



**COX-2 GENİNİN CRISPR/CAS9 ARACILI
DÜZENLENMESİ İÇİN POLİMERİK NANOPARTİKÜL
TEMELLİ TRANSFEKSİYON AJANININ
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI
RİZVAN İMAMOĞLU**

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK
Prof. Dr. İsa GÖKÇE
Mayıs-2021
Her hakkı saklıdır**

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK

BİYOMÜHENDİSLİK

**COX-2 GENİNİN CRISPR/CAS9 ARACILI DÜZENLENMESİ İÇİN
POLİMERİK NANOPARTİKÜL TEMELLİ TRANSFEKSİYON AJANININ
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

RİZVAN İMAMOĞLU

TOKAT
Mayıs-2021

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2020/65 nolu proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma birimine teşekkür ederim. Ayrıca YÖK 100/2000 Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği Programı kapsamında destek veren YÖK'e teşekkür ederim.

Rizvan İMAMOĞLU tarafından hazırlanan “**COX-2 Geninin CRISPR/Cas9 Aracılı Düzenlenmesi için Polimerik Nanopartikül Temelli Transfeksiyon Ajanının Kullanılabilirliğinin Araştırılması**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 20 Mayıs 2021 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **BIYOMÜHENDİSLİK** Anabilim Dalı Yök 100/2000 Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği Programı’nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Cemil ALKAN

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Yavuz ERDEN

Bartın Üniversitesi

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ

İstanbul Üniversitesi

ONAY

.....
Prof. Dr. Mehmet GÜNEŞ
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü
---/---/20--

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Rizvan İMAMOĞLU

20 Mayıs 2021

ÖZET

DOKTORA TEZİ

COX-2 GENİNİN CRISPR/CAS9 ARACILI DÜZENLENMESİ İÇİN POLİMERİK NANOPARTİKÜL TEMELLİ TRANSFEKSİYON AJANININ KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

RİZVAN İMAMOĞLU

**TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM
ENSTİTÜSÜ**

BİYOMÜHENDİSLİK

**TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İSA GÖKÇE
İKİNCİ DANIŞMAN: DOÇ. DR. MEHMET KORAY GÖK**

Genom düzenleme çalışmaları birçok hastalığın tedavisi için bilim dünyasında umut uyandıran yeni bir teknolojidir. CRISPR/Cas9 sistemi günümüzde genom düzenleme çalışmalarında kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. CRISPR/Cas9'un basit, hızlı ve ucuz bir yöntem olması terapötik uygulamalar için büyük umut vaat etmektedir. Ancak, bu teknolojinin hastalarda başarılı bir şekilde uygulanması için bazı zorlukların üstesinden gelinmesi gerekmektedir. CRISPR/Cas9 genom düzenleme sisteminin insan vücudundaki hedef hücrelere güvenli ve verimli bir şekilde ulaştırılması bu sistemin en büyük zorluklardan birini oluşturmaktadır. Gerçekleştirilen bu tez kapsamında, P β AE temelli transfeksiyon ajanı kullanılarak HUVEC hücre hattında CRISPR/Cas9 sistemi aracılı COX-2 geninin susturması gerçekleştirilmiştir. HUVEC hücre hattında COX-2 geninin susturulmasının doğrulanması Western blot analizi ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca COX-2 geninin susturulmasının bu hücrelerde hücre migrasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak HUVEC hücre hattı için sentezlenen ve kullanılan P β AE transfeksiyon ajanının transfeksiyon verimi %90-95 ve Western blot sonucuna göre CRISPR verimi % 57.12 olarak hesaplanmıştır. Bu tez kapsamında kullanılan P β AE temelli nanopartikülerin, CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenlemede özellikle plazmid transfeksiyonu için HUVEC hücre hattında iyi bir transfeksiyon ajanı olarak kullanılabileceğini ortaya koyulmuştur.

2021, 115 SAYFA

ANAHTAR KELİMELEER: CRISPR, Nanopartikül, Polimer, P β AE

ABSTRACT

DOCTORATE THESIS

INVESTIGATION OF THE USABILITY OF POLYMERIC NANOPARTICLE BASED TRANSFECTION AGENT FOR CRISPR/CAS9-MEDIATED EDITING OF COX-2 GENE

RİZVAN İMAMOĞLU

**TOKAT GAZİOSMANPAŞA UNIVERSITY
INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES**

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

**SUPERVISOR: PROF. DR. İSA GÖKÇE
CO-SUPERVISOR: ASSOC. DR. MEHMET KORAY GÖK**

Genome editing studies are a promising new technology in the scientific world for the treatment of many diseases. The CRISPR/Cas9 system is one of the most common methods used in genome editing studies today. The fact that CRISPR/Cas9 is a simple, fast, and inexpensive method holds great promise for therapeutic applications. Although the CRISPR/Cas9 technology holds great promise, some difficulties must be overcome to be successfully applied in patients. Safe and efficient delivery of the CRISPR/Cas9 genome editing system to target cells in the human body poses one of the biggest challenges of this system. Within the scope of this thesis, the silencing of the COX-2 gene via the CRISPR/Cas9 system was performed in the HUVEC cell line using a P β AE-based transfection agent. Confirmation of silencing of the COX-2 gene in the HUVEC cell line was analyzed by Western blot. In addition, the effects of silencing the COX-2 gene on cell migration in these cells were investigated. As a result, the transfection efficiency of the P β AE transfection agent synthesized and used for the HUVEC cell line was between 90-95% and the CRISPR efficiency was calculated as 57.12% according to the Western blot result. It has been revealed that the P β AE-based nanoparticles used within the scope of this thesis can be used as a good transinfection agent in the HUVEC cell line for CRISPR/Cas9 mediated genome editing, especially for plasmid transfection.

2021, 115 PAGES

KEYWORDS: CRISPR, Nanoparticle, Polymer, P β AE

ÖNSÖZ

Akademik hayatım süresince bana araştırma ve kendimi geliştirme olanağı sağlayan, çalışmanın yürütülmesi boyunca laboratuvarlarının tüm imkânlarını kullanmama izin veren bilgi ve tecrübesiyle bana her konuda daima yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam esnasında yardımlarını esirgemeyen tecrübe ve önerilerinden yararlandığım eş danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet Koray GÖK'e teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarımın birçok yerinde desteklerini esirgemeyen değerli çalışma arkadaşım Arş. Gör. Özlem KAPLAN'a teşekkür ederim. Ayrıca çalışmama katkı sunan Prof. Dr. Cemil ALKAN, Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN, Dr. Öğr. Üyesi Sema BİLGİN ve Dr. Öğr. Üyesi Yavuz ERDEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini her an hissettiğim aileme teşekkürlerimi sunarım.

Rizvan İMAMOĞLU

20 Mayıs 2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	i
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ/GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Genom Düzenleme	5
2.2. CRISPR/Cas9 Sistemi.....	9
2.3. Gen Taşıyıcı Sistemler	12
2.3.1. Gen taşıyıcı viral sistemler	14
2.3.2. Viral olmayan gen taşıyıcı sistemler	17
2.4. Polimerik Nanopartikül Sentezi	26
2.4.1. Solvent buharlaştırma yöntemi.....	27
2.4.2. Çözücü yer değiştirme yöntemi.....	27
2.4.3. Tuzla çöktürme	28
2.4.4. Diyaliz	29
2.4.5 Süper kritik akışkan teknolojisi	29
2.4.6 Emülsiyon polimerizasyonu	30
2.4.7. Rekombinant teknoloji	31
2.5. Gen Taşıyıcı Olarak Kullanılan Polimerler	32
2.5.1. Poly(Laktik Asit) (PLA).....	32
2.5.2 Poly-l-Lysine (PLL)	33
2.5.3. Poly(amidoamine) (PAMAM).....	33
2.5.4. Poly(methyl-methacrylate) (PMMA)	33
2.5.5. Poly(Ethylene-Imine) (PEI).....	34
2.5.6. Poly(Laktik-ko-glikolid) (PLGA)	35
2.5.7. Poli Beta Amino Esterler	35
2.6. CRISPR/Cas9 Taşıyıcı Sistemler.....	37
2.7. CRISPR/Cas9 Polimerik Nanotaşıyıcı Sistemler	38
2.8. Gen Taşımada Zorluklar.....	42
2.9. Transfeksiyon Veriminin Artırılması	44

2.10. Polimerik Nanopartikül Kullanımıyla İlişkili Zorluklar	45
2.11. PNP'lerin Stabilitesi.....	46
2.12. Polimerik Nanopartiküllerin Birikimi ve Toksisitesi	47
2.13. Polimerlerin Toksik Metabolitlerin Oluşumu.....	48
2.14. PNP'lerin Biyolojik Dağılımı ve Hücresel Etkileşimi.....	49
2.15. COX-2 Geni.....	50
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	53
3.1. Materyal.....	53
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	53
3.1.2. Kullanılan kimyasallar.....	53
3.1.3. Kullanılan çözeltiler	54
3.2. Yöntem.....	56
3.2.1. Yapılan çalışmanın özeti	56
3.2.2. Biyoinformatik çalışmalar	56
3.2.3. FSB'li kompetant hücre hazırlanması	57
3.2.4. PX601-GFP plazmidinin transformasyonu	57
3.2.5. PX601-GFP plazmidinin saflaştırılması.....	58
3.2.6. Polimer sentezi	59
3.2.7. Polimer sentezinin FTIR ile analizi	60
3.2.8. P β AE taşıyıcı sistemlerin hazırlanması	60
3.2.9. Nanopolimerin zeta potansiyeli ve partikül boyut analizi analizi	60
3.2.10. Saflaştırılan plazmidin konsantre hale getirilmesi	60
3.2.11. P β AE transfeksiyon ajanının plazmid tutma kapasitesinin belirlenmesi	61
3.2.12. HUVEC hücrelerinin kültüre alınması	62
3.2.13. HUVEC hücrelerine sentezlenen P β AE temelli transfeksiyon ajanı ile	
PX601 plazmidinin transfeksiyon işleminin yapılması	64
3.2.14. ImageJ programıyla transfeksiyon oranının analizi	65
3.2.15. HUVEC hücrelerine sentezlenen P β AE temelli transfeksiyon ajanı ile	
transfeksiyon işleminin yapılması	66
3.2.16. Western blot Analizi.....	67
3.2.17. Hücre migrasyonu analizi.....	69
4. BULGULAR.....	70
4.1. Polimer Sentezi.....	70
4.2. FTIR Analizi.....	70
4.3. PNP Taşıyıcı Sistemi Hazırlanması.....	72
4.4. Zeta Potansiyeli ve Partikül Boyut Analizi Analizi	73
4.6. PX601-GFP Plazmidi ile Transfeksiyon Veriminin İncelenmesi	74
4.7. Cox-2 Genin Knock-out Yapılması.....	75
4.8. Western Blot Sonuçları	77

4.9. HUVEC Hücrelerinde Hücre Migrasyonuna Bakılması.....	77
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	79
6. KAYNAKLAR	82
7. ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Açıklama

bç	baz çifti
gr	gram
mg	miligram
mL	mililitre
μ M	mikromolar
M	molar
mM	milimolar
nm	nanometre
rpm	dakika daki devir sayısı (round per minute)

Kısaltmalar

Açıklama

AAV	Adeno İlişkili Virüs
CPP	Hücre Geçiş Peptidi
CRISPR	Düzenli Aralıklarla
crRNA	CRISPR RNA
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSB	Çif İplik Kırığı
dsDNA	Çift İplikli DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GFP	Yeşil Floresan Protein
HDR	Homoloji Yönlendirilmiş Onarım
HSV	Herpes Simpleks Virüsü
iTOP	Osmotiz ve Propanebetain ile İndüklenen Transdüksiyon
MMSV	Moloney murin sarkom virüsü
MSCV	Murin Kök Hücre Virüsü

Kısaltmalar**Açıklama**

NHEJ	Homolog Olmayan Rekombinasyon ile Tamir
NP	Nanopartikül
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PEI	Polietilenimin
PLA	Poli laktik asit
PLL	L-lisin
PNP	Poimerik Nanopartikül
P β AE	Polibeta amino ester
RGD	Arginilglisilaspartik Asit
RNA	Ribonükleik asit
RNP	Ribonükleoprotein Kompleksi
SFV	Semliki Forest virüsü
sgRNA	Klavuz RNA
SIN	Sindbis Virüsü
ssDNA	Tek zincirli DNA
TALEN	Transkripsiyonel Aktivatör Benzeri Efektör Nükleazlar
tracrRNA	Trans-activating RNA
VEE	Venezuela Ensefaliti Virüsü
VSV	Veziküler Stomatit Virüsü
VV	Vaccinia Virüsü
ZFN	Çinko parmak nükleaz

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Genom düzenleme için kullanılan farklı nesil nükleazlar	7
Şekil 2.2. Homolog ve Homolog olmayan rekombinasyonun gösterimi	8
Şekil 2.3 CRIPSR/Cas 9 gen düzenleme sistemleri için dağıtım sistemleri.	18
Şekil 2.4 Elektroporasyon işleminin şematik gösterimi	19
Şekil 2.5. Mikroenjeksiyon yönteminin gösterimi	20
Şekil 2.6. Gen iletimi için polimerik nanoparçacık türlerinin gösterimi	25
Şekil 2.7 Çeşitli DNA transfeksiyon metotlarında verimliliğinin karşılaştırılması	26
Şekil 2.8. Çözücü buharlaştırma tekniğinin şematik gösterimi	27
Şekil 2.9. Nanopresipitasyon tekniğinin şematik gösterimi	28
Şekil 2.10. Poli(β -amino ester)'in sentezi.....	36
Şekil 2.11. Polimerik taşıyıcının hücreye alınımında temel süreçler.....	43
Şekil 3.1. Transfeksiyon verimi için kullanılan px601-GFP plazmidi	65
Şekil 3.2. Cox-2 genini knock-out yapmak için kullanılan plazmid.....	66
Şekil 4.1. Sentezlenen polimerin fotoğrafı	70
Şekil 4.2. Sentezlenen P β AE'in FTIR analizi.....	71
Şekil 4.3. Polimerin tutma kapasitesi.....	72
Şekil 4.4. Sentezlenen nanopolimerin zeta potansiyel değeri..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	74
Şekil 4.6. PX601-GFP Plazmidi ile yapılan transfeksiyon sonuçları	75
Şekil 4.7. HUVEC hücrelerine yapılan transfeksiyon işlemi sonuçları.....	76
Şekil 4.8. Western blot sonucu	77
Şekil 4.9. Hücre migrasyonu sonucu	78

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1 ZFN, TALEN ve CRISPR/Cas9'un karşılaştırılması	6
Tablo 2.2 Günümüzde keşfedilmiş farklı cas tipleri ve fonksiyonları.....	10
Tablo 2.3. CRISPR varyantlarının karşılaştırılması	11
Tablo 2.4. Viral ve viral olmayan taşıyıcıların avantajları ve dezavantajları ...	13
Tablo 2.5. Gen terapisi için uygulanan viral vektör örnekleri	15
Tablo 2.6. Polimer sentezinde kullanılan yöntemler ve örnek polimerler.....	32
Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılan cihazlar	53
Tablo 3.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar	54
Tablo 3.3. P β AE temelli transfeksiyon ajanının plazmid ile demeleri	61
Tablo 3.4. Western blotlama işlemlerinde kullanılan tampon çözeltiler	69
Tablo 3.5. Western blotlama primer ve sekonder antikor	69
Tablo 4.1 Ölçüm sonrası elde edilen ortalama zeta potansiyeli	73
Tablo 4.2 Ölçüm sonrası elde edilen ortama partikül boyutu.....	74

1. GİRİŞ

Genom düzenleme çalışmaları, bilim insanlarına bir organizmanın genetik materyalini değiştirme yeteneği veren teknolojileri içermektedir. Bu teknolojiler sayesinde, genetik materyalde hedef spesifik olarak istenilen değişiklikleri gerçekleştirmek mümkün olmaktadır. Şimdiye kadar genom düzenlemeye yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en yaygın olanları, çinko parmak nükleazlar (ZFN'ler), transkripsiyonel aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler) ve düzenli aralıklarla dizilmiş kısa palindromik tekrar (CRISPR)/CRISPR ile ilişkili nükleaz 9 (Cas9))'dur (Gaj ve ark., 2013). Bunların içinde yakın zamanda keşfedilen CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme yöntemi; genetik materyal üzerinde daha etkin, basit, ucuz ve daha hızlı değişiklik yapılabilmesine imkân tanımıştır. CRISPR/Cas9 sistemi ilk olarak bakteriyel bağışıklık sistemi olarak keşfedilmiştir. Bilim insanları bakteri genomunda viral dizilere tam olarak uyan tekrarlar arasında "ara" DNA dizileri bulunan CRISPR adı verilen tekrarlayan DNA dizileri gözlemiştir. Daha sonra bakterilerin virüsle tekrar karşılaştıkları zaman bu DNA elemanlarını RNA'ya kopyaladığını keşfedilmiştir. Klavuz RNA olarak adlandırılan bu RNA, viral DNA'yı kesmek için bir nükleazı (DNA'yı kesen bir protein) hedefine yönlendirerek virüse karşı bağışıklık sağlamaktadır. DNA'yı kesmek için kullanılan nükleazlar Cas proteinleri olarak adlandırılmaktadır (Zhang ve ark., 2014).

Son beş yılda bilim insanlarının, CRISPR/Cas9 genom düzenleme sisteminin hastalıklara karşı terapötik potansiyelini fark etmeleri CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemine yönelik yoğun bir çalışma başlatılmasının önünü açmıştır. 2016 yılında, CRISPR/Cas9 kullanılan ilk klinik araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar CRISPR/Cas9'u genetik bozuklukları olan hastalıkların tedavisinde kullanmak ve hastalık modelleri oluşturmak için büyük bir umut vaat ettiğini göstermektedir (Baylis ve McLeod, 2017).

Bununla birlikte, CRISPR/Cas9 sisteminde, gen terapisi ve diğer nükleik asit bazlı terapötiklerle benzer şekilde hedef dışı etkiler, güvenli ve verimli dağıtım sistemlerinin eksikliği ve etik sorunlar CRISPR/Cas9'u insanlarda terapötik uygulamalar için kullanmanın önündeki temel engelleri oluşturmaktadır (Liu ve ark., 2017).

CRISPR/Cas9 ile ilişkili etik sorunlar, temel olarak bu teknolojinin insan embriyolarını değiştirmek için kolayca kullanılabileceği endişesinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, CRISPR/Cas9'un etik zorlukları, genetik mühendisliği ve gen terapisi ile benzerdir. Dolayısıyla, genetik mühendisliği ve gen terapisi için mevcut düzenlemeler, CRISPR/Cas9'un insanlarda kullanımında uygun sınırlar oluşturmak için de kullanılabilir (Hirsch ve ark., 2019).

CRISPR/Cas9 aracılı gen düzenleme çalışmalarında, özellikle plazmid tabanlı sistemi kullanan çalışmalarda hedef dışı etkiler gözlemlenebilmektedir. Hedef dışı etkiler gen fonksiyonlarını bozarak, genom kararsızlığına neden olmaktadır ve epigenetik mutasyonları indüklemektedir. Hedef dışı etkiler, Cas9/sgRNA kompleksinin PAM (Protospacer Adjacent Motif) bölgesinden uzak bölgelerde hedef dışı bağlanmasıyla indüklenmektedir. Özellikle hedef dışı etki, insanlarda terapötik uygulamalar için potansiyel bir engel olabilmektedir, çünkü sgRNA yalnızca 20 bç'lik bir DNA dizisini hedefler ve potansiyel hedef dışı alanlar insan genomunda mevcut olabilmektedir. Bu nedenle, CRISPR/Cas9 sisteminin potansiyel hedef dışı etkilerinden kaçınmak için eşleştirilmiş bir Cas9 nikazın kullanılması, rasyonel tasarlanmış sgRNA'lar ve hedefleme sahasının doğru seçimi gibi bazı stratejiler dikkate alınmaktadır. Ek olarak, geneik kargoyu taşıyacak iletim sistemin ve CRISPR/Cas9 tipinin doğru seçimi de hedef dışı etkiyi azaltabilmektedir. Genel olarak, viral olmayan iletim sistemleri, viral iletim sistemine göre daha düşük hedef dışı etkilere sahiptir (Liu ve ark., 2017).

CRISPR/Cas9 sistemlerinin insan vücudundaki hedef doku veya hücrelere iletilmesi, terapötik uygulamaları için en büyük zorluklardan biridir. Bu nedenle, güvenli ve verimli dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi, CRISPR/Cas9'un kliniklerdeki başarısı için oldukça önemlidir. Son birkaç yılda, çeşitli dağıtım sistemlerinden yararlanılmaktadır (Kang ve ark., 2017). CRISPR/Cas9 sistemlerinin dağıtım stratejileri, son otuz yılda nükleik asitler ve proteinler için geliştirilenlere benzer niteliktedir. Örneğin, plazmit bazlı CRISPR/Cas9 sisteminin dağıtım stratejisi, plazmit bazlı gen terapisi ile aynıdır. Gen tedavisi için geliştirilen viral ve viral olmayan vektörler, başka modifikasyonlara gerek kalmadan doğrudan plazmit bazlı CRISPR/Cas9 sistemi için kullanılabilir. Cas9 haberci RNA (mRNA) ve sgRNA'nın iletilmesi zordur, ancak küçük interferans RNA (siRNA) iletimine benzer özelliktedir. siRNA için geliştirilen iletim sistemleri bu nedenle küçük

modifikasyonlardan sonra Cas9 mRNA ve sgRNA'nın iletilmesi için kullanılabilmektedir (Tao ve ark., 2019). Bunun tersine, Cas9 proteini/sgRNA kompleksinin verilmesi, nükleik asitler için mevcut iletim sistemlerinden çok farklıdır. Çünkü Cas9 proteini, pozitif yüklü bir proteindir. Cas9 proteinini sgRNA ve viral olmayan vektörlerle kararlı bir kompleks oluşturacak şekilde modifiye etmek için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir (Kuhn ve ark., 2020). Bununla birlikte, CRISPR/Cas9 sistemine ilişkin yapılan yoğun araştırmalar CRISPR/Cas9 tabanlı terapötikler için güvenli ve verimli bir dağıtım sistemi geliştirmek üzerine odaklanarak devam etmektedir.

COX-2, prostaglandin G/H sentaz ailesine ait olan bir enzimdir. 604 amino asitten oluşmaktadır ve moleküler ağırlığı 68.996 kDa'dır. Hem dioksijenaz hem de peroksidaz olarak işlev gören COX-2 enzimi, araşidonik asidin, prostaglandinlerin (PG'ler) ve tromboksan A2'nin (TXA2) oluşumunda hız sınırlayıcı adım olan prostaglandin H2'ye dönüşümünü katalize etmektedir (Rouzer ve Marnett, 2009). COX-2, güçlü bir enflamasyon aracıdır ve prostanoid sinyallemede aktiviteye bağlı plastisitede rol oynamaktadır. COX-2 enzimi endotel hücrelerinde eksprese edilmektedir (Liu ve ark., 2013). İndüklenebilir bir enzimdir ve enflamasyon, anjiyogenez ve tümörjenez dahil olmak üzere çeşitli patofizyolojik süreçlerde önemli görevler almaktadır (Ricciotti ve Fitzgerald, 2011). Anjiyogenez, mevcut vaskülatürden kan damarlarının büyümesidir. Yaşam boyunca hem sağlıkta hem de hastalıklarda büyüme devam etmektedir (Aldair ve Montani, 2010). İnsan göbek kordonu toplardamarı endotel hücreleri (HUVEC), *in vitro* vasküler biyolojiyi çalışmalarını incelemek için en yaygın kullanılan model sistemlerinden biridir. COX-2'ye bağlı prostaglandin üretimi, tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonunu uyarabildiğinden, COX-2, anjiyojenik süreçte tümör hücreleri ve endotelial hücreler arasında bir pozitif geri besleme döngüsü olarak işlev görebilmektedir. COX-2'nin inhibisyonu, böyle bir geri besleme döngüsünü bloke edebilir ve böylece anjiyogenez bağımlı tümör büyümesini inhibe edebilmektedir (Wu ve ark., 2006).

