksel stabilitesi belirli zaman aralığında incelenmiştir. Bu amaçla hazırlanan nanopartiküllerden +4 °C’de belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçülmüştür (Tablo 4.15).

Tablo 4.15: Nanopartiküllerin +4 °C'deki stabiliteleri.

Nanopartiküller		PLGA NP	PLGA-MS1	PLGA-PBAE NP	PLGA-PBAE-MS1-NP	MS1 NPs
0.saat	Partikül boyutu (nm)	170,70±2,10	157,4±1,80	159,20±1,40	159,30±2,50	84,90±1,90
	PDI	0,10±0,05	0,14±0,09	0,10±0,01	0,12±0,02	0,38±0,160
	Zeta potansiyeli (mV)	-34,34±3,10	-14,70±2,30	+50,80±3,40	+62,00±2,10	- 11,10±1,30
1.Hafta	Partikül boyutu (nm)	176,40±3,20	176,30±2,20	159,07±1,70	156,70±0,10	73,40±2,30
	PDI	0,04±0,02	0,187±0,03	0,034±0,01	0,10±0,01	0,56±0,12
	Zeta potansiyeli (mV)	-32,70±2,30	-15,00±2,40	+40,90±2,80	+50,70±2,50	- 11,50±1,80
2.Hafta	Partikül boyutu (nm)	174,30±2,50	243,60±3,8	158,8±1,2	159,10±0,80	70,40±5,40
	PDI	- 30,10±0,120	-12,50±0,18	0,051±0,037	0,08±0,01	0,51±0,12
	Zeta potansiyeli (mV)	-20,20±2,10	-15,10±3,20	+38,00±0,20	+45,70±1,90	- 11,00±1,20
3.Hafta	Partikül boyutu (nm)	179,30±2,30	260,90±2,50	161,20±2,50	170,00±2,90	89,70±2,80
	PDI	0,07±0,10	0,38±0,12	0,13±0,05	0,15±0,02	0,51±0,01
	Zeta potansiyeli (mV)	-15,70±3,10	-12,10±2,50	+32,00±0,20	+42,80±1,60	- 11,00±2,10
4.Hafta	Partikül boyutu (nm)	174,40±3,40	257,3±3,2	163,40±1,60	172,60±1,80	83,50±8,80
	PDI	0,11±0,09	0,33±0,12	0,15±0,01	0,15±0,04	0,48±0,18
	Zeta potansiyeli (mV)	-11,40±1,20	-10,40±1,50	+30,00±0,10	+40,60±0,30	- 11,00±1,30

4.8.3. Nanopartiküller Taşıyıcı Sistemlerin Serum Stabilitelerinin Belirlenmesi

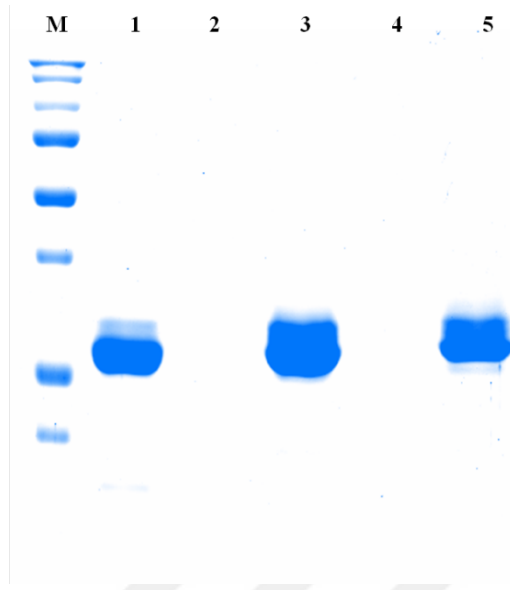
Nanopartiküllerin hücre sıvısındaki davranışlarını belirlemek için serum stabilitelerine bakılmıştır. Hazırlanan nanopartikül süspansiyonlarına %10 oranında FBS ilave edilmiş ve süspansiyonlarının belirli aralıklarla partikül boyutları ve zeta potansiyelleri ölçülmüştür (Tablo 4.16). Elde edilen sonuçlar FBS içermeyen nanopartiküllerin partikül boyutları ile karşılaştırılmıştır.

Tablo 4.16: Nanopartiküllerin %10 FBS içerisindeki stabiliteleri.

Nanopartiküller		PLGA NP	PLGA-MS1	PLGA-PBAE NP	PLGA-PBAE-MS1-NP	MS1 NP
0.saat	Partikül boyutu (nm)	170,70±2,10	157,40±1,80	159,2±1,40	159,30±2,50	84,90±1,90
	PDI	0,10±0,05	0,141±0,09	0,105±0,01	0,125±0,02	0,38±0,16
	Zeta potansiyeli (mV)	-34,34±3,1	-14,7±2,3	+50,8±3,4	+62±2,1	-11,10±1,30
24.saat	Partikül boyutu (nm)	256±2,5	254,5±1,6	156,50±4,60	159,30±2,10	94,60±3,60
	PDI	0,35±0,10	0,47±0,12	0,27±0,02	0,15±0,002	0,58±0,05
	Zeta potansiyeli (mV)	-9,10±1,30	-8,90±1,20	-2,30±0,120	-7,10±1,50	-1,90±0,11
48.saat	Partikül boyutu (nm)	270,00±3,20	260,30±3,50	156,80±2,40	167,30±2,30	132,20±5,40
	PDI	0,36±0,10	0,42±0,11	0,24±0,05	0,29±0,01	0,45±0,05
	Zeta potansiyeli (mV)	-9,10±1,20	-8,90±1,10	-2,30±0,10	-7,10±1,90	-1,20±0,21
72.saat	Partikül boyutu (nm)	363,60±2,20	276,30±3,20	153,5±1	159,4±1,1	145,80±1,30
	PDI	0,29±0,05	0,69±0,08	0,31±0,02	0,38±0,01	0,43±0,07
	Zeta potansiyeli (mV)	-9,10±1,10	-8,90±1,50	-2,30±0,10	-7,10±1,20	-1,50±0,120

4.8.4. Enkapsüle olan MS1-mNeonGreen proteinin bütünlüğünün SDS-PAGE’de analizi

Etkili bir formülasyon için, kargo molekülün bütünlüğünün korunması gerekir. Bu çalışmada, partiküllerin hazırlanması sırasında kullanılan yüksek sonikasyon kuvvetlerinin ve organik solventlerin etkisini belirlemek için, nanopartiküllerden salınan MS1-mNeonGreen proteininin SDS bütünlüğü SDS-PAGE ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.47). İkili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle enkapsülasyon işlemi MS1-mNeonGreen proteininin parçalanmasına neden olmamıştır.



Şekil 4.47: Nanopartiküller içinde kapsüllenmiş MS1-mNeonGreen proteininin SDS-PAGE analizi: M: Protein Marker, 1. kuyucuk MS1 mNeonGreen proteini (kontrol) 2. kuyucuk PLGA nanopartikülleri 3. kuyucuk PLGA-MS1 nanopartikülleri 4. kuyucuk PLGA-PBAE hibrit nanopartiküller 5. kuyucuk PLGA-PBAE-MS1 hibrit nanopartiküller.

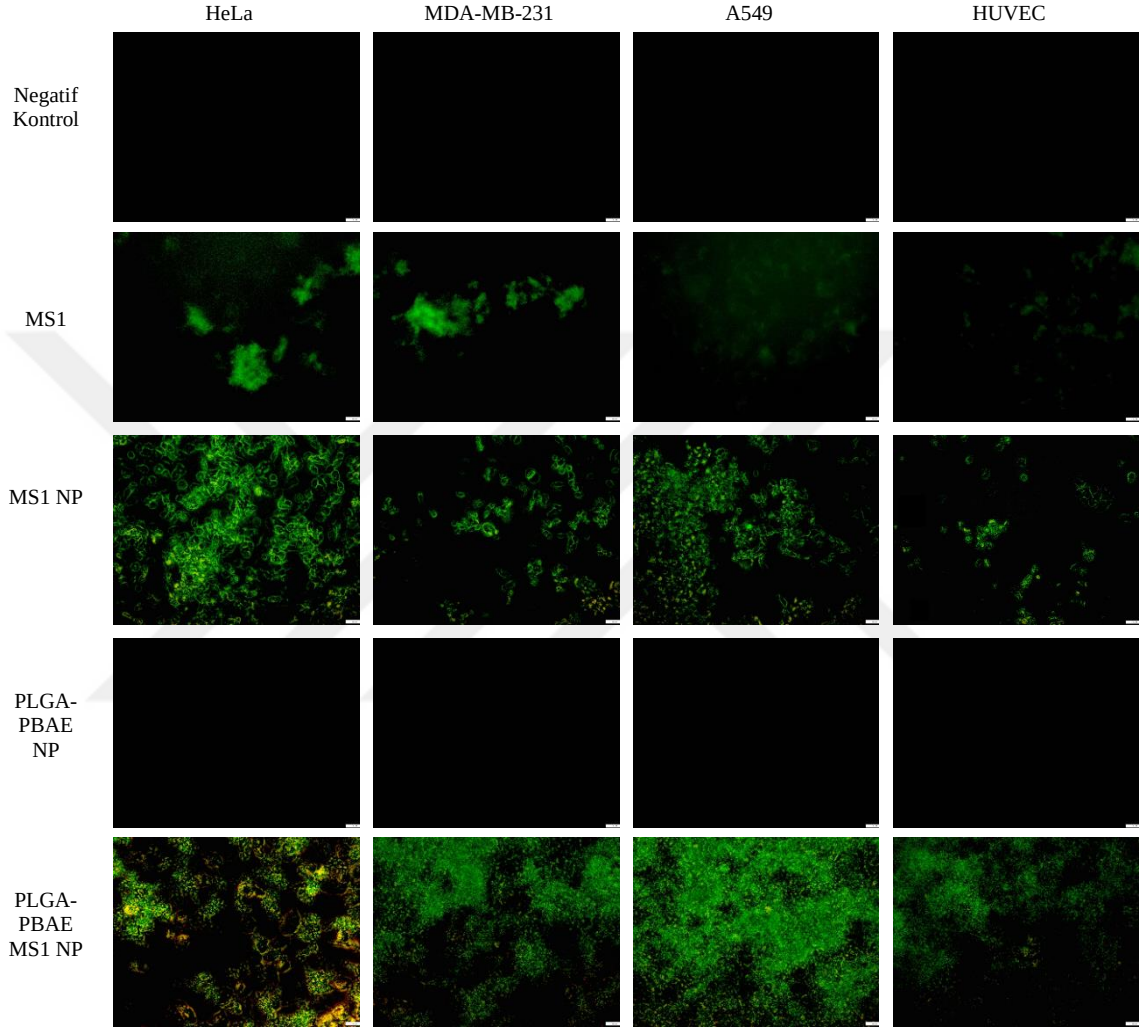
Kapsüle olan nanopartiküler sistemler santrifüj ile çöktürüldüğünde MS1-proteini polimerik nanopartikül içerisinde hala floresan ışımalarını korumaktadır. Bu proteinin konformasyonunun bozulmadığını da kanıtlamaktadır (Şekil 4.48).



Şekil 4.48: Tez çalışması kapsamında üretilen polimerik nanopartiküllerin 10000 rpm'de 15 dk santrifüj işlemi sonrası UV ışık altındaki görüntüsü.

4.8.5. Nanopartiküllerin Hücreye Alımının Floresan Mikroskop ile Analizi

Nanopartiküllerin hücreye alımları floresan mikroskop ile analiz edilmiştir. Elde edilen floresan mikroskop görüntüleri şekil 4.49’da verilmiştir.



Şekil 4.49: Nanopartiküllerin hücreye alımının floresan mikroskop ile analizi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Apoptoz, BCL-2 protein ailesinin üyeleri arasındaki dinamik bir etkileşim ağı tarafından düzenlenir. BCL-2 ailesinin proteinleri, mitokondriden apoptotik faktörlerin salınmasını düzenleyen, apoptozun intrinsik yolundaki temel proteinlerdir. BCL-2 ailesi, antiapoptotik ve proapoptotik proteinleri içerir. Antiapoptotik BCL-2 proteinleri, mitokondriyal membran bütünlüğünü koruyarak apoptozu engeller. Bu proteinler, mitokondriyal membran permeabilizasyonunun efektörleri olan BAX ve BAK'ı bağlar ve etkisiz hale getirirler (Wei ve diğ., 2001). Hücrenin akıbeti, BCL-2 ailesinin proapoptotik ve antiapoptotik üyeleri arasındaki denge ve bu proteinler arasındaki etkileşimler tarafından belirlenir. Apoptozdan kaçınma, kanser hücrelerinin ayırt edici özelliklerinden biridir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Apoptoz direncinin altında yatan moleküler mekanizmalar çeşitlidir ve BCL-2 proteinlerinin ekspresyonunda ve aktivitesinde değişiklikleri içerir. Birçok durumda kanser hücrelerinin sağkalımı BCL-2 ailesinin antiapoptotik proteinlerinin ekspresyonuna bağımlı hale gelir (Gong ve diğ., 2016). Ayrıca kanserli hücrenin kemoterapiye cevabında, BCL-2 ailesindeki proteinlerin etkisi önem arz etmektedir. Çünkü; birçok antikanser ajan apoptozun intrinsik yolağı üzerinden hücre ölümüne neden olmaktadır. Antiapoptotik proteinlerden BCL-XL, BCL-2 ve MCL-1 agresif malign fenotipler ve çeşitli kemoterapötik ajanlara karşı direnç ile ilişkili oldukları için cazip terapötik hedeflerdir.

MCL-1'in önemli bir kanser hedefi olabileceğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Akut miyeloid lösemi, kronik miyeloid lösemi, T hücre lenfomaları, multipl miyelom, meme, pankreas, yumurtalık ve rahim ağzı kanserlerinde MCL-1 proteini kanser hücrelerinin apoptozunu önlemede özellikle önem taşımaktadır (Belmar ve Fesik, 2015). MCL-1'in kanser hücrelerinde yüksek oranda eksprese olmasının, BCL-2-inhibitörlerine, paklitaksel, vinkristin (Wertz ve diğ., 2011) ve gemsitabin (Wei ve diğ., 2008) gibi yaygın olarak kullanılan antikanser ajanlarına karşı direnci indüklediği gösterilmiştir. MCL-1'in yüksek oranda eksprese edildiği akciğer, kolon, yumurtalık ve lenfoma hücrelerinde MCL-1 ifadesinin RNA aracılı inhibisyonunun, tümör gelişimi durdurduğu ve hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir (Chen ve diğ., 2010b; Lucas ve diğ., 2012). Ayrıca kemoterapiye dirençli hücrelerde MCL-1'in susturulması bu hücrelerin kemoterapiye duyarlılığını artırmıştır (Meng ve diğ., 2007), Campbell ve arkadaşları (2018), primer meme kanseri olan 428 hastada yaptığı mikrodizin analizinde MCL-1 ekspresyonunun artmış olduğunu ortaya koymuşlar ve meme kanserinde

klinopatolojik verilerle MCL-1 ekspresyonunun ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Campbell ve diğ., 2018). Bu veriler doğrultusunda MCL-1'e bağımlı olarak apoptoza direnç gösteren kanser hücrelerinde, bir MCL-1 inhibitörünün tek bir ajan olarak ve diğer ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılmasının etkili bir tedavi stratejisi olması beklenmektedir. Dolayısıyla, MCL-1 proteinin umut verici bir kanser hedefi olduğu görülmektedir. Bu tez çalışması kapsamında kullanılan MDA-MB-231 meme kanseri (Placzek ve diğ., 2010) ve HeLa serviks kanseri (Eichhorn ve diğ., 2013) ve A549 akciğer kanseri hücre hatlarında da MCL-1 ekspresyonu yüksektir.