Bu tez çalışması kapsamında,

HUVEC hücrelerine poli-beta aminoester (P β AE) temelli transfeksiyon ajanıyla CRISPR plazmidi aktarılmıştır ve bu transfeksiyon ajanının CRISPR sisteminde transfeksiyon verimi, CRISPR verimi ve HUVEC hücrelerinde COX-2 geninin susturularak hücre migrasyonu üzerine etkisi ilk defa araştırılmıştır. Bu çalışmada P β AE temelli transfeksiyon ajanının karakterizasyonu yapılarak HUVEC hücre hattı için optimal transfeksiyon oranları belirlenmiştir. Transfeksiyon verim oranları belirlendikten sonra HUVEC hücrelerinde gen susturma işleminin sonucunun belirlenmesi için Western blot analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak HUVEC hücre hattı için sentezlenen ve kullanılan P β AE transfeksiyon ajanının transfeksiyon verimi % 90-95 arasında çıkmıştır ve CRISPR verimi Western blot sonucuna göre % 57.12 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda P β AE temelli transfeksiyon ajanının HUVEC hücre hattına başarılı bir şekilde transfeksiyon işlemini gerçekleştirdiği görülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER

2.1. Genom Düzenleme

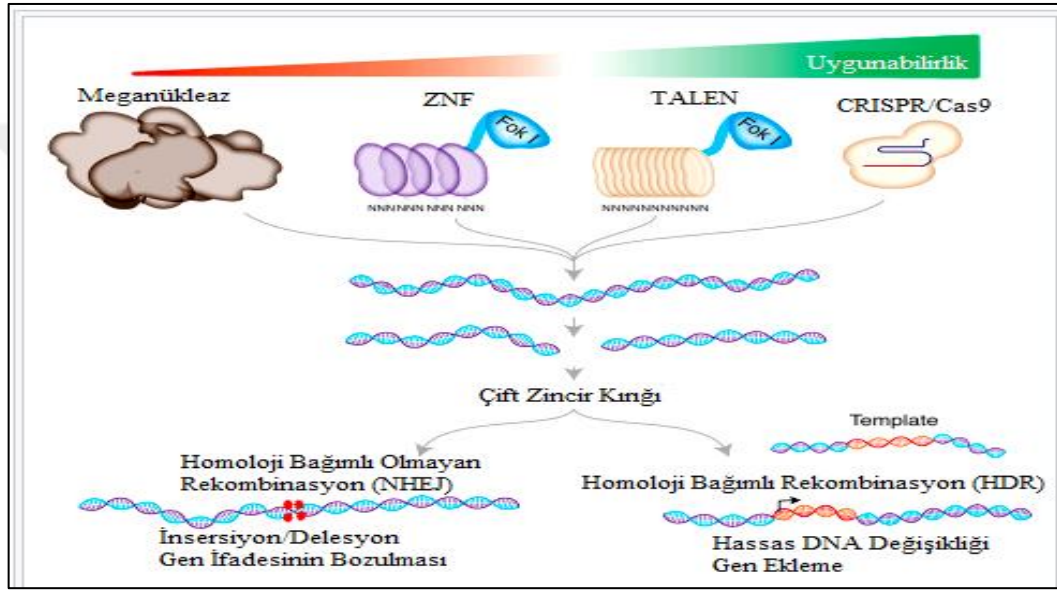
Genom düzenleme, organizmanın DNA'sında hedeflenen değişiklikleri gerçekleştirmek için kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemler, çinko parmak nükleazlarının (ZFN'ler) kullanımı, transkripsiyonel aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler) ve en son geliştirilen, düzenli aralıklarla dizilmiş kısa palindromik tekrar (CRISPR)/CRISPR ile ilişkili nükleaz 9 (Cas9) gibi çeşitli teknikler içermektedir (Gaj ve ark., 2016). Programlanabilir nükleazların ortaya çıkışı, gen düzenleme sürecini büyük ölçüde hızlandırmıştır ve benzeri görülmemiş bir şekilde, bilim insanlarına çok çeşitli hücre türlerinde herhangi bir gen üzerinde değişiklik yapabilme imkânı sunmaktadır. ZFN'ler, herhangi bir bölgedeki DNA sekanslarını kesmek için kullanılan hedeflenebilir DNA parçalama proteinleridir. TALEN'ler, hedef dizilerde çift sarmallı kırılmalara (DSB'ler) neden olur ve bu da DNA hasarı yanıt yollarını tetikleyerek genom modifikasyonuna yol açmaktadır (Gaj ve ark., 2016). ZFN'ler ve TALEN'ler insan, hayvan ve bitki hücrelerinde genom düzenleme için yaygın olarak kullanılsa da bunların etkili kullanımını engelleyen bazı sınırlamalar mevcuttur. ZFN'nin özgüllüğü sınırlıdır ve sıklıkla hedef dışı mutasyonları ortaya çıkarmaktadır (Puchta, 2017). ZFN'ler ve TALEN'ler için vektör dizaynı zaman ve emek gerektirmektedir (Tang ve ark., 2017). Bu nedenle, 2013'ten beri dikkatler CRISPR/Cas9 kullanımına ve son zamanlarda yeni ortaya çıkan birkaç CRISPR/Cas varyantına çevrilmiştir. CRISPR/Cas9, nükleotid baz eşleştirmesi yoluyla DNA dizilerini spesifik olarak hedefleyen, RNA kılavuzlu bir endonükleazdır. ZFN, TALEN ve CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemlerinin karşılaştırılması Tablo 2.1' de özetlenmiştir.

Tablo 2.1 ZFN, TALEN ve CRISPR/Cas9'un karşılaştırılması (Li ve ark., 2020'den uyarlanmıştır)

	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
Tanıma Bölgesi	Çinko parmak proteini	TALE proteininin RVD birbiri ardına dizilmiş tekrar bölgesi	Tek iplikli kılavuz RNA
Modifikasyon Enzimi	FokI nükleaz	FokI nükleaz	Cas9 nükleaz
Hedef sekans büyüklüğü	Tipik olarak ZFN monomeri başına 9–18 bp, ZFN çifti başına 18–36 bp	Tipik olarak TALEN monomeri başına 14–20 bp, TALEN çifti başına 28–40 bp	Tipik olarak 20 bp rehber dizisi + PAM dizisi
Spesifite	Az sayıda konumsal uyumsuzluğu tolere etme	Az sayıda konumsal uyumsuzluğu tolere etme	Konumsal / ardışık çoklu uyumsuzlukları tolere etme
Hedef sınırlamaları	G nükleotidi içeriği zengin olmayan bölgeleri hedeflemek zor	5' hedeflenen baz, her TALEN monomeri için bir T nükleotidi olmalıdır	Hedeflenen bölge bir PAM dizisinden önce gelmelidir
Zorluklar	Önemli protein mühendisliği gerektirir	Karmaşık moleküler klonlama yöntemleri	Standart klonlama prosedürlerini ve oligo sentezini kullanma
Transfeksiyon zorlukları	ZFN ekspresyon elemanlarının küçük boyutu, çeşitli viral vektörler için uygun olduğundan nispeten kolaydır	Fonksiyonel bileşenlerin büyük boyutu nedeniyle zor	Yaygın olarak kullanılan SpCas9 orta büyüklüktedir ve AAV gibi viral vektörler için paketleme sorunlarına neden olabilir, ancak daha küçük ortologlar mevcuttur
ZFN Çinko parmak nükleaz, TALEN Transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleaz, CRISPR Kümelenmiş düzenli aralıklarla kısa palindromik tekrar			

Ex vivo ve *in vivo* genom düzenleme, CRISPR bileşenlerinin memeli hücrelerine DNA, RNA veya ribonükleoprotein (RNP) şeklinde verilebildiği klinik araştırmalarda CRISPR

aracılı terapi için kullanılan iki yaklaşımdır. Bununla birlikte, CRISPR bileşenlerinin teslimi, CRISPR teknolojilerinin başarılı klinik uygulamaları için üstesinden gelinmesi gereken zorluklardan biridir (Tang ve ark., 2017). Güncel klinik araştırmaların çoğunda, elektroporasyon, *ex vivo* genom düzenlemesinin sağlanması için en yaygın kullanılan yöntemlerden biri olmaya devam etmektedir (Yip, 2020). Genom düzenleme için kullanılan farklı nesil nükleazlar ve hedef DNA'yı değiştirmek için kullanılan DNA onarım yolları Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1. Genom düzenleme için kullanılan farklı nesil nükleazlar ve hedef DNA'yı değiştirmek için kullanılan DNA onarım yolları (Ananonim A, 2021)

Homolog rekombinasyon (HDR), birbirine benzer veya aynı dizilere sahip DNA iplikleri arasında nükleotit dizilerinin birbiri arasında yer değiştirdiği bir genetik rekombinasyon tipidir. Bu süreç sırasında DNA birkaç defa kesilir ve daha sonrasında birleştirilir (Malzahn ve ark., 2017). Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ise oluşan çift zincir ipliği kırığı düzeltme yollarından biridir ve çift zincir kırığının herhangi ekleme yapılmadan direkt olarak birleştirilmesini sağlamaktadır (Chang ve ark., 2017). Homolog ve Homolog olmayan rekombinasyonun gösterimi Şekil 2.2’de verilmiştir.

CRISPR/Cas9 kullanılırken hata eğilimli NHEJ onarım yolu tercih edilmektedir (Ferreira ve ark., 2019). İndel mutasyonlar oluşturma yüksek verimliliğine rağmen, NHEJ'in dezavantajları da bulunmaktadır. Silinmeler genellikle çerçeve içindedir ve bu da yarı işlevsel proteinlerle sonuçlanabilmektedir. İndeller, kesin uzunlukları veya konumları (yukarı/aşağı) üzerinde herhangi bir kontrol olmaksızın kolayca 1-200 bp aralığında olabilir ve bu da indel tanımlamayı ve doğrulamayı pahalı ve zaman alıcı bir iş haline getirebilmektedir (Ryu ve ark., 2019).

2.2. CRISPR/Cas9 Sistemi

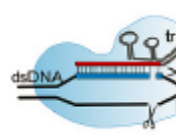
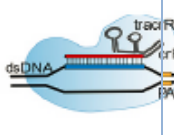
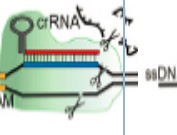
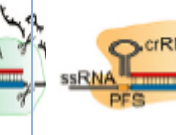
CRISPR/Cas9, basitliği, çok yönlülüğü ve özgüllüğü nedeniyle hem gen işlevini hem de gen düzenlemek için biyolojik araştırmalarda hayati bir araç haline gelmiştir (Doudna ve Charpentier, 2014). CRISPR, Cas sistemler, kendilerini işgal eden nükleik asitlerden korumak için birçok bakteri ve arkenin kullandığı bir bağışıklık mekanizmasıdır (Boyaval ve ark., 2007). CRISPR yapısı ilk olarak 1987'de Ishino tarafından rapor edilmiş ve CRISPR kısaltması, farklı bakteri ve arkelerde birkaç benzer yapı tespit edildikten sonra 2002 yılında Jansen tarafından önerilmiştir (Ishino ve ark., 1987; Jansen ve ark., 2002). İlk olarak 2013 yılında memeli hücrelerinde uygulandığından günümüze kadar, RNA rehberliğinde bir nükleaz temel alan CRISPR/Cas sistemi, genom düzenleme çalışmaları için bir devrim yaratmıştır (Church ve ark., 2013). CRISPR/Cas sistemleri, tip I ila VI olarak sınıflandırılmaktadır (Makarova ve ark., 2015). Tip I sistemler, hedefi degrade etmek için kullanılan hem DNaz hem de helikaz aktivitesi içeren bir protein olan Cas3'ün oluşmasına dayalı olarak karakterize edilmiştir. Tip II CRISPR/Cas sistemleri Cas1, Cas2, Cas9 ve dördüncü bir protein (Csn2 veya Cas4) kullanmaktadır (Rath ve ark., 2015). Tip III-A CRISPR-Cas sistemleri, yabancı DNA'ya karşı transkripsiyona bağımlı bağışıklık için bir protein-RNA kompleksi olan Csm kullanan prokaryotik RNA rehberliğinde uyarlanabilir bağışıklık sistemleridir (Liu ve ark., 2019). Tip II CRISPR/Cas sistemi, *S. pyogenes* türevidir ve CRISPR RNA (crRNA), trans-aktive edici crRNA (tracrRNA) ve bir Cas9 proteini olmak üzere üç bileşenden oluşmaktadır (Jinek ve ark., 2014). Cas9 (veya "CRISPR ile ilişkili protein 9"), CRISPR dizisini tamamlayıcı olan spesifik DNA ipliklerini tanımak ve ayırmak için CRISPR dizilerini kullanan bir enzimdir. Tablo 2.2'de günümüzde keşfedilmiş farklı cas tipleri ve fonksiyonları verilmiştir.

Tablo 2.2. Günümüzde keşfedilmiş farklı cas tipleri ve fonksiyonları (Anonim B)
<https://en.wikipedia.org/wiki/CRISPR>

Sınıf	Cas tip	Protein	Fonksiyonu	Referans
1	I	Cas3	Tek iplikçikli DNA nükleaz (HD alanı) ve ATP'ye bağlı helikaz	(Sinkunas ve ark., 2011) (Yanwu ve ark., 2011)
	IA	Cas8a, Cas5	Girişim modülünün alt birimi. PAM dizisini tanıyarak istilacı DNA'nın hedeflenmesinde önemlidir.	(Makarova ve ark., 2015)
	IB	Cas8b		
	IC	Cas8c		
	ID	Cas10d	Nükleik asit polimerazların ve nükleotid siklazların palmiye alanına homolog bir alan içerir	(Chylinski ve ark., 2014) (Makarova ve akr., 2011)
	IE	Cse1, Cse2		
	IF	Csy1, Csy2, Csy3	Belirlenmedi	(Makarova ve ark., 2015)
	IU	GSU0054		(Makarova ve ark., 2015)
	III	Cas10	Cas10d ve Cse1 homologları	(Iwasaki ve Batey, 2020)
	IIIA	Csm2	Belirlenmedi	(Makarova ve ark., 2015)
	IIIB	Cmr5	Belirlenmedi	(Makarova ve ark., 2015)
	IIIC	Cas10 veya Csx11	Belirlenmedi	(Makarova ve ark., 2015)
	IIID	Csx10	Belirlenmedi	(Makarova ve ark., 2015)
2	II	<u>Cas9</u>	Nükleazlar RuvC ve HNH birlikte DSB'ler üretir ve ayrı ayrı tek sarmallı kırılmalar üretebilir. Adaptasyon sırasında fonksiyonel ara parçaların elde edilmesini sağlar.	(Gasiunas, Barrangou, Horvath ve Siksnys, 2012) (Heler ve ark., 2015)

Cas9 enzimleri ve CRISPR sekansları, organizmalar içindeki genleri düzenlemek için kullanılabilen CRISPR/Cas9 olarak bilinen bir teknolojinin temelini oluşturmaktadır (Zhang ve ark., 2014). Bu düzenleme sürecinin temel biyolojik araştırma, biyoteknoloji ürünlerinin geliştirilmesi ve hastalıkların tedavisi gibi çok çeşitli uygulamaları vardır (Hsu ve ark., 2014). Bakterilerden elde edilen Cas proteini iki nükleaz domaini olan ve hedef DNA dizisinde çift iplik kırığı oluşturmak için sgRNA ile iş gören bir proteindir. Tek bir kılavuz RNA olan sgRNA ise crRNA (CRISPR RNA) ve tracrRNA (Trans-activating RNA) içeren ve hedef DNA sekansına tamamlayıcı kısa diziye sahip olmasından dolayı cas proteini hedef DNA'ya yönlendiren komponenttir. Diğer önemli bileşen hedef DNA dizisinde bulunan ve Cas proteinin kesim yerinin belirlenmesine kılavuzluk yapan PAM (protospacer adjacent motif (protospacer bitişik motif)) motiftir. Bu sistem hedef bölgede mutasyon delesyon, gen baskılama ve aktivite etme gibi uygulamaları yapmayı mümkün kılmıştır. Tablo 2.3'te CRISPR varyantlarının karşılaştırılması verilmiştir.

Tablo 2.3. CRISPR varyantlarının karşılaştırılması (van Dongen ve ark., 2020'den uyarlanmıştır)

Tip	II	V	VI		
Efektör protein	(sp)Cas9	(sp)dCas9	(fn)Cas12a	Cas14a/b	Cas13a/b
					
Spacer uzunluğu	18-24 nt	18-24 nt	18-25 nt	20-40 nt	22-30 nt
PAM gerekliliği	Var	Var	Var	Var	Hayır, PFS
PAM sekans	NGG	NGG	(T)TTN	- ^a	non-G
Kesim	kör uçlu kesim	-	tek kademeli kesim	tek kademeli ^a kesim	Birçok kesim bölgesi
Hedef Tipi	dsDNA	-	DNA (ds/ss ^b)	DNA (ss/ds ^a)	RNA (ss)
Tamamlayıcı Kesim	Hayır	Hayır	DNA (ss)	DNA (ss)	RNA (ss)
a. TTTA gibi T bakımından zengin PAM dizileri, dsDNA bölünmesine izin verebilir. b. ssDNA, Cas12 tarafından da saptanabilir, ancak daha az spesifiktir.					

Genetik mühendisliği alanında bu yöntem ile genomda kesimin yapıldığı alanlarda DNA'nın yapısı hassas bir şekilde değiştirilebilmektedir. Hücrelerin hasarlı DNA'yı tanıma ve tamir etme mekanizmasından faydalanılarak genetik mühendisliği alanında bu yöntem kullanılabilir (Genetic Home, 2020). CRISPR/Cas9 sistemi ile genom/genin istenilen bölgesinde oluşturulan kesme sonucunda DNA'daki çift iplik kırığı ile oluşan kesik uçların homolog olmayan uç birleştirme ya da homolog rekombinasyon tamir mekanizması ile düzeltilmesi temeline dayanmaktadır. Sistemin bileşenleri modifiye edilerek istenilen, tasarlanan genom/gen değişikliği gerçekleştirilebilmektedir (Osakabe ve ark., 2015). Tasarlanmış sgRNA dizisinin baz eşleşmesi yoluyla hedef DNA bölgesine bağlanması ile Cas proteini kesim bölgesini tanıır ve nükleaz aktivitesi ile PAM motifinin 3 nükleotit yakınından zincirin her iki ipliğini de keser ve endojen DNA tamiri başlatılmış olur. Bu aşamadan sonra eğer hedef genin çıkarılması (knock-out) hedeflenmiş ise çift zincir kırığının hataya meyilli olan homolog olmayan tamir mekanizmasıyla tamir edilmesi sağlanır (Ferreira ve ark., 2019). Bu sırada meydana gelen insersiyon mutasyonlar gen ürünlerinin kaybolmasına yol açmaktadır.

2.3. Gen Taşıyıcı Sistemler

Transfeksiyon bir genin plazmit aracılığı ile başka bir hücrenin çekirdeğine taşınıp DNA'sına yerleştirilmesi olayıdır. Bu konuda 20. yüzyılın sonlarına doğru iki yaklaşım ortaya konulmuştur. Bunların en başında gelen viral vektörlerin gen transfeksiyon verimliliği yüksektir, fakat viral vektörlerin mutageneze sebep olma ihtimali, immünolojik tepkiler oluşturmaları ve hedef bölgenin dışında değişiklikler neden olabilmesi gibi nedenlerden dolayı viral vektörler yerine viral olmayan vektörlere ilgi giderek artmaktadır (Nayerossadat ve ark., 2012).

Viral olmayan vektörler, yüksek miktarda üretim kolaylığı, kolay kullanım, güvenli oluşu, kolay modifiye edilebilmesi ve istenilen özelliklere ayarlanabilmesi gibi avantajlara sahiptir. Viral olmayan vektör temelli sistemlerde donör DNA'yı elektroporasyon, mikroenjeksiyon gibi fiziksel yollarla ya da lipit, inorganik ve polimerik esaslı bir kimyasal ajan ile transfekte etmek mümkündür (Huang, 2002). Viral ve viral olmayan taşıyıcı sistemlerin avantaj ve dezavantajları Tablo 2.4 de gösterilmiştir.

Tablo 2.4. Viral ve viral olmayan taşıyıcıların avantajları ve dezavantajları (Liu ve ark., 2017'den uyarlanmıştır)

Gen Taşıyıcı Sistem	Avantaj	Dezavantaj
Elektroporasyon	• Çoğu hücre tipi için uygun • Yüksek transfeksiyon etkinliği • <i>In vivo</i> ve <i>In vitro</i> kullanılabilir • Farklı CRISPR/Cas9 stratejileri için uygun	• Hücre ölümü • Spesifik olmayan transfeksiyon
Mikroenjeksiyon	• Tekrarlanabilirliği yüksek • Farklı CRISPR/Cas9 stratejileri için uygun	• Hücre zararı • Nitelikli personel ve kapsamlı laboratuvar gerekli • Düşük verim
iTOP	• Cas9 protein ve sgRNA için etkili	• Primer hücreler için düşük verim • <i>In vivo</i> uygulamalar için uygun değil
Mekanik Hücre Deformasyonu	• Yüksek transfeksiyon • Düşük hücre ölümü	• Kısıtlı <i>in vitro</i> kullanım
Hidrodinamik Enjeksiyon	• Küçük hayvanlarda <i>in vivo</i> transfeksiyonda basit ve etkili metot • Karaciğerde yüksek verim • Farklı CRISPR/Cas9 stratejileri için uygun	• Kardiyak fonksiyon bozukluğuna, karaciğer genişlemesine ve hayvan ölümüne neden olabilir • Klinik uygulamalar ve büyük hayvanlar için uygun değil • Karaciğer hariç diğer organlar için düşük verim
Adeno-İlişkili Virüs (AAV)	• Yüksek enfeksiyon verimliliği • Güvenli • Geniş hücre çeşitliliği	• Sınırlı boyutlarda gen paketleme • Zor üretim
Lentivirüs	• Yüksek enfeksiyon verimliliği • Büyük boyutlarda gen paketleme • Uzun süreli gen ifadesi	• Mutasyon oluşumu
Hücre Geçiş Pepetidi (CPP)	• Güvenli • Küçük boyut	• Kimyasal eşlenik gerekli
DNA Nanoyapılar	• Kontrol edilebilir boyut ve mimari	• Karmaşık katlanma • DNA taşıyıcının zayıf stabilitesi

Tablo 2.4.(Devamı) Viral ve viral olmayan taşıyıcıların avantajları ve dezavantajları (Liu ve ark., 2017'den uyarlanmıştır)

Gen Taşıyıcı Sistem	Avantaj	Dezavantaj
Altın Nanopartiküller	Yüksek transfeksiyon verimi	<i>İn vivo</i> 'da yüksek konsantrasyon potansiyel toksisite
Lipit Nanopartiküller	• Kolay hazırlama Farklı CRISPR/Cas9 stratejileri için uygun	• Düşük transfeksiyon yüzdesi Toksik etki gösterebilme potansiyeli
Polimer Nanopartiküller	• Kolay hazırlama • Ucuz • Güvenli Farklı CRISPR/Cas9 stratejileri için uygun	• Düşük transfeksiyon yüzdesi

2.3.1. Gen taşıyıcı viral sistemler

Günümüzde mevcut başarılı gen terapi sistemlerinden olan gen taşıyıcı viral sistemlerde yaygın olarak kullanılan viral vektörler retrovirüs, adenovirüs (tip 2 ve 5), adeno ilişkili virüs, herpes virüsü, çiçek virüsü ve lentivirüslerdir (Seow ve Wood, 2009).

Tüm viral vektör genomları, genomlarının bazı bölgeleri modifiye edilerek değiştirilebilmektedir, böylece doğal replikasyonları bozulmakta ve daha güvenli hale getirmektedirler. Ancak sistemin, dejenerasyonuna yol açan enflamatuvar sistemin indüksiyonuna neden olan belirgin immünojenisitetleri gibi bazı olumsuzlukları bulunmaktadır. Viral vektörlerin toksin üretimi, insersiyonel mutagenез ve bunların transgenik kapasite boyutundaki sınırlamaları bulunmaktadır. Son birkaç yıl içinde, transgenleri doğal hedef hücreleri olmayan diğer bazı spesifik hücrelere (yeniden hedefleme) aktarabilen spesifik reseptörlere sahip viral vektörler tasarlanmıştır (Jang ve ark., 2011). Tablo 2.5'te gen terapisi için kullanılan viral vektör örnekleri yer almaktadır.

Tablo 2.5. Gen terapisi için uygulanan viral vektör örnekleri (Slade, 2018'den uyarlanmıştır)

Virüs	Genom	Insert Kapasitesi	Özellikleri
Adenovirüsler Ad5	dsDNA	>7.5 kb	Geniş konakçı aralığına Geçici ifade Güçlü immünojenite
AAV AAV2, 3, 5, 6, 8, 9	ssDNA	>4 kb	Nispeten geniş konak aralığı Yavaş ifade başlangıcı kromozomal entegrasyon bağışıklık yanıtı
Herpes simpleks HSV1, HSV	dsDNA	>30 kb	Geniş konakçı aralığına Gizli enfeksiyon, uzun vadeli ifade Düşük toksisite, geniş insert kapasitesi
Retrovirüsler MMSV MSCV	ssDNA	8 kb	Sadece bölünen hücreleri dönüştürür Uzun vadeli ifade Rastgele entegrasyon
Lentivirüsler HIV-1, HIV-2	ssDNA	8 kb	Geniş konakçı aralığına Düşük sitotoksosite, entegrasyon Uzun vadeli ifade
Alfavirüsler SFV, SIN, VEE, M1	ssDNA	8 kb	Geniş konakçı aralığına Aşırı geçici ifade Düşük immünojenite nöron ve glial spesifik mutantlar
Flavivirüsleri Kunjin, West Nile, Dengue virus	ssDNA	6 kb	Nispeten geniş konak aralığı Geçici ifade Paketleme sistemi
Rhabdovirüsleri Rabies, VSV	ssDNA	6 kb	Nispeten geniş konak aralığı Yüksek geçici ifade Düşük immünojenite
Kızamık virüs MV-Edm	ssDNA	6 kb	Geçici ifade Onkolitik suşlar
Newcastle hastalığı Virüsü	ssDNA	6 kb	Geçici ifade Geliştirilmiş onkolitik vektörler
Poksvirüsler	dsDNA	>30 kb	Geniş bir konakçı aralığı, geniş insertler
Vaccinia virüsü	ssDNA	6 kb	Replikasyona uygun vektörler onkolitik suşlar

AAV, adeno ile ilişkili virüs; HIV, insan immün yetmezlik virüsü; HSV, herpes simpleks virüsü; MMSV, Moloney murin sarkom virüsü; MSCV, murin kök hücre virüsü; SFV, Semliki Forest virüsü; SIN, Sindbis virüsü; VEE, Venezuela at ensefaliti virüsü; VSV, veziküler stomatit virüsü; VV, vaccinia virüsü.