Antiapoptotik BCL-2 proteinlerinin kanser gelişimi ve direncindeki öneminden yola çıkarak, antiapoptotik proteinlerin inhibe edilmesine yönelik stratejiler son dönemlerde artmıştır. Proapoptotik ve antiapoptotik proteinler arasındaki etkileşimleri aydınlatan yapısal çalışmalarla birlikte, proapoptotik BH3 domainini fonksiyonel olarak taklit eden birkaç molekül tasarlanmıştır. Antiapoptotik BCL-2 protein inhibitörlerinin yeni bir sınıfı olan BH3 mimetik bileşikler ya BH3 domainlerden modellenen peptidler ya da peptid olmayan sentetik küçük moleküllerdir. BH3 mimetikleri, malignant hücrelerde apoptozun mitokondriyal yolağını doğrudan aktive etmek için tasarlanmıştır. Seçici olarak BCL-2'yi inhibe eden peptid yapıda olmayan küçük bir molekül olan venetoklaz lenfositik lösemi tedavisinde kullanılmak üzere 2016 yılında FDA onayı almıştır ve FDA onayı alan ilk BH3 mimetiği ilaçtır (Roberts ve ark., 2016). Bununla birlikte, venetoklaz sadece BCL-2 proteinine spesifiktir. Dolayısıyla MCL-1 de dahil olmak üzere diğer BCL-2 paraloglarının aşırı ekspresyonu bu ilaca karşı dirence yol açabilmektedir (Wertz ve diğ., 2011). Ancak BCL-2 ailesinin antiapoptotik üyelerinin tamamını hedefleyen çok hedefli inhibitörlerin gelişimi de klinik olarak etkili olmayan bir strateji haline gelmiştir. Çünkü özellikle BCL-XL proteinin de inhibe edilmesine neden olan inhibitörler trombositopeni gibi istenmeyen yan etkilere neden olmuştur (Mason ve diğ., 2007). Dolayısıyla tek bir antiapoptotik proteine spesifik inhibitörlerin tasarlanması önem arz etmektedir. Özellikle MCL-1'in kanserde en çok eksprese olan genlerden biri olmasına ve önemli bir kemodirenç faktörü olmasına (Beroukhi ve diğ., 2010) rağmen, klinik olarak MCL-1 inhibitörlerinin gelişimi BCL-2 inhibitörlerinin gerisinde kalmıştır.

Peptid ilaçlar, özellikle hedefli tedavide yüksek özgüllüğü ve çeşitliliği nedeniyle yeni nesil ilaçlar olarak düşünülmektedir (Dissanayake ve diğ., 2017). BH3 mimetik peptidler oldukça spesifik antiapoptotik protein inhibitörleri olmasına karşın, bu tür peptidlerin kullanımı, metabolik kararsızlıkları, hücresel proteazlara bağlı bozunmaları, zayıf hücre geçirgenlikleri

nedeniyle sınırlıdır (Gong ve diğ., 2016). MCL-1 inhibisyonunda sentetik peptidler, protein-protein etkileşimlerinin doğal inhibitörleri olarak muazzam bir potansiyele sahiptir. Yüksek afiniteli tasarlanmış bir peptid olan MS1 peptidi ve diğer BCL-2 paraloglarına göre MCL-1 proteinine 40 kat daha fazla özgülüğe sahiptir. Foight ve arkadaşları (2014), yaptıkları çalışmalarında BH3 mimetik yapıların, seçici olarak MCL-1 ile etkileşime girdiğini ve fonksiyonel analizlerde antiapoptotik aktivitesini bloke ettiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada, MCL-1'e oldukça spesifik olarak bağlanan Bim BH3 mimetiği olan MS1 peptidini tanımlamışlar ve bu peptidin BCL-XL, BCL-2, BCL-W ve BFL-1 proteinlerine oranla en az 40 kat daha spesifik olduğu göstermişlerdir (Foight ve diğ., 2014). Bununla birlikte böylesine bir spesifikliğe rağmen, modifiye edilmemiş peptidler, *in vivo* proteolize duyarlılıkları ve hücrelere girme kapasitesi sınırlı olması nedeniyle zayıf terapötik adaylardır. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için, çeşitli çalışmalarda peptidler kimyasal olarak modifiye edilmiştir. Örneğin, stabilize etmek için hidrokarbonların ilave edildiği BH3 mimetik peptidlerin (SAHB) insan lösemi xenograftlarında *in vivo* büyümeyi inhibe ettiği gösterilmiştir. Ancak, Barile ve arkadaşları (2017), hidrokarbon grup ekleyerek modifiye ettikleri BH3 mimetik peptidlerde çözünürlüğün azaldığı ve hücre denemelerinde kullanılamadığını belirtmiştir (Barile ve diğ., 2017). Ayrıca, Okamoto ve arkadaşları da (2013) yaptıkları çalışmada, modifiye edilen peptidlerin hedef afinitelerinin ve çözünürlüğünün azaldığını ortaya koymuştur (Okamoto ve diğ., 2013).

Barile ve arkadaşları (2017), yaptıkları çalışmada hücre penetrasyon peptidlerini kullanarak BH3 mimetiği peptidlerin hücresel alımlarını iyileştirmeye çalışmıştır (Barile ve diğ., 2017). Hücre penetrasyon peptidleri hücre zarına bağlanma ve hücre zarını geçme eğiliminde olmaları nedeniyle, onlara bağlanan moleküllerin hücre içerisine alınmalarını sağlamada büyük potansiyele sahiptir. Ancak, hücre penetrasyon peptidlerinin, bu aktiviteleri spesifik hücre yüzeyi reseptörlerine bağlı değildir. Dolayısıyla, uygun hücrelerin hedeflenmesi ve terapötik komplekslerin biyolojik dağılımı hücre penetrasyon peptidleri kullanılarak sağlanamayabilir (Milletti, 2012). Bu kapsamda hastalığa bağlı hücre yüzey markerlerinin keşfi, reseptör aracılı endositoz için spesifik ligandların tanımlanması sağlanmıştır. Özellikle kanserde belirlenen yüzey markerlerine spesifik ligandlar kullanılarak hedefli ilaç salımı, kanser terapisinde büyük öneme sahiptir. Geleneksel terapilerin aksine genel olarak nanotıp ve inovatif ilaçlar, kemoterapi ve görüntüleme maddelerinin hedefli salımlarını sağlarlar. Bu tip ilaçların etkili

terapötik dozlarının, üretim maliyetlerinin ve kanserli olmayan normal hücrelere toksisitelerinin önemli ölçüde daha düşük olması beklenmektedir (Pautler ve Brenner, 2010).

Peptid ilaçların klinik uygulamalarını teşvik etmek için yeni ilaç salım sistemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Bu çerçevede, biyouyumlulukları, sentez ve modifikasyonlarının kolaylığı nedeniyle, self-assembly yapıların oluşturulması etkili bir strateji olmuştur. Son yıllarda, kendiliğinden kurulan benzersiz özelliklere sahip biyomalzemelerin tasarımında oldukça ilerleme kaydedilmiştir (Gazit, 2015). Çoğu durumda, termodinamik olarak kararlı bir yapı, yapının temel birimleri ve reaksiyona giren çözücü moleküller arasındaki entalpik ve entropik etkileşimler yoluyla oluşturulur (Wang ve diğ., 2015c). Bu yapılarda elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları moleküllerin düşük enerji seviyelerinde stabil olmasını sağlar (Stupp, 2010). Kendiliğinden kurulma işlemi, tek aşamada tasarım ile istenen ayarlanabilir özelliklere ve yapılara sahip birçok fonksiyonel materyalin geliştirilmesine olanak sağlar. Peptidler, tasarımlarına ve kendi kendine kurulma koşullarına dayanarak nanotüpler, nanofiber ve nanovesiküller gibi farklı nanoyapılar oluşturabilir. Dipeptidler, siklik peptidler, amfifilik peptidler, α -sarmal peptidler ve β -tabakalı peptidler de dahil olmak üzere peptidlerin farklı tipleri ve yapıları kendiliğinden kurulan nanoyapılar oluşturmak için kullanılmıştır (Fan ve diğ., 2017). Bir grup araştırmacı fonksiyonel peptidlerin aktif bir şekilde kullanımı için, amino terminalinde katyonik bir alanın ve karboksi terminalinde bir çekirdek proteinle histidin açısından zengin bir bölgenin kombine kullanımını tanımlamıştır. Çekirdek proteinin ilgili orijinden ve amino asit sekansından bağımsız olarak, oluşturulan yapının 12'den 100 nm'ye kadar yalnızca protein içeren dairesel nanopartiküllerin oluşumuyla sonuçlandığını göstermiştir (Rueda ve diğ., 2015; De Pinho Favaro ve diğ., 2018). Bu prensibe göre amino terminali katyonik bir peptid ve karboksi terminali polihistidin bir kuyruk ile etiketlendiğinde, bu iskeleti oluşturan proteinler (örneğin GFP, IRFP, p53 ve Hsp 70), elektrostatik etkileşimlerle çapraz etkileşim kurar ve van der Waals, hidrojen bağı gibi alternatif kuvvetlerle dengelenmiş toroid nanoyapılar oluştururlar. Düzenlenebilir boyuta sahip olan bu nano ölçekli malzemeler, fonksiyonel proteinlerin spesifik hedef hücrelere ve dokulara intraselüler olarak salımını sağlamıştır (Serna ve diğ., 2017). Bahsi geçen yaklaşım ile antimikrobiyal maddeler (Carratala ve diğ., 2020), kanserde hedefli nano taşıyıcılar (Falgas ve diğ., 2020), görüntüleme ajanları (Unzueta ve diğ., 2020) ve kan-beyin bariyerini geçen araçlar (Serna ve diğ., 2016) olarak oldukça etkili olduğu kanıtlanmıştır. Elde edilen bu rekombinant protein bazlı nanopartiküller fizyolojik pH'ta oldukça stabildir, model hayvanlara enjekte edildikten sonra doğru bir biyolojik

dağılım gösterir ve hedef hücre bölmesine verimli bir şekilde ulaştığı kanıtlanmıştır (Unzueta ve diğ., 2012; Serna ve diğ., 2016; De Pinho Favaro ve diğ., 2018; Carratala ve diğ., 2020; Falgas ve diğ., 2020; Unzueta ve diğ., 2020).

Nanopolimerler de peptid ilaçların klinik uygulamalarını teşvik etmek için de hem klinik öncesi hem de klinik gelişim aşamalarında mükemmel bir potansiyel sunmaktadır. Nanopolimerler terapötik molekülleri etkili bir şekilde enkapsüle ederek; onları çevredeki pH ortamından ve enzimatik degradasyondan koruyabilirler (Peppas ve Kavimandan, 2006). Diğer nanopartikülere oranla polimerik nanopartiküllerin kullanılması, fizikokimyasal özelliklerin (boyut, yüzey yükü, hidrofobiklik) ve ilaç salım özelliklerinin (dış uyaranlar tarafından kontrol edilen veya tetiklenen) modülasyonunu mümkün kılarak dikkate değer bir tasarım esnekliği sağlar (Alexis ve diğ., 2008). Nanopartiküllerin küçük boyutu, epitelyal yüzey ile temas alanını artırarak, spesifik olmayan alım veya reseptör aracılı endositoz için büyük bir potansiyel sağlar. Hedefli ilaç salımında hücresele reseptörlerle spesifik etkileşimlerde bulunabilen antikolar, peptidler veya küçük moleküler ligandlar yüzeye kolaylıkla konjuge edilebilir (Yu ve diğ., 2012). Ayrıca, polimerik nanopartiküllerin, birçoğu FDA (U.S. Food and Drug Administration) tarafından insan kullanımı için onaylanmış olan biyouyumlu malzemelerdir (Mansour ve diğ., 2009). Tüm bu avantajları sayesinde, polimerik nanopartiküller kanser terapötiklerinin hedefli salımında ve kombine tedavi uygulamalarında sıklıkla araştırılan ve potansiyelleri ortaya koyulan taşıyıcı sistemler olmuştur (Roh ve diğ., 2017; Bressler ve diğ., 2018; Xu ve diğ., 2018).

Bu tez kapsamında, MCL-1 inhibitör peptidlerinin kararlılığını ve hücresele geçirgenliğini artırmanın yanı sıra hedefli salımlarını sağlamak için yeni stratejiler önerilmiştir. Bu çerçevede MCL-1 proteinine spesifik olarak bağlanan MS1 peptidi apoptozu indüklemek amacıyla kullanılmıştır. MS1 peptidinin stabilizasyonunun ve hücresele alımının iyileştirilmesi için çeşitli nanoyapılar oluşturulmuştur. MS1 peptidinin mNeonGreen proteini ve polihistidin ile füzyon halinde rekombinant olarak üretilmiştir ve self-assembly nanopartiküller oluşturulmuştur. Ayrıca bu rekombinant protein polimerik nanopartiküllere enkapsüle edilmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin serviks, akciğer ve meme kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksiteleri araştırılmıştır. Sağlıklı hücre hattı olarak HUVEC hücreleri kullanılmış ve nanopartiküllerin HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri de araştırılmıştır. Son olarak nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi, apoptotik ve antiapoptotik mRNA ve proteinlerin seviyesinin sırasıyla RT-PCR ve Western blotlama ile belirlenmesiyle ortaya koyulmuştur.

T22-MS1-mNeonGreen ve MS1-mNeonGreen proteinleri oldukça saf ve yüksek verimde *E. coli* ekspresyon sistemlerinde rekombinant olarak üretilmiştir. Her iki proteinden de self-assembly nanopartiküller elde edilmiştir (sırasıyla, yaklaşık olarak 94 nm ve 80 nm boyutlarında). Çalışma kapsamında üretilen bir diğer nanopartiküler sistem polimerik nanopartiküllerdir. MS1-mNeonGreen proteinin polimerik nanopartiküllere enkapsülasyonu için polimerik nanopartiküller hazırlanmıştır. Polimer olarak PLGA ve PBAE yapısında kopolimerler kullanılmıştır. İlk olarak, grubumuzun patentli ürünü olan PBAE (Gok ve diğ., 2016) ile MS1-mNeonGreen proteinin enkapsüle eden polimerik nanopartiküller hazırlanmıştır. Yaklaşık 70 nm boyutlarında nanoçöktürme tekniği kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerde enkapsülasyon verimi oldukça düşük miktarlarda hesaplanmıştır (yaklaşık %10). Proteinin ve PBAE'nin her ikisinin de yüksek pozitif yüke sahip olması PBAE ile MS1-mNeonGreen proteinin kapsülasyonunu zorlaştırmıştır. Bu yüzden negatif yüklü PLGA kopolimeri ile enkapsülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, PLGA'nın tek başına ve PBAE ile nanopartikül formülasyonları hazırlanmıştır. PLGA ile %90'nın üzerinde enkapsülasyon verimi sağlanmıştır. PLGA ve PBAE birlikte kullanılarak iki farklı nanopolimer sistemi hazırlanmıştır. Hibrit ve core-shell şeklinde hazırlanan bu kopolimerlerden core-shell yapılar da enkapsülasyon verimi yüksek (%90'nın üzerinde) olmasına rağmen sağlıklı hücrelere de oldukça toksik olması dolayısıyla ileriki çalışmalarda kullanılmamıştır. Ayrıca PLGA nanopartikülleri rekombinant olarak üretilen T22 peptidleri ile de hedeflendirilmiş ancak, hedeflendirilmemiş PLGA NP'lerden farklı bir sitotoksikite göstermediği için ileriki çalışmalarda kullanılmamıştır. Bunun nedeninin proteinin *E. coli*'de ekspresyonunda düzgün katlanamaması ve inklüzyon cisimcikleri oluşturması, sonrasında da refolding işlemlerinin katlanma sürecinde yeterli olmamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. T22-MS1-mNeonGreen proteininden elde edilen self-assembly nanopartiküller kanser hücreleri üzerinde düşük sitotoksikite sergilemiştir ve ileriki çalışmalarda kullanılmamıştır. Bu durumun T22 peptidinin içerdiği 4 sistein aminoasidinde disülfid bağlarının oluşamaması veya yanlış oluşmasından kaynaklı doğru konformasyonda katlanamamasından ileri geldiği muhtemeldir. Nitekim T22 peptidinin polimer yüzeyine bağlanması için *E. coli* sisteminde rekombinant olarak üretiminde inklüzyon cisimciği oluşumu gözlemlenmiştir. *E. coli* ucuz karbon kaynakları gereksinimi, düşük maliyetler ve iyi karakterize edilmiş genetik yapısı nedeniyle dikkat çekici bir konakçıdır. Ancak, *E. coli* posttranslasyonel modifikasyonların yetersizliği, kompleks disülfid bağları içeren proteinlerin üretilmemesi ve proteinlerin çözünmeyen

inklüzyon cisimcikleri olarak ifadesi gibi bazı dezavantajlara sahiptir (Baneyx ve Mujacic, 2004; De Marco, 2009).