Adeno-İlişkili Virüs (AAV)

Adenovirüs vektörleri, gen terapisi için kullanılan yaygın vektörlerden biridir. Adenovirüsler, doğrusal, çift zincirli DNA taşıyan zarflı virüslerdir. İnsanlarda ve diğer memelilerde mukozal dokuları enfekte ederek doğal olarak ortaya çıkarlar. Adenoviral enfeksiyonlar için herhangi bir tedavi bulunmamaktadır, ancak bağışıklık sistemi bu virüslerle mücadele edebilmektedir. Adenovirüslerin ikozahedral kapsidleri (kabukları) vardır. Kapsitleri ve DNA'larının yanında, bu virüsler cement ve çekirdek proteinlerden oluşmaktadır. Cement proteinleri kapsidi stabilize eder ve çekirdek proteinler çift sarmallı DNA genomu ile birleşir (Wold ve Toth, 2014).

Adenoviral vektörler çok sayıda farklı türden izole edilmiştir ve yüzden fazla farklı serotipleri rapor edilmiştir ve çoğu yetişkin, gen terapisinde (özellikle tip 2 ve 5) yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Adenovirüs tip 2 ve 5, hücrelere gen aktarılması için kullanılabilir ve düşük konakçı özgüllüğüne sahiptir, bu nedenle çok çeşitli dokularda kullanılabilir. Adenovirüsler büyük DNA parçalarını (38 kb'ye kadar) hücreye transfekte edebilme yeteneğine sahiptirler (Volpers ve Kochanek, 2004; Vandebroek ve Schrijvers, 2007; Wold ve Toth, 2014)

Retroviral vektörler

Retroviral vektörler, somatik ve germ hattı gen terapilerinde sık kullanılan viral vektörlerden biridir. Retrovirüsler, adenoviral ve lentiviral vektörlerin aksine, mitotik hücrelerin nükleer gözeneklerinden geçebildikleri için bölünen hücreleri transfekte edebilirler; retrovirüslerin bu karakteri onları hedef spesifik tedavi için uygun aday haline getirmektedir. Retrovirüslerin, tüm viral genleri çıkartılmıştır ve gen aktarımı için yaklaşık 8 kb alan oluşturulmuştur. Retrovirüsler, konakçı hücre genomuna doğrusal olarak entegre olma yetenekleri nedeniyle somatik hücrelerin *ex vivo* olarak kullanılması için faydalıdır (Nienhuis ve ark., 2006; Stripecke ve Kasahara, 2007, Biasco ve ark., 2012).

Lentivirüs

Lentivirüsler retrovirüslerin bir alt sınıfıdır. Son zamanlarda, sadece bölünen hücreleri enfekte edebilen diğer retrovirüslerle karşılaştırıldığında lentivirüslerin benzersiz özelliği olan, bölünmeyen hücrelerle doğal olarak entegre olma kabiliyetlerinden dolayı gen iletim vektörleri olarak kullanımı yaygınlaşmıştır. Lentiviral vektörler 8 kb diziyi hücre içine sokabilmektedir. Lentivirüsler nöral kök hücreler için güçlü bir tropizme sahip olduğundan, merkezi sinir sisteminde *ex vivo* gen transferi için yaygın olarak kullanılabilirler. Lentiviral vektörler, bölünen ve bölünmeyen hücrelerin yüksek verimli enfeksiyonu, bir transgenin uzun süreli stabil ekspresyonu, düşük immünojenisite ve daha büyük transgenleri barındırma yeteneğine sahiptir (Cockrell ve Kafri, 2007; Sakuma ve ark., 2012; Shirley ve ark., 2020).

Lentivirüslerin motor nöron hastalıkları, Parkinson, Alzheimer, Huntington hastalığı, lizozomal depo hastalıkları ve omurilik yaralanması gibi nörolojik bozuklukların hayvan

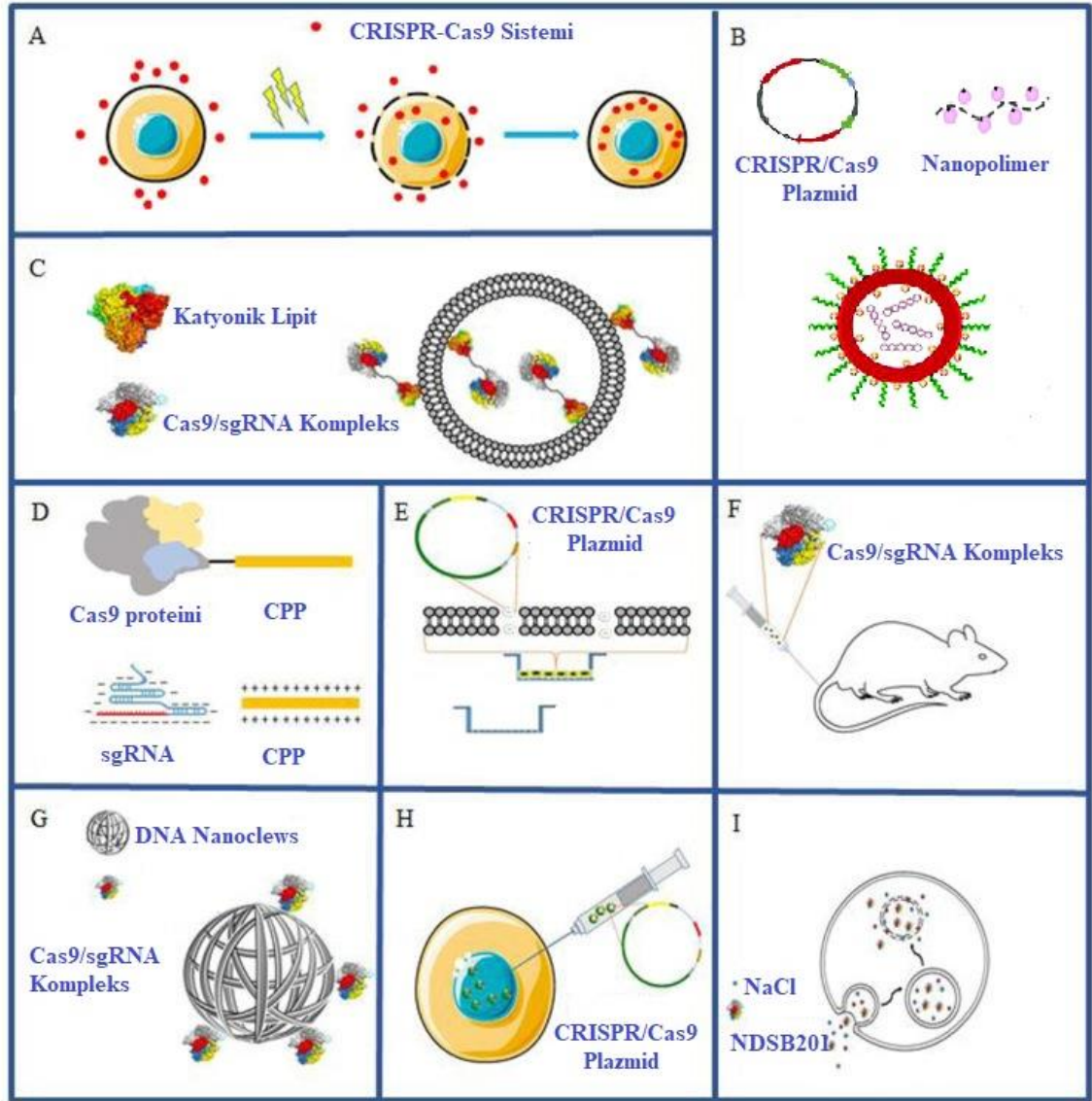
modellerinin etkili uzun süreli tedavisinde kullanılmaktadırlar (Popovic ve ark., 2005; Stripecke ve Kasahara, 2007).

Herpes simplex virüs (HSV)

Uzun vadeli etkisi nedeniyle, HSV vektörleri çeşitli hastalıklarda birçok uygulama alanı bulmuştur. Örneğin, proenflamatuvar sitokinlerin HSV temelli ekspresyonunun ağırlı diyabetik nöropatinin tedavisinde yararlı olduğu kanıtlanmıştır (Thakur ve ark., 2016). Başka bir yaklaşımda, farelerin derisinde büyüme faktörlerini eksprese eden replike olmayan HSV vektörlerinin uygulanması, herhangi bir yan etkiye neden olmadan duyuusal nöropatinin ilerlemesini engellemiştir (Chattopadhyay, 2013). Kansere ilgili olarak, onkolitik HSV vektörleri çeşitli prelinik çalışmalarda uygulanmıştır.

2.3.2. Viral olmayan gen taşıyıcı sistemler

CRISPR/Cas9'u hedef hücrelere ulaştırmak için elektroporasyon, nanopartiküller ve mikroenjeksiyon gibi çeşitli fiziksel ve viral olmayan uygulama yaklaşımları kullanılmaktadır. Şekil 2.3'te CRISPR-Cas 9 gen düzenleme sistemleri için viral olmayan dağıtım sistemleri gösterilmiştir. Viral vektörler, plazmit bazlı CRISPR/Cas9 gibi nükleik asitleri iletmek için daha verimli olsa da güvenlik, nonviral vektörlerin birincil avantajıdır. Transgenik DNA için bir boyut sınırlamasının olmaması, viral olmayan taşıyıcı sistemlerinin bir başka avantajıdır. Önemli olarak, viral olmayan dağıtım sistemlerinin mevcudiyeti ve maliyet etkinliği, onları viral iletim sistemleri yerine CRISPR/Cas9'u hastalara uygulamak için çekici kılmaktadır. Bu yaklaşımların avantajları ve dezavantajları Tablo 2.4'te özetlenmiştir.

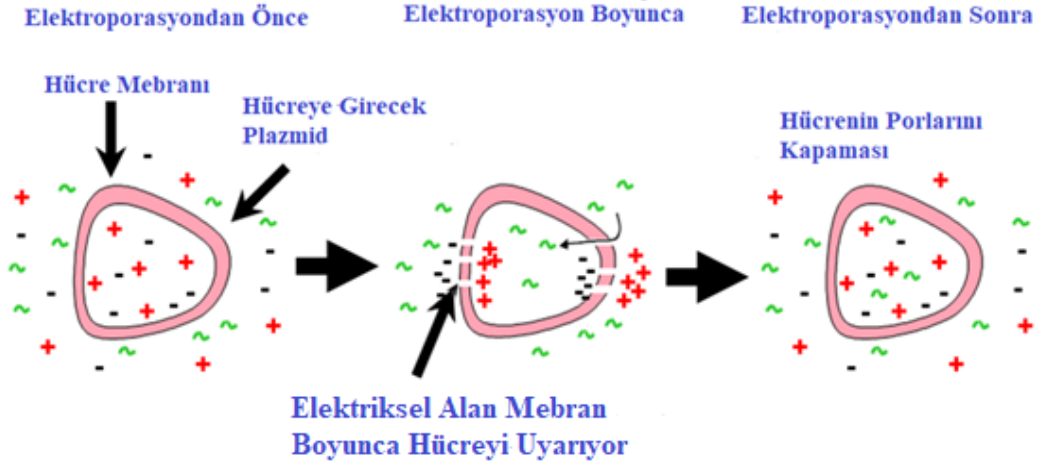


Şekil 2.3. CRISPR-Cas 9 gen düzenleme sistemleri için viral olmayan dağıtım sistemleri. (A) elektroporasyon, (B) altın nanopartiküller, (C) lipid aracılı transfeksiyon, (D) hücreye nüfuz eden peptid, (E) mekanik hücre deformasyonu, (F) hidrodinamik teslimat, (G) DNA nanoclews, (H) mikroenjeksiyon, ve (I) osmositoz ve propanebetain ile indüklenen transdüksiyon (Liu ve ark., 2017'den uyarlanmıştır).

Elektroporasyon

Elektroporasyon, bakteri, maya ve memeli hücreleri veya dokularını kısa süreli yüksek bir güçte elektriksel bir alan uygulayarak, hücre zarından DNA'nın geçebileceği geçici gözenekler açılması esasına dayanan gen aktarımı işlemidir. Elektroporasyon işlemi sırasında hücreler zarar gördüğü için hücreler zenginleştirilmiş besi ortamı içeren

ortamlara aktarılması gerekmektedir. Şekil 2.4'te elektroporasyon işleminin gösterimi yapılmıştır.



Şekil 2.4 Elektroporasyon işleminin şematik gösterimi (Anonoim C)

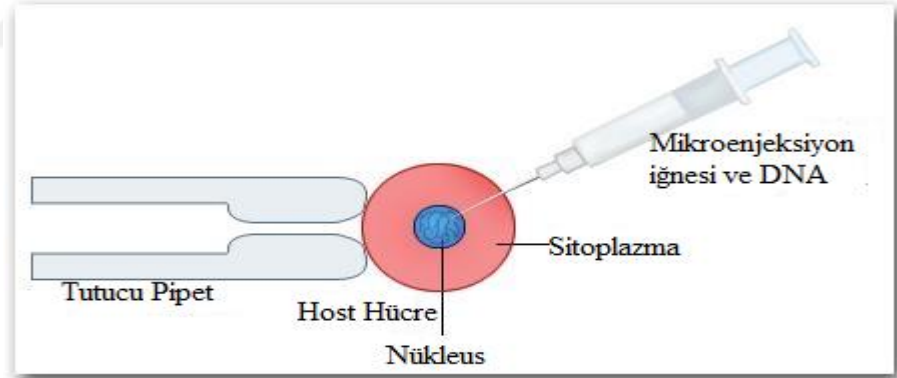
<https://www.btxonline.com/technical-resources/faq.html>

Mikroenjeksiyon

Mikroenjeksiyon, yabancı moleküllerin mikroskopik düzeyde bir cam mikropipet kullanılarak canlı hücrelere doğrudan enjekte edilmesidir. Basit bir mekanik prosedür olarak, mikroenjeksiyon, eksojen protein veya DNA'yı tek bir hücreye vermek için yaygın olarak kullanılan bir laboratuvar tekniği haline gelmiştir. Mikroenjeksiyon, CRISPR/Cas9 sistemini embriyonik hücrelere veya yüksek tekrarlanabilirlik ve özgüllükle diğer hücrelere doğrudan enjekte etmek için kullanılmaktadır (Niu ve ark., 2014).

Cas9 ve sgRNA'yı kodlayan plazmidlerin pronükleus veya çekirdeğe enjeksiyonu, genleri düzenlemek için kullanılan doğrudan yöntemdir. Örneğin, Mashiko ve ark. Cas9 ve sgRNA'yı kodlayan bir plazmidin fare zigotlarının pronükleusuna mikroenjeksiyonunun bir ay içinde nakavt bir fare modeli elde etmek için basit ve kullanışlı bir yöntem olduğunu göstermiştir (Mashiko ve ark., 2013). Benzer şekilde, CRISPR/Cas9'un mikroenjeksiyonu, tavşan (Yan ve ark., 2014), zebra balığı (Kimura ve ark., 2014), *Ciona intestinalis* (Sasaki ve ark., 2014), solucan (Friedland ve ark., 2013) ve *Aedes aegypti* (Basu ve ark., 2015) hücrelerinde genleri düzenlemek için kullanılmıştır.

Basitliği ve doğruluğu nedeniyle mikroenjeksiyon, aynı geni hedefleyen farklı plazmid tabanlı CRISPR/Cas9 sistemlerinin gen düzenleme etkinliğini değerlendirmek için kullanılmıştır (Nakagawa ve ark., 2015). Bununla birlikte, dairesel plazmitlerin enjeksiyonu, plazmit konakçı kromozomlara entegre olduğuunda istenmeyen yan etkilere neden olabilmektedir. Bu, Cas9 mRNA ve sgRNA'nın mikroenjeksiyonu ile önlenabilmektedir. Örneğin, Horii ve arkadaşları, Cas9 mRNA/sgRNA'nın pronükleusa mikroenjeksiyonunun, Cas9 ve sgRNA'yı kodlayan karşılık gelen plazmitin enjeksiyonundan veya Cas9 mRNA/sgRNA'nın sitoplazmaya enjeksiyonundan daha yüksek bir etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir (Horii ve ark., 2014). Bu sonuçlar, mikroenjeksiyonun plazmit bazlı CRISPR/Cas9 veya Cas9 mRNA/sgRNA iletmek için etkili bir fiziksel yöntem olduğunu göstermesine rağmen, mikroenjeksiyonun birkaç dezavantajı da vardır. Birincisi, mikroenjeksiyon hücre hasarına neden olur ve bu nedenle yüksek düzeyde karmaşıklık ve el becerisi gerektirmektedir. İkincisi, her enjeksiyonda yalnızca tek bir hücre hedeflenebilir ve bu yöntem yalnızca sınırlı sayıda hücre için uygundur. Şekil 2.5'te mikroenjeksiyon işleminin gösterimi yer almaktadır.



Şekil 2.5. Mikroenjeksiyon yönteminin gösterimi (AnonimD)

<https://howdoesgeneticengineeringaffectmankind.wordpress.com/microinjection/>

Osmozitoz ve propanebetaine ile indüklenen transdüksiyon (iTOP)

iTOP, doğal proteinleri ve diğer bileşikleri hücrelere iletmek için kullanılan yeni bir yöntemdir. Sodyum klorür ve propanbetain (bir transdüksiyon bileşiği) içeren hiperozmolar bir tampon, makro-pinositozu uyararak kargoların hücresel alımına yol açmaktadır. iTOP transdüksiyonu, Cas9 proteininin ve sgRNA'ların ayrı ayrı hücre içi iletimi veya RNP'lerin doğrudan iletimi için etkili bir yöntemdir. RNP'ler, iTOP kullanılarak çeşitli vektörler birincil hücre türlerine başarıyla teslim edilmiştir. Cas9

proteini ve sgRNA'nın insan embriyonik kök hücrelerine birlikte uygulanması, iki uygulamadan sonra % 26'ya yakın gen düzenleme etkinliği sağlamıştır (D'Astolfo ve ark., 2015). Elektroporasyon, katyonik lipidler ve CPP'ler gibi diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında iTOP, birincil hücrelerde daha düşük gen düzenleme verimliliği sağlamaktadır (Katz ve ark., 2013). Ek olarak, Cas9 proteini sadece iTOP'ta kullanılan yüksek tuz konsantrasyonlarında çözünür bir form alır ve bu nedenle *in vivo* uygulamalar için şu an için uygun değildir.

Mekanik Hücre Deformasyonu

Mekanik deformasyon tarafından üretilen geçici membran bozulması, pasif difüzyon yoluyla kargoların hücre alımını desteklemektedir. Araştırmacılar, bu yöntemi çeşitli kargoları hücrelere taşımak için kullanmışlardır. Mekanik hücre deformasyonunun avantajı, düşük hücre ölüm oranı ile yüksek dağıtım verimliliğidir (Sharei ve ark., 2013). Han ve meslektaşları, plazmid tabanlı bir CRISPR/Cas9 sistemini farklı hücre hatlarına başarıyla iletmek için mikroakışkan temelli bir cihaz ve optimize edilmiş fiziksel daralmayı kullanmışlardır (Han ve ark., 2015). Mikroakışkan cihazı kullanarak, plazmid bazlı CRISPR/Cas9 sisteminin iletilmesi, Epideryal Büyüme Faktörü(EGF)'nin sırasıyla MDA-MB-231 (insan meme kanseri) ve SU-DHL-1 (insan lenfoma) hücre hatlarında % 90 ve % 70'in üzerinde nakavt etkinliğine ulaştığını göstermişlerdir (Han ve ark., 2015). Lenfoma hücrelerinin transfekte edilmesi çok zor olduğundan, mekanik hücre deformasyonunun lenfoma hücrelerinde % 70'lik bir nakavt etkinliğine ulaşması umut verici bir gelişmedir. Bununla birlikte, bu mikroakışkan cihazın kullanımı ile ilgili, *in vivo* uygulamalara henüz uyarlanmamıştır.

Hücre Geçiş Peptidi (CPP)

Hücre geçiş peptitleri (CPP'ler), nano boyutlu partiküllerden küçük kimyasal bileşiklere ve büyük DNA fragmanlarına kadar değişen moleküllerin hücre alımını kolaylaştıran kısa peptitlerdir. "Kargo" peptitlerle ya kovalent bağlar yoluyla kimyasal bağlantıyla veya kovalent olmayan etkileşimler yoluyla bağlantılıdır. CPP'ler kargoyu genellikle endositoz yoluyla hücrelere taşır. CPP, CRISPR/Cas9 dahil olmak üzere çeşitli kargolara eklenebilir ve bunları çok çeşitli hücrelere teslim edebilir (Suresh ve ark., 2017). Örneğin, Cas9 proteini, arginin bazlı olmayan bir CPP'ye kovalent olarak konjuge edilebilir ve

sgRNA, elektrostatik etkileşimler yoluyla başka bir benzer CPP ile kompleksler oluşturabilir. Cas9/CPP konjugatı ve sgRNA/CPP kompleksinin karışımı eşzamanlı olarak HeLa, HEK293T, dermal fibroblastlar, embriyonik hücreler dahil olmak üzere farklı hücre hücrelere verilmiştir ve bu hücre hatlarında genleri % 2,3 ila % 16 arasında değişen oranlarda düzenlediği gösterilmiştir (Suresh ve ark., 2017). Bilim insanları ayrıca Cas9/CPP konjugatı ve sgRNA'nın karışımını da incelemiştir, ancak gen düzenleme etkilerini gözlemlememişlerdir. Bunun nedeni, sgRNA'nın CPP'nin pozitif yükünü nötralize etmesi ve ardından hücre penetrasyon kabiliyetini zayıflatması olarak düşünülmüşlerdir. Bu sonuç hem Cas9 proteininin hem de sgRNA'nın, gen düzenleme etkisi elde etmek için CPP ile konjuge edilmesi veya kompleks hale getirilmesi gerektiğini göstermektedir (Ramakrishna ve ark., 2014; Liu ve diğerleri, 2017)

DNA Nanoyapılar

DNA nanoyapıları, DNA görüntüleme ve hedefli ilaç dağıtımı gibi çeşitli biyomedikal uygulamalar için kullanılmıştır. Geleneksel olarak, DNA nanoyapıları, küçük DNA parçalarının Watson-Crick baz eşleştirmesi yoluyla birleştirilmesi işlemidir. Bununla birlikte, bu birleştirme prosedürü karmaşıktır ve büyük miktarda DNA gerektirmektedir (Zhuang ve ark., 2020). Son zamanlarda, DNA nano yapısını yoğun şekilde paketlenmiş DNA ile birleştirmek için dönen daire replikasyonu (RCR) geliştirilmiştir. Aynı teknolojiyi kullanarak, RNP'lerin sağlanması için iplik benzeri bir DNA nanoclew geliştirilmiştir (Sun ve ark., 2015). DNA nanoclew'ler, dönen daire amplifikasyonu ile sentezlenen bir DNA kafesinden yapılan nanopartiküllerdir. Hücresel alımı iyileştirmek ve endozomdan kaçmak ve pozitif bir yük sağlamak için bu komplekse polietilenimin ilave edilmektedir. Bu DNA nanoclew'ler aracılı RNP dağıtımının kullanımı, U2OS.EGFP hücrelerinde yaklaşık % 28'lik bir mutasyon oranı elde edilmiştir. Ayrıca bu uygulama sistemi, bir tümör içi enjeksiyonu takiben *in vivo* olarak EGFP'nin yaklaşık %25'ini degrade etmiştir (Sun ve ark., 2015).

Altın Nanopartiküller

Altın nanopartiküller, RNP'ler için yeni bir dağıtım yöntemidir. Altın nanopartiküller, bir glutamat peptit etiketi ve sgRNA ile tasarlanmış Cas9 proteiniyle birlikte nanopartiküller halinde birleştirilir. Bu nanopartikül aracılı dağıtım sistemi, çok çeşitli hücre tiplerinde % 90'dan fazla dağıtım verimliliği ve %30 gen düzenleme verimliliği sağlamıştır (Mout ve ark., 2017). Tasarlanmış Cas9 proteininin ve sgRNA'nın nanopartikül aracılı iletimi, hücresel endositozdan farklı olan kolesterole bağımlı bir membran füzyon süreci ile gerçekleştirilir ve bu; bu sistemin dikkate değer dağıtım etkinliğinin göstermektedir (Mout ve ark., 2017). Bu yöntem, *in vitro* geçici gen düzenleme için yeni bir platform sağlamaktadır.

Lipit Nanopartiküller

Lipid nanopartiküller, nükleik asitler için en yaygın kullanılan iletim sistemlerinden birini temsil etmektedir ve bunlardan bazıları RNAi tedavisi için klinik denemelere girmiştir (Fitzgerald ve ark., 2014). Negatif yüklü nükleik asitler, nükleik asitleri nükleazdan koruyan ve endositoz veya makro-pinositoz yoluyla hedef hücrelere giren lipid nanopartiküller oluşturmak için elektrostatik etkileşimler yoluyla pozitif yüklü lipidlerle kompleks haline getirilmektedir. Lipid nanopartiküller, CRISPR/Cas9 sistemlerini terapötik amaçlarla çok sayıda hücreye (Cong ve ark., 2013) iletmek veya nakavt hayvan modelleri oluşturmak için araştırılmıştır (Raghavan ve ark., 2016). Lipofectamine 2000, Lipofectamine 3000, RNAiMAX gibi ticari olarak temin edilebilen transfeksiyon lipidleri, plazmid bazlı CRISPR/Cas9, Cas9 mRNA/sgRNA karışımını çeşitli hücre hatlarına RNP'leri iletmek için kullanılabilmektedirler.

Ticari olarak temin edilebilen lipidler, *in vitro* gen düzenlemesi yapmak ve RNP'leri iletmek için doğrudan kullanılabilmesine rağmen, genellikle, lipid nanopartiküllerinin, Cas9-sgRNA RNP'leri için modifiye edilmesi gerektiği düşünülmektedir. Cas9 proteini, katyonik lipidlerin ve RNP'lerin kompleksleşmesini içeren pozitif yüklüdür. Ek olarak, RNP'ler, plazmid bazlı CRISPR/Cas9'dan daha yüksek gen düzenleme etkinliği ve daha az hedef dışı etki göstermektedir. Bu nedenle, RNP'ler üzerine yeni lipid nanopartiküller geliştirmek için önemli çabalar sarf edilmiştir. Zuris ve ark., negatif yüklü bir protein (–30) GFP'yi Cas9 proteini ile birleştirmiş ve ortak katyonik lipidlerin, modifiye Cas9

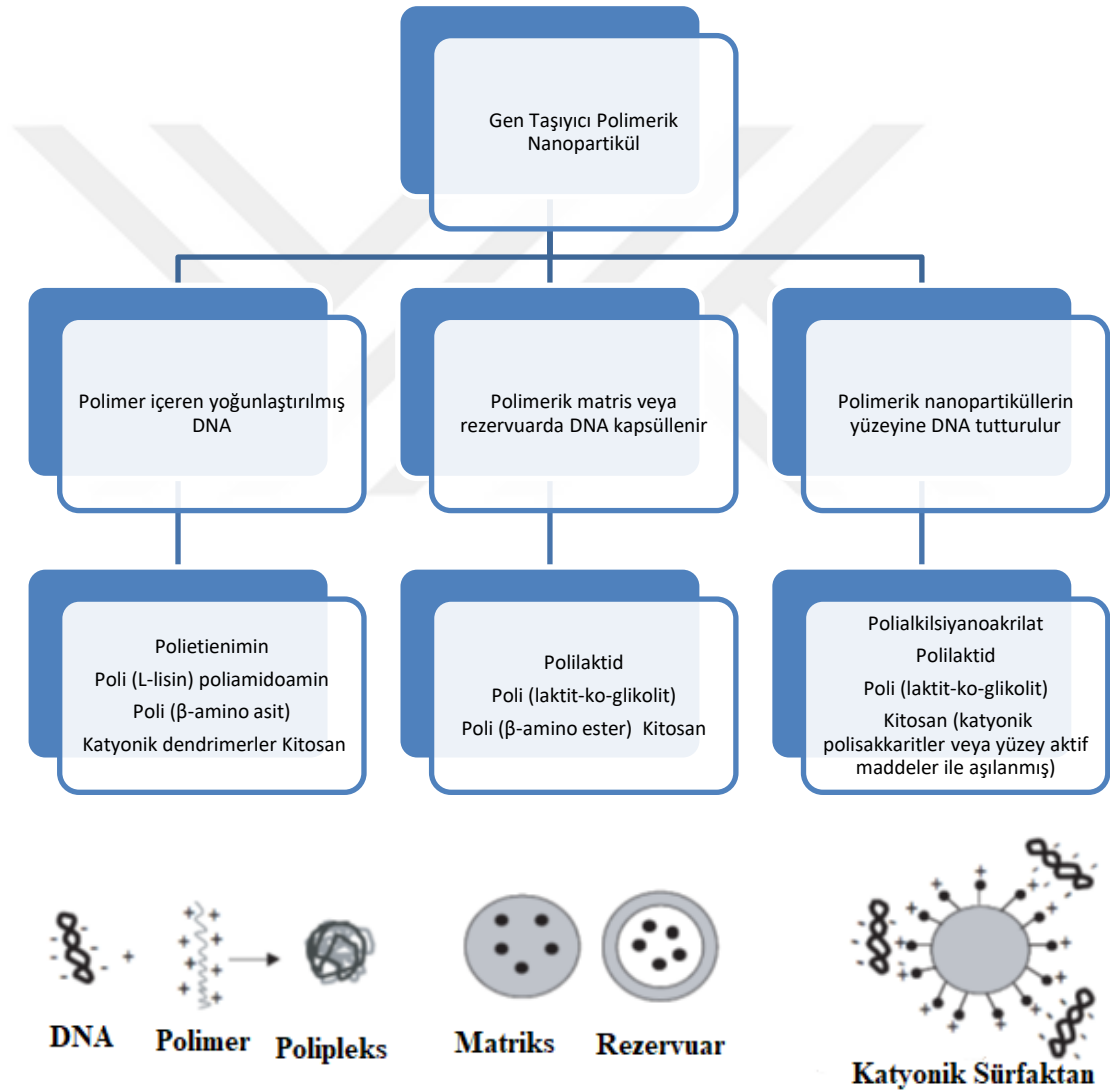
proteini ve sgRNA'dan yapılan RNP'leri verimli bir şekilde iletmek için kullanılabileceğini göstermiştir. RNP'lerin hücrelere verilmesi oldukça etkilidir ve bir tedaviden sonra kültürlenmiş insan hücrelerinde % 80'e kadar genom düzenlemesine olanak sağlamaktadır (Zuris ve ark., 2015). Benzer strateji kullanılarak, fare beynine iletmek üzere modifiye edilmiş RNP'ler ile nanopartiküller oluşturmak üzere birkaç biyo-indirgenebilir lipid tasarlanmıştır. Bu biyo-indirgenebilir lipidler, kapsüllenmiş RNP'leri salmak için sitozoldeki nanopartiküllerin endozomal salımını ve degradasyonunu desteklemiştir. Lipid nanopartiküllerinin gen düzenleme etkinliği, kültürlenmiş insan HEK hücrelerinde % 70'ten fazladır. Ayrıca, Wang ve arkadaşları, lipid nanopartiküllerinin *in vivo* gen düzenleme için fare beynine RNP'leri verimli bir şekilde iletebildiğini göstermişlerdir (Wang ve ark., 2016).

Polimerik gen taşıyıcı sistemler

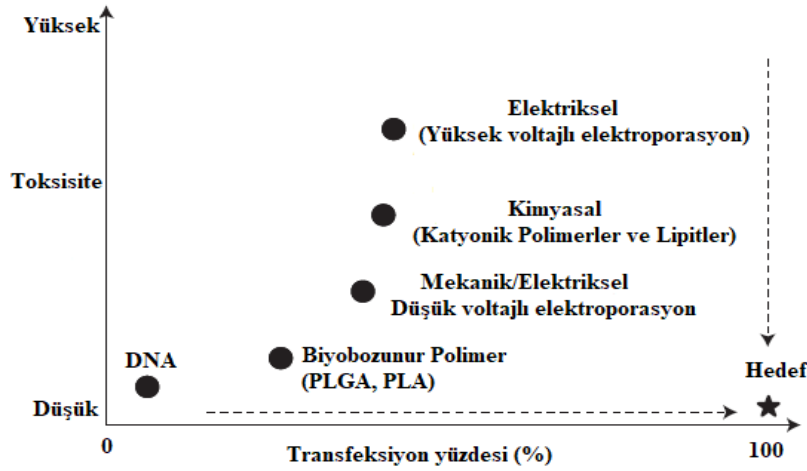
Polimer nanopartiküller plazmit, DNA, RNA ve oligonükleotitleri içeren nükleik asitlerin çeşitli tiplerini taşımada yaygın olarak kullanılmaktadır. Polimerik nanopartiküler sistemler, gen dağıtımını kolaylaştırmak için fizyolojik pH'da polileksler oluşturan, genetik materyal ile konjuge edilebilmektedir (Hosseinkhani ve ark., 2015). Katyonik polimerik nanopartiküllerin gen transfeksiyon verimini taşıyıcı maddenin moleküler yapısı, moleküler ağırlığı ve yüzey yükü gibi birçok faktör etkilemektedir (Yin ve ark., 2014). Polimerik viral olmayan taşıyıcı sistemlerde özellikle moleküler yapı üzerinde yer alan uç gruplarda yapılan modifiye reaksiyonlar (tiyolleme, sodyum nitrit ile reaksiyon vb.) sayesinde bu taşıyıcıların molekül ağırlığının istenilen miktarlara ayarlanmaktadır. Ayrıca dallanmanın artırılması-azaltılması ile polimerik taşıyıcı sistemlerde transfeksiyon etkinliği ve biyouyumluluk özelliklerini önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir (Guk ve ark., 2013).

Polimerik nanopartiküler taşıyıcıların nükleik asitlerle oluşturdukları yapılara "polileks" denilmektedir. Bu tip polimerik taşıyıcı sistemlerin bir kısmı doğal polimer esaslı oldukları gibi bir kısmı da sentetik polimer esaslıdır (kondenzasyon ve katılma polimerleri) ve genelde dört gruba ayrılırlar. Bunlardan birincisi biyolojik olarak bozunmayan transjenik polimerler (poli-L-lizin, polietilen imin, polietilen glikol konjugatları ve siklodekstrinler vb.), ikincisi biyobozunabilen yeni transjenik polimerler (poli(β -aminoesterler), poli(amidoaminler), polimidazoller, çeşitli polisakkaritler ve

kitosan vb.), üçüncüsü polietilen oksit/polipropilen oksit kopolimerleri, poli(N-vinilpirolidon) ve hidroksipropil metakrilat kopolimerleri, dördüncü grup ise polimerik poli(etilen oksid) ve polialkilsiyanoakrilat nano-/mikroküreleridir (Amiji, 2004) Gen iletimi için farklı polimerik nanoparçacık türlerini şematik gösterimi Şekil 2.6'de gösterilmiştir. Nanopolimerlerin toksisitesi ve transfeksiyon verimliliği farklılık göstermektedir. Çeşitli DNA transfeksiyon metotlarında toksisite ve transfeksiyon verimliliğinin karşılaştırılması Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Gen iletimi için farklı polimerik nanoparçacık türlerini şematik gösterimi (Vasir ve Labhasetwar, 2006'den uyarlanmıştır)



Şekil 2.7. Çeşitli DNA transfeksiyon metotlarında toksisite ve transfeksiyon verimliliğinin karşılaştırılması (Vasir and Labhasetwar, 2006'den uyarlanmıştır)

Polietilenimin (PEI), poli (L-lisin) (PLL), poli [2- (dimetilamino) etil metakrilat] (PDMAEMA), polibeta amino ester (P β AE) ve poliamidoamin (PAMAM) dendrimerler gibi katyonik polimerler, düşük immünojenisite, fonksiyonellikleri ve daha kolay büyük ölçekli üretilmeleri özelliklerinden dolayı gen terapisinde önemli bir ilgi kazanmışlardır (Li ve ark., 2015).

Kang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada dallanmış polietilenimin (bPEI)'den katyonik bir nanoparçacık oluşturarak sgRNA ile kompleks oluşturan Cas9 proteinine kovalent olarak konjuge edilmiştir. Polimer-konjuge Cas9, Cas9 proteini hedef geninde çift iplikli DNA'yı kesmek için nükleaz aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir. Polimer bazlı nanoparçacık, CRISPR sisteminde, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a (MRSA) başarıyla iletilmiş ve hedef genomunda etkili bir şekilde düzenleme gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada geleneksel lipidlerle komplekslenmiş modifiye edilmemiş Cas9/sgRNA'ya kıyasla daha yüksek genom düzenleme etkinliği gerçekleştirildiği gösterilmiştir (Kang ve ark., 2017).

2.4. Polimerik Nanopartikül Sentezi

Polimerik nanopartikül sentezinde tek başına veya kombinasyonları halinde çözücü buharlaştırma, tuzla çökeltme diyalizi, nanopresipitasyon ve süper kritik sıvı teknolojisi yöntemleri kullanılmaktadır.

2.4.1. Solvent buharlaştırma yöntemi

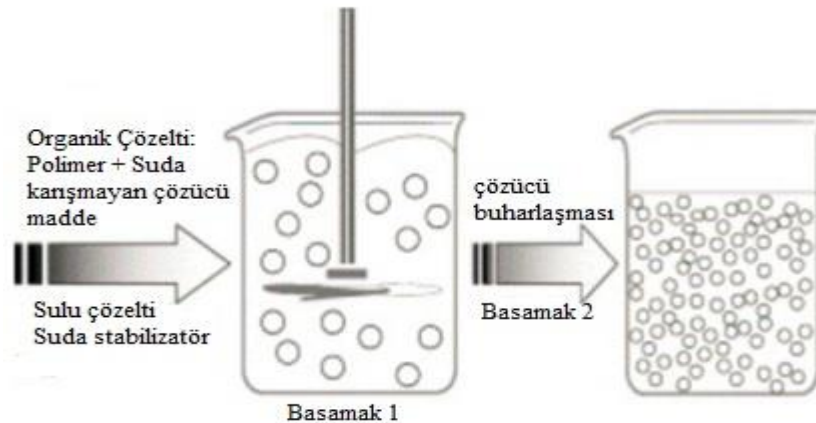
Entian ve arkadaşları çözücü buharlaştırma yöntemi kullanarak önceden oluşturulmuş polimerlerden PNP hazırlama yöntemini geliştirmiştir (Entian ve ark., 1993). Çözücü buharlaştırma tekniğinin gösterimi Şekil 2.8’de yer almaktadır. Yöntem, uçucu çözücüler içinde polimer çözeltileri kullanan emülsiyon formülasyonunu gerektirmektedir.

NP dispersiyonu, çözücünün polimerden buharlaştırılması ve sürekli fazdan yayılmasıyla emülsiyondan üretilir (Santos-Carballal, ve ark. 2018)

Geleneksel olarak, emülsiyon oluşturmak için iki yaklaşım vardır:

- (1) tek emülsiyonların hazırlanması, örneğin su içinde yağ
- (2) su içinde su gibi daha karmaşık çift emülsiyonlar (Nagavarma ve ark. 2012)

Zambaux ve arkadaşları sırasıyla çözücü ve stabilize edici ajan olarak diklorometan ve polivinil alkol (PVA) kullanılarak ortalama 200 nm boyutunda ve düşük PDI ($<0,1$) olan poli (laktik asit) (PLA) PNP'leri sentezlemişlerdir (Zambaux ve ark., 1998). Bu yöntemdeki partikül boyutu, işlemde kullanılan stabilizatörün tipine ve konsantrasyonuna, homojenleştirici hızına ve polimer konsantrasyonuna bağlıdır (Lemoine ve Pr  at, 1998).

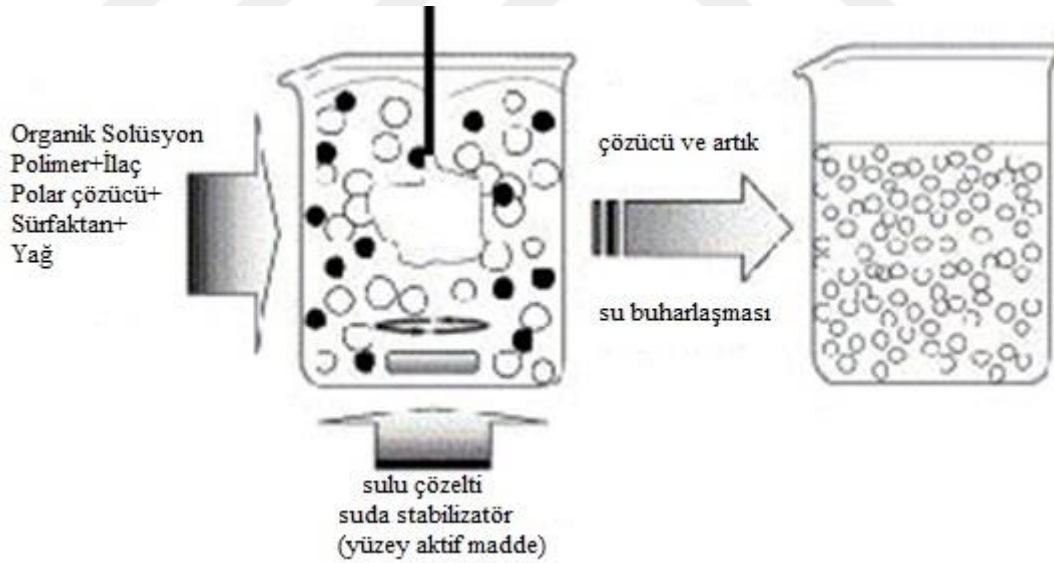


Şekil 2.8. Ç       buharlaştırma tekniğinin şematik gösterimi (Reis and Neufeld, 2006'dan uyarlanmıştır)

2.4.2. Ç       yer değiştirme yöntemi

Nanopresipitasyon olarak da bilinen bu yöntem, önceden oluşturulmuş polimerin organik bir   zeltiden   keltilmesinden ve ardından organik       n  n sulu bir ortamda yüzey

aktif madde ile veya yüzey aktif madde olmadan yayılmasından oluşmaktadır (Galindo ve ark., 2004). Şekil 2.9'da nanopresipitasyon (çözücü ile yer değiştirme) yöntemi gösterilmiştir. Bu yöntemde, PLA gibi polimer, su ile karışabilen bir geçiş polaritesi çözücüsü içinde çözülerek nanosfer çökmesine neden olmaktadır. Bu, karıştırılmış sulu çözelti içindeki yüzey aktif maddelerle etkileşimler nedeniyle oluşmaktadır. Çözücünün hızlı difüzyonu, su ve organik çözücü arasındaki arayüzde bir polimer birikimi oluşturur ve bu da koloidal dispersiyon oluşumuna neden olmaktadır (Quintanar ve ark. 1998). Nanokapsüllerin sentezlenmesi için organik faza küçük bir hacimde toksik olmayan yağ eklenebilir ve ayrıca bir çözücü yer değiştirme tekniği ile yükleme verimliliği artırılabilir. Bu basit teknik, spontan emülsifikasyon için yeterli bir oran elde etmek amacıyla sadece suyla karışabilen çözücüler için kullanılabilir (Quintanar ve ark., 1998). Bu işlem çoğunlukla lipofilik kısımlara uygulanabilir ve % 98'e varan verimlilikleri elde edilebilir (Allémann, ve ark., 1998). Nispeten basit ve uygun maliyetli olmasına rağmen, DNA ve RNA gibi suda çözünür materyali kapsüllemek için ilk seçenek olarak kullanılmamaktadır.



Şekil 2.9. Nanopresipitasyon (çözücü ile yer değiştirme) tekniğinin şematik gösterimi (Reis ve Neufeld, 2006'dan uyarlanmıştır)

2.4.3. Tuzla çöktürme

Bu teknik, suyla karışabilen bir çözücünün tuzlama yoluyla sulu çözeltiden ayrılması şeklindeki basit ilkeye dayanmaktadır. Prosedür, emülsiyonlaştırma/çözücü difüzyonunun geliştirilmiş ve değiştirilmiş versiyonudur. Burada, aseton gibi organik bir

çözücü, polimeri ve materyali çözmek için kullanılmaktadır (Zheng ve ark., 2006). Nanoküre oluşumu, yeterli miktarda sulu faz kullanılarak yağ/su emülsiyonunun seyreltilmesiyle tetiklenmektedir (Song ve ark., 1997). Tuzla çökeltici ajan, ilacın kapsülleme etkinliğine karar vermede hayati bir rol oynamaktadır; bu nedenle dikkatli seçim yapılmalıdır. Nanopresipitasyon yöntemi gibi, tuzla salmanın da lipofilik kısımları kapsüllemek için daha büyük bir afinitesi vardır.

2.4.4. Diyaliz

Diyaliz, küçük ve tekdüze dağılmış PNP'ler hazırlamak için en basit ve etkili yöntemlerden biridir (Jeong ve ark., 2001). Yöntem, polimerin (organik bir çözücü içinde çözülmüş) uygun moleküler ağırlık aralığına sahip bir diyaliz tüpü içinde tutulmasını ve karışmayan bir çözücüye karşı diyaliz yapılması basamaklarını içermektedir. NP'lerin homojen süspansiyonu, membran içindeki çözücünün yer değiştirmesinden ve ardından çözünürlük kaybına bağlı polimer toplanmasından kaynaklanır (Liu ve ark., 2007). Diyaliz yöntemi ile PNP oluşumunun mekanizması henüz tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Poli (benzil-L-glutamat) -b-poli (etilen oksit) ve poli (laktit) -b-poli (etilen oksit) gibi bu teknik kullanılarak (Heinze ve ark., 2007) sentezlenen çeşitli polimerler ve ko-polimerler bulunmaktadır (Lee ve ark., 2004).

2.4.5 Süper kritik akışkan teknolojisi

Süper kritik akışkan teknolojisi, geleneksel çözücülere kıyasla daha çevre dostu olan ve yüksek saflıkta PNP üretme potansiyeline sahip olan süper kritik akışkanların kullanımını içerir (Rao ve Geckeler, 2011). Bu teknoloji,

- (1) süper kritik çözeltilinin (RESS) hızlı genişlemesi
- (2) süper kritik çözeltilinin sıvı çözücüye (RESOLV) hızlı genişlemesi (York, 1999) olmak üzere iki ilkeye dayanmaktadır.

Süper kritik akışkan teknolojisi, iyi dağılmış partiküller, çözünen maddenin süper kritik bir akışkan içinde çözülmesi ve ardından çözeltilinin bir delik boyunca çevreleyen havaya hızlı bir şekilde genişletilmesiyle oluşturulmaktadır. Yüksek derecede süper doygunluk, genişleme basıncındaki hızlı düşüşle birlikte homojen parçacıkların oluşmasına neden olmaktadır. Poli (perfloropolietilendiamid) damlacıkları bu teknik kullanılarak üretilmektedir. Nagavarma ve arkadaşları en küçük partikül boyutu $18,93 \pm 3,73$ nm olan

ve PDI 0.1'den küçük olan raloksifen NP'leri hazırlamak için bu tekniği kullanmışlardır (Nagavarma ve ark., 2012).

Süper kritik çözeltinin sıvı bir çözücüye genişlemesinden oluşan RESS yönteminin modifiye edilmiş versiyonuna RESOLV adı verilmektedir (Rao ve Geckeler, 2011). RESS yöntemi, mikro parçacıkların birincil ürün olduğu, nanometre ve mikrometre boyutlu parçacıkların zayıf bir şekilde ayrılabilir bir karışımını üretmektedir. RESOLV yönteminde, sıvı çözücü, partikülü baskılayarak nano boyutta partikül elde etmeyi mümkün kılmaktadır (Mohammed ve ark. 2004).

2.4.6 Emülsiyon polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonu yöntemi, organik veya sulu sürekli fazın kullanımına bağlı olarak iki yaklaşımda sınıflandırılabilir (Nagavarma ve ark., 2012). Sürekli organik faz metodolojisi, monomerin bir emülsiyona veya çözücü olmayan bir malzemeye dağıtılmasını içerir (Reis ve Neufeld, 2006). Bununla birlikte, yöntem toksik organik çözücüler, yüzey aktif maddeler, monomerler ve sonunda oluşan parçacıklardan en sonunda yıkanan bir başlatıcı gerektirmektedir. Bu yöntem kullanılarak poli (metilmetakrilat) (PMMA), poli (etilsiyanoakrilat) (PECA) ve poli (butilsiyanoakrilat) (PBCA) NP'ler, sikloheksan (ICH, sınıf 2), organik faz olarak n-pentan (ICH, sınıf 3) veya toluen (ICH, sınıf 2) sentezlenmişlerdir (Zambaux ve ark., 1998). Monomer sulu bir sürekli fazda çözöldüğünde başlatma ajanı gerekli değildir. Gama ışınları, ultraviyole (UV) veya güçlü görünür ışık gibi yüksek enerjili radyasyon reaksiyonu başlatmanın çeşitli başka yöntemleri vardır. Mini-emülsiyon polimerizasyonu, emülsiyon polimerizasyonuna benzer. Monomer, su, yardımcı stabilizatör, yüzey aktif maddeler ve başlatıcı kokteyllerini içerir. Bu iki yöntemi birbirinden ayıran faktörler, düşük moleküler kütleli bir bileşiğin ortak stabilizatör olarak kullanılması ve ultrason jeneratörleri gibi yüksek kesme cihazlarının kullanılmasıdır (Lemoine ve Pr  at, 1998).

Mikro emülsiyon polimerizasyonu, önemli ölçüde daha küçük partikül boyutuna ve partikül başına ortalama zincir sayısına sahip olmakla sonuçlanmaktadır (Nagavarma ve ark., 2012). Mikro emülsiyon polimerizasyonunda, başlatıcı olarak görev yapan suda c  z  n  r bir ajan, şişmiş miseller içeren termodinamik olarak kararlı mikro-emülsiyonun sulu fazında karıştırılır. Başlatıcı türü ve konsantrasyonu, yüzey aktif madde ve

monomerin doğası ve reaksiyon sıcaklığı, mikro emülsiyon polimerizasyon kinetiğini ve PNP'nin özelliklerini etkileyen birkaç faktördür (Keshavarz ve ark., 2012).