Sonuç olarak PLGA-MS1 NP, PLGA-PBAE-MS1 NP (hibrit) ve MS1 NP ile hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu partiküllerin DLS sonuçlarına göre boyutları sırasıyla 157 nm, 159 nm ve 85 nm olarak ölçülmüştür (Tablo 4.15). Düşük PDI değerleri (partiküllerin monodispers olduğunu göstermektedir (0,10, 0,12, 0,38). PDI değerleri 0,7'nin altında monodispers kabul edilir (Danaei ve diğ., 2018). Bu nanopartiküllerin SEM analizlerine bakıldığında (Şekil 4.46) dairesel şekilli ve boyutlarının DLS ile ölçülen boyutlar ile uyumlu olduğu görülmektedir. Bu nanopartiküllerden PLGA-PBAE-MS1 NP ve MS1 NP serum stabilitesi oldukça yüksektir (Tablo 4.16). PLGA-MS1 NP sistemi ise serum stabilitesi diğer sistemler ile karşılaştırıldığında nispeten daha düşüktür. Ayrıca, etkili bir formülasyon için, kargo molekülün bütünlüğünün korunması gerekir. Bu çalışmada, partiküllerin hazırlanması sırasında kullanılan yüksek sonikasyon kuvvetlerinin ve organik solventlerin etkisini belirlemek için, nanopartiküllerden salınan MS1-mNeonGreen proteininin SDS bütünlüğü SDS-PAGE ile değerlendirilmiştir. Enkapsülasyon işlemi MS1-mNeonGreen proteininin bütünlüğüne zarar vermemiştir. Kapsüle olan nanopartiküler sistemler santrifüj ile çöktürüldüğünde MS1-proteini polimerik nanopartikül içerisinde hala floresan ışımasını korumaktadır. Bu proteinin konformasyonunun bozulmadığını da kanıtlamaktadır.

Bu nanopartiküllerin sitotoksitesi sağlıklı hücre hattı HUVEC ile karşılaştırıldığında, nanopartiküllerin HeLa, A549 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına karşı seçici olarak toksisite gösterdiği ortaya koyulmuştur (Tablo 4.12). PLGA-MS1 NP sistemi üç kanser hücre hattında da PLGA-PBAE-MS1 NP'e göre daha az sitotoksite sergilemiştir. Bu durum PLGA-MS1 NP'nin serum stabilitesinin nispeten daha düşük olması ve partikül boyutunun artışı dolayısıyla hücreye girişinin zorlaşmasıyla açıklanabilir. Bu nanopartiküller en yüksek sitotoksiteyi HeLa hücrelerine karşı sergilemiştir. HeLa hücrelerinde MCL-1'in tek başına inhibisyonu hücreleri ölüme sürüklediği ortaya koyulmuştur (Abdul Rahman ve diğ., 2020). PLGA-PBAE-MS1 NP ve MS1 NP'lerinin kanser hücrelerinde neden olduğu bu seçici ölümün apoptotik yolla gerçekleşip gerçekleşmediğinin analizi için RT-PCR ve western blotlama yapılmıştır.

HeLa hücrelerinde RT-PCR sonuçlarına göre MS1 NP ve PLGA-PBAE-MS1 NP'lerine maruz kalan hücrelerde BAX/BCL-2, kaspaz 9, kaspaz 3, sitokrom C ve p53 proteinlerinin mRNA seviyelerindeki dramatik bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.37). MS1 NP'lere maruz kalan HeLa

hücrelerinde inhibisyonu hedeflenen MCL-1 proteinin mRNA seviyesinde ise ciddi bir düşüş gözlenirken PLGA-PBAE-MS1 NP'lerine maruz kalan hücrelerdeki değişim istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Bu farklılığın nedeni PLGA-PBAE NP'lerine maruz kalan MCL-1 proteinin mRNA seviyesindeki artışıyla açıklanabilir. Apoptozun dışsal yolağında rol alan kaspaz 8 proteininin mRNA seviyesindeki değişim ise her iki sistem için de istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Ek olarak iki sistemde de bir diğer antiapoptotik protein olan BCL-XL proteininin mRNA seviyesindeki artış, hücrenin diğer antiapoptotik protein üzerinden apoptoza direnç geliştirmeye eğilimiyle açıklanabilir. Anti-apoptotik BCL-2 proteinlerinin bir üyesinin seçici olarak inhibe edilmesi, diğer anti-apoptotik proteinlerin up-regülasyonunu destekleyebilir (Kale ve diğ., 2018; Maji ve diğ., 2018; Ewald ve diğ., 2019; Lee ve diğ., 2019). Örneğin, BCL-2 proteinin seçici bir inhibitörü olan ABT-199 ile uzun süreli tedaviye ortak bir yanıt olarak MCL-1 proteini aşırı eksprese olmaktadır (Ewald ve diğ., 2019; Hird ve Tron, 2019).

Western Blotlama sonuçlarına göre (Şekil 4.41), HeLa her iki nanopartikül sisteminde de BAX/BCL-2, p53 ve sitokrom C protein seviyesinde önemli derecede bir artış söz konusudur. Prokaspaz 9 ve prokaspaz 3 seviyesindeki azalış ise kaspazların aktive olduğu ve aktif kaspaz formuna dönüşerek apoptozu başlatığının ciddi bir kanıtıdır. İnhibisyonu hedeflenen MCL-1 proteini ise tüm sistemlerde azalmıştır. PLGA-PBAE NP'lerine maruz kalan HeLa hücrelerinde mRNA seviyesinde MCL-1 proteini artarken protein seviyesinde bu artışın gözlenmemesi p53 proteinin seviyesindeki artış ile açıklanabilir. MCL-1 proteininin ekspresyonu ubiquitin-proteasome sistemi tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. F-box proteini FBW7, MCL-1'i hedefleyen ve bir tümör baskılayıcı gen olarak iyi karakterize edilen bir ubiquitin ligazdır. FBW7 ekspresyonu, tümör baskılayıcı p53 tarafından transkripsiyonel olarak düzenlenir ve p53'ün fonksiyon kaybı, FBW7'nin ekspresyonunu azaltır (Perez-Losada ve diğ., 2005). P53 proteini MCL-1 proteininin dolaylı olarak degradasyonuna ve protein seviyesinde düzenlenmesine neden olmaktadır.

MDA-MB-231 hücrelerinde RT-PCR sonuçlarına göre (Şekil 4.38) MS1 NP ve PLGA-PBAE-MS1 NP'lerine maruz kalan hücrelerde BAX/BCL-2, kaspaz 9 ve sitokrom C proteinlerinin mRNA seviyelerindeki dramatik bir artış gözlemlenmiştir. PLGA-PBAE-MS1 NP'lerine maruz kalan MDA-MB-231 hücrelerinde inhibisyonu hedeflenen MCL-1 proteinin mRNA seviyesinde ise ciddi bir düşüş gözlenirken MS1 NP'lerine maruz kalan hücrelerde MCL-1

proteinin mRNA seviyesindeki düşüş istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Ayrıca PLGA-PBAE-MS1 NP'lerine maruz kalan MDA-MB-231 hücrelerinde kaspaz 3 mRNA seviyesinde de ciddi bir artış söz konusudur. Apoptozun dışsal yolağında rol alan kaspaz 8 proteininin mRNA seviyesindeki değişim ise her iki sistem için de istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. HeLa hücrelerinin aksine MDA-MB-231 hücrelerinde BCL-XL mRNA seviyesindeki değişim istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

A549 hücrelerinde RT-PCR sonuçlarına göre (Şekil 4.39) her iki nanopartiküle de maruz kalan hücrelerde BAX/BCL-2, kaspaz 3 ve sitokrom C proteinlerinin mRNA seviyelerindeki artış gözlemlenmiştir. MS1 NP'lerine maruz kalan A549 hücrelerinde inhibisyonu hedeflenen MCL-1 proteinin mRNA seviyesinde düşüş gözlenirken PLGA-PBAE-MS1 NP'lerine maruz kalan hücrelerde MCL-1 proteinin mRNA seviyesindeki düşüş istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Ayrıca PLGA-PBAE-MS1 NP'lerine maruz kalan A549 hücrelerinde kaspaz 9 mRNA seviyesinde de bir artış söz konusudur. Apoptozun dışsal yolağında rol alan kaspaz 8 proteininin mRNA seviyesindeki değişim ise her iki sistem için de istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. HeLa hücrelerinin aksine A549 hücrelerinde BCL-XL mRNA seviyesindeki değişim istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

Western Blotlama sonuçlarına göre (Şekil 4.43 ve 4.45), A549 ve MDA-MB-231 hücrelerinde her iki nanopartikül sisteminde de BAX/BCL-2, p53 ve sitokrom C protein seviyesinde önemli derecede bir artış söz konusudur. Prokaspaz 9 ve prokaspaz 3 seviyesindeki azalış ise kaspazların aktive olduğu ve aktif kaspaz formuna dönüşerek apoptozu başlatığının ciddi bir kanıtıdır. İnhibisyonu hedeflenen MCL-1 proteini ise tüm sistemlerde azalmıştır.

Bu tezle gerçekleştirilen çalışmalarda, tüm bu veriler ışığında antiapoptotik protein inhibitörü taşıyan hem self-assembly nanopartiküller sistem hem de polimerik nanopartiküler sistem başarılı bir şekilde hazırlanmıştır. Elde edilen nanopartiküler sistemler karakterize edilmiş ve serviks, akciğer ve meme kanseri hücre hatlarında sağlıklı hücre kıyasla seçici sitotoksiste göstermiştir. Nanopartiküler sistemlerin kanser hücrelerini MCL-1 proteininin inhibisyonu yoluyla apoptozu instristik yolaktan tetiklediği ortaya koyulmuştur. MS1 peptidini içeren nanopartikül formülasyonları bu tez çalışması kapsamında ilk kez üretilmiş ve etkinliği *in vitro* çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Çalışma kapsamında elde edilen nanopartikül formülasyonlarının patent başvurusu yapılmıştır (başvuru no:2022/012178) ve patent başvuru işlemleri devam etmektedir. Bu çalışma ile peptid ilaçların klinik uygulamalarda başarısını

artıracak yeni ilaç salım sistemleri tanımlanmıştır. Çalışmamız kapsamında elde edilen nanopartiküler sistemler peptid temelli terapötik biyomoleküllerin terapiye yönelik kullanımlarında nanobiyoteknolojik çözümlerin önemini ortaya koymaktadır.

Bu tez çalışmasının devamında gerçekleştirilebilecek *in vivo* çalışmalar ile üretilen nanoformülasyonların etkinliği ortaya koyulabilecektir. Çalışma kapsamında elde edilen nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin kanser dışında çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılabilecek potansiyeli de oldukça yüksektir. Ayrıca elde edilen bilgi birikimi ve tecrübe ile kanser tedavisinde kullanılabilecek yeni ilaç taşıyıcı sistemler geliştirebilecektir. Bu tez ile elde edilen veriler gelecekte tanı ve tedavide kullanılabilecek yeni nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine katkı sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abdul Rahman, S. F., Muniandy, K., Soo, Y. K., Tiew, E. Y. H., Tan, K. X., Bates, T. E., Mohana-Kumaran, N., 2020, Co-inhibition of Bcl-xL and MCL-1 with selective BCL-2 family inhibitors enhances cytotoxicity of cervical cancer cell lines, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 22, 100756.
- Abulwerdi, F., Liao, C., Liu, M., Azmi, A. S., Aboukameel, A., Mady, A. S., Gulappa, T., Cierpicki, T., Owens, S., Zhang, T., Sun, D., Stuckey, J. A., Mohammad, R. M., Nikolovska-Coleska, Z., 2014, A novel small-molecule inhibitor of mcl-1 blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo, *Molecular Cancer Therapeutics*, 13, 565-75.
- Acharya, S., Sahoo, S. K., 2011, PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 170-83.
- Aichberger, K. J., Mayerhofer, M., Krauth, M. T., Skvara, H., Florian, S., Sonneck, K., Akgul, C., Derdak, S., Pickl, W. F., Wacheck, V., Selzer, E., Monia, B. P., Moriggl, R., Valent, P., Sillaber, C., 2005, Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides, *Blood*, 105, 3303-11.
- Akgul, C., 2009, Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer, *Cell Mol Life Sci*, 66, 1326-36.
- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K., Farokhzad, O. C., 2008, Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Molecular Pharmaceutics*, 5, 505-15.
- Arnold, A. A., Aboukameel, A., Chen, J., Yang, D., Wang, S., Al-Katib, A., Mohammad, R. M., 2008, Preclinical studies of Apogossypolone: a new nonpeptidic pan small-molecule inhibitor of Bcl-2, Bcl-XL and Mcl-1 proteins in Follicular Small Cleaved Cell Lymphoma model, *Molecular Cancer*, 7, 20.
- Ashimori, N., Zeitlin, B. D., Zhang, Z., Warner, K., Turkienicz, I. M., Spalding, A. C., Teknos, T. N., Wang, S., Nor, J. E., 2009, TW-37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2, mediates S-phase cell cycle arrest and suppresses head and neck tumor angiogenesis, *Molecular Cancer Therapeutics*, 8, 893-903.
- Bae, Y. M., Park, Y. I., Nam, S. H., Kim, J. H., Lee, K., Kim, H. M., Yoo, B., Choi, J. S., Lee, K. T., Hyeon, T., Suh, Y. D., 2012, Endocytosis, intracellular transport, and exocytosis of lanthanide-doped upconverting nanoparticles in single living cells, *Biomaterials*, 33, 9080-6.
- Balko, J. M., Giltneane, J. M., Wang, K., Schwarz, L. J., Young, C. D., Cook, R. S., Owens, P., Sanders, M. E., Kuba, M. G., Sanchez, V., Kurupi, R., Moore, P. D., Pinto, J. A., Doimi, F. D., Gomez, H., Horiuchi, D., Goga, A., Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Pietenpol, J. A., Ross, J. S., Palmer, G. A., Yelensky, R., Cronin, M., Miller, V. A., Stephens, P. J., Arteaga, C. L., 2014, Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets, *Cancer Discovery*, 4, 232-45.
- Banerjee, S., Choi, M., Aboukameel, A., Wang, Z., Mohammad, M., Chen, J., Yang, D., Sarkar, F. H., Mohammad, R. M., 2010, Preclinical studies of apogossypolone, a novel pan inhibitor of bcl-2 and mcl-1, synergistically potentiates cytotoxic effect of gemcitabine in pancreatic cancer cells, *Pancreas*, 39, 323-31.
- Baneyx, F., Mujacic, M., 2004, Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*, *Nature Biotechnology*, 22, 1399-408.

- Baou, M., Kohlhaas, S. L., Butterworth, M., Vogler, M., Dinsdale, D., Walewska, R., Majid, A., Eldering, E., Dyer, M. J., Cohen, G. M., 2010, Role of NOXA and its ubiquitination in proteasome inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells, *Haematologica*, 95, 1510-8.
- Barile, E., Marconi, G. D., De, S. K., Baggio, C., Gambini, L., Salem, A. F., Kashyap, M. K., Castro, J. E., Kipps, T. J., Pellicchia, M., 2017, hBfl-1/hNOXA Interaction Studies Provide New Insights on the Role of Bfl-1 in Cancer Cell Resistance and for the Design of Novel Anticancer Agents, *ACS Chemical Biology*, 12, 444-455.
- Belmar, J., Fesik, S. W., 2015, Small molecule Mcl-1 inhibitors for the treatment of cancer, *Pharmacology & Therapeutics*, 145, 76-84.
- Benjaminsen, R. V., Mattheijer, M. A., Henriksen, J. R., Moghimi, S. M., Andresen, T. L., 2013, The possible "proton sponge " effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH, *Molecular Therapy*, 21, 149-57.
- Bernal, F., Tyler, A. F., Korsmeyer, S. J., Walensky, L. D., Verdine, G. L., 2007, Reactivation of the p53 tumor suppressor pathway by a stapled p53 peptide, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 2456-7.
- Beroukhi, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J. S., Dobson, J., Meyerson, M., 2010, The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers, *Nature*, 463, 899-905.
- Bian, X. W., Yang, S. X., Chen, J. H., Ping, Y. F., Zhou, X. D., Wang, Q. L., Jiang, X. F., Gong, W., Xiao, H. L., Du, L. L., Chen, Z. Q., Zhao, W., Shi, J. Q., Wang, J. M., 2007, Preferential expression of chemokine receptor CXCR4 by highly malignant human gliomas and its association with poor patient survival, *Neurosurgery*, 61, 570-8; discussion 578-9.
- Bieber, T., Meissner, W., Kostin, S., Niemann, A., Elsasser, H. P., 2002, Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes, *Journal of Control Release*, 82, 441-54.
- Billadeau, D. D., Chatterjee, S., Bramati, P., Sreekumar, R., Shah, V., Hedin, K., Urrutia, R., 2006, Characterization of the CXCR4 signaling in pancreatic cancer cells, *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 37, 110-9.
- Bolomsky, A., Vogler, M., Kose, M. C., Heckman, C. A., Ehx, G., Ludwig, H., Caers, J., 2020, MCL-1 inhibitors, fast-lane development of a new class of anti-cancer agents, *Journal of Hematology & Oncology*, 13, 173.
- Breitenbach, B. B., Schmid, I., Wich, P. R., 2017, Amphiphilic Polysaccharide Block Copolymers for pH-Responsive Micellar Nanoparticles, *Biomacromolecules*, 18, 2839-2848.
- Bressler, E. M., Kim, J., Shmueli, R. B., Mirando, A. C., Bazzazi, H., Lee, E., Popel, A. S., Pandey, N. B., Green, J. J., 2018, Biomimetic peptide display from a polymeric nanoparticle surface for targeting and antitumor activity to human triple-negative breast cancer cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106, 1753-1764.
- Brinkmann, K., Grabow, S., Hyland, C. D., Teh, C. E., Alexander, W. S., Herold, M. J., Strasser, A., 2017, The combination of reduced MCL-1 and standard chemotherapeutics is tolerable in mice, *Cell Death & Differentiation*, 24, 2032-2043.
- Byrne, J. D., Betancourt, T., Brannon-Peppas, L., 2008, Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1615-26.
- Caenepeel, S., Brown, S. P., Belmontes, B., Moody, G., Keegan, K. S., Chui, D., Whittington, D. A., Huang, X., Poppe, L., Hughes, P. E., 2018, AMG 176, a Selective MCL1

- Inhibitor, Is Effective in Hematologic Cancer Models Alone and in Combination with Established Therapies, *Cancer Discovery*, 8, 1582-1597.
- Campbell, K. J., Dhayade, S., Ferrari, N., Sims, A. H., Johnson, E., Mason, S. M., Dickson, A., Ryan, K. M., Kalna, G., Edwards, J., Tait, S. W. G., Blyth, K., 2018, MCL-1 is a prognostic indicator and drug target in breast cancer, *Cell Death and Disease*, 9, 19.
- Canton, I., Battaglia, G., 2012, Endocytosis at the nanoscale, *Chemical Society Reviews*, 41, 2718-39.
- Carneiro, B. A., El-Deiry, W. S., 2020, Targeting apoptosis in cancer therapy, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17, 395-417.
- Carratala, J. V., Brouillette, E., Serna, N., Sanchez-Chardi, A., Sanchez, J. M., Villaverde, A., Aris, A., Garcia-Fruitos, E., Ferrer-Miralles, N., Malouin, F., 2020, In Vivo Bactericidal Efficacy of GWH1 Antimicrobial Peptide Displayed on Protein Nanoparticles, a Potential Alternative to Antibiotics, *Pharmaceutics*, 12.
- Cavallaro, S., 2013, CXCR4/CXCL12 in non-small-cell lung cancer metastasis to the brain, *Int J Mol Sci*, 14, 1713-27.
- Champa, D., Russo, M. A., Liao, X. H., Refetoff, S., Ghossein, R. A., Di Cristofano, A., 2014, Obatoclox overcomes resistance to cell death in aggressive thyroid carcinomas by countering Bcl-2a1 and Mcl1 overexpression, *Endocr Relat Cancer*, 21, 755-67.
- Chang, J., Jallouli, Y., Kroubi, M., Yuan, X. B., Feng, W., Kang, C. S., Pu, P. Y., Betbeder, D., 2009, Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier, *International Journal of Pharmaceutics*, 379, 285-92.
- Chen, C. L., Hsieh, F. C., Lieblein, J. C., Brown, J., Chan, C., Wallace, J. A., Cheng, G., Hall, B. M., Lin, J., 2007a, Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers, *Br J Cancer*, 96, 591-9.
- Chen, J., Zhang, X., Lentz, C., Abi-Daoud, M., Pare, G. C., Yang, X., Feilotter, H. E., Tron, V. A., 2011, miR-193b Regulates Mcl-1 in Melanoma, *Am J Pathol*, 179, 2162-8.
- Chen, K. F., Tai, W. T., Liu, T. H., Huang, H. P., Lin, Y. C., Shiau, C. W., Li, P. K., Chen, P. J., Cheng, A. L., 2010a, Sorafenib overcomes TRAIL resistance of hepatocellular carcinoma cells through the inhibition of STAT3, *Clinical Cancer Research*, 16, 5189-99.
- Chen, L., Fletcher, S., 2017, Mcl-1 inhibitors: a patent review, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 27, 163-178.
- Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., Day, C. L., Adams, J. M., Huang, D. C., 2005, Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function, *Molecular Cell*, 17, 393-403.
- Chen, S., Dai, Y., Harada, H., Dent, P., Grant, S., 2007b, Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation, *Cancer Research*, 67, 782-91.
- Chen, W., Bai, L., Wang, X., Xu, S., Belinsky, S. A., Lin, Y., 2010b, Acquired activation of the Akt/cyclooxygenase-2/Mcl-1 pathway renders lung cancer cells resistant to apoptosis, *Molecular Pharmaceutics*, 77, 416-23.
- Cheng, F. Y., Su, C. H., Wu, P. C., Yeh, C. S., 2010, Multifunctional polymeric nanoparticles for combined chemotherapeutic and near-infrared photothermal cancer therapy in vitro and in vivo, *Chemical Communications*, 46, 3167-9.
- Chittasupho, C., Lirdprapamongkol, K., Kewsuwan, P., Sarisuta, N., 2014, Targeted delivery of doxorubicin to A549 lung cancer cells by CXCR4 antagonist conjugated PLGA nanoparticles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88, 529-38.

- Chronopoulou, L., Fratoddi, I., Palocci, C., Venditti, I., Russo, M. V., 2009, Osmosis based method drives the self-assembly of polymeric chains into micro- and nanostructures, *Langmuir*, 25, 11940-6.
- Cohen, N. A., Stewart, M. L., Gavathiotis, E., Tepper, J. L., Bruekner, S. R., Koss, B., Opferman, J. T., Walensky, L. D., 2012, A competitive stapled peptide screen identifies a selective small molecule that overcomes MCL-1-dependent leukemia cell survival, *Chemical Biology*, 19, 1175-86.
- Convertine, A. J., Benoit, D. S., Duvall, C. L., Hoffman, A. S., Stayton, P. S., 2009, Development of a novel endosomolytic diblock copolymer for siRNA delivery, *Journal of Control Release*, 133, 221-9.
- Crucho, C. I., 2015, Stimuli-responsive polymeric nanoparticles for nanomedicine, *ChemMedChem*, 10, 24-38.
- Crucho, C. I. C., Barros, M. T., 2017, Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 80, 771-784.
- Cupic, K. I., Rennick, J. J., Johnston, A. P., Such, G. K., 2019, Controlling endosomal escape using nanoparticle composition: current progress and future perspectives, *Nanomedicine (Lond)*, 14, 215-223.
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., Adams, J. M., 2014, Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 49-63.
- Dai, Y., Desano, J., Tang, W., Meng, X., Meng, Y., Burstein, E., Lawrence, T. S., Xu, L., 2010, Natural proteasome inhibitor celastrol suppresses androgen-independent prostate cancer progression by modulating apoptotic proteins and NF-kappaB, *PLoS One*, 5, e14153.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., Mozafari, M. R., 2018, Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems, *Pharmaceutics*, 10.
- Dang, J. M., Leong, K. W., 2006, Natural polymers for gene delivery and tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 487-99.
- Danhier, F., Feron, O., Preat, V., 2010, To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery, *Journal of Control Release*, 148, 135-46.
- Daniels, T. R., Delgado, T., Helguera, G., Penichet, M. L., 2006a, The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells, *Clinical Immunology*, 121, 159-76.
- Daniels, T. R., Delgado, T., Rodriguez, J. A., Helguera, G., Penichet, M. L., 2006b, The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer, *Clinical Immunology*, 121, 144-58.
- Davis, M. E., Pun, S. H., Bellocq, N. C., Reineke, T. M., Popielarski, S. R., Mishra, S., Heidel, J. D., 2004, Self-assembling nucleic acid delivery vehicles via linear, water-soluble, cyclodextrin-containing polymers, *Current Medicinal Chemistry*, 11, 179-97.
- De Falco, V., Guarino, V., Avilla, E., Castellone, M. D., Salerno, P., Salvatore, G., Faviana, P., Basolo, F., Santoro, M., Melillo, R. M., 2007, Biological role and potential therapeutic targeting of the chemokine receptor CXCR4 in undifferentiated thyroid cancer, *Cancer Research*, 67, 11821-9.
- De Marco, A., 2009, Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in Escherichia coli, *Microbial Cell Factories*, 8, 26.
- De Pinho Favaro, M. T., Sanchez-Garcia, L., Sanchez-Chardi, A., Roldan, M., Unzueta, U., Serna, N., Cano-Garrido, O., Azzoni, A. R., Ferrer-Miralles, N., Villaverde, A.,

- Vazquez, E., 2018, Protein nanoparticles are nontoxic, tuneable cell stressors, *Nanomedicine (Lond)*, 13, 255-268.
- De Silva, R. A., Peyre, K., Pullambhatla, M., Fox, J. J., Pomper, M. G., Nimmagadda, S., 2011, Imaging CXCR4 expression in human cancer xenografts: evaluation of monocyclam ^{64}Cu -AMD3465, *Journal of Nuclear Medicine*, 52, 986-93.
- Del Gaizo Moore, V., Letai, A., 2013, BH3 profiling--measuring integrated function of the mitochondrial apoptotic pathway to predict cell fate decisions, *Cancer Lett*, 332, 202-5.
- Denicourt, C., Dowdy, S. F., 2004, Medicine. Targeting apoptotic pathways in cancer cells, *Science*, 305, 1411-3.
- Denis, C., Sopkova-De Oliveira Santos, J., Bureau, R., Voisin-Chiret, A. S., 2020, Hot-Spots of Mcl-1 Protein, *Journal of Medicinal Chemistry*, 63, 928-943.
- Derenne, S., Monia, B., Dean, N. M., Taylor, J. K., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Bataille, R., Amiot, M., 2002, Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells, *Blood*, 100, 194-9.
- Dewan, M. Z., Ahmed, S., Iwasaki, Y., Ohba, K., Toi, M., Yamamoto, N., 2006, Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60, 273-6.
- Ding, Q., He, X., Xia, W., Hsu, J. M., Chen, C. T., Li, L. Y., Lee, D. F., Yang, J. Y., Xie, X., Liu, J. C., Hung, M. C., 2007, Myeloid cell leukemia-1 inversely correlates with glycogen synthase kinase-3 β activity and associates with poor prognosis in human breast cancer, *Cancer Research*, 67, 4564-71.
- Dissanayake, S., Denny, W. A., Gamage, S., Sarojini, V., 2017, Recent developments in anticancer drug delivery using cell penetrating and tumor targeting peptides, *Journal of Control Release*, 250, 62-76.
- Doerflinger, M., Glab, J. A., Puthalakath, H., 2015, BH3-only proteins: a 20-year stock-take, *FEBS JOURNAL*, 282, 1006-16.
- Doi, K., Li, R., Sung, S. S., Wu, H., Liu, Y., Manieri, W., Krishnegowda, G., Awwad, A., Dewey, A., Liu, X., Amin, S., Cheng, C., Qin, Y., Schonbrunn, E., Daughdrill, G., Loughran, T. P., Jr., Sebti, S., Wang, H. G., 2012, Discovery of marinopyrrole A (maritoclax) as a selective Mcl-1 antagonist that overcomes ABT-737 resistance by binding to and targeting Mcl-1 for proteasomal degradation, *Journal of Biological Chemistry*, 287, 10224-35.
- Doi, K., Liu, Q., Gowda, K., Barth, B. M., Claxton, D., Amin, S., Loughran, T. P., Jr., Wang, H. G., 2014, Maritoclax induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells with elevated Mcl-1 expression, *Cancer Biology & Therapy*, 15, 1077-86.
- Driessen, W. H., Fujii, N., Tamamura, H., Sullivan, S. M., 2008, Development of peptide-targeted lipoplexes to CXCR4-expressing rat glioma cells and rat proliferating endothelial cells, *Molecular Therapy*, 16, 516-24.
- Egorova, A., Bogacheva, M., Shubina, A., Baranov, V., Kiselev, A., 2014, Development of a receptor-targeted gene delivery system using CXCR4 ligand-conjugated cross-linking peptides, *Journal of Gene Medicine*, 16, 336-51.
- Eichhorn, J. M., Alford, S. E., Hughes, C. C., Fenical, W., Chambers, T. C., 2013, Purported Mcl-1 inhibitor marinopyrrole A fails to show selective cytotoxicity for Mcl-1-dependent cell lines, *Cell Death and Disease*, 4, e880.
- Elizondo, E., Veciana, J., Ventosa, N., 2012, Nanostructuring molecular materials as particles and vesicles for drug delivery, using compressed and supercritical fluids, *Nanomedicine (Lond)*, 7, 1391-408.