2.4.7. Rekombinant teknoloji

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak sentezlenen katyonik polimerler, gen dağıtımının bazı önemli zorluklarını (hücreleri hedefleme kabiliyetinin düşük olması, genetik materyalin zayıf hücre içi trafiği ve nukleusa alım gibi) yenme potansiyeline sahiptir. Konvansiyonel termodinamik türevli kimyasal teknikleri içeren sentetik polimer üretimi yöntemleri sonucu, ortaya çıkan ürünler bileşim ve moleküler ağırlık açısından heterojen olduğundan, genetik materyal teslimi amaçları için yetersiz kalabilmektedir. Buna karşılık, *E. coli* gibi canlı sistemlerde rekombinant teknoloji ile sentezlenen amino asit bazlı polimerler, fonksiyonun amino asit dizisinden etkilenebileceği özel bir bileşime sahip homojen biyopolimerler üretebilmektedir (Canine ve Hate, 2010). Aris ve arkadaşları bir arginilglisilaspartik asit (RGD) hücre bağlanma peptidi gösteren β -galaktozidazdan türetilmiş protein ile konjüge edilmiş katyonik bir lizin oligomerinden (K10) oluşan bir gen dağıtım sistemi olan 249AL'ni bildirdirmiştir (Feliu ve ark., 2000). K10, plazmit DNA'nın (pDNA) yoğunlaşmasına yardımcı olurken, RGD, hücre zarında bulunan $\alpha V\beta 3$ integrini ile etkileşime girmektedir. Benzer şekilde, Furgeson'un grubu gen iletimi için rekombinant elastin bazlı katyonik bir çift blok biyopolimerin geliştirildiğini bildirmişlerdir (Chen ve ark., 2008).

Genel olarak, PNP'lerin hazırlanması henüz mükemmelleştirilmemiştir. Lipofilik ilaç yüklü nanokapsüller, iyi tekrarlanabilirliğe sahip basit, güvenli yöntemler kullanılarak sentezlenebilmektedir. Bununla birlikte, genetik materyaller gibi daha karmaşık ve hassas terapötik kargolara geçerken, uygun fizikokimyasal özellikleri, işlem parametrelerinin minimum müdahalesini ve maksimum verimini elde etmek için uygun yöntemin dikkatli seçimi çok önemlidir. Polimer sentezinde kullanılan yöntemler ve örnek polimerler Tablo 2.6'da gösterilmiştir.

Tablo 2.6. Polimer sentezinde kullanılan yöntemler ve örnek polimerler (Rai ve ark., 2019'dan uyarlanmıştır.)

Polimer Sentez Yöntemi	Örnek	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	PDI	Referans
Çözücü buharlaştırma yöntemi	PLA NP'ler	200	<0.1	Alleman ve ark. 1993
Çözücü yer değiştirme yöntemi	PLGA NP'ler	160–170	<0.2	(Galindo-Rodriguez ve ark., 2004)
Tuz Çöktürme	PTMC NP'ler	184 + ₋ 3	0.21	(Zheng Zhang ve ark., 2006)
Tek emülsiyon	PTMC NP'ler	334 _ 4	0.17	(Zheng Zhang ve ark., 2006)
Diyaliz	PLA küre NP'ler	198.6	0.062	(Liu ve ark., 2007)
Süper kritik akışkan teknolojisi (RESS)	Raloxifene NP'ler	18.93 _ 3.73	<0.1	(Siegel ve ark., 2006)
Süper kritik akışkan teknolojisi (RESOLV)	PHDFDA NP'ler	<50	<0.25	(Mohammed ve ark., 2004)
Rekombinant teknoloji	K8-ELP(1-60) NP'ler	<115	<0.2	(Chen ve ark., 2008)

2.5. Gen Taşıyıcı Olarak Kullanılan Polimerler

2.5.1. Poly(Laktik Asit) (PLA)

PLA bulunabilirliği, uygun fiyatı ve biyolojik olarak parçalanabilir yapısı nedeniyle yıllar boyunca gen tedavisi için geniş çapta araştırılmıştır. Bu polimerin yapı taşı, fermantasyon yoluyla doğal olarak üretilen laktik asittir. Literatürde, PLA'yı sentezlemek için iki polimerizasyon mekanizması tanımlanmaktadır (Juliana ve ark., 2010).

A. Laktik asidin doğrudan yoğunlaştırılması: Solventlerin kullanıldığı ve yüksek reaksiyon süreleri sergileyen geleneksel sentez yöntemidir (Juliana ve ark., 2010). Katalizör olarak kalay (II) klorür varlığında çözücü olarak da difenil eter kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Süreç polimerizasyon sıcaklığına ve basıncına bağlıdır. Sıcaklıktaki bir artış, yüksek moleküler ağırlıklı bir PLA'ya yol açmaktadır (Laonud ve ark., 2010).

B. Laktidin halka açılması polimerizasyonu: Bu işlem iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada laktik asit, ısı ve vakum altında laktide (bir yakın zincirli lakton di-ester) dönüşür. Su buharlarının uzaklaştırılmasını hızlandırmak için nitrojen kontrollü inert bir

ortam kullanılır ve siklizasyonu arttırmaktadır. İkinci adım, siklik halkanın parçalanmasını ve ardından polimeri oluşturan açık zincirlerin birleşmesini içermektedir. Bu aşama, ester bağlarının oluşumunu desteklemek için kalaylı oktoat tarafından katalize edilmektedir (Robert ve Aubrecht, 2008).

2.5.2 Poly-L-Lysine (PLL)

PLL birçok yapısal konformasyonda (doğrusal, dendritik ve hiper dallı) ve moleküler ağırlıkta sentezlenmiştir. Doğrusal PLL, monomerlerin ısı ve vakum altında polimerleştirilmesi ve ardından dietil eter kullanılarak çökeltme yoluyla sentezlenmektedir. Dendritik PLL, lizin monomerlerinin bir dal birimi olarak konjuge edilmesiyle oluşturulur. Dendritik PLL'ler doğrusal muadillerine kıyasla gelişmiş gen transfeksiyonu göstermektedirler (Yamagata ve ark., 2007). Dendritik konformasyon, lizin monomerlerinin çeşitli biçimlerde tekrar tekrar bağlandığı hekza-metilen-diamin gibi bir başlatıcı çekirdek kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Ohsaki ve ark., 2002). Hiper dallı PLL, yapısal olarak dendritik PLL'lerle ilişkili nispeten daha yeni bir konformasyondur. Tek bir çekirdek sergileyen dendritik konformasyonların aksine, hiper dallı PLL rastgele dallanmış bir yapıya sahiptir ve tek adımlı bir işlemle üretilbildiği için ilgi çekicidir (Kadlecova ve ark., 2013). Polimerizasyon tamamlandığında, nihai ürün çökeltme yoluyla toplanmaktadır (Zu ve ark., 2016).

2.5.3. Poly(amidoamine) (PAMAM)

PAMAM, özellikle iç kulaktaki koklea (Wang ve ark., 2011) ve beyindeki glioblastoma (Bae ve ark., 2017) gibi kompleks hedeflere gen iletimi için kullanılan viral olmayan taşıyıcıdır. Dendritik biçimlerde bir alkil-amin çekirdek ve üçüncül amin dallarından oluşmaktadır. Çoğu durumda, çekirdekte etilen-diamin-tetra-asetik asit (EDTA) kullanılmaktadır (Shadrack ve ark., 2015).

2.5.4. Poly(methyl-methacrylate) (PMMA)

PMMA, elektroegirme (Gupta ve ark., 2005), karbon nanotüp/PMMA kompozitlerinin sentezi ve yüksek kırılma indisli ince film imalatı (Du, Fischer ve Winey, 2003) uygulamaları için kapsamlı olarak araştırılan polimerlerden biridir. PMMA'nın özellikleri moleküler ağırlığa bağlıdır. Polimerizasyonunun aşağıdan yukarıya bir yaklaşımı, iyonik ve serbest radikal polimerizasyonunu içermektedir. Anyonik polimerizasyon, aktif bir anyonik merkezden oluşmaktadır. Zincir sonlanmasının, bir sonlandırma maddesi

eklenene kadar gerçekleşmediği dinamik bir polimerizasyon tekniğidir (Kubisa, 2009). Polimerizasyon derecesi, bir sonlandırma maddesi yokluğunda başlatıcıya karşı monomerin molar oranı ile belirlenmektedir. Anyonik polimerizasyon, düşük moleküler ağırlıklı PMMA-PS üretmek için kullanılır. Anyonik polimerizasyon, hem oksijen hem de sudan oluşan bir ortama duyarlı olduğundan katı reaksiyon koşulları için gerekliliktir. Bu nedenle proses, tüm polimerizasyon reaktiflerinin ve etkisiz atmosferik koşulların saflaştırılmasını gerektirir (Hadjichristidis ve ark., 2000). Polimerizasyon tekniği, yüksek moleküler ağırlıklı PMMA ve bununla ilgili blok kopolimerlerini sentezlemek için kullanılır. Diğer bir polimerizasyon tekniği, tersinir ilave parçalanma zincir transferidir (RAFT). Teknik, diğer serbest radikal polimerizasyonuna çok benzer. RAFT'ta termokimyasal başlatıcı veya gama veya UV radyasyonunun bazı reaktiflerle etkileşimi, serbest radikalleri açığa çıkarır (Kiani ve ark., 2007). Yüksek moleküler ağırlıklı PMMA, elektron transferi (ARGET) veya atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) ile rejenere edilen aktivatörler gibi diğer tekniklerle de başarıyla sentezlenebilir. Bu yeni teknikler, önemli ölçüde daha az miktarda Cu (II) türü gerektirir (Nicolaÿ ve ark., 2010). Sonuç olarak, yüksek moleküler ağırlıklı PMMA'nın sentezi için bir dizi aşağıdan yukarıya teknik mevcuttur.

2.5.5. Poly(Ethylene-Imine) (PEI)

Doğrusal PEI 22 kilodalton (kDa) ve dallı PEI 25 kDa ağırlığa sahiptir ve gen terapisi için kullanılan en yaygın türlerdir (Gao ve ark., 2016). Doğrusal PEI sentezi için kullanılan mekanizma, 2-oksazolinin katyonik halka açma polimerizasyonunu içermektedir (Brissault ve ark., 2003). Asillenmiş oksazolin, yani metil veya etil oksazolin kullanıldığında, reaksiyon sulu ortamda güçlü asit ve yüksek sıcaklık altında hidroliz yoluyla gerçekleşir (Brissault ve ark., 2003). Doğrusal PEI'ler gibi, dallı PEI, aziridinin katyonik halka açma polimerizasyonu yoluyla hazırlanır (Brissault ve ark., 2003). Bu, aziridin monomeri üzerindeki protonların elektrofilik saldırısı ile elde edilir. Genel polimerizasyon reaksiyonu, asitin katalitik aktivitesi ve sulu veya alkollü solüsyonda ısı girişi yoluyla işlenebilir (Von Harpe ve ark., 2000). PEI, ticari bir DNA transfeksiyon reaktifi olarak başarıyla geliştirilmiştir. JetPEITM adı verilen sistem, minimum sitotoksosite ile 4 saate kadar etkili bir gen transfeksiyon gerçekleştirmektedir. Doğrusal PEI zincirlerinden yapılmıştır ve hem adherent hem de süspansiyon hücreleri için kullanışlıdır. JetPEI®-Makrofaj (birincil makrofajlar, glial ve dendritik hücreler),

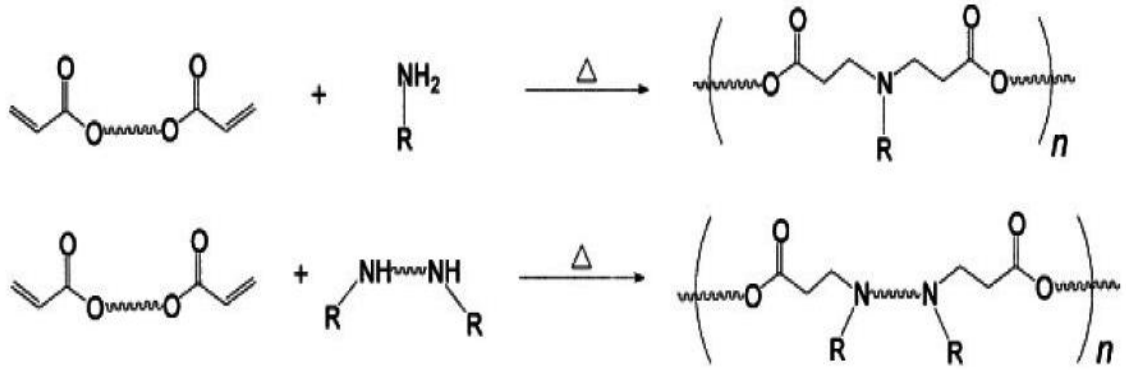
jetPEI®-Hepatosit (karaciğer hücreleri) ve jetPEI®-HUVEC (endotel hücreleri) gibi hücreye özgü versiyonlar da bu reaktif için tasarlanmıştır.

2.5.6. Poly(Laktik-ko-glikolid) (PLGA)

PLGA, laktik asit ve glikolik asidin sentetik bir kopolimeridir. PLGA, laktik ve glikolik asidin doğrudan poli yoğunlaşması yoluyla sentezlenebilir; bununla birlikte, yüksek moleküler ağırlıklı kopolimerleri elde etmenin en etkili ve yaygın şekli, laktit ve glikolid'in halka açma polimerizasyonudur. Yüksek moleküler ağırlıklı PGLA sentezi, yüksek derecede dehidrasyon için poli-yoğunlaşma gerektirir ki bu, elde edilmesi güçtür ve iyi bir polimer verimi elde etmek için verimsiz bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Martin ve Avérous, 2001). Yüksek moleküler ağırlıklı PLGA hazırlamak için daha kısa reaksiyon süresi, siklik diesterler, laktit ve glikolitin halka açma polimerizasyonu yoluyla ilerlemek önemlidir. Hem PLA hem de PLGA, ticari olarak temin edilebilen ilaç ürünlerinde kullanılan FDA onaylı polimerlerdir. En düşük etkili dozu azaltmak, ilaç aktivitesini hedeflemek ve ilaç toksisitesini azaltmak için ilaç dağıtımında yaygın olarak kullanılmıştır. FDA bugüne kadar PLA veya PLGA kullanan yalaşık 25 ilaç ürününü onaylamıştır (Blasi, 2019).

2.5.7. Poli Beta Amino Esterler

Poli (β -amino ester) (P β AE)'ler, pH duyarlılıkları, yüksek biyouyumlulukları ve biyobozunurlukları nedeniyle önemli bir biyomalzemeler sınıfı oluşturur. Ana zincirlerinde amin ve ester grupları içerirler ve katalizör veya çözücüye ihtiyaç duymadan di- veya trifonksiyonel akrilatlarla primer veya sekonder aminlerin Michael katılma reaksiyonu ile eklenmesiyle sentezlenirler. Fizyolojik koşullar altında bis (β -aminoasit)'ler, diol ve poli (akrilik asit)'ler gibi küçük moleküllere parçalanabilirler. P β AE 'ler ilaç ve gen dağıtım araçları ve doku mühendisliği iskeleleri gibi uygulamalarda kullanılabilirler. Şekil 2.10'da P β AE'lerin sentez reaksiyonuna örnek verilmiştir.



Şekil 2.10. Poli(β -amino ester)'in sentezi (Cordeiro, Serra, Coelho ve Faneca, 2019)

P β AE'lerin, negatif yüklü DNA'yı nanopartiküller halinde enkapsüle etme yeteneği sayesinde, hücre içerisinde meydana gelen DNA kaçışına neden olan endozomu tamponlama kabiliyetlerine sahiptir. Gentransferi çalışmaları için katyonik yük yoğunluğu bakımından daha fazla katyonik yük yoğunluğuna sahip PEI ile karşılaştırıldığında daha düşük toksik etki göstermektedir. Bu özellikleri nedeniyle viral olmayan gen taşıyıcı araçlar arasında önemli bir yere sahiptir. P β AE 'lerin düşük sitotoksikite derecesine sahip olması, pozitif yüklü yüksek moleküler ağırlıklı polimerlerin hücrelerde birikmesini önleyen hidrolize edilebilir yapılarından kaynaklanmaktadır (Bishop ve ark., 2016).

Yapılan kaynak araştırmaların ışığında moleküler ağırlığın ve yüksek dallanmış P β AE 'lerin konfigürasyonunun gen transfeksiyon işleminde biyoyumluluk ve verimlilik üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hela hücre hattında yapılan çalışmada daha yüksek gen transfeksiyon etkinliği ve düşük toksisite, yüksek moleküler ağırlıklı yüksek dallanmış P β AE'ler ile elde edilmiştir. Yüksek dallı P β AE/DNA poliplekslerinin hücre zarı ile etkileşimi, biyoyumluluk ve moleküler ağırlık arasındaki olumlu ilişkiden sorumludur (Gao ve ark., 2016). Yine literatürde yer alan bir başka çalışmada, bazı modifiye edilmiş P β AE'lerin, spesifik olmayan toksisite ile primer glioblastoma hücrelerine gen aktarılabildiğini göstermiştir (Tzeng ve ark., 2011). P β AE'lerin, düşük moleküler ağırlıklı PEI ile birleştirildiği PEI-P β AE içerikli nanopolimerler, az sitotoksikite ile anlamlı derecede yüksek transfeksiyon etkinliği göstermiştir (Zhao ve ark., 2016).

Primer amin 2- (piridildiyo)-etilamin kullanılarak yeni bir P β AE sınıfı sentezlenmiştir. Bu polimerlerin yan zincirlerindeki piriditiyo grupları, integrin reseptörlerine özgü bir

ligand olan tiyol peptidi, RGDC gibi tiyol ligandları ile hızlı reaktivite göstermektedir. DNA ile olan kompleksleri, PEI'ye benzer şekilde medyum da yapılan transfeksiyon ile düşük hücrel toksisite göstermiştir (Zugates ve ark., 2006).

Ayrıca, P β AE'lerin amin bakımından zengin oligopeptidlere sahip kimyasal modifikasyonu, gelecekteki gen dağıtım sistemleri için güçlü bir potansiyel olduklarını göstermektedir (Segovia ve ark., 2014). Endosomal kompartmanların asidik pH'ında ayrılabilir olan Ketal içeren P β AE (KPAE), viral olmayan bir siRNA iletim sistemi olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir (Guk ve ark., 2013).

Amfifilik kopolimerler veya P β AE'lerin nanoparçacıkları, bölgeye özgü ilaç dağıtım sistemlerinin ve gen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi için kullanılmaktadır. pH'a bağlı çözünürlüğe sahip olmaları ve asidik ortama maruz kalmaları üzerine ilaçların, oligonükleotitlerin ve plazmid DNA'nın salınımı tetiklemek için kullanılabilirler. P β AE 'ler, protonlanmamış yapılarından dolayı fizyolojik pH'da (7.4) çözünmez, ancak çözeltinin pH'ı 6.5'ten az olduğunda kuaterner yapıları nedeniyle çözünebilir hale gelirler. Bu geçiş hücre dışı ve endozomal pH aralığında (7.4 ve 5.0-6.5) gerçekleşir. Bu nedenle, ilaç dağıtım stratejileri için tümör dokusunun normal hücre ile karşılaştırıldığında daha düşük hücre dışı pH'ı kullanılmıştır (Poly ve ark., 2014; Song ve ark., 2012). P β AE'lerin pK_b değerleri, aminlerin alkil gruplarını değiştirerek geniş bir aralıkta ayarlanabilmektedir (Song ve ark., 2012).

2.6. CRISPR/Cas9 Taşıyıcı Sistemler

CRISPR/Cas9 terapötik olarak önemli bir teknoloji olmasına rağmen, pratik uygulamalarında çeşitli engeller vardır. Bu engeller aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. CRISPR/Cas9 sisteminin serum nükleazlarına karşı stabilitesi oldukça düşüktür.
2. CRISPR/Cas9 sistemi doğuştan gelen bağışıklık sistemini uyarabilir.
3. Serum proteinleri ve hedef olmayan hücrelerle nonspesifik etkileşime girebilir.
4. Böbrek sistemi tarafından kolaylıkla temizlenebilir.
5. Kan damarlarından hedef dokulara girişi zordur (Cebrian-Serrano ve Davies, 2017; Dowdy, 2017; Oude ve ark., 2016; Timin ve ark., 2018).

Bu sorunların üstesinden gelmek için, zaman içerisinde yeni taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Viral vektörler (lentivirüs, adeno ilişkili virüs, adenovirüs, nano taşıyıcılar ve fiziksel stratejiler (mikroenjeksiyon, elektroporasyon, propanebetain ve osmositoz ile indüklenen transdüksiyon, mekanik hücre deformasyonu, hidrodinamik enjeksiyon vb.) en sık kullanılan taşıyıcı sistem stratejileridir (Burks ve ark., 2018; Cheng ve ark., 2014; Gori ve ark., 2015; Yin ve ark., 2016). Viral vektörler, CRISPR/Cas9 iletimi için en yaygın kullanılan stratejilerden biridir. Viral taşıyıcı sistemler genom düzenlemede yüksek verimlilik sağlamaktadır. Ancak, kanser gelişimi riski, büyük ölçekte üretimlerinin çok uzun ve zor bir süreç olması ve bağışıklık sistemi uyarımı gibi bazı temel sınırlamaları mevcuttur (Li ve ark., 2015).

Mikroenjeksiyon ve elektroporasyon gibi fiziksel taşıyıcılar ile yüksek transfeksiyon verimi sağlanabilse de, *in vivo* amaçlar için uygun değildir (Hori ve ark., 2014; Stewart ve ark., 2016; Remy ve ark., 2017). Hidrodinamik uygulama yöntemi, *in vivo* deneyler için kullanılabilir. Ancak bu yöntem hepatomegali, yüksek kan basıncı ve kalp disfonksiyonu gibi çeşitli fizyolojik sorunlara neden olabilmektedir (Yarmush ve ark., 2014; Hyland ve ark., 2017). Son yıllarda, CRISPR/Cas9 sisteminin hedef hücrelere taşınması için nanopartikül sistemlerinin geliştirilmesi konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Gelişmiş nanotaşıyıcıların senteziyle yukarıda bahsedilen engellerin üstesinden gelinerek gen dağıtım verimliliği ve transgenin ekspresyonu önemli ölçüde artırılabilir (Liu ve ark., 2017; Cunningham ve ark., 2018; C. Su ve ark., 2018). Düşük immünojenite veya kanserojenlik, kargo moleküllerin korunması, yük boyutunda daha az sınırlama, büyük ölçekte üretim kolaylığı ve CRISPR/Cas9 sistemi ile nanoformülasyon oluşturma yeteneği sayesinde polimerler yüksek potansiyel sergilemektedir (Hill ve ark., 2016). Ayrıca, polimerlere yapılan çeşitli modifikasyonlar ile dolaşım süresinin artırılması, kargo molekülün hücre veya doku spesifik iletimi ve kontrollü salımı sağlanabilmektedir (Lim ve ark., 2017; Ryu ve ark., 2018). Polimerlerin bu özellikleri, CRISPR/Cas9 sistemini gen tedavisi için umut verici bir seçenek haline getirmektedir.

2.7. CRISPR/Cas9 Polimerik Nanotaşıyıcı Sistemler

Polimerik nanopartiküller, plazmid DNA, RNA ve oligonükleotidler dahil olmak üzere çeşitli nükleik asit türlerinin taşınımı için yaygın olarak kullanılmaktadır (Aghamiri ve

ark., 2019). Polimerik taşıyıcılar, doğal monomerlerden, (kitosan gibi şekerler) veya sentetik kimyasal monomerlerden (poli-kaprolakton (PCL) veys PLGA sentezlenebilir (Glass et al., 2018). Polimerik kapsülleme, kargoyu *in vivo* bozunma yollarından koruyabilir ve gizleyebilir ve ayrıca hedef hücre tipinin yüzey reseptörlerine spesifik olarak bağlanan aktif hedefleme parçalarıyla işlevselleştirilerek kargo molekülün özgüllüğünü geliştirebilir (C. Liu ve ark., 2017). Polimerik taşıyıcılar, çeşitli protein ve nükleik asidin taşınması ve salımı için yaygın olmakla birlikte, bugüne kadar literatürde çok az polimerik CRISPR/Cas9 taşınması ve salımı örneği bulunabilir. Nanopartiküler sistemler, CRISPR/Cas9 bileşenlerinin 3 formunun da (Cas9/sgRNA plazmid DNA, Cas9 mRNA/sgRNA ve Cas9 protein/sgRNA) istenilen hücrelere taşınmasında kullanılmaktadır.