- Elkholi, R., Floros, K. V., Chipuk, J. E., 2011, The Role of BH3-Only Proteins in Tumor Cell Development, Signaling, and Treatment, *Genes Cancer*, 2, 523-37.
- Eltoukhy, A. A., Siegwart, D. J., Alabi, C. A., Rajan, J. S., Langer, R., Anderson, D. G., 2012, Effect of molecular weight of amine end-modified poly(beta-amino ester)s on gene delivery efficiency and toxicity, *Biomaterials*, 33, 3594-603.
- Ewald, L., Dittmann, J., Vogler, M., Fulda, S., 2019, Side-by-side comparison of BH3-mimetics identifies MCL-1 as a key therapeutic target in AML, *Cell Death and Disease*, 10, 917.
- Falgas, A., Pallares, V., Unzueta, U., Cespedes, M. V., Arroyo-Solera, I., Moreno, M. J., Sierra, J., Gallardo, A., Mangues, M. A., Vazquez, E., Villaverde, A., Mangues, R., Casanova, I., 2020, A CXCR4-targeted nanocarrier achieves highly selective tumor uptake in diffuse large B-cell lymphoma mouse models, *Haematologica*, 105, 741-753.
- Fan, R., Mei, L., Gao, X., Wang, Y., Xiang, M., Zheng, Y., Tong, A., Zhang, X., Han, B., Zhou, L., Mi, P., You, C., Qian, Z., Wei, Y., Guo, G., 2017, Self-Assembled Bifunctional Peptide as Effective Drug Delivery Vector with Powerful Antitumor Activity, *Advanced Science*, 4, 1600285.
- Foight, G. W., Ryan, J. A., Gulla, S. V., Letai, A., Keating, A. E., 2014, Designed BH3 peptides with high affinity and specificity for targeting Mcl-1 in cells, *ACS Chemical Biology*, 9, 1962-8.
- Fonte, P., Araujo, F., Silva, C., Pereira, C., Reis, S., Santos, H. A., Sarmiento, B., 2015, Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches, *Biotechnology Advances*, 33, 1342-54.
- Frappier, V., Jenson, J. M., Zhou, J., Grigoryan, G., Keating, A. E., 2019, Tertiary Structural Motif Sequence Statistics Enable Facile Prediction and Design of Peptides that Bind Anti-apoptotic Bcl-1 and Mcl-1, *Structure*, 27, 606-617 e5.
- Friberg, A., Vigil, D., Zhao, B., Daniels, R. N., Burke, J. P., Garcia-Barrantes, P. M., Camper, D., Chauder, B. A., Lee, T., Olejniczak, E. T., Fesik, S. W., 2013, Discovery of potent myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1) inhibitors using fragment-based methods and structure-based design, *Journal of Medicinal Chemistry*, 56, 15-30.
- Funhoff, A. M., Van Nostrum, C. F., Koning, G. A., Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M., Crommelin, D. J., Hennink, W. E., 2004, Endosomal escape of polymeric gene delivery complexes is not always enhanced by polymers buffering at low pH, *Biomacromolecules*, 5, 32-9.
- Gambini, L., Udompholkul, P., Baggio, C., Muralidharan, A., Kenjic, N., Assar, Z., Perry, J. J. P., Pellecchia, M., 2021, Design, Synthesis, and Structural Characterization of Lysine Covalent BH3 Peptides Targeting Mcl-1, *Journal of Medicinal Chemistry*, 64, 4903-4912.
- Gao, D. Y., Lin Ts, T., Sung, Y. C., Liu, Y. C., Chiang, W. H., Chang, C. C., Liu, J. Y., Chen, Y., 2015, CXCR4-targeted lipid-coated PLGA nanoparticles deliver sorafenib and overcome acquired drug resistance in liver cancer, *Biomaterials*, 67, 194-203.
- Gauthier, A., Ho, M., 2013, Role of sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: An update, *Hepatology Research*, 43, 147-54.
- Gazit, E., 2015, Molecular self-assembly: Searching sequence space, *Nat Chem*, 7, 14-5.
- Gimenez, C., De La Torre, C., Gorbe, M., Aznar, E., Sancenon, F., Murguia, J. R., Martinez-Manez, R., Marcos, M. D., Amoros, P., 2015, Gated mesoporous silica nanoparticles for the controlled delivery of drugs in cancer cells, *Langmuir*, 31, 3753-62.
- Glab, J. A., Doerflinger, M., Puthalakath, H., 2017, BH3-only proteins: the thorny end of the ER stress response, *Cell Death and Disease*, 8, e2889.

- Glaser, S. P., Lee, E. F., Trounson, E., Bouillet, P., Wei, A., Fairlie, W. D., Izon, D. J., Zuber, J., Rappaport, A. R., Herold, M. J., Alexander, W. S., Lowe, S. W., Robb, L., Strasser, A., 2012, Anti-apoptotic Mcl-1 is essential for the development and sustained growth of acute myeloid leukemia, *Genes & Development*, 26, 120-5.
- Gok, M. K., Pabuccuoglu, S., Cevher, E., Demir, K., Pabuccuoglu, S. 2016. *Synthesis of nanoparticulate gene carrier systems based on poly(beta-aminoesters)*. (EP 2 995 318 A1)
- Gong, J. N., Khong, T., Segal, D., Yao, Y., Riffkin, C. D., Garnier, J. M., Khaw, S. L., Lessene, G., Spencer, A., Herold, M. J., Roberts, A. W., Huang, D. C. S., 2016, Hierarchy for targeting pro-survival BCL2 family proteins in multiple myeloma: pivotal role of MCL1, *Blood*, 128, 1834-1844.
- Grossen, P., Witzigmann, D., Sieber, S., Huwyler, J., 2017, PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application, *Journal of Control Release*, 260, 46-60.
- Guerrero-Cazares, H., Tzeng, S. Y., Young, N. P., Abutaleb, A. O., Quinones-Hinojosa, A., Green, J. J., 2014, Biodegradable polymeric nanoparticles show high efficacy and specificity at DNA delivery to human glioblastoma in vitro and in vivo, *ACS Nano*, 8, 5141-53.
- Guo, P., You, J. O., Yang, J., Jia, D., Moses, M. A., Auguste, D. T., 2014, Inhibiting metastatic breast cancer cell migration via the synergy of targeted, pH-triggered siRNA delivery and chemokine axis blockade, *Molecular Pharmaceutics*, 11, 755-65.
- Guo, P., You, J. O., Yang, J., Moses, M. A., Auguste, D. T., 2012, Using breast cancer cell CXCR4 surface expression to predict liposome binding and cytotoxicity, *Biomaterials*, 33, 8104-10.
- Gupta, A., Kaur, C. D., Saraf, S., Saraf, S., 2016, Formulation, characterization, and evaluation of ligand-conjugated biodegradable quercetin nanoparticles for active targeting, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44, 960-70.
- Haley, B., Frenkel, E., 2008, Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment, *Urologic Oncology*, 26, 57-64.
- Han, M., Lv, S., Zhang, Y., Yi, R., Huang, B., Fu, H., Bian, R., Li, X., 2014, The prognosis and clinicopathology of CXCR4 in gastric cancer patients: a meta-analysis, *Tumor Biology*, 35, 4589-97.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., 2011, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 144, 646-74.
- Hanaoka, H., Mukai, T., Tamamura, H., Mori, T., Ishino, S., Ogawa, K., Iida, Y., Doi, R., Fujii, N., Saji, H., 2006, Development of a ¹¹¹In-labeled peptide derivative targeting a chemokine receptor, CXCR4, for imaging tumors, *Nuclear Medicine and Biology*, 33, 489-94.
- Haneef, J., Parvathy, M., Thankayyan, R. S., Sithul, H., Sreeharshan, S., 2012, Bax translocation mediated mitochondrial apoptosis and caspase dependent photosensitizing effect of *Ficus religiosa* on cancer cells, *PLoS One*, 7, e40055.
- Happo, L., Strasser, A., Cory, S., 2012, BH3-only proteins in apoptosis at a glance, *Journal of Cell Science*, 125, 1081-7.
- Hasan, W., Chu, K., Gullapalli, A., Dunn, S. S., Enlow, E. M., Luft, J. C., Tian, S., Napier, M. E., Pohlhaus, P. D., Rolland, J. P., Desimone, J. M., 2012, Delivery of multiple siRNAs using lipid-coated PLGA nanoparticles for treatment of prostate cancer, *Nano Letters*, 12, 287-92.

- Haschka, M. D., Soratroi, C., Kirschnek, S., Hacker, G., Hilbe, R., Geley, S., Villunger, A., Fava, L. L., 2015, The NOXA-MCL1-BIM axis defines lifespan on extended mitotic arrest, *Nature Communications*, 6, 6891.
- Hirata, H., Hinoda, Y., Kikuno, N., Kawamoto, K., Dahiya, A. V., Suehiro, Y., Tanaka, Y., Dahiya, R., 2007, CXCL12 G801A polymorphism is a risk factor for sporadic prostate cancer susceptibility, *Clinical Cancer Research*, 13, 5056-62.
- Hird, A. W., Tron, A. E., 2019, Recent advances in the development of Mcl-1 inhibitors for cancer therapy, *Pharmacology & Therapeutics*, 198, 59-67.
- Hong, S. C., Yoo, S. Y., Kim, H., Lee, J., 2017, Chitosan-Based Multifunctional Platforms for Local Delivery of Therapeutics, *Marine Drugs*, 15.
- Hosseinkhani, H., Hong, P. D., Yu, D. S., 2013, Self-assembled proteins and peptides for regenerative medicine, *Chemical Reviews*, 113, 4837-61.
- Hu, Y., Litwin, T., Nagaraja, A. R., Kwong, B., Katz, J., Watson, N., Irvine, D. J., 2007, Cytosolic delivery of membrane-impermeable molecules in dendritic cells using pH-responsive core-shell nanoparticles, *Nano Letters*, 7, 3056-64.
- Hui, D., Satkunam, N., Al Kaptan, M., Reiman, T., Lai, R., 2006, Pathway-specific apoptotic gene expression profiling in chronic lymphocytic leukemia and follicular lymphoma, *Modern Pathology*, 19, 1192-202.
- Irvine, D. J., Hanson, M. C., Rakhra, K., Tokatlian, T., 2015, Synthetic Nanoparticles for Vaccines and Immunotherapy, *Chemical Reviews*, 115, 11109-46.
- Jain, D., Bar-Shalom, D., 2014, Alginate drug delivery systems: application in context of pharmaceutical and biomedical research, *Drug Dev Ind Pharm*, 40, 1576-84.
- Jenson, J. M., Ryan, J. A., Grant, R. A., Letai, A., Keating, A. E., 2017, Epistatic mutations in PUMA BH3 drive an alternate binding mode to potently and selectively inhibit anti-apoptotic Bcl-1, *Elife*, 6.
- Jenson, J. M., Xue, V., Stretz, L., Mandal, T., Reich, L. L., Keating, A. E., 2018, Peptide design by optimization on a data-parameterized protein interaction landscape, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, E10342-E10351.
- Jeon, H. J., Jeong, Y. I., Jang, M. K., Park, Y. H., Nah, J. W., 2000, Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics, *International Journal of Pharmaceutics*, 207, 99-108.
- Jones, J., Marian, D., Weich, E., Engl, T., Wedel, S., Relja, B., Jonas, D., Blaheta, R. A., 2007, CXCR4 chemokine receptor engagement modifies integrin dependent adhesion of renal carcinoma cells, *Experimental Cell Research*, 313, 4051-65.
- Jones, R. A., Cheung, C. Y., Black, F. E., Zia, J. K., Stayton, P. S., Hoffman, A. S., Wilson, M. R., 2003, Poly(2-alkylacrylic acid) polymers deliver molecules to the cytosol by pH-sensitive disruption of endosomal vesicles, *Biochemical Journal*, 372, 65-75.
- Kajiyama, H., Shibata, K., Terauchi, M., Ino, K., Nawa, A., Kikkawa, F., 2008, Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma, *International Journal of Cancer*, 122, 91-9.
- Kale, J., Osterlund, E. J., Andrews, D. W., 2018, BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death, *Cell Death & Differentiation*, 25, 65-80.
- Karlsson, J., Vaughan, H. J., Green, J. J., 2018, Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Therapeutic Cancer Treatments, *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 9, 105-127.
- Kean, T., Thanou, M., 2010, Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 3-11.

- Klok, H. A., 2002, Protein-inspired materials: synthetic concepts and potential applications, *Angewandte Chemie*, 41, 1509-13.
- Kohl, T. M., Hellinger, C., Ahmed, F., Buske, C., Hiddemann, W., Bohlander, S. K., Spiekermann, K., 2007, BH3 mimetic ABT-737 neutralizes resistance to FLT3 inhibitor treatment mediated by FLT3-independent expression of BCL2 in primary AML blasts, *Leukemia*, 21, 1763-72.
- Konoplev, S., Rassidakis, G. Z., Estey, E., Kantarjian, H., Liakou, C. I., Huang, X., Xiao, L., Andreeff, M., Konopleva, M., Medeiros, L. J., 2007, Overexpression of CXCR4 predicts adverse overall and event-free survival in patients with unmutated FLT3 acute myeloid leukemia with normal karyotype, *Cancer*, 109, 1152-6.
- Koss, B., Morrison, J., Perciavalle, R. M., Singh, H., Reh, J. E., Williams, R. T., Opferman, J. T., 2013, Requirement for antiapoptotic MCL-1 in the survival of BCR-ABL B-lineage acute lymphoblastic leukemia, *Blood*, 122, 1587-98.
- Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A. L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G. L., Gong, J. N., Moujalled, D. M., Bruno, A., Csekei, M., Paczal, A., Szabo, Z. B., Sipos, S., Radics, G., Proszenyak, A., Balint, B., Ondi, L., Blasko, G., Robertson, A., Surgenor, A., Dokurno, P., Chen, I., Matassova, N., Smith, J., Pedder, C., Graham, C., Studeny, A., Lysiak-Auvity, G., Girard, A. M., Grave, F., Segal, D., Riffkin, C. D., Pomilio, G., Galbraith, L. C., Aubrey, B. J., Brennan, M. S., Herold, M. J., Chang, C., Guasconi, G., Cauquil, N., Melchiorre, F., Guigal-Stephan, N., Lockhart, B., Colland, F., Hickman, J. A., Roberts, A. W., Huang, D. C., Wei, A. H., Strasser, A., Lessene, G., Geneste, O., 2016, The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models, *Nature*, 538, 477-482.
- Krasnici, S., Werner, A., Eichhorn, M. E., Schmitt-Sody, M., Pahernik, S. A., Sauer, B., Schulze, B., Teifel, M., Michaelis, U., Naujoks, K., Dellian, M., 2003, Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels, *International Journal of Cancer*, 105, 561-7.
- Kuil, J., Buckle, T., Oldenburg, J., Yuan, H., Borowsky, A. D., Josephson, L., Van Leeuwen, F. W., 2011, Hybrid peptide dendrimers for imaging of chemokine receptor 4 (CXCR4) expression, *Molecular Pharmaceutics*, 8, 2444-53.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J. E., Bonzon, C., Sullivan, B. A., Green, D. R., Newmeyer, D. D., 2005, BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly, *Molecular Cell*, 17, 525-35.
- Labelle, J. L., Katz, S. G., Bird, G. H., Gavathiotis, E., Stewart, M. L., Lawrence, C., Fisher, J. K., Godes, M., Pitter, K., Kung, A. L., Walensky, L. D., 2012, A stapled BIM peptide overcomes apoptotic resistance in hematologic cancers, *J Clin Invest*, 122, 2018-31.
- Lam, L. T., Lu, X., Zhang, H., Lesniewski, R., Rosenberg, S., Semizarov, D., 2010, A microRNA screen to identify modulators of sensitivity to BCL2 inhibitor ABT-263 (navitoclax), *Molecular Cancer Therapeutics*, 9, 2943-50.
- Le Bon, B., Van Craynest, N., Daoudi, J. M., Di Giorgio, C., Domb, A. J., Vierling, P., 2004, AMD3100 conjugates as components of targeted nonviral gene delivery systems: synthesis and in vitro transfection efficiency of CXCR4-expressing cells, *Bioconjugate Chemistry*, 15, 413-23.
- Le Gouill, S., Podar, K., Amiot, M., Hideshima, T., Chauhan, D., Ishitsuka, K., Kumar, S., Raje, N., Richardson, P. G., Harousseau, J. L., Anderson, K. C., 2004, VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis, *Blood*, 104, 2886-92.

- Lee, E. F., Harris, T. J., Tran, S., Evangelista, M., Arulananda, S., John, T., Ramnac, C., Hobbs, C., Zhu, H., Gunasingh, G., Segal, D., Behren, A., Cebon, J., Dobrovic, A., Mariadason, J. M., Strasser, A., Rohrbeck, L., Haass, N. K., Herold, M. J., Fairlie, W. D., 2019, Bcl-xL and MCL-1 are the key BCL-2 family proteins in melanoma cell survival, *Cell Death and Disease*, 10, 342.
- Lestini, B. J., Goldsmith, K. C., Fluchel, M. N., Liu, X., Chen, N. L., Goyal, B., Pawel, B. R., Hogarty, M. D., 2009, Mcl1 downregulation sensitizes neuroblastoma to cytotoxic chemotherapy and small molecule Bcl-2-family antagonists, *Cancer Biology & Therapy*, 8, 1587-95.
- Letai, A., 2016, S63845, an MCL-1 Selective BH3 Mimetic: Another Arrow in Our Quiver, *Cancer Cell*, 30, 834-835.
- Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., Korsmeyer, S. J., 2002, Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics, *Cancer Cell*, 2, 183-92.
- Levenson, J. D., Zhang, H., Chen, J., Tahir, S. K., Phillips, D. C., Xue, J., Nimmer, P., Jin, S., Smith, M., Xiao, Y., Kovar, P., Tanaka, A., Bruncko, M., Sheppard, G. S., Wang, L., Gierke, S., Kategaya, L., Anderson, D. J., Wong, C., Eastham-Anderson, J., Ludlam, M. J., Sampath, D., Fairbrother, W. J., Wertz, I., Rosenberg, S. H., Tse, C., Elmore, S. W., Souers, A. J., 2015, Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax), *Cell Death and Disease*, 6, e1590.
- Li, J., Lepadatu, A. M., Zhu, Y., Ciobanu, M., Wang, Y., Asaftei, S. C., Oupicky, D., 2014, Examination of structure-activity relationship of viologen-based dendrimers as CXCR4 antagonists and gene carriers, *Bioconjugate Chemistry*, 25, 907-17.
- Li, K., 2021, Interdiction at a protein-protein interface: MCL-1 inhibitors for oncology, *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 32, 127717.
- Lian, B. S. X., Yek, A. E. H., Shuvas, H., Abdul Rahman, S. F., Muniandy, K., Mohana-Kumaran, N., 2018, Synergistic anti-proliferative effects of combination of ABT-263 and MCL-1 selective inhibitor A-1210477 on cervical cancer cell lines, *BMC Research Notes*, 11, 197.
- Ling, X., Cao, S., Cheng, Q., Keefe, J. T., Rustum, Y. M., Li, F., 2012, A novel small molecule FL118 that selectively inhibits survivin, Mcl-1, XIAP and cIAP2 in a p53-independent manner, shows superior antitumor activity, *PLoS One*, 7, e45571.
- Liu, Y., Busscher, H. J., Zhao, B., Li, Y., Zhang, Z., Van Der Mei, H. C., Ren, Y., Shi, L., 2016, Surface-Adaptive, Antimicrobially Loaded, Micellar Nanocarriers with Enhanced Penetration and Killing Efficiency in Staphylococcal Biofilms, *ACS Nano*, 10, 4779-89.
- Liu, Y., Li, Y., Keskin, D., Shi, L., 2019, Poly(beta-Amino Esters): Synthesis, Formulations, and Their Biomedical Applications, *Advanced Healthcare Materials*, 8, e1801359.
- Loberg, R. D., McGregor, N., Ying, C., Sargent, E., Pienta, K. J., 2007, In vivo evaluation of AT-101 (R-(-)-gossypol acetic acid) in androgen-independent growth of VCaP prostate cancer cells in combination with surgical castration, *Neoplasia*, 9, 1030-7.
- Lockman, P. R., Mumper, R. J., Khan, M. A., Allen, D. D., 2002, Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier, *Drug Dev Ind Pharm*, 28, 1-13.
- Lomas, H., Massignani, M., Abdullah, K. A., Canton, I., Lo Presti, C., Macneil, S., Du, J., Blanazs, A., Madsen, J., Armes, S. P., Lewis, A. L., Battaglia, G., 2008, Non-cytotoxic polymer vesicles for rapid and efficient intracellular delivery, *Faraday Discuss*, 139, 143-59; discussion 213-28, 419-20.

- Low, P. S., Kularatne, S. A., 2009, Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer, *Current Opinion in Chemical Biology*, 13, 256-62.
- Lowik, D. W., Van Hest, J. C., 2004, Peptide based amphiphiles, *Chemical Society Reviews*, 33, 234-45.
- Lucas, K. M., Mohana-Kumaran, N., Lau, D., Zhang, X. D., Hersey, P., Huang, D. C., Weninger, W., Haass, N. K., Allen, J. D., 2012, Modulation of NOXA and MCL-1 as a strategy for sensitizing melanoma cells to the BH3-mimetic ABT-737, *Clinical Cancer Research*, 18, 783-95.
- Luedtke, D. A., Niu, X., Pan, Y., Zhao, J., Liu, S., Edwards, H., Chen, K., Lin, H., Taub, J. W., Ge, Y., 2017, Inhibition of Mcl-1 enhances cell death induced by the Bcl-2-selective inhibitor ABT-199 in acute myeloid leukemia cells, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, 17012.
- Lurje, G., Lenz, H. J., 2009, EGFR signaling and drug discovery, *Oncology*, 77, 400-10.
- Lv, S., Yang, Y., Kwon, S., Han, M., Zhao, F., Kang, H., Dai, C., Wang, R., 2014, The association of CXCR4 expression with prognosis and clinicopathological indicators in colorectal carcinoma patients: a meta-analysis, *Histopathology*, 64, 701-12.
- Maccallum, D. E., Melville, J., Frame, S., Watt, K., Anderson, S., Gianella-Borradori, A., Lane, D. P., Green, S. R., 2005, Seliciclib (CYC202, R-Roscovitrine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1, *Cancer Research*, 65, 5399-407.
- Maeda, H., 2001, The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting, *Advances in Enzyme Regulation*, 41, 189-207.
- Maghrebi, S., Prestidge, C. A., Joyce, P., 2019, An update on polymer-lipid hybrid systems for improving oral drug delivery, *Expert Opin Drug Delivery*, 16, 507-524.
- Maji, S., Panda, S., Samal, S. K., Shriwas, O., Rath, R., Pellicchia, M., Emdad, L., Das, S. K., Fisher, P. B., Dash, R., 2018, Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer, *Advances Cancer Research*, 137, 37-75.
- Maji, S., Samal, S. K., Pattanaik, L., Panda, S., Quinn, B. A., Das, S. K., Sarkar, D., Pellicchia, M., Fisher, P. B., Dash, R., 2015, Mcl-1 is an important therapeutic target for oral squamous cell carcinomas, *Oncotarget*, 6, 16623-37.
- Mansour, H. M., Rhee, Y. S., Wu, X., 2009, Nanomedicine in pulmonary delivery, *International Journal of Nanomedicine*, 4, 299-319.
- Mason, K. D., Carpinelli, M. R., Fletcher, J. I., Collinge, J. E., Hilton, A. A., Ellis, S., Kelly, P. N., Ekert, P. G., Metcalf, D., Roberts, A. W., Huang, D. C., Kile, B. T., 2007, Programmed anuclear cell death delimits platelet life span, *Cell*, 128, 1173-86.
- Mcarthur, K., Whitehead, L. W., Heddleston, J. M., Li, L., Padman, B. S., Oorschot, V., Geoghegan, N. D., Chappaz, S., Davidson, S., San Chin, H., Lane, R. M., Dramicanin, M., Saunders, T. L., Sugiana, C., Lessene, R., Osellame, L. D., Chew, T. L., Dewson, G., Lazarou, M., Ramm, G., Lessene, G., Ryan, M. T., Rogers, K. L., Van Delft, M. F., Kile, B. T., 2018, BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis, *Science*, 359.
- Mccall, R. L., Sirianni, R. W., 2013, PLGA nanoparticles formed by single- or double-emulsion with vitamin E-TPGS, *Journal of Visualized Experiments*, 51015.
- Meng, X. W., Lee, S. H., Dai, H., Loegering, D., Yu, C., Flatten, K., Schneider, P., Dai, N. T., Kumar, S. K., Smith, B. D., Karp, J. E., Adjei, A. A., Kaufmann, S. H., 2007, Mcl-1 as a buffer for proapoptotic Bcl-2 family members during TRAIL-induced apoptosis: a

- mechanistic basis for sorafenib (Bay 43-9006)-induced TRAIL sensitization, *Journal of Biological Chemistry*, 282, 29831-46.
- Milletti, F., 2012, Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape, *Drug Discovery Today*, 17, 850-60.
- Minko, T., 2004, Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 491-509.
- Misra, A. C., Luker, K. E., Durmaz, H., Luker, G. D., Lahann, J., 2015, CXCR4-Targeted Nanocarriers for Triple Negative Breast Cancers, *Biomacromolecules*, 16, 2412-7.
- Mitchell, C., Yacoub, A., Hossein, H., Martin, A. P., Bareford, M. D., Eulitt, P., Yang, C., Nephew, K. P., Dent, P., 2010, Inhibition of MCL-1 in breast cancer cells promotes cell death in vitro and in vivo, *Cancer Biology & Therapy*, 10, 903-17.
- Mohammad, R. M., Goustin, A. S., Aboukameel, A., Chen, B., Banerjee, S., Wang, G., Nikolovska-Coleska, Z., Wang, S., Al-Katib, A., 2007, Preclinical studies of TW-37, a new nonpeptidic small-molecule inhibitor of Bcl-2, in diffuse large cell lymphoma xenograft model reveal drug action on both Bcl-2 and Mcl-1, *Clinical Cancer Research*, 13, 2226-35.
- Montero, J., Letai, A., 2018, Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic?, *Cell Death & Differentiation*, 25, 56-64.
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., Elaissari, A., 2011, Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods critical comparison, *Advanced Colloid Interface Science*, 163, 90-122.
- Mukherjee, N., Almeida, A., Partyka, K. A., Lu, Y., Schwan, J. V., Lambert, K., Rogers, M., Robinson, W. A., Robinson, S. E., Applegate, A. J., Amato, C. M., Luo, Y., Fujita, M., Norris, D. A., Shellman, Y. G., 2016, Combining a GSI and BCL-2 inhibitor to overcome melanoma's resistance to current treatments, *Oncotarget*, 7, 84594-84607.
- Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hebert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J., Power, C. A., 2000, International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors, *Pharmacol Reviews*, 52, 145-76.
- Nagata, S., 2018, Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells, *Annual Review of Immunology*, 36, 489-517.
- Negi, A., Murphy, P. V., 2021, Development of Mcl-1 inhibitors for cancer therapy, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 210, 113038.
- Nguyen, M., Marcellus, R. C., Roulston, A., Watson, M., Serfass, L., Murthy Madiraju, S. R., Goulet, D., Viallet, J., Belec, L., Billot, X., Acoca, S., Purisima, E., Wiegmanns, A., Cluse, L., Johnstone, R. W., Beauparlant, P., Shore, G. C., 2007, Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 19512-7.
- Nimmagadda, S., Pullambhatla, M., Pomper, M. G., 2009, Immunoimaging of CXCR4 expression in brain tumor xenografts using SPECT/CT, *Journal of Nuclear Medicine*, 50, 1124-30.
- Nimmagadda, S., Pullambhatla, M., Stone, K., Green, G., Bhujwalla, Z. M., Pomper, M. G., 2010, Molecular imaging of CXCR4 receptor expression in human cancer xenografts with [⁶⁴Cu]AMD3100 positron emission tomography, *Cancer Research*, 70, 3935-44.
- Okamoto, T., Zobel, K., Fedorova, A., Quan, C., Yang, H., Fairbrother, W. J., Huang, D. C., Smith, B. J., Deshayes, K., Czabotar, P. E., 2013, Stabilizing the pro-apoptotic BimBH3 helix (BimSAHB) does not necessarily enhance affinity or biological activity, *ACS Chemical Biology*, 8, 297-302.

- Onoue, T., Uchida, D., Begum, N. M., Tomizuka, Y., Yoshida, H., Sato, M., 2006, Epithelial-mesenchymal transition induced by the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral squamous cell carcinoma cells, *International Journal of Oncology*, 29, 1133-8.
- Opferman, J. T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M. D., Ong, C. C., Korsmeyer, S. J., 2003, Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1, *Nature*, 426, 671-6.
- Osaki, S., Tazawa, H., Hasei, J., Yamakawa, Y., Omori, T., Sugiu, K., Komatsubara, T., Fujiwara, T., Sasaki, T., Kunisada, T., Yoshida, A., Urata, Y., Kagawa, S., Ozaki, T., Fujiwara, T., 2016, Ablation of MCL1 expression by virally induced microRNA-29 reverses chemoresistance in human osteosarcomas, *Scientific Reports*, 6, 28953.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B., Bao, J. K., 2012, Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis, *Cell Proliferation*, 45, 487-98.
- Pan, R., Ruvolo, V. R., Wei, J., Konopleva, M., Reed, J. C., Pellecchia, M., Andreeff, M., Ruvolo, P. P., 2015, Inhibition of Mcl-1 with the pan-Bcl-2 family inhibitor (-)BI97D6 overcomes ABT-737 resistance in acute myeloid leukemia, *Blood*, 126, 363-72.
- Paulus, A., Chitta, K., Akhtar, S., Personett, D., Miller, K. C., Thompson, K. J., Carr, J., Kumar, S., Roy, V., Ansell, S. M., Mikhael, J. R., Dispenzieri, A., Reeder, C. B., Rivera, C. E., Foran, J., Chanan-Khan, A., 2014, AT-101 downregulates BCL2 and MCL1 and potentiates the cytotoxic effects of lenalidomide and dexamethasone in preclinical models of multiple myeloma and Waldenstrom macroglobulinaemia, *British Journal of Haematology*, 164, 352-365.
- Pautler, M., Brenner, S., 2010, Nanomedicine: promises and challenges for the future of public health, *International Journal of Nanomedicine*, 5, 803-9.
- Pelicano, H., Martin, D. S., Xu, R. H., Huang, P., 2006, Glycolysis inhibition for anticancer treatment, *Oncogene*, 25, 4633-46.
- Pelz, N. F., Bian, Z., Zhao, B., Shaw, S., Tarr, J. C., Belmar, J., Gregg, C., Camper, D. V., Goodwin, C. M., Arnold, A. L., Sensintaffar, J. L., Friberg, A., Rossanese, O. W., Lee, T., Olejniczak, E. T., Fesik, S. W., 2016, Discovery of 2-Indole-acylsulfonamide Myeloid Cell Leukemia 1 (Mcl-1) Inhibitors Using Fragment-Based Methods, *Journal of Medicinal Chemistry*, 59, 2054-66.
- Peperzak, V., Vikstrom, I., Walker, J., Glaser, S. P., Lepage, M., Coquery, C. M., Erickson, L. D., Fairfax, K., Mackay, F., Strasser, A., Nutt, S. L., Tarlinton, D. M., 2013, Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells, *Nature Immunology*, 14, 290-7.
- Peppas, N. A., Kavimandan, N. J., 2006, Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29, 183-97.
- Perciavalle, R. M., Stewart, D. P., Koss, B., Lynch, J., Milasta, S., Bathina, M., Temirov, J., Cleland, M. M., Pelletier, S., Schuetz, J. D., Youle, R. J., Green, D. R., Opferman, J. T., 2012, Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration, *Nature Cell Biology*, 14, 575-83.
- Perez-Losada, J., Mao, J. H., Balmain, A., 2005, Control of genomic instability and epithelial tumor development by the p53-Fbxw7/Cdc4 pathway, *Cancer Research*, 65, 6488-92.
- Placzek, W. J., Wei, J., Kitada, S., Zhai, D., Reed, J. C., Pellecchia, M., 2010, A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy, *Cell Death and Disease*, 1, e40.