Klasik transfeksiyon ajanları olarak kabul edilen ve dünyada yaygın olarak kullanılan PEI gibi katyonik polimerler CRISPR/Cas9 sistemlerinin taşınması için çalışılmıştır. Bu polimerler, DNA'yı yoğunlaştırmak ve DNA'yı DNaz ve diğer fiziksel ve kimyasal faktörlerden korumak için yüksek pozitif yüke sahiptir. Pozitif yük ayrıca polimerleri plazmidi serbest bırakmak için yüksek endozomal kaçış olanağı sağlamaktadır. Şimdiye kadar, PEI, PAMAM, PLGA, kitosan gibi polimerler, CRISPR/Cas9 plazmidinin hedef hücrelere taşınması için test edilmiş ve iyi genom editing potansiyeli sergilemiştir. Yüksek amino grupları konsantrasyonu, PEI'ye plazmid ile güçlü bir şekilde etkileşime girmesi için yüksek bir pozitif yük ve endozomlardan etkili bir şekilde kaçmak için güçlü bir proton süngeri etkisi verir, bu nedenle yüksek gen transfeksiyon etkinliğine sahiptir. Ryu ve arkadaşları (2018) tarafından yürütülen çalışmalara göre, basit 25-kDa dallı PEI ve ticari jet-PEI polimer bazlı DNA transfeksiyon reaktifini Cas9/sgRNA kodlayan plazmidinin iletimini başarıyla sağlamıştır. Bununla birlikte, araştırmalarında dallı PEI'nin optimal N/P (polimerde azot ve plazmidde fosfor) oranlarında hücre canlılığını % 67,57'ye düşürdüğü gözlemlendiğinden, bu nanotaşıyıcıların kullanımını yüksek sitotoksitesiteleri nedeniyle gölgelemiştir (Ryu ve ark., 2018). PEI'nin hem toksisite hem de transfeksiyon etkinliği moleküler ağırlıkla paralel olarak artmaktadır. Düşük transfeksiyon etkinliği tolere edilebilir olduğundan düşük moleküler ağırlıklı PEI (LMWPEI), CRISPR/Cas9 plazmid taşınmasında denenmiştir. LMWPEI üzerinde çeşitli modifikasyonlar yapılarak özellikleri iyileştirilmiştir. Lino ve ark., LMWPEI polimerini Polietilenglikol (PEG) ve kolesterol (CHOL) ile işlevselleştirirerek bir tür lipopolimer

elde etmiştir. CHOL, zar yoluyla geçirgenliği artırmak için biyoyumlu bir hidrofobik lipid görevi görmektedir ve PEG ise lipopolimerin stabilitesini ve hemo-uyumluluğunu artırmak için biyoyumlu bir hidrofilik kısım görevi görmektedir. Bu araştırmacılar ayrıca CRISPR/Cas9 sisteminin hedefe ulaşmasını sağlamak için lipopolimeri hücreye özgü aptamerlerle modifiye etmişlerdir (Lino ve ark., 2018).

Liu ve arkadaşları, LMEPEI'yi florlama ile modifiye etmişlerdir. Polimer, florlandıktan sonra hem hidrofilik hem de hidrofobik hale gelmiştir. Lipit çift tabakasına karşı yüksek bir dayanıklılığa sahip olan nanopolimerler hücreler tarafından kolayca alınabilmiş ve endozomlardan kaçış da gerçekleşmiştir (Liu ve ark., 2018). Li ve arkadaşları, çok işlevli RGD-R8-PEG-HA kopolimeri ile kaplanmış LMWPEI ile CRISPR/Cas9 hedef dağıtımı için polimerik bir "core-shell" kompleksi oluşturmuştur. Peptid RGD-R8, tümör ve tümör damarında aşırı eksprese edilen bir tür integrin reseptörüne karşı yüksek bir etkiye sahiptir ve polimere tümör hedefleme yeteneği kazandırmıştır. PEG segmenti, kompleksi daha kararlı hale getirmiştir ve anyonik HA segmenti, insan vücudundaki bileşikler ile spesifik olmayan etkileşimi azaltmak için, florlanmış LMWPEI'nin katyonik yükünü tersine çevirmiştir (Liu ve ark., 2018). Zhang ve arkadaşları, Hela hücrelerinde katyonik polimer polietilenimin-siklodekstrin (PC) tarafından aracılık edilen CRISPR/cas9'un *in vitro* iletiminin, Hela hücrelerinde hemoglobin alt birimi beta ve rhomboid 5 homolog 1 (RHBDF1) olarak adlandırılan iki genom lokusunda başarılı bir şekilde düzenlemesini sağlanmıştır. Cas9/sgRNA plazmidi ile üretilen nanokompleksler, uygun hücresel absorpsiyon ve transfeksiyonla sonuçlanan pozitif bir yüke sahiptir. Cas9 ve sgRNA'yı kodlayan plazminin PC içinde verimli kapsüllenmesi ve yoğunlaştırılması sağlanmıştır. Yüksek moleküler ağırlıklı polietilenimin (PEI) ile benzer yapıya rağmen PC, daha düşük sitotoksiste göstermiştir. Bu özellik, PC'yi yüksek bir doz düze yinde veya tekrarlanan bir şekilde transfeksiyon için işlevsel kılmıştır (Zhang ve ark., 2019). Kang ve arkadaşları, çalışmalarında katyonik bir polimer olan dallı polietilenimini (bPEI), Cas9 proteinine kovalent olarak konjuge etmiştir ve füzyon daha sonra bir CRISPR nanopartikülü oluşturmak için sgRNA ile komplekslenmiştir. Metisilin direncinde yer alan ana gen olan mecA'yı hedefleyen nanokompleks, kalın bakteri hücre duvarına ve zor transfeksiyonuna rağmen *Staphylococcus aureus*'a başarıyla iletilmiştir. Ayrıca, polimer ile konjuge edilmiş Cas9 ile, doğal Cas9 kompleksleri veya yaygın lipid bazlı formülasyonların

genom düzenlemenin verimliliği ile karşılaştırıldığında polimer ile konjuge Cas9'un verimliliği nispeten daha yüksek bulunmuştur (Kang ve ark., 2017).

E6 ve E7 HPV onkoproteinleri, servikal kanser gelişimi ve ilaç direncinde önemli bir role sahiptir. HPV16 E7'yi hedeflemek için Zhu ve arkadaşları, tarafından CRISPR/kısa hairpin RNA'yı (shRNA) HPV16 transgenik farelere aktarmak için poli P β AE'den oluşan yeni bir nanoyapı tasarlamıştır. Yüksek transfeksiyon etkinliği ve tümör büyümesi inhibisyonu, *in vivo* olarak göstermişlerdir. P β AE, Biyouyumluluk, düşük toksisite, pH duyarlılığı, yüksek suda çözünürlük, asidik pH değerlerinde hızlı ilaç salımı gibi özelliklere sahiptir (Zhu ve ark., 2018). Rui ve arkadaşları, tarafından üretilen dallı poli (amino ester) karboksilatlı nanopartiküller, Cas9/sgRNA'nın hedef hücre sitoplazmasına verimli ve hızlı iletimi, endozomal kaçışı ve verimli salınmasını sağlamıştır. Bu sistem, sırasıyla % 75 ve % 4'lük bir *in vitro* knock-out ve knock-in etkinliği göstermiştir (Rui ve ark., 2019).

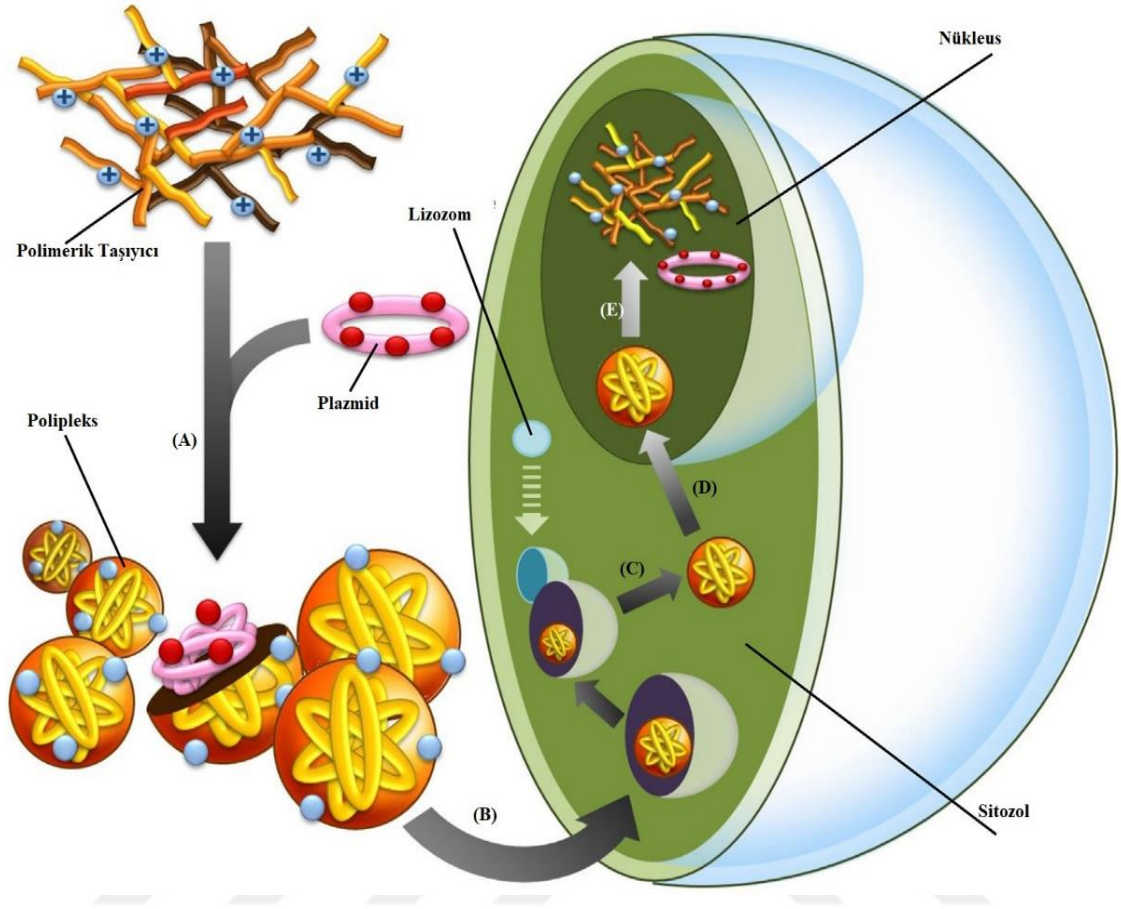
Xu ve arkadaşları CRISPR/Cas9 mRNA iletim sistemleri olarak PEG-PLGA ve BHEM-chol'den oluşan bir tür katyonik kolesterol yardımcı PLGA nanopartikülleri (CLAN) geliştirmiştir. Katyonik lipidler, polimerin negatif yükünü nötralize etmek için kullanırken nanopartiküllerin, uzun süreli dolaşımı için PEG kullanılmıştır. Ayrıca uygun CLAN'ı üretmek için, farklı PEG yoğunluklarına ve yüzey yüklerine sahip bir CLAN kütüphanesi tasarlamışlar ve ardından optimize edilmiş olanı taramak için *in vivo* makrofaj alımını test etmişlerdir. Sonuçlar, en yüksek yüzey yüküne ve nispeten düşük PEG yoğunluğuna sahip nanopartikülün en iyi makrofaj alımını sergilediğini göstermiştir (Xu ve ark., 2018). PEGilasyon, opsonizasyonu azaltmak ve retiküloendotelial sistem (RES) ile klirensi azaltmak için yaygın olarak kullanılır, ayrıca nonviral vektörlere dayalı CRISPR/Cas9 iletimi için de uygulanabilir. İmmün tanımayı önlemek için çeşitli nanopartiküller, PEG veya diğer hidrofilik polimerlere konjuge edilerek oluşturulabilir (Turecek ve ark., 2016). Liu ve arkadaşları, BCR-ABL genini bozmak için yenilikçi bir CLANpCas9/gBCR ABL yapısı geliştirmişlerdir. Apoptoz ve kronik myeloid lösemi(CML) hücre proliferasyonu (K562 hücreleri) *in vitro* önemli ölçüde inhibe edilmiştir (Liu ve ark., 2018).

Kitosan, tekrar eden glukozamin ve N-asetil-glukozamin birimlerinden oluşan bir tür doğal polisakkarittir. Pozitif yüklü, toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen bir

polimer olarak kabul edilmektedir ve gen dağıtım vektörleri için uygun bir polimerdir (Thomas, ve ark, 2019). Ek olarak, kitosan muko yapışkandır. Mukus, tuz, lizozim, müsin gibi moleküllerin bir karışımı olup, fizyolojik durumda yüksek viskoelastik özellikler ve negatif yük, fiziksel bariyer oluşturarak etkili ilaç ve partikül geçirgenliği sergileyen ve ayrıca katyonik polimerler ile elektrostatik olarak etkileşime giren bir karışımdır. Muko yapışma ile kitosan, mukozal dağıtımda daha büyük potansiyel gösterir (Ways ve ark., 2018). Zhang ve arkadaşları, CRISPR/Cas9 iletimi için kitosanı mPEG ile birleştirmiştir. Bu nanokompleks, DNA'yı nükleaz sindiriminden ve nebulizasyondan koruma yeteneği göstermiştir, ayrıca PEGillenmiş kitosan, PEGilasyonsuz muko yapışkan kitosan kompleksleri ile karşılaştırıldığında, kistik fibroz mukusu dahil olmak üzere farklı mukus türlerinde penetrasyonu iyileştirmiştir (Zhu ve ark., 2018).

2.8. Gen Taşımada Zorluklar

Polimerik vektörlerin aracılık ettiği gen iletimi, çok aşamalı bir süreçtir. Nükleik asit materyali hedef bölgeye ulaşmadan önce aşılması gereken çok sayıda engel içermektedir (Rai ve ark., 2019). Şekil 2.11'de bu polimerik taşıyıcının hücreye alınımında temel süreçler gösterilmiştir. Buradaki hedef bölge, RNA molekülleri için sitozole, plazmitler için çekirdeğe karşılık gelmektedir. İlaç taşıyıcı sistemlerin aksine gen tedavisi ancak nükleik asit materyali hedefe ulaşabilirse uygulanabilmektedir. Bu nedenle, bir polimerik vektörün hücresel düzeyde karşılaşacağı ilk engel hücresel internalizasyondur. Polimerik vektörün hücresel internalizasyon mekanizması Kopatz ve arkadaşları tarafından modellenmiştir (Kopatz ve ark., 2004).



Şekil 2.11. Polimerik taşıyıcının hücreye alınımında temel süreçler

(A) elektrostatik etkileşimleri (B) hücresel içselleştirme, (C) endolizozomal kaçış, (D) nükleer translokasyon ve (E) polipeks ayrışmayı içerir (Lai ve Wong, 2018'den uyarlanmıştır).

Endositoz genellikle hücresel internalizasyonda önemli bir rol oynamaktadır. Nano taşıyıcılara özel bir endositik yol belirlemek zordur, çünkü endositik yol hücre tipine, hücre yüzeyinin moleküler bileşimine ve nano taşıyıcının fiziksel özelliklerine göre değişiklik göstermektedir (Marchini ve ark., 2009; von Gersdorff ve ark., 2006; D. Li, van Nostrum ve ark., 2017). Örneğin, lipopleksler hücreye klatine bağımlı yoldan girme eğilimindedir (Midoux ve ark., 2008); ancak, serum albümin ile kaplandıklarında kaveola aracılı endositoz yoluyla internalizasyona uğrar (Marchini ve ark., 2009). Polipeksler için hücresel alım mekanizması büyük ölçüde hücre tipi ve polimerin özelliklerine göre belirlenmektedir (Midoux ve ark., 2008). HepG2 hücrelerinde, PEI bazlı polipekslerin hücresel alımı klatine bağımlı yolla gerçekleşmekteyken (von Gersdorff ve ark., 2006), HeLa hücrelerinde bu polipeksler klatine bağımlı yol üzerinde daha çok kaveolar

aracılığıyla gerçekleşmektedir (von Gersdorff ve ark., 2006). Polipleksin boyutu ayrıca endositik mekanizmayı da etkilemektedir. 200 nm boyutundaki polipleksler, klatrine bağımlı yolu izleme eğilimindeyken, 500 nm'den büyük olanlar, klatriin bağımsız mekanizma yoluyla alınma eğilimindedir (Li ve ark., 2017).

Polipleksler, nükleer translokasyondan önce endozomal kaçışa girmek zorundadır (Martens ve ark., 2014). Endozomal kaçışın düşük etkinliği, etkili hücre içi gen iletimi için hücresel içselleştirmeye ikinci bir engel olarak kabul edilmektedir. Özellikle plazmid transferinin önündeki üçüncü engel, hücre iskeleti bileşenlerin önemli roller oynadığı sitozolik taşınmadır. Aktin, keratin ve vimentin ile rastgele bağlanma, plazmidin nükleus transferini büyük ölçüde tehlikeye atmaktadır (Vaughan ve Dean, 2006; Grosse ve ark., 2007; Vaughan ve ark., 2008). Son olarak, iletilen transgenin nükleer transferi, çekirdek ve sitoplazma arasındaki makromoleküler değişimini düzenleyen nükleer gözenek kompleksi (NPC) tarafından engellenebilmektedir (Kabachinski ve Schwartz, 2015).

2.9. Transfeksiyon Veriminin Artırılması

Hücre içi gen dağıtımının etkinliğini arttırmak çeşitli stratejiler bulunmaktadır. Poliplekslerin fiziksel özelliklerini modifiye edilmesi en yaygın başvuru stratejilerdendir. Fiziksel özelliklerde kolaylıkla modüle edilebilen iki ana özellik, polipleks boyutu ve polipleksin yüzey yüküdür. Polielektrolit kompleksleşmesi, polipleks oluşumunun önemli bir süreci oluşturmaktadır. Bu parametreler, daha küçük boyutlu ve daha pozitif zeta potansiyeline sahip polipleksler oluşturmak için nükleik asit yoğunlaşmasını kolaylaştırabilen, polimer yük yoğunluğunu artırarak basitçe manipüle edilebilmektedirler. Partikül şekli, hücre alımı ve kan dolaşımının süresi üzerindeki etkisi nedeniyle dikkate alınması gereken üçüncü parametredir (Lai ve He, 2016). Partikül şeklinin hücresel alım üzerindeki etkisi, en boy oranındaki bir artışla hücresel içselleştirme etkinliği azaltılan altın nanorodlarla gösterilmiştir (Qiu ve ark., 2010). Kan dolaşımının süresi ile ilgili olarak, Ghandehari'nin ekibi, intravenöz uygulamadan 6 saat sonra, farelerde PEG ile çubuk benzeri altın nanopartiküllerin plazma konsantrasyonunun, enjekte edilen dozun yaklaşık % 11'i olduğunu (Arnida ve ark., 2011), küresel şekilde olan ise yaklaşık %1 oranında bir sonuç aldıklarını göstermişlerdir (Arnida ve ark., 2011). Bu sonuç, molekül geometrisinin biyolojik performansla olan yüksek ilişkisini göstermektedir.

Polimerik parçacıkların geometrisini değiştirmeye yardımcı olabilecek tekniklerden biri, katman katman montaj yöntemidir (Alexander ve ark., 2015; Björnmalin ve ark., 2017). Uygun biriktirme koşullarının ve polimerlerin seçiminde, parçacıkların kimyasal, mekanik ve yüzey özelliklerinden yararlanılmaktadır (Chen ve ark., 2013). İstenilen geometriye sahip bir şablon yapılarak, parçacıkların şeklinin manipülasyonu da sağlanabilmektedir.

2.10. Polimerik Nanopartikül Kullanımıyla İlişkili Zorluklar

Diğer birçok viral olmayan vektörler gibi, PNP'lerin de güvenlik ve nano taşıyıcılar olarak stabilite açısından bazı zorlukları bulunmaktadır. Yeni nesil PNP'ler vektörler olarak klinik deneylere doğru yol aldıkça, bu zorlukların üstesinden gelmeye odaklanılmaktadır. Hücresel membran ile en iyi etkileşim için optimum şekle ve esnekliğe sahip olan ve genlerin yüklenmesi ve hedefleme parçaları için bölümlere ayırma sergileyen PNP'ler tasarlanmıştır. Sistemik toksisiteyi azaltmak için biyolojik molekülleri taklit eden PNP'ler oluşturulmaktadır (Zielinska ve ark., 2020).

Yukarıda bahsedilen zorluklara ek olarak, tüm nanoformülasyonlar için ortak görünen bir diğer önemli endişe, bunların güvenlik ve etkinliklerinin değerlendirilmesiyle ilişkili zaman ve maliyettir. Daha yeni polimerler kendi kendini yok eden biyolojik olarak parçalanabilen polimerler olduğundan, bunların *in vivo* metabolizmalarını ve eliminasyon yollarını açıklığa kavuşturmak çok önemlidir. Bu ayrıca formülasyon, geliştirme ve metabolit takibi için gereken çabalara ve kaynaklara katkıda bulunmaktadır (Deptula ve ark., 2015). Bu nedenle, bu alan sürekli olarak ilaç/gen dağıtımı için değer gösterse de birçok tasarım başarılı bir şekilde klinik çeviri aşamasına ulaşamamaktadır. Daha fazla işlevselleştirme, tümü daha yüksek maliyet, geliştirme süreleri ve düzenleyici engellerle ilişkili olan daha karmaşık reaksiyon kimyaları, bozunma ürünleri için ayrıntılı izleme ihtiyacı ve daha katı süreç tasarım parametreleri anlamına gelmektedir. Üstelik, bu formülasyonlar piyasaya sürüldüğünde, genellikle çok pahalıdırlar. Onaylandıktan hemen sonra jenerik muadilleri başlatmak ve bu teknolojiler için hükümet ve özel ilaç planlarını devreye sokmak, onları genel hasta popülasyonu için daha erişilebilir hale getirecektir (Rai ve ark., 2019).

2.11. Elektrolit ve Proteince Zengin Biyolojik Ortamda PNP'lerin Stabilitesi

Katyonik polimerler ve genetik malzemeler arasında oluşan polipleksler elektrostatik etkileşimlere dayanmaktadır. Katyonik polimerlerin moleküler ağırlığı, hidrofilikliği, yüzey yükü ve yapısı gibi faktörler taşıyıcının etkinliğini tanımlamaktadır (Bolhassani ve ark., 2014). Yaygın PNP'ler arasında PLA (parçalanabilir) ve PMMA (parçalanamaz), FDA tarafından insan kullanımı için onaylandıklarından en dikkat çekici polimerlerdendir (Oh, 2011). Lazzari ve arkadaşları farklı özelliklere dayalı olarak simüle edilmiş biyolojik ortamda bu polimerlerin koloidal stabilitesini analiz etmişlerdir. PLA NP'leri, sentetik mide suyunda yüksek derecede topaklanma ve ortalama partikül boyutu dağılımında %20'lik bir artış gösterirken, PMMA NP'ler stabil kalmıştır. Bu, iki formülasyonun yüzey yük yoğunluklarındaki (yani zeta potansiyelleri) farklılık nedeniyle bu şekilde bir sonuç gösterdiği tahmin edilmiştir. NP'ler dolaşım sırasında toplanırsa, pıhtılaşma riski artar ve ilacın genel salınımı tehlikeye girmektedir. PMMA NP'ler, daha yüksek yüzey yükleri nedeniyle PLA NP'lere kıyasla serum ve diğer organ homojenatlarında daha yüksek stabilite göstermiştir (Lazzari ve ark., 2012).

Biyolojik sıvılardaki PNP stabilitesini kontrol eden bir diğer önemli parametre, yüzeyin hidrofobikliğidir. Örneğin, N-izopropil-akrilamid ve N-üçüncül bütillakrilamid kopolimer partiküllerinin daha az hidrofobik bir versiyonu, apo-lipoproteinler, albümin ve fibrinojen dahil protein serilerini bağlayan daha hidrofobik bir versiyona kıyasla yüzeyde protein bağlanmasını engellemiştir ve fagositik yıkım riskini artırmaktadır (Cedervall ve ark., 2007). Diğer birçok NP'den farklı olarak, PNP'ler için zorluklardan biri, polimerlerin hidrofobikliğini değiştirmek için yapılan çalışmaların, PNP'nin boyut, yüzey yükü ve bileşimi olumsuz etkilemeden çok zor olmasıdır (Aggarwal ve ark., 2009). Serum açısından zengin ortamdaki bazı NP'lerin kararsızlığına rağmen, diğer organik ve inorganik NP'ler ile konjuge edildiğinde az sayıda polimer, taşıyıcının genel stabilitesini geliştirir ve kan dolaşımı sırasında opsonizasyonu azaltır. Pek çok NP formülasyonu için uygulamaya konan tipik bir örnek PEGilasyondur. PEG'nin yüzeye bağlanması, proteinlerle rastgele etkileşimleri etkili bir şekilde azaltarak, immün hücreler tarafından tanınması ve boşaltım organları yoluyla uzaklaştırılmasının önüne geçilerek, NP'lerin dolaşım süresini uzatmaktadır (Otsuka ve ark., 2012).

2.12. Polimerik Nanopartiküllerin Birikimi ve Toksisitesi

Parçalanamayan polimerlerden yapılan PNP'ler organlarda, özellikle de karaciğer ve dalakta birikerek toksisiteye yol açma eğilimindedirler (Owens ve Peppas, 2006). İlaç dağıtımı amacıyla en çok araştırılan örnek, glikoz bazlı bir polimer olan dekstran'dır (Bisht ve Maitra, 2009). Bu taşıyıcı üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalar yoluyla anafilaksi, aşırı hacim yüklenmesi, pulmoner ve serebral ödem ve trombosit disfonksiyonu dahil ciddi alerjik reaksiyonlar bildirilmiştir (Sharma ve ark., 2012). Dekstran ayrıca akut böbrek yetmezliğine yol açan güçlü bir ozmotik etki sergiler ve bu nedenle kullanımı böbrek yetmezliği ve diabetes mellituslu hastalarda kontrendikedir (Brooks ve ark., 2001).