- Podar, K., Gouill, S. L., Zhang, J., Opferman, J. T., Zorn, E., Tai, Y. T., Hideshima, T., Amiot, M., Chauhan, D., Harousseau, J. L., Anderson, K. C., 2008, A pivotal role for Mcl-1 in Bortezomib-induced apoptosis, *Oncogene*, 27, 721-31.
- Prabhu, R. H., Patravale, V. B., Joshi, M. D., 2015, Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights, *International Journal of Nanomedicine*, 10, 1001-18.
- Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B., Cesaro, A., 2013, Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability, *International Journal of Pharmaceutics*, 455, 219-28.
- Reiner, T., De Las Pozas, A., Parrondo, R., Palenzuela, D., Cayuso, W., Rai, P., Perez-Stable, C., 2015, Mcl-1 protects prostate cancer cells from cell death mediated by chemotherapy-induced DNA damage, *Oncoscience*, 2, 703-15.
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., Veiga, F., 2006, Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine*, 2, 8-21.
- Rezaei Araghi, R., Bird, G. H., Ryan, J. A., Jenson, J. M., Godes, M., Pritz, J. R., Grant, R. A., Letai, A., Walensky, L. D., Keating, A. E., 2018, Iterative optimization yields Mcl-1-targeting stapled peptides with selective cytotoxicity to Mcl-1-dependent cancer cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, E886-E895.
- Riedl, S. J., Salvesen, G. S., 2007, The apoptosome: signalling platform of cell death, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 405-13.
- Roh, Y. J., Kim, J. H., Kim, I. W., Na, K., Park, J. M., Choi, M. G., 2017, Photodynamic Therapy Using Photosensitizer-Encapsulated Polymeric Nanoparticle to Overcome ATP-Binding Cassette Transporter Subfamily G2 Function in Pancreatic Cancer, *Molecular Cancer Therapeutics*, 16, 1487-1496.
- Rueda, F., Cespedes, M. V., Conchillo-Sole, O., Sanchez-Chardi, A., Seras-Franzoso, J., Cubarsi, R., Gallardo, A., Pesarrodon, M., Ferrer-Miralles, N., Daura, X., Vazquez, E., Garcia-Fruitos, E., Mangues, R., Unzueta, U., Villaverde, A., 2015, Bottom-Up Instructive Quality Control in the Biofabrication of Smart Protein Materials, *Advanced Materials*, 27, 7816-22.
- Sadowsky, J. D., Fairlie, W. D., Hadley, E. B., Lee, H. S., Umezawa, N., Nikolovska-Coleska, Z., Wang, S., Huang, D. C., Tomita, Y., Gellman, S. H., 2007, (alpha/beta+alpha)-peptide antagonists of BH3 domain/Bcl-x(L) recognition: toward general strategies for foldamer-based inhibition of protein-protein interactions, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 139-54.
- Santoro, M., Tatara, A. M., Mikos, A. G., 2014, Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering, *Journal of Control Release*, 190, 210-8.
- Sarosiek, K. A., Letai, A., 2016, Directly targeting the mitochondrial pathway of apoptosis for cancer therapy using BH3 mimetics - recent successes, current challenges and future promise, *FEBS Journal*, 283, 3523-3533.
- Scala, S., Ottaiano, A., Ascierto, P. A., Cavalli, M., Simeone, E., Giuliano, P., Napolitano, M., Franco, R., Botti, G., Castello, G., 2005, Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma, *Clinical Cancer Research*, 11, 1835-41.
- Schimanski, C. C., Bahre, R., Gockel, I., Muller, A., Frerichs, K., Horner, V., Teufel, A., Simionantoni, N., Biesterfeld, S., Wehler, T., Schuler, M., Achenbach, T., Junginger, T., Galle, P. R., Moehler, M., 2006, Dissemination of hepatocellular carcinoma is mediated via chemokine receptor CXCR4, *British Journal of Cancer*, 95, 210-7.

- Schneider, J. P., Pochan, D. J., Ozbas, B., Rajagopal, K., Pakstis, L., Kretsinger, J., 2002, Responsive hydrogels from the intramolecular folding and self-assembly of a designed peptide, *Journal of the American Chemical Society*, 124, 15030-7.
- Selby, L. I., Cortez-Jugo, C. M., Such, G. K., Johnston, A. P. R., 2017, Nanoescapology: progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles, *Wiley interdisciplinary reviews: Nanomedicine and nanobiotechnology*, 9.
- Serna, N., Cespedes, M. V., Saccardo, P., Xu, Z., Unzueta, U., Alamo, P., Pesarrodon, M., Sanchez-Chardi, A., Roldan, M., Mangues, R., Vazquez, E., Villaverde, A., Ferrer-Miralles, N., 2016, Rational engineering of single-chain polypeptides into protein-only, BBB-targeted nanoparticles, *Nanomedicine*, 12, 1241-51.
- Serna, N., Sanchez-Garcia, L., Sanchez-Chardi, A., Unzueta, U., Roldan, M., Mangues, R., Vazquez, E., Villaverde, A., 2017, Protein-only, antimicrobial peptide-containing recombinant nanoparticles with inherent built-in antibacterial activity, *Acta Biomaterialia*, 60, 256-263.
- Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., Andrews, D. W., 2013, Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, a008714.
- Shangary, S., Johnson, D. E., 2003, Recent advances in the development of anticancer agents targeting cell death inhibitors in the Bcl-2 protein family, *Leukemia*, 17, 1470-81.
- Shi, J., Xu, B., 2015, Nanoscale Assemblies of Small Molecules Control the Fate of Cells, *Nano Today*, 10, 615-630.
- Sieghart, W., Losert, D., Strommer, S., Cejka, D., Schmid, K., Rasoul-Rockenschaub, S., Bodingbauer, M., Crevenna, R., Monia, B. P., Peck-Radosavljevic, M., Wacheck, V., 2006, Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential target for antisense therapy, *Journal of Hepatology*, 44, 151-7.
- Silva, G. A., Czeisler, C., Niece, K. L., Beniash, E., Harrington, D. A., Kessler, J. A., Stupp, S. I., 2004, Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers, *Science*, 303, 1352-5.
- Snyder, E. L., Saenz, C. C., Denicourt, C., Meade, B. R., Cui, X. S., Kaplan, I. M., Dowdy, S. F., 2005, Enhanced targeting and killing of tumor cells expressing the CXCR4 chemokine receptor 4 by transducible anticancer peptides, *Cancer Research*, 65, 10646-50.
- Soderquist, R. S., Danilov, A. V., Eastman, A., 2014, Gossypol increases expression of the pro-apoptotic BH3-only protein NOXA through a novel mechanism involving phospholipase A2, cytoplasmic calcium, and endoplasmic reticulum stress, *Journal of Biological Chemistry*, 289, 16190-9.
- Stewart, M. L., Fire, E., Keating, A. E., Walensky, L. D., 2010, The MCL-1 BH3 helix is an exclusive MCL-1 inhibitor and apoptosis sensitizer, *Nat Chemical Biology*, 6, 595-601.
- Stupp, S. I., 2010, Self-assembly and biomaterials, *Nano Letters*, 10, 4783-6.
- Su, J. C., Tseng, P. H., Hsu, C. Y., Tai, W. T., Huang, J. W., Ko, C. H., Lin, M. W., Liu, C. Y., Chen, K. F., Shiau, C. W., 2014, RFX1-dependent activation of SHP-1 induces autophagy by a novel obatoclax derivative in hepatocellular carcinoma cells, *Oncotarget*, 5, 4909-19.
- Such, G. K., Yan, Y., Johnston, A. P., Gunawan, S. T., Caruso, F., 2015, Interfacing materials science and biology for drug carrier design, *Advanced Materials*, 27, 2278-97.
- Sun, L., Zheng, C., Webster, T. J., 2017, Self-assembled peptide nanomaterials for biomedical applications: promises and pitfalls, *International Journal of Nanomedicine*, 12, 73-86.
- Sun, X., Cheng, G., Hao, M., Zheng, J., Zhou, X., Zhang, J., Taichman, R. S., Pienta, K. J., Wang, J., 2010, CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression, *Cancer and Metastasis Reviews*, 29, 709-22.

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021, Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*.
- Tarasov, S. G., Gaponenko, V., Howard, O. M., Chen, Y., Oppenheim, J. J., Dyba, M. A., Subramaniam, S., Lee, Y., Michejda, C., Tarasova, N. I., 2011, Structural plasticity of a transmembrane peptide allows self-assembly into biologically active nanoparticles, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 9798-803.
- Thomas, L. W., Lam, C., Edwards, S. W., 2010, Mcl-1; the molecular regulation of protein function, *FEBS Letters*, 584, 2981-9.
- Timucin, A. C., Basaga, H., Kutuk, O., 2019, Selective targeting of antiapoptotic BCL-2 proteins in cancer, *Medicinal Research Reviews*, 39, 146-175.
- Tong, W. G., Ding, X. Z., Witt, R. C., Adrian, T. E., 2002, Lipoxigenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway, *Molecular Cancer Therapeutics*, 1, 929-35.
- Townsend, K. J., Trusty, J. L., Traupman, M. A., Eastman, A., Craig, R. W., 1998, Expression of the antiapoptotic MCL1 gene product is regulated by a mitogen activated protein kinase-mediated pathway triggered through microtubule disruption and protein kinase C, *Oncogene*, 17, 1223-34.
- Tron, A. E., Belmonte, M. A., Adam, A., Aquila, B. M., Boise, L. H., Chiarparin, E., Cidado, J., Embrey, K. J., Gangl, E., Gibbons, F. D., Gregory, G. P., Hargreaves, D., Hendricks, J. A., Johannes, J. W., Johnstone, R. W., Kazmirski, S. L., Kettle, J. G., Lamb, M. L., Matulis, S. M., Nooka, A. K., Packer, M. J., Peng, B., Rawlins, P. B., Robbins, D. W., Schuller, A. G., Su, N., Yang, W., Ye, Q., Zheng, X., Secrist, J. P., Clark, E. A., Wilson, D. M., Fawell, S. E., Hird, A. W., 2018, Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia, *Nature Communications*, 9, 5341.
- Unzueta, U., Cespedes, M. V., Ferrer-Miralles, N., Casanova, I., Cedano, J., Corchero, J. L., Domingo-Espin, J., Villaverde, A., Manges, R., Vazquez, E., 2012, Intracellular CXCR4(+) cell targeting with T22-empowered protein-only nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*, 7, 4533-44.
- Unzueta, U., Roldan, M., Pesarrodon, M., Benitez, R., Sanchez-Chardi, A., Conchillo-Sole, O., Manges, R., Villaverde, A., Vazquez, E., 2020, Self-assembling as regular nanoparticles dramatically minimizes photobleaching of tumour-targeted GFP, *Acta Biomaterialia*, 103, 272-280.
- Ur Rehman, Z., Hoekstra, D., Zuhorn, I. S., 2013, Mechanism of polyplex- and lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: real-time visualization of transient membrane destabilization without endosomal lysis, *ACS Nano*, 7, 3767-77.
- Van Hout, A., D'huys, T., Oeyen, M., Schols, D., Van Loy, T., 2017, Comparison of cell-based assays for the identification and evaluation of competitive CXCR4 inhibitors, *PLoS One*, 12, e0176057.
- Vela, L., Gonzalo, O., Naval, J., Marzo, I., 2013, Direct interaction of Bax and Bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation, *Journal of Biological Chemistry*, 288, 4935-46.
- Vo, T. T., Ryan, J., Carrasco, R., Neuberg, D., Rossi, D. J., Stone, R. M., Deangelo, D. J., Frattini, M. G., Letai, A., 2012, Relative mitochondrial priming of myeloblasts and normal HSCs determines chemotherapeutic success in AML, *Cell*, 151, 344-55.