PLL, viral olmayan gen vektörü olarak kullanılan katyonik polimerden biridir (Trubetskoy ve ark., 1992). Modifiye edilmemiş PLL, yüksek *in vitro* toksisitesi göstermektedir ve hücre canlılığını % 50'ye kadar düşürmektedir (Choi ve ark., 1998). Bu taşıyıcının biyouyumluluğunu iyileştirmek için çok sayıda çalışma yapılmıştır. PLL'nin % 5-25 mol arasında değişen PEG ile kaplanması transfeksiyonu ve 96 saate kadar biyouyumluluğu iyileştirmiştir (Choi ve ark., 1998).

Polietilenimin (PEI), gen iletimi için kullanılan bir başka öncü polimerdir. Genetik materyalleri yoğunlaştırabilen ve transfeksiyon etkinliğini artırmak için hücre içi endozomal kaçışa izin verebilen bir nanopartiküldür (Lungwitz ve ark., 2005). Bu katyonik polimer ayrıca yapıya (doğrusal veya dallanmış) ve moleküler ağırlığa (Godbey ve ark., 1999; Kunath ve ark., 2003) bağlı olarak önemli toksisite göstermiştir. Düşük moleküler ağırlık ve orta derecede dallı tasarım, doğrusal PEI'ye kıyasla genellikle daha güvenli kabul edilmektedir (Kunath ve ark., 2003). Bununla birlikte, literatürde, dallanmış PEI'nin doğrusal PEI'ye kıyasla daha düşük IC₅₀ değerlerine sahip olduğunu göstermektedir (Kafil ve Omid, 2011). Dahası, yüzeydeki birincil aminlerin sayısı ve dolayısıyla yüzey katyonik karakteri, hematolojik uyumluluk ve sitotoksisite ile doğru orantılıdır (Kafil ve Omid, 2011). Serbest formda PEI, negatif yüklü serum proteinleri ve kırmızı kan hücreleri ile etkileşime girerek plazma membranını stabilize edebilir ve ani toksisiteye yol açabilir (Fischer ve ark., 1999). Genetik materyallerle kompleks oluşturdukça, bu etki azalır, ancak kargo taşındığında ve serbest PEI'ler boşaltım için kanda tekrar belirdiğinde geri yüklenebilir. Serbest PEI ayrıca hücresel bileşenlerle

etkileşime girer ve normal süreçlere müdahale eder (Godbey ve ark., 2001; Hosseinkhani ve ark., 2015). PEI NP'lerin PEGilasyonu, güvenlik profillerini iyileştirmek için sunulan yaklaşımlardan biridir. % 6 ve % 10 ağırlık oranlarında PEG konjugasyonu, sitotoksisteyi önemli ölçüde azaltmıştır ve genlerin kaslara lokal olarak iletilmesine yardımcı olmuştur. Bu çalışmayla, yüzeyde daha yüksek PEG oranının daha iyi güvenlik sergilediği gösterilmiştir (Hong ve ark., 2004). Serbest PEI'nin toksisitesini azaltmaya çalışan bir başka yaklaşım, PEI/DNA polipekslerinin lisinile, histidile ve arginile kolesterol ile kaplanmasıdır (Song ve ark., 2012).

Yeni tip PNP'ler, bir çekirdeğe, bir iç kabuğa ve bir dış kabuğa sahip tekrar tekrar dallanmış büyük küresel yapılar olan dendrimerlerdir (Mintzer ve Grinstaff, 2011). PAMAM, kemoterapötik ve viral olmayan DNA iletim aracı olarak kullanılan çok iyi bilinen dendrimerlerden biridir (Svenson ve Tomalia, 2005; Medina ve El-Sayed, 2009; Masotti ve ark., 2016) Amin ile sonlandırılan pozitif yüklü PAMAM dendrimerleri, hücre zarını destabilize ederek sıçan kan hücrelerinde hemoliz sergilemiştir (Jevprasesphant ve ark., 2003). Bu taşıyıcının mükemmel teslimat yetenekleri nedeniyle, bu güvenlik sorununu aşmak için birçok yaklaşım değerlendirilmiştir. Böyle bir yaklaşım, terminal amin işlevselliklerinin tipini değiştirmektir. Birincil aminlerin ikincil veya üçüncül aminlerle değiştirilmesi, bu taşıyıcının sitotoksitesini azaltmıştır (Jevprasesphant ve ark., 2003) PAMAM dendrimerlerinin yağ asidi fonksiyonelizasyonu veya PEGilasyonu tüm konjugatın sitotoksitesini azaltmıştır (El-Sayed ve ark., 2002). Hidroksil veya meth-oksi sonlu dendrimerlerin diğer muadillerinden nispeten daha güvenli olduğuna da düşünülmektedir (Sharma ve ark., 2012).

Birçok PNP'nin fizyolojik davranışı da büyük ölçüde kapsüllenmiş yüke bağlıdır, çünkü bu parametre doğuştan gelen boyutunu, yükünü, kararlılığını ve diğer fizikokimyasal özelliklerini değiştirmektedir. Örneğin, çeşitli oranlarda bir deneme ilacı "KU50019" içeren PEG-PLGA NP'ler, farklı partikül boyutları vermiştir. Daha küçük ilaç kapsüllü PNP'ler, büyük partiküllere göre daha yüksek ince bağırsak toksisitesi göstermiştir (Caster ve ark., 2017).

2.13. Polimerlerin Oksidatif Parçalanması Toksik Metabolitlerin Oluşumu

Yaygın biyolojik olarak parçalanabilen polimerler genellikle güvenli olarak kabul edilir, ancak vücutta polimer bozunma ürünlerinin birikmesinden kaynaklanan kısa vadeli veya

uzun vadeli toksisite hakkında toplanan birtakım veriler bulunmaktadır. Ayrıntılı bir çalışma, PLGA, poli-kaprolakton (PCL) ve poli (laktit-ko-kaprolakton) (PLCL) gibi bazı polimerlerin *in vitro* toksisitesini, bu tür metabolitler yoluyla indüklenen sitotoksisite mekanizmaları incelenerek araştırılmıştır (Singh ve Ramarao, 2013). Çalışmada, yukarıdaki tüm polimerlerin, makrofajlar, hepatositler, akciğer ve böbrek epitel hücreleri ve nöronal hücreler dahil olmak üzere sağlıklı hücrelere konsantrasyona ve zamana bağlı hasar gösterdiği sonucuna varılmıştır (Singh ve Ramarao, 2013). Bu sonuçların *in vivo* senaryolara tahmin edilip edilemeyeceği tartışmalıdır. İnsan vücudu bu tür metabolitleri çeşitli yollarla ortadan kaldırabilir (örneğin, laktat Krebs döngüsüne girebilir) ve bu da genel sistemin biyoyumluluğunu korumaktadır (Forrest ve Kwon, 2008; Jain ve ark., 2011; Prencipe ve ark., 2009). PLGA, en yaygın kabul gören FDA onaylı biyolojik olarak parçalanabilir polimerdir (Jain, 2000; Sharma ve ark., 2012). PLGA'nın bozunma ürünleri vücut tarafından kolaylıkla metabolize edilip elimine edilmesine ve bu nedenle sistemik toksisite sınırlı olmasına rağmen, büyük ölçüde laktid/glikolid bileşenlerinin oranına ve toplam moleküler ağırlığa bağlıdır (Anderson ve Shive, 2012; Jain, 2000; Sharma ve ark., 2012). Fare modellerinde gerçekleştirilen PLGA NP'ler için toksisite testleri doku hasarı göstermemiş, ancak oral uygulamayı takiben karaciğerde % 40 retansiyon göstermiştir (Semete ve ark., 2010). Çoğu çalışma, PLGA NP'lerin dokularda belirli bir dereceye kadar birikme eğiliminde olsalar da yüzey özelliklerinden bağımsız olarak çok sınırlı sitotoksisite veya inflamatuvar yanıtlar gösterdikleri sonucuna varmaktadır. Bununla birlikte, çoğu zaman gen terapisinde PLGA'nın kullanımı, gen transfeksiyonunu iyileştirmek için daha fazla işlevselleştirme gerektirmektedir. Bu onların doğuştan gelen güvenlik profillerinde değişikliklere yol açabilmektedir. Şimdiye kadar, PLGA NP'lerin ikincil polimerler dahil diğer aktif moleküller ile işlevselleştirilmesinin, doğuştan gelen biyoyumluluğu hiçbir etkiye sahip olmadığı veya tamamladığı görülmüştür. Örneğin, PLGA NP'lerin PEGilasyonunun, alt hücrel organel hedefli iletimi iyileştirdiği, rasgele maruz kalmayı ve polimer komplekslerinin birikimini en aza indirerek güvenliğini tamamladığı gösterilmiştir (Savić ve ark., 2003; Moore, 2014).

2.14. Polimerik Nanopartiküllerin Biyolojik Dağılımı ve Hücrel Etkileşimi

PNP'ler, birden fazla biyolojik engelin üstesinden gelebilir ve terapötik yüklerinin salınmasını kontrol edebilmektedirler. Bu faktörler, vücudun savunma mekanizmalarının üstesinden gelme yeteneğini tanımlamaktadır ve bileşim, konfigürasyon, boyut, çekirdek

özellikler ve yüzey işlevselleştirme (PEGilasyon, yüklü kısımlar ve hedefleme ligand işlevselleştirme) gibi özelleştirilebilir fizyokimyasal özellikleri içermektedir (Link ve ark., 2015). NP'lerin biyolojik çevre ile etkileşimi esas olarak opsonizasyondan etkilenmektedir. Burada kan serumunda bulunan opsonin proteinleri etkileşime girer ve NP'leri mononükleer fagositik sistemdeki (MPS) makrofajlara maruz bırakarak biyolojik sistemden uzaklaştırılmalarını tetiklemektedir (Owens ve Peppas, 2006). Opsonizasyondan sonra, yabancı materyalin kan dolaşımından yutulmasını ve yok edilmesini içeren fagositoz meydana gelmektedir. Fagositler tarafından elimine edilemeyen PNP'ler MPS organlarında (karaciğer ve dalak) tutulur. Burada, biyolojik olarak parçalanamayan PNP'ler durumunda, bu hedef organlarda birikimin negatif sonuçlara yol açabileceğine dikkat etmek önemlidir (Peracchia ve ark., 1999; Wani, ark., 2020; Fam ve ark., 2020)

NP'lerin opsonizasyonundan tamamen kaçınmak için açık stratejiler bulunmamaktadır. Bununla birlikte, son 40 yılda bu alanda yapılan önemli araştırmalar, genel kan dolaşımı yarı ömrünü ve uygulama sisteminin etkinliğini artırmak için kalıplar ve yöntemler belirlemiştir. Örneğin araştırmalarda, hidrofobik partiküllerin opsonizasyonunun, bu yüzeylerdeki serum proteinlerinin artmış adsorpsiyonundan dolayı hidrofilik muadilleriyle karşılaştırıldığında daha hızlı olduğuna dair kanıt sağlamaktadır (Carrstensen ve ark., 1992; Wani ve ark., 2020). Hidrofilik NP'ler için, *in vitro* çalışmalar yüzey yükü ile opsonizasyon arasında bir korelasyon kurmuştur, bu da nötr olarak yüklü parçacıkların yüklü parçacıklardan çok daha düşük bir opsonizasyon oranına sahip olduğunu göstermektedir (Roser ve ark., 1998).

2.15. COX-2 Geni

Prostaglandin-endoperoxid sentaz (PTGS), aynı zamanda siklooksijenaz (COX) olarak da bilinen prostaglandin biyosentezinde anahtar rol oynayan bir enzimdir ve hem dioksijenaz hem de peroksidaz olarak görev yapmaktadır. COX'lar, ateş ve ağrıya duyarlılık gibi süreçlerde yer alan biyoaktif bileşiklerin üretimindeki hız sınırlayıcı adımı katalize etmektedir ve aspirin benzeri ilaçların hedefinde olan proteinlerdir (Chandrasekharan ve Simmons, 2004). Prostaglandin biyosentezi için gerekli olan COX enzimi, Siklooksijenaz-1 (COX-1) ve Siklooksijenaz-2 (COX-2) olmak üzere iki izoformdan oluşmaktadır. COX'lerin tümü yaklaşık 600 amino asit büyüklüğündedir ve

benzer bir birincil yapıya sahiptirler (Michael ve ark., 2002; Simmons ve ark., 2004). COX-1, memeli doku ve hücrelerinde her yerde eksprese edilirken, COX-2 sitokinler ve büyüme faktörleri gibi birçok uyarıcı tipinden biri tarafından indüklenir ve genellikle memeli dokularında COX-1'e göre düşük seviyelerde ifade edilmektedir (Van ve ark., 2002).

PTGS2 veya COX2 geni, enzim yapıda protein kodlayan bir gendir (NCBI, Gene ID:5743) ve PTGS2, prostaglandin biyosentezinde hem dioksijenaz hem de peroksidaz olarak görev yaparak araşidonik asidin son ürünü olan Prostaglandin-E2 (PGE2)'ye dönüştürülmesinde önemli rol oynayan bir enzimdir. PTGS2 enzimi araşidonik asidin Prostaglandin-G2'ye, ardından Prostaglandin H2'ye dönüşümünü katalizle edilir ve bu ürün izomeraz enzimleri tarafından Prostaglandin-E2'ye dönüştürülmektedir. PGE2, hücrel hayatta kalımı aktive eden Nükleer Faktör-kappa B (NF-kB) sinyal yolağındaki transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini arttırmaktadır. Aktive olmuş NF-kB sinyal yolağı ise Bcl2 anti-apoptotik proteininin ekspresyonunu arttırarak apoptozun inhibe edilmesine yol açmaktadır. Böylece, anormal şekilde ekspresyonu artan PTGS2 ifadesi, PGE2 miktarını arttırarak karsinogeneze dolaylı yoldan katkı sağlamaktadır (Park ve ark., 2006). COX-2, büyüme faktörleri ve IL1 β , IL6 veya TNF α gibi farklı sitokinler tarafından düzenlenen ve bu nedenle inflamasyon sırasında aşırı eksprese edilen indüklenabilir bir izoformdur (Ramsay ve ark., 2003). COX-2 geni, kromozom 1 üzerinde bulunur ve promotörü, bir NFkB yanıt elementinin yanı sıra diğer sitokine bağımlı (yani, IL6) yanıt elementleridir (Chandrasekharan ve Simmons, 2004). COX-2 proteini, COX-1 ile %60 homoloji göstermektedir. COX-2, bir C-terminal uzantısı ve Non steroidal antienflamatuar ilaçlar (NSAID)'ler için farklı bir bağlanma bölgesi sunmaktadır, bu da COX-2'yi COX-1'e kıyasla tercihli bir hedef haline getirerek, daha düşük dozlarda spesifik olarak inhibe edilmektedir (Hinz ve Brune, 2002).

COX-2'nin solid tümör tiplerinde ifade edildiğine dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Karsinogenezin ilk evrelerinde, COX-2 proteinin hücrel ifadesi, tümör gelişimi ve invaziv tümör büyümesi yoluyla arttığı gözlemlenmiştir (Ogino ve ark., 2008). COX-2 ifadesinin kolorektal kanser, safra yolu kanseri ve meme kanseri ile de ilişkili olduğu bulunmuştur (Cox ve ark, 2004; Li ve ark., 2009).

COX-2 geni, endotelyal hücreler tarafından az miktarda eksprese edilebilmektedir. Protein ekspresyonunun artırılması için sitokinler, büyüme faktörleri ve tümör destekleyicileri kullanılarak yüksek oranda COX-2 ekspresyonu gerçekleştirilmektedir ve anjiyogenez üzerinde önemli etkilere sahiptir (Caughey ve ark., 2001; Eligini ve ark., 2005; Syeda ve ark., 2006).



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

Cihaz	Markası
Laminar Akışlı Kabin (Class II Dikey Hava akışlı)	B-Science B-Safe150a
Inverted Floresan Mikroskop	LEICA DMi8
CO2’li İnkübatör	N-BIOTEK NB-203
Soğutmalı Masaüstü Santrifüj	Nüve NF800R
Soğutmalı Mikrosantrifüj	Hettich UNIVERSAL 320 R
Cell Counter	Invitrogen Countess 3 FL
Zetasizer	Horiba
FTIR	IRAffinity-1
SpeedVac	Thermo Scientific DNA120
Western blot Sistemi	Bio-Rad
Kemilüminisans Jel Görüntüleme Sistemi	Bio-Rad
Soğutmalı İnkübatör	ZHWY-211C
Etüv	Memmert
Çeker Ocak	Fume Cupboard 120 cm

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve markaları Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar

Kullanılan Sarf	Kullanılan Sarf
Agar	LB Broth Base
Agaroz	EDTA
Tripton	DNA Ladder
Tris	DMEM
Potasyum Klorür	FBS
Sodyum Klorür	Tripsin-EDTA
Gliserol	L-glutamin
Maya ekstrakt	Ampisilin
BSA	Etilendiamin
DMSO	Bisfenol A Etoksilat
DTT	Potasyum Asetat
Metanol	Kalsiyum Klorür
Etanol	Potasyum Klorür
Endotoksin-Free Plazmid DNA Saflaştırma Kiti	Mangan Klorür
Asetik Asit	Gliserol
HCl	Sodyum Dodesil Sülfat
Puromisin	Brom Fenol Blue

3.1.3. Kullanılan çözeltiler

Amfisilin Antibiyotiği: 1 gram ampfisilin alınarak 10 ml saf suda çözülmüştür. Antibiyotik steril 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek mikrotüplere bölündü ve derin dondurucuda (-20°C) saklanmıştır.

FSB çözeltisi: 100 g gliserol, 7.5 g CaCl₂.2H₂O, 7.4 g KCl, 10 mL 1 M (pH:7.5) KCH₃COO alınarak pH:6.5'e ayarlanmıştır ve hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır ve otoklavlanmıştır.

LB çözeltisi: 20 g LB (Luria-Bertani) Broth Base 1000 ml suda çözöldü. Hazırlanan 1000 mL'lik çözelti 250'er mL olacak şekilde iki tane stok şişesine alınmıştır ve üzerine 3.75 g agar ilave edilip karıştırılmıştır, otoklavlanmıştır.

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

Etilendiamin tetra asetik asit (0,5 M pH 8 EDTA): 186,1 gr Na₂EDTA.2H₂O 700 mL saf suda çözöldükten sonra pH'sı 1 M NaOH ile 8'a ayarlanarak toplam hacim saf suyla 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Tris Asetat EDTA (50xTAE) tamponu: 242 gr Tris, 57.1 mL glasiyel asetik asit, 100 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) bir miktar suda çözöldükten sonra pH'sı glasiyel asetik asitle 8.5'e ayarlanarak toplam hacim saf suyla 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Örnek yükleme boyası (6x): 25 mg bromfenol mavisi ve 3 mL gliserol karıştırılarak toplam hacim distile suyla 10 mL'ye tamamlanmıştır.

SDS Elektroforez Jeli:

Alt Tampon: 182 g Tris (1.5 M), 4 g SDS (% 0.4) 1000 mL saf suda çözölerek pH:8.8 olarak ayarlanmıştır.

Üst Tampon: 60.5 g Tris (1.5 M), 4 g SDS (% 0.4) 1000 mL saf suda çözölerek pH:6.6 olarak ayarlanmıştır.

Yürütme jeli: 2.7 mL % 40 akrilamid, 2.25 ml alt tampon, 4 ml su, 50 µL %10 APS ve 20 µL TEMED.

Yükleme jeli: 0.35 mL % 40 akrilamid, 1 mL üst tampon, 2.55 ml su, 50 µL %10 APS ve 10 µL TEMED. Tüm maddeler katılmıştır ve en son TEMED eklenip kasete dököldü. Yürütme jeli polimerleştikten sonra üzerine yükleme jeli dököldü ve polimerleşmesi beklenmiştir.

Elektroforez Tamponu (1X): 3 g Tris, 14.4 g Glisin, 1 g SDS bileşikleri son hacim 1000 mL olacak şekilde saf su eklenerek hazırlanmıştır.

SDS Örnek Yükleme Tamponu (5X): 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- Merkaptoetanol), 1000 µL % 1'lik Bromfenol mavisi ve 0.9 mL saf su karışımından hazırlanmıştır.

SDS Jel boyama (Staining) Çözeltisi: 0.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 ml metanol içerisinde çözülüp filtre kâğıdından süzöldükten 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

Amonyum Persölfat (APS-%10): 0.1 g APS 1 mL saf su içerisinde çözölkerek hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Yapılan çalışmanın özeti

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında ilk olarak CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak susturulması hedeflenen COX-2 geni için sgRNA içeren plazmid siparişı verilmiştir. Ardından polimerik nanopartiköl transfeksiyon ajanının çalışmaları ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon ajanı oluşturulduktan sonra ilk olarak Addgene firmasından temin edilen PX601-GFP plazmidile transfeksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon işlemi sonucu elde edilen hücreler floresan mikroskop ile görüntölenerek optimum transfeksiyon koşulları belirlenmiştir. Bu işlemler tamamladıktan sonra COX-2 genini susturmak için transfeksiyon işlemi yapılmıştır. HUVEC hücreleri yetiştirilerek yeterli çoğunluğa geldikten sonra tez kapsamında hazırlanmış olan nanopolimer esaslı transfeksiyon ajanı ve CRISPR/Cas9 vektörü ile muamele edilerek hücreler büyötmeye bırakılmıştır. Ardından HUVEC hücrelerinden total protein izolasyonu gerçekleştirilerek genom-düzenlemenin gerçekleşip gerçekleşmediği Western blot analizi ile gerçekleştirilmiştir. Son olarak COX-2 geninde yapılan genom değişikliğinin hücre migrasyonu üzerine etkisine bakılarak genom değişikliği yapılmamış hücre ile karşılaştırılmıştır.

3.2.2. Biyoinformatik çalışmaları ve CRISPR/Cas9 plazmidinin oluşturulması

Gen susturma plazmidinin oluşturulması

COX-2 gen sekansını knock-out yapmak için Santa Cruz firmasının ticari olarak sunduğu COX-2 CRISPR/Cas9 KO Plasmid (h2) isimli ve sc-400072-KO-2 kodlu hazır vektör kullanılmıştır.

3.2.3. FSB'li kompetant hücre hazırlanması

- 50 mL steril LB (Luria Bertani-LabM) besi yeri bulunan iki tane erlene gece inkübasyona bırakılan kültürden birer mL alınarak eklendi ve hücreler 37 °C ve 250 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.
- Optik yoğunluk, 600 nm'de absorbans yaklaşık olarak 0.7 olduğunda erlenler inkübatörden alınmıştır ve +4°C 5 000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Süpernatant atılmıştır. Pelet üzerine 50 mL soğuk FSB (dondurulmuş saklama tamponu) çözeltisi eklenir, çok iyi vortekslenmiş ve sonrasında 1 saat buz banyosunda bekletilmiştir.
- 1 saatin sonrasında; +4 °C, 4 000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılmıştır. Pelet üzerine 8 mL soğuk FSB çözeltisi eklenmiş ve tüpe vurarak çözünme sağlanmıştır.
- Peletin tamamı çözününce üzerine 560 µL DMSO (Sigma) eklenerek, 3 saat buza gömülmüştür. 3 saatin sonrasında kompetent hücre hazır hale gelmiştir (Sambrook ve Russell, 2006).

3.2.4. PX601-GFP plazmidinin *E. coli* Dh5α hücrelerine transformasyonu

PX601-GFP plazmidinden fazla miktarda etmek için px601 vektörünün *E. coli* Dh5α hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir.

- -80°C'den buz banyosuyla alınacak kompetent hücrelerden 200 µL'le alınarak üzerine 1 µL px601 vektörü eklenerek ve karıştırılarak 1 saat buz banyosunda ligasyon karışımı bekletilmiştir.
- Ligasyon karışımı 1 saatin ardından 2 dakika 42 °C'de ısı şokuna maruz bırakılmıştır.
- Ardından tekrar buza gömülerek 5 dakika bekletilmiştir.
- Hücrelerin üzerine 250 µL LB besiyeri eklenerek hücreler 30 dakika 37 °C ve 240 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.

Yarım saatin ardından her bir mikrotüp ampisilin içeren antibiyotikli petriye sprader ile yayılmıştır ve 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır (Froger ve Hall, 2007).

3.2.5. PX601-GFP plazmidinin *E. coli* Dh5a hücrelerinden endotoksin-free kit kullanılarak saflaştırılması

Petrilerden elde edilen koloniler px601 vektör sistemi için amfisilin içeren 4 mL’lik steril sıvı LB içerisine tek koloni olarak inoküle edildikten sonra 37 °C’de gece boyu inkübe edilerek yetiştirilmiştir. Santrifüjle mikrotüp tüplerine toplanan hücrelerden plazmit DNA “Geneaid Presto Mini Plasmid” kiti kullanarak aşağıdaki protokole göre saflaştırılmıştır. Protokol aşağıdaki gibidir:

Hücrelerin toplanması

- Bakteriyel hücre kültürü 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne transfer edilerek 1dk oda sıcaklığında 15 000 rpm’de santrifüj yapılacak ve süpernatant tamamen dökülmüştür.

Resüspansiyon

- 200 µL PE1 Tamponu eklenerek pelet iyice karıştırılır (vorteksle) ve tampon-pelet karışımı oda sıcaklığında 2 dk beklenilmiştir.

Hücre Parçalanması

- Karışıma 200 µL PE2 Tampon eklenerek karışım nazikçe 10 defa alt üst edildikten sonra 2 dk oda sıcaklığında beklenilmiştir.