- Walensky, L. D., Kung, A. L., Escher, I., Malia, T. J., Barbuto, S., Wright, R. D., Wagner, G., Verdine, G. L., Korsmeyer, S. J., 2004, Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix, *Science*, 305, 1466-70.
- Walensky, L. D., Pitter, K., Morash, J., Oh, K. J., Barbuto, S., Fisher, J., Smith, E., Verdine, G. L., Korsmeyer, S. J., 2006, A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX, *Molecular Cell*, 24, 199-210.
- Wang, C., Cheng, H., Li, Y., 2016a, Role of SDF-1 and CXCR4 in the proliferation, migration and invasion of cervical cancer, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29, 2151-2154.
- Wang, G., Chen, S., Edwards, H., Cui, X., Cui, L., Ge, Y., 2014, Combination of chloroquine and GX15-070 (obatoclax) results in synergistic cytotoxicity against pancreatic cancer cells, *Oncology Reports*, 32, 2789-94.
- Wang, H., Guo, M., Wei, H., Chen, Y., 2021, Targeting MCL-1 in cancer: current status and perspectives, *Journal of Hematology & Oncology*, 14, 67.
- Wang, X., Bathina, M., Lynch, J., Koss, B., Calabrese, C., Frase, S., Schuetz, J. D., Rehg, J. E., Opferman, J. T., 2013, Deletion of MCL-1 causes lethal cardiac failure and mitochondrial dysfunction, *Genes & Development*, 27, 1351-64.
- Wang, Y., Hazeldine, S. T., Li, J., Oupicky, D., 2015a, Development of functional poly(amido amine) CXCR4 antagonists with the ability to mobilize leukocytes and deliver nucleic acids, *Advanced Healthcare Materials*, 4, 729-38.
- Wang, Y., Li, J., Chen, Y., Oupicky, D., 2015b, Balancing polymer hydrophobicity for ligand presentation and siRNA delivery in dual function CXCR4 inhibiting polyplexes, *Biomaterials Science*, 3, 1114-23.
- Wang, Y., Xie, Y., Oupicky, D., 2016b, Potential of CXCR4/CXCL12 Chemokine Axis in Cancer Drug Delivery, *Current Pharmacology Reports*, 2, 1-10.
- Wang, Z., Li, Y., Huang, Y., Thompson, M. P., Leguyader, C. L., Sahu, S., Gianneschi, N. C., 2015c, Enzyme-regulated topology of a cyclic peptide brush polymer for tuning assembly, *Chemical Communications*, 51, 17108-11.
- Weerasinghe, P., Garcia, G. E., Zhu, Q., Yuan, P., Feng, L., Mao, L., Jing, N., 2007, Inhibition of Stat3 activation and tumor growth suppression of non-small cell lung cancer by G-quartet oligonucleotides, *International Journal of Oncology*, 31, 129-36.
- Wei, A. H., Roberts, A. W., Spencer, A., Rosenberg, A. S., Siegel, D., Walter, R. B., Caenepeel, S., Hughes, P., Mciver, Z., Mezzi, K., Morrow, P. K., Stein, A., 2020, Targeting MCL-1 in hematologic malignancies: Rationale and progress, *Blood Reviews*, 44, 100672.
- Wei, D., Zhang, Q., Schreiber, J. S., Parsels, L. A., Abulwerdi, F. A., Kausar, T., Lawrence, T. S., Sun, Y., Nikolovska-Coleska, Z., Morgan, M. A., 2015, Targeting mcl-1 for radiosensitization of pancreatic cancers, *Translational Oncology*, 8, 47-54.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., Macgregor, G. R., Thompson, C. B., Korsmeyer, S. J., 2001, Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death, *Science*, 292, 727-30.
- Wei, S. H., Dong, K., Lin, F., Wang, X., Li, B., Shen, J. J., Zhang, Q., Wang, R., Zhang, H. Z., 2008, Inducing apoptosis and enhancing chemosensitivity to gemcitabine via RNA interference targeting Mcl-1 gene in pancreatic carcinoma cell, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 62, 1055-64.
- Wertz, I. E., Kusam, S., Lam, C., Okamoto, T., Sandoval, W., Anderson, D. J., Helgason, E., Ernst, J. A., Eby, M., Liu, J., Belmont, L. D., Kaminker, J. S., O'rourke, K. M., Pujara, K., Kohli, P. B., Johnson, A. R., Chiu, M. L., Lill, J. R., Jackson, P. K., Fairbrother, W.

- J., Seshagiri, S., Ludlam, M. J., Leong, K. G., Dueber, E. C., Maecker, H., Huang, D. C., Dixit, V. M., 2011, Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7, *Nature*, 471, 110-4.
- Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., Adams, J. M., Huang, D. C., 2005, Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins, *Genes & Development*, 19, 1294-305.
- Wu, J., Wu, X., Liang, W., Chen, C., Zheng, L., An, H., 2014, Clinicopathological and prognostic significance of chemokine receptor CXCR4 overexpression in patients with esophageal cancer: a meta-analysis, *Tumor Biology*, 35, 3709-15.
- Xia, J., Tian, H., Chen, L., Lin, L., Guo, Z., Chen, J., Chen, X., 2011, Oligoethylenimines grafted to PEGylated poly(beta-amino ester)s for gene delivery, *Biomacromolecules*, 12, 1024-31.
- Xiao, Y., Nimmer, P., Sheppard, G. S., Bruncko, M., Hessler, P., Lu, X., Roberts-Rapp, L., Pappano, W. N., Elmore, S. W., Souers, A. J., Levenson, J. D., Phillips, D. C., 2015, MCL-1 Is a Key Determinant of Breast Cancer Cell Survival: Validation of MCL-1 Dependency Utilizing a Highly Selective Small Molecule Inhibitor, *Molecular Cancer Therapeutics*, 14, 1837-47.
- Xu, C., Liu, Y., Huang, J., Wang, H., Tan, L., Xu, Y., Jiang, Z., Wang, X., Hou, Y., Jiang, D., Wang, Q., 2017, The prognostic significance of MCL1 copy number gain in esophageal squamous cell carcinoma, *Oncotarget*, 8, 87699-87709.
- Xu, J., Liao, X., Wong, C., 2010, Downregulations of B-cell lymphoma 2 and myeloid cell leukemia sequence 1 by microRNA 153 induce apoptosis in a glioblastoma cell line DBTRG-05MG, *International Journal of Cancer*, 126, 1029-35.
- Xu, L., Xu, S., Wang, H., Zhang, J., Chen, Z., Pan, L., Wang, J., Wei, X., Xie, H., Zhou, L., Zheng, S., Xu, X., 2018, Enhancing the Efficacy and Safety of Doxorubicin against Hepatocellular Carcinoma through a Modular Assembly Approach: The Combination of Polymeric Prodrug Design, Nanoparticle Encapsulation, and Cancer Cell-Specific Drug Targeting, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10, 3229-3240.
- Yamagata, M., Kawano, T., Shiba, K., Mori, T., Katayama, Y., Niidome, T., 2007, Structural advantage of dendritic poly(L-lysine) for gene delivery into cells, *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 15, 526-32.
- Young, A. I., Law, A. M., Castillo, L., Chong, S., Cullen, H. D., Koehler, M., Herzog, S., Brummer, T., Lee, E. F., Fairlie, W. D., Lucas, M. C., Herrmann, D., Allam, A., Timpson, P., Watkins, D. N., Millar, E. K., O'toole, S. A., Gallego-Ortega, D., Ormandy, C. J., Oakes, S. R., 2016, MCL-1 inhibition provides a new way to suppress breast cancer metastasis and increase sensitivity to dasatinib, *Breast Cancer Research*, 18, 125.
- Yu, M. K., Park, J., Jon, S., 2012, Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy, *Theranostics*, 2, 3-44.
- Yuan, S., Akey, C. W., 2013, Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation, *Structure*, 21, 501-15.
- Zervantonakis, I. K., Iavarone, C., Chen, H. Y., Selfors, L. M., Palakurthi, S., Liu, J. F., Drapkin, R., Matulonis, U., Levenson, J. D., Sampath, D., Mills, G. B., Brugge, J. S., 2017, Systems analysis of apoptotic priming in ovarian cancer identifies vulnerabilities and predictors of drug response, *Nature Communications*, 8, 365.
- Zhang, C., An, T., Wang, D., Wan, G., Zhang, M., Wang, H., Zhang, S., Li, R., Yang, X., Wang, Y., 2016, Stepwise pH-responsive nanoparticles containing charge-reversible pullulan-based shells and poly(beta-amino ester)/poly(lactic-co-glycolic acid) cores as carriers

- of anticancer drugs for combination therapy on hepatocellular carcinoma, *Journal of Control Release*, 226, 193-204.
- Zhang, C. Y., Yang, Y. Q., Huang, T. X., Zhao, B., Guo, X. D., Wang, J. F., Zhang, L. J., 2012, Self-assembled pH-responsive MPEG-b-(PLA-co-PAE) block copolymer micelles for anticancer drug delivery, *Biomaterials*, 33, 6273-83.
- Zhang, Z., Song, T., Zhang, T., Gao, J., Wu, G., An, L., Du, G., 2011, A novel BH3 mimetic S1 potently induces Bax/Bak-dependent apoptosis by targeting both Bcl-2 and Mcl-1, *International Journal of Cancer*, 128, 1724-35.
- Zhao, B., Sensintaffar, J., Bian, Z., Belmar, J., Lee, T., Olejniczak, E. T., Fesik, S. W., 2017, Structure of a Myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) inhibitor bound to drug site 3 of Human Serum Albumin, *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 25, 3087-3092.
- Zhou, X. R., Cao, Y., Zhang, Q., Tian, X. B., Dong, H., Chen, L., Luo, S. Z., 2017, Self-assembly nanostructure controlled sustained release, activity and stability of peptide drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 528, 723-731.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Özlem KAPLAN
Doğum Yeri	-
Doğum Tarihi	-
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	-
Web Adresi	-

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi
Bölümü	Biyomühendislik
Mezuniyet Yılı	09.06.2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyomühendislik
Programı	Biyomühendislik

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	
Özgür, A., Kaplan, Ö., Gökşen Tosun, N., Türkekul, İ., Gökçe, İ. 2022, Green synthesis of silver nanoparticles using Macrolepiota procera extract and investigation of their HSP27, HSP70, and HSP90 inhibitory potentials in human cancer cells, <i>Particulate Science and Technology</i>, 1-11. Gökşen Tosun, N., Kaplan, Ö., İmamoğlu, R., Türkekul, İ., Gökçe, İ., Özgür, A. 2022, Green synthesized silver nanoparticles with mushroom extracts of Paxina leucomelas and Rhizopogon luteolus induce ROS-Induced intrinsic apoptotic pathway in cancer cells, <i>Inorganic and Nano-metal Chemistry</i>, 1-10. Kaplan, Ö., Gökşen Tosun, N., İmamoğlu, R., Türkekul, İ., Gökçe, İ., Özgür, A. 2022, Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from Tricholoma ustale and Agaricus arvensis extracts and investigation of their antimicrobial, cytotoxic, and apoptotic potentials, <i>Journal of Drug Delivery Science and Technology</i>, 69, 103178.	

- Gökşen Tosun, N., **Kaplan, Ö.**, Erden Tayhan, S., Alkan C., İ. Gökçe, 2022, A new approach to breast cancer therapy: targeted nanocarrier systems, *International Journal of Chemistry and Technology* (accepted)
- İmamoğlu, R., **Kaplan, Ö.**, Gök, M. K., Gökçe, İ., 2022, Polymer-Based Transfection Agents Used in CRISPR-CAS9 System, *Turkish Journal of Nature and Science*, 11 (1), 151-156.
- Kaplan, Ö.**, İmamoğlu, R., Gökçe, İ., 2022, Recombinant Production of *E. coli* NAD⁺-dependent DNA ligase as a Target for Antibacterial Drug Discovery, *KSU Journal of Agriculture and Nature*, 2619-9149.
- Gökşen Tosun, N., **Kaplan, Ö.**, 2022, Biosynthesis of silver nanoparticle using white propolis extract as a reduction agent and optimized by Box-Behnken design, *KSU Journal of Agriculture and Nature*, 25, 5, 933-945.
- Gökşen Tosun, N., **Kaplan, Ö.**, Özgür, A., 2021, Apoptosis Induced by Tarantula cubensis Crude Venom (Theranekron® D6) in Cancer Cells, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 1981-528X.
- Kaplan, Ö.**, Gökşen Tosun, N., 2021, Biosynthesis of silver nanoparticles from Teucroside and investigation of its antibacterial activity, *Cumhuriyet Science Journal*, 2587-2680, 42.
- İncir, İ., **Kaplan, Ö.**, Bilgin, S., Gökçe, İ., 2021, Development of a Fluorescent Protein Based FRET Biosensor for Determination of Protease Activity, *Sakarya University Journal of Science SAUJS*, 2147-835X, 25, 5, 1235-1244.
- Gökşen Tosun, N., **Kaplan, Ö.**, Türkekul, İ., Gökçe, İ., Özgür, A., 2021, Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Schizophyllum commune and Geopora sumneriana Extracts and Evaluation of Their Anticancer and Antimicrobial Activities, *Particulate Science And Technology*, 0272-6351
- Kaplan, Ö.**, İmamoğlu, R., Gökçe, İ., 2021, High-Level Production of MMLV Reverse Transcriptase Enzyme in Escherichia Coli, *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 2636-8277, 33, 4.
- Kaplan, Ö.**, Gökşen Tosun, N., Özgür, A., Erden Tayhan, S., Bilgin, S., Türkekul, İ., Gökçe, İ., 2021, Microwave-Assisted Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Crude Extracts of Boletus Edulis and Coriolus Versicolor: Characterization, Anticancer, Antimicrobial And Wound Healing Activities, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 7127906, 64, 1-8.
- Gökşen Tosun, N., **Kaplan, Ö.**, 2021, Optimization of the green synthesis of silver nanoparticle with Box-Behnken design: Using Aloe vera plant extract as a reduction agent, *Sakarya University Journal of Science*, 1301-4048.
- Şenol, B., **Kaplan, Ö.**, İmamoğlu, R., Gökçe, İ., 2021, Recombinant production and characterization of Aspergillus niger prolyl endopeptidase enzyme for gluten-free food production, *International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences*, 2602-246X, 3.
- Kaplan, Ö.**, İmamoğlu, R., Şahingöz, İ., Gökçe, İ., 2021, Recombinant production of Thermus aquaticus single-strand binding protein for usage as PCR enhancer, *International Advanced Researches and Engineering Journal*, 2618-575X, 5.
- Kaplan, Ö.**, Pekmez, M., Akıncı, Y., Ataklı, H. D., Eren, F., Dirican, A. C., Gözübatık Çelik, R. G., Gül, Z. B., Ur Özçelik, E., Gül, G., Sarı, H., Özkara, Ç., 2021, The relationship between DIRAS1 gene and idiopathic generalized epilepsy in the Turkish population, *Gene Reports*, 2452-0144, 23.

- Gökçe, İ., Özgür, A., Tayhan, Y., **Kaplan, Ö.**, Gökşen Tosun, N., İmamoğlu, R., Erden Tayhan, S., Bilgin, S., Development of One-Step RT-PCR Kit for Diagnosis of COVID-19, Sözlü Sunum, *3rd Eurasia Biochemical Approaches Technologies Congress (EBAT)*, 04 Kasım 2021, 05 Aralık 2021.
- Özgür, A., Gökşen Tosun, N., **Kaplan, Ö.**, Türkekul, İ., Gökçe, İ., Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Armillaria Mellea and Xerocomellus Chrysenteron Extracts and Evaluation of Their Antimicrobial and Anticancer Potentials, Sözlü Sunum, *3rd Eurasia Biochemical Approaches Technologies Congress (EBAT)*, 04 Kasım 2021, 07 Kasım 2021.
- Kaplan, Ö.**, Gökçe, İ., İmamoğlu, R., Expression of Recombinant Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) Reverse Transcriptase Enzyme for Development of Viral Diagnostic Kits, *1st International Symposium on Graduate Research in Science Focus on Entrepreneurship and Innovation (ISGRS 2018)* October 4-6, 2018, İstanbul
- İmamoğlu, R., Gökçe, İ., **Kaplan, Ö.**, Expression of Recombinant Narenginase Enzyme for Debitting of Juices, *1st International Symposium on Graduate Research in Science Focus on Entrepreneurship and Innovation (ISGRS 2018)* October 4-6, 2018, İstanbul
- Şahingöz, İ., **Kaplan, Ö.**, Bilgin, S., Ulusu, Y., Expression of Thermus Aquaticus Single Strand Binding Protein In Pichia Pastoris For Molecular Biology Applications, Özet Bildiri, *Pichia 2016*, 03 Nisan 2016, 06 Nisan 2016.
- İmamoğlu, R., **Kaplan, Ö.**, Bilgin, S., Gökçe, İ., Expression, Purification and Characterization Of Recombinant Proteinase K From Tritirachium Album Limber, Özet Bildiri, *Pichia 2016*, 03 Nisan 2016, 06 Nisan 2016.
- Kaplan, Ö.**, Bozkurt, Y., Ulusu, Y., Gökçe, İ., Production of Recombinant Unag Fluorescent Protein In Pichia Pastoris For Improving Bilirubin Biosensor, Özet Bildiri, *Pichia 2016*, 03 Nisan 2016, 06 Nisan 2016.
- İmamoğlu, R., **Kaplan, Ö.**, Gökçe, İ., DNA Saflaştırma Kitlerinde Kullanmak İçin RNaz A Enziminin Rekombinant Olarak Üretilmesi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Poster Sunumu, *AGÜ II. Yaşam Bilimleri Kongresi*, 23 Şubat 2016, 25 Şubat 2016.