Nötralizasyon

- Karışıma 200 µL PE3 eklenerek karışım nazikçe ve hızlı bir şekilde 10 defa karıştırmış ve oda sıcaklığında 1 dk beklenilmiştir.
- 15 000 rpm’de 6dk santrifüj gerçekleştirilecektir.
- Santrifüjden sonra süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.

Endotoksin Kaldırma

- Mikrosantrifüj tüpündeki lizata 60 µl PE4 Tamponu (kırmızı endotoksin giderme solüsyonu) eklenerek vorteks işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Karışımını 5 dakika buz üzerinde inkübe edildi ve ardından 65 °C’de 5 dakika su banyosunda bekletildi.

- 5 dakika boyunca 15.000 rpm'de santrifüjlendi.
- Tüpün dibinde küçük bir kırmızı pelet oluşmuştur, süpernatantı kırmızı peleti bozmadan yeni bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarımı gerçekleştirildi.

DNA Bağlanması

- Süpernatanta 350 µl PE5 Tamponu eklendi ve vortekslendi.
- 2 ml'lik Toplama Tüpüne bir PDH Kolonu yerleştirildi.
- 700 µl numune karışımını PDH Kolonuna aktarıldı.
- Süpernatant PDH Kolon konulup 30 saniye 15 000 rpm'de gerçekleştirilmiştir.

Yıkama

- Alttaki sıvı atılarak kolona 600 µL “Yıkama Solüsyonu” eklenerek ve 2 dk 15000 rpm 'de gerçekleştirilecektir.
- Alttaki sıvı atılarak kolon aynı tüpe tekrar konulmuştur.
- Yıkama Solüsyonu'ın kalan miktarını çıkarmak için ek olarak 3dk daha santrifüj yapılmıştır.
- Kolon 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne konularak, kolonun tam merkezine 50 µL steril saf su eklenmiş ve 60°C'de 2 dk beklenilmiştir.
- 15000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılarak plazmit DNA'ların saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Polimer sentezi

Tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen PBAE polimeri bisfenol-A-etoksilat diakrilat ve etilendiamin arasında çözücü/çöktürme yöntemine göre Michael katılma reaksiyonu ile EP2995318 başvuru numarası ve “Synthesis of nanoparticulate gene carrier systems based on poly(beta-aminoesters)” başlıklı patent başvurusunda açıklandığı gibi sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Patent başvuru ve araştırma süreçleri devam ettiğinden 551 sayılı “Patent Haklarının Korunması Hakkında Kanun Hükmünde Kararname” ye göre ürünlerin sentezlenmesine ait deneyler ayrıntılı olarak sunulamamıştır.

3.2.7. Polimer sentezinin Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile analizi

FTIR spektroskopisi, özellikle organik ve polimerik malzemeleri tanımlamak için kullanılan analitik bir tekniktir (Nichols ve ark., 1985). Bu tez kapsamında sentezlenen polimerin yapısının aydınlatılması için FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Tüm ürünlerin yapılarının aydınlatılması için, FTIR analizleri FTIR cihazında, 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında kaydedilmek suretiyle analiz edilmiştir. FTIR sonuçları Şekil 4.2’de verilmiştir.

3.2.8. P β AE polimerinden nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin hazırlanması

Sentezlenen polimerden 2 mg alınarak 2 mL DMSO da çözülmüştür. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması ve oluşan nanopartiküllerin büyüklüğünün belirlenmesi için ilk olarak nanoçöktürme metodu ile plazmid içermeyen nanopartiküller hazırlanmıştır. Çeşitli hacimlerde polimer çözeltisi soğuk ultrasaf su içerisine damla damla eklenerek hızlıca vortekslenmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin partikül boyutu, partikül boyut dağılımı ve zeta potansiyel değerleri belirlenmiştir.

3.2.9. Nanopolimerin zeta potansiyeli ve partikül boyut analizi

Sentezlenen nanopolimerik transfeksiyon ajanının zeta potansiyeli ve partikül büyüklüğünün analiz edilmesi için zetasizer (Horiba) cihazı kullanılmıştır. Zeta potansiyeli, nanopartikül yüzeyindeki etkili elektrik yükünün bir ölçüsüdür ve yüklerin miktarını belirler. Bir nanopartikül net bir yüzey yüküne sahip olduğunda, yük, nanopartikül yüzeyinin yakınında zıt yüklü iyonların konsantrasyonu ile taranmaktadır. Bu zıt yüklü iyon tabakası nanoparçacık ve tabaka ile hareket eder. Zeta potansiyeli, içinde bir parçacığın dağıldığı hacimli sıvı ile nanoparçacık yüzeyiyle ilişkili karışık yüklü iyonları içeren sıvı katmanı arasındaki potansiyel farkının bir ölçüsüdür (Mahmood Aljamali, 2015; Selvamani, 2018). Zeta potansiyelin ve partikül boyutu analizi Şekil 4.4 ve Tablo 4.2’de verilmiştir.

3.2.10. Saflaştırılan plazmidin konsantre hale getirilmesi

Saflaştırılan plazmidin 1 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde Thermo-speedvac marka cihazda konsantre edilmiştir. Saflaştırılan plazmid mikrosantrifüj tüpünde 2 saat 50 °C derecede bu işleme tabi tutulmuştur.

3.2.11. Sentezlenen P β AE temelli transfeksiyon ajanının plazmid tutma kapasitesinin belirlenmesi

Uygun oran (200-1300) belirlendikten sonra polimerik nanopartiküllerin plazmit tutma kapasitesi belirlenmiştir. Bu işlem için farklı oranlarda plazmit DNA ve polimer kullanılarak nanoçöktürme tekniği ile nanopartiküller hazırlanmıştır. Yükleme etkinliği ortama eklenen plazmid ile nanopartikül formülasyonuna yüklenen plazmidin miktarları kullanılarak gözlemlenmiştir. Plazmidin ne kadar nanopartiküle yüklendiği ve oranı agaroz jel elektroforezinde belirlenmiştir. Tablo 9’da belirlenen oranlara göre bu deney gerçekleştirilmiştir. Mikrosantrifüj tüpleri alınarak bir tüplere Tablo 3.3’te belirtilen oranlarda plazmid ve nanopolimer konuldu. Bu karışım 30 dakika ışık almayacak şekilde bekletildi. Bu sürenin sonunda Tablo 3.3’te belirtilen miktarlarda distile suların konulmuş olduğu mikrosantrifüj tüplerine polimer plazmid karışımı damla damla eklendi ve vorteks işlemi gerçekleştirildi. Tüm örnekler % 1’lik agaroz jelde 130 Voltta 20 dakika yürütülerek analiz edilmiştir.

Tablo 3.3. P β AE temelli transfeksiyon ajanının plazmid tutma kapasitesinin belirlenmesi için kullanılan plazmit DNA, polimer oranları

ÜRÜN OSMOLARİTESİ	ÜRÜN	SIRA	ORAN	POLİMER MİKTARI (μL)	DİSTİLE SU (μL)	GEN
	GEN	1	0:1	-	8	
	POLİMER 1 (1:0)	2	1:0	1	6,5	
	PβAE ÖRNEK ORANI	3	2:1	2	13	1
		4	3:1	3	19,5	1
		5	5:1	5	32,5	1
		6	7:1	7	45,5	1
		7	10:1	10	65	1
		8	12:1	12	78	1
		9	15:1	15	97,5	1
		10	17:1	17	110,5	1
		11	20:1	20	130	1

3.2.12. HUVEC hücrelerinin kültüre alınması

HUVEC hücreleri için yüksek glukoz içeren DMEM besi ortamının hazırlanması:

Hazırlanan polimerik nanopartikülün insan göbek kordonu endotel hücrelerine (HUVEC) etkisinin araştırılması amacıyla DMEM-High glukoz (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besi ortamında 37 °C derece de % 5 CO₂ içeren nemli ortamda büyütülmüştür.

Besi ortamının içeriği aşağıda yer almaktadır.

DMEM besi ortamının içeriği:

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium)
- % 1 L-glutamin
- % 1 Penisilin-Streptomisin
- % 15 FBS (Fetal Bovine Serum)

Endotel hücrelerinin çözülmesi ve kültürünün yapılması:

Sıvı azot da muhafa edilen hücreler kriyo-tüp dört de üçü çözününceye kadar 37 °C su banyosunda bekletilmiştir. Cryo-tüp laminar akışlı kabinde daha önceden 37 °C'ye getirilmiş yaklaşık 1 ml besi ortamına alınmıştır ve 800 rpm de 5 dk 4°C de santrifüj edilen hücrelerden besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Böylece besi ortamı ile kriyoprotektan ajan (DMSO) ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Hücreler 37 °C sıcaklığa getirilmiş olan antibiyotikli DMEM besi ortamı ile süspanse edildikten sonra yaklaşık 5 mL besi ortamı ile karıştırılarak 37° C derece olan % 5 CO₂ içeren etüvde büyümeye bırakılmıştır. 24-48 saat inkübasyon sürelerinde hücrelerin büyümeleri inverted mikroskop ile incelenmiştir.

Endotel hücrelerinin pasajlanması ve dondurulması:

Besi ortamındaki besnilerin tükenmesi hücre kültürünün üreme hızının düşmesine ya da hücrelerin ölümü ile sonuçlanabilmektedir. Bu sebepten dolayı inverted mikroskop altında çoğaldıkları yüzeyi % 70-80 oranında kaplayan HUVEC hücre kültürünün bir kısmı dondurularak saklanırken geri kalan kısmında pasaj işlemi yapılmıştır.

- ❖ Pasajlama işlemi esnasında kullanılacak olan DMEM besi ortamı, Tripsin-EDTA ve PBS (Ca⁺², Mg⁺² içermeyen)'in sıcak su banyosunda önceden alınarak 37 °C sıcaklığa gelmeleri sağlanmıştır. Çalışılacak malzemeler ve inkübatördeki hücreleri

içeren kültür kabı laminar akışlı steril kabine alınmadan önce % 70'lik alkol ile steril hale getirilmiştir.

- ❖ Flaskdaki besi ortamı ortamdaki uzaklaştırılmıştır.
- ❖ Flaskın yüzeyi PBS ile bir defa yıkanmıştır. Bunun için kültür kabının hücre bulunmayan yüzeyine doğru PBS ilave edilmiştir (5 mL/25 cm²) ve hücreler üzerinde PBS yavaşça dolaştırıldıktan sonra PBS uzaklaştırılmıştır.
- ❖ Hücrelerin flask yüzeyinden kalkmaları amacı ile 2 mL Tripsin-EDTA çözeltisi flaska bırakılmıştır. Flaska Tripsin-EDTA çözeltisini ilave edildikten sonra 37 °C'deki inkübatörde hücreler 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- ❖ Yüzeyden ayrılmayan hücreler için mekanik etki uygulanmıştır ve inverted mikroskopta hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları gözlemlenmiştir.
- ❖ Hücrelere toksik etki gösteren Tripsin-EDTA çözeltisinin serumlu besi ortamı ile inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. 5 mL besi ortamı ilave edilmiştir ve pipet yardımıyla hücreler besi ortamında süspansiyon edilmiştir.
- ❖ Hücre sayımı için 10 µL hücre süspansiyonu 10 µL tripan mavisi ile pipet yardımıyla homojenize edilmiştir.

Hücre Sayımı:

Neubauer lamı üzerine bırakılan bir miktar hücre süspansiyonun 10X büyütme kullanılarak inverted mikroskopta hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. 4 büyük karede hücreler sayılmıştır. Sayım gerçekleştirildiğinde yaklaşık olarak bir karede 55 canlı hücre olduğu gözlemlenmiş ve toplam 4 karede 220 canlı hücre sayılmıştır.

Neubauer lamında toplam hücre miktarını belirlemek için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$A \times 10^4 \times SF$ / Toplam sayılan kare

A: Sayılan karelerdeki toplam hücre sayısı

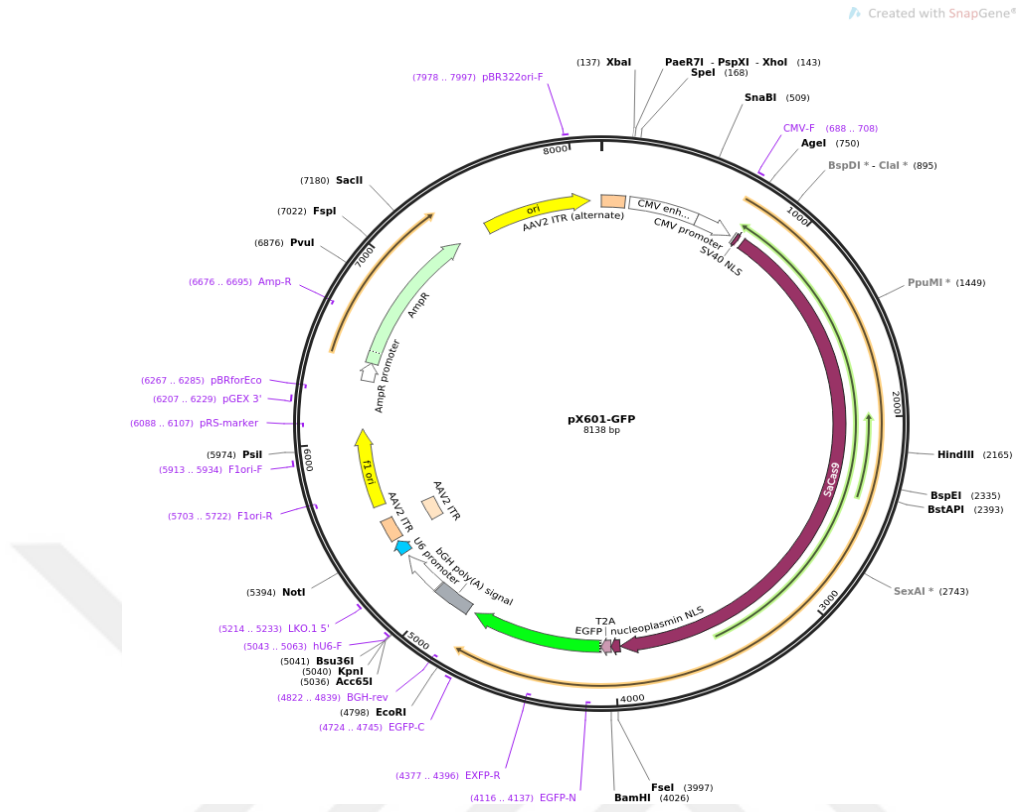
10^4 : 0.1 mm³ deki sayım sonucu 1ml'deki sayıya dönüştürmek için katsayı

SF: Seyreltme faktörü

3.2.13. HUVEC hücrelerine sentezlenen P β AE temelli transfeksiyon ajanı ile PX601 plazmidinin transfeksiyon işleminin yapılması

Transfeksiyon işlemi için 1 adet 6 gözlü pleyt kullanılmıştır. Agaroz jel sonucuna göre belirlenen orana göre (7:1) nanopolimer ve plazmid 30 dk mikrosantrifüj tüpünde muamale edilmiştir. Ardından 45.5 μ L Santa Cruz firmasından satın alınan transfeksiyon medyumunu içeren mikrosantrifüj tüpüne damla damla eklendi ve vorteks işlemi yapılmıştır.

Bir gün önceden hazırlanan HUVEC hücreleri üzerine plazmid ve nanopartikül karıymışı pleytin çeperinden yavaşça bırakılmıştır ve pleyt gözüne 500 μ L transfeksiyon medyumunu eklenmiştir ve 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. 4 saatin ardından kuyucuklara 2 mL FBS içeren HUVEC medyumunu eklenmiştir. 24 saatin ardından medyum ortamdan çekilmiş ve 3 ml taze medyum ortama eklenmiştir. 72 saatin ardından kuyucuklardaki medyum çekilerek PBS ile yıkanmıştır. Ardından floresan mikroskop ile görüntüleme işlemi yapılmıştır. Görüntüleme sonuçları Şekil 4.5'te verilmiştir. P β AE temelli sentezlenen transfeksiyon ajanı transfeksiyon veriminin ölçülmesi için kullanılan px601-GFP plazmidi ile yapılan transfeksiyon başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.1'de px601-GFP plazmidi



Şekil 3.1. Transfeksiyon verimi için kullanılan px601-GFP plazmidi (<https://www.addgene.org/84040/>)

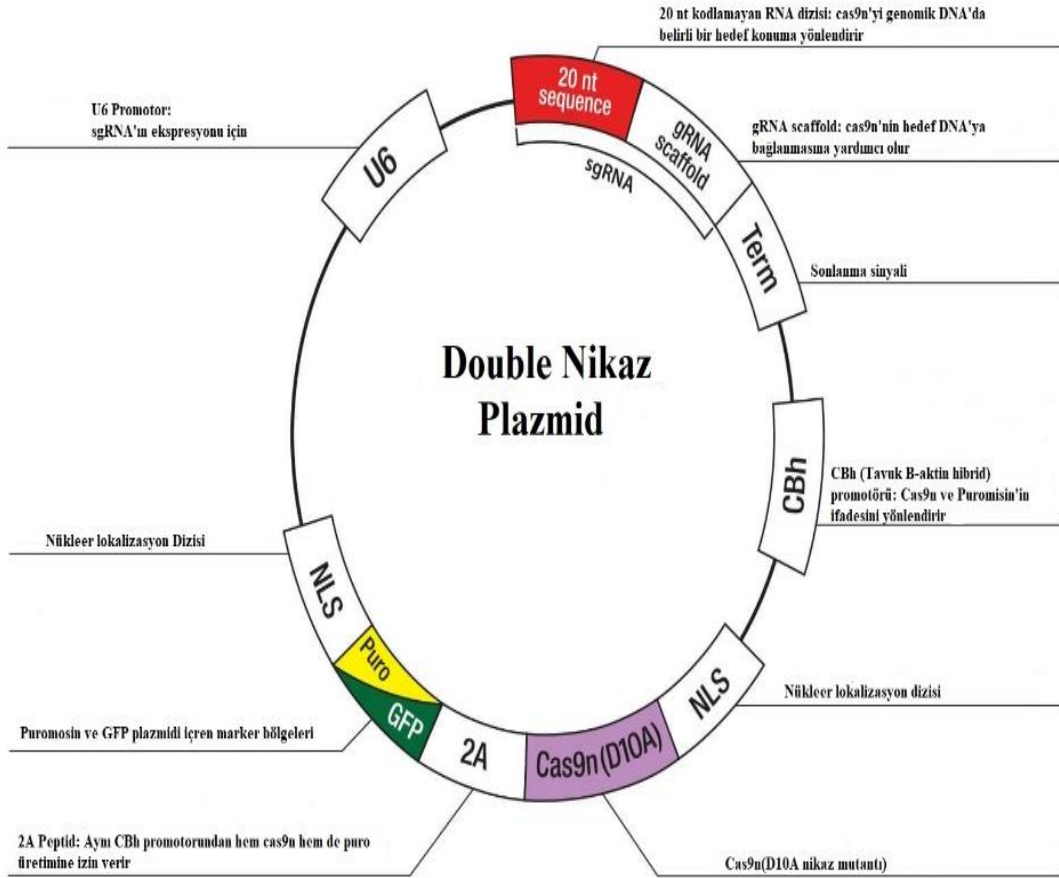
3.2.14. ImageJ programıyla transfeksiyon oranının analizi

Farklı miktarlarda px601-GFP plazmidi üretilen polimerik transfeksiyon ajanıyla birlikte transfeksiyonu yapılan HUVEC hücrelerinin analizi LEICA invert-floresan mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir. İncelenecek hücrelerin bulunduğu alanın ışık ve floresan filtre modu kullanılarak fotoğrafı çekilmiştir. Daha sonra ImageJ programı kullanılarak hücre sayması sekmesiyle aynı alanda normal ışık ve floresans ışık görüntüsü ile sayılan hücrelerin oranları birbirlerine göre % cinsinden hesaplanmıştır. Buna görede en başarılı px601-GFP plazmidi üretilen polimerik transfeksiyon ajan oranı ileri çalışmalar için kullanılmıştır.

Cox-2 Genin Knouck-out yapılması

3.2.15. HUVEC hücrelerine sentezlenen PBAE temelli transfeksiyon ajanı ile transfeksiyon işleminin yapılması

Sentezlenen polimerden 2 mg alınarak 2 mL DMSO da çözülmüştür. Ardından Crispr-Cox-2 genini knockout yapacak plazmid 1 µg/mL konsantrasyona getirilerek plazmid DNA ve PBAE temelli transfeksiyon ajanı 30 dakika boyunca mikrosantrifüj tüpünde karanlık bir ortamda muamele edilmiştir. Ardından nanoçöktürme işlemine geçilmiştir. Bir vorteks vasıtasıyla nanoçöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Cox-2 genini knouckout yapmak için kullanılan plazmid Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2. Cox-2 genini knouckout yapmak için kullanılan plazmid

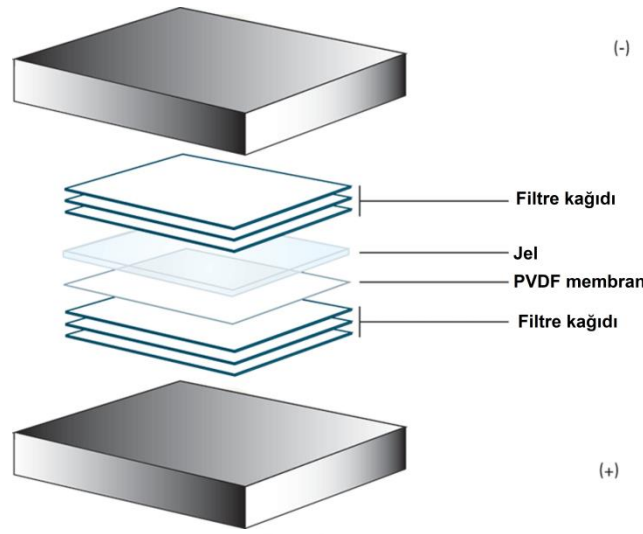
(<https://www.scbt.com/p/cox-2-crispr-knockout-and-activation-products-h>)

Transfeksiyon işlemi için 6 gözlü pleyt kullanılmıştır. Nanoçöktürme işleminden sonra 45.5 µL Santa Cruz firmasından satın alınan transfeksiyon medyumunu içeren besi ortamı mikrosantrifüj tüpüne damla damla eklendi ve vorteks işlemi yapıldı.

Bir gün önceden hazırlanan HUVEC hücreleri üzerine plazmid ve nanopartikül karışımı pleytin çeperinden yavaşça bırakıldı ve pleyt gözüne 500 µL transfeksiyon medyum eklendi ve 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. 4 saatin ardından kuyucuklara 2 ml FBS içeren HUVEC medyum eklenmiştir. 24 saatin ardından medyum ortamdan çekildi ve 3 ml taze medyum ortama eklendi. 72 saatin ardından kuyucuklardaki medyum çekildi ve PBS ile yıkandı. Ardından floresan mikroskop ile görüntüleme işlemi yapıldı. Görüntüleme sonuçları Şekil 4.6’da verilmiştir. PβAE temelli sentezlenen transfeksiyon ajanı ile transfeksiyon işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Crispr-Cox-2 plazmidi ile yapılan transfeksiyon başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.16. Western blot Analizi

Santacruz Double Nikaz plazmiti ile transfekte edilen ve transfekte edilmeyen HUVEC hücrelerinden protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Protein izolasyonu RIPA buffer kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tripsin ile flasklerden kaldırılan hücreler 16.000’de 5 dk santrifüj işlemi ile toplanmış ve üzerlerine RIPA buffer eklenmiştir. İyi vortekslenen hücreler 30 dk boyunca buz üzerinde bekletilmiş ve 10 dk’da bir 30 sn sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. 30 dk sonra 16.000’de 20 dk +4°C’de santrifüj yapılarak protein lizatları elde edilmiştir. Elde edilen lizatlardaki protein konsantrasyonu BCA kiti ile belirlenmiştir. Protein örnekleri Sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) kuyucuklarına 50 µg olacak şekilde yüklenmiştir. Protein örnekleri SDS-PAGE yöntemi ile ayrıştırılmıştır. 200V’da 60 dk elektroforez işlemi ayrıştırılan proteinler, elektroblot yöntemi ile polivinilidinden diflorür (PVDF) membranlara aktarılmıştır. PVDF membranlara transfer BioRad Trans-Blot Turbo ile semi-dry olarak gerçekleştirilmiştir. Transfer işleminde Bjerrum Schafer-Nielsen tamponu 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 işlemde önce transfer tamponuyla ıslatılmıştır. Şekil 14’teki gibi hazırlanan transfer sandiviçi cihaza yerleştirilmiş ve transfer 25 V, 1.3 mA ve 10 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Johnson, 2013).



Şekil 3.3. Semi-dry transferde western blot sandviçin şeması

Membranlar % 5 süt tozu (% 0.05 Tween-20 içeren TBS içinde) ile 1 saat oda sıcaklığında bloke edildikten sonra, insan cox-2 primer antikör ile gece boyu +4 °C’de inkübasyonda tutulmuştur. Primer antikör kalıntıları ortamdan uzaklaştırmak amacıyla membran yıkama solüsyonu ile 5 dakika aralıklarla 5 kez yıkanmıştır. Daha sonra membranlar, sekonder antikör ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır ve yıkama solüsyonu ile tekrar yıkanmıştır. Membranlar kemilüminesans görüntüleme için ayrı bir yere alınarak üzerlerine karanlık ortamda geliştirilmiş kemilüminesans (ECL) substratı eklenerek 5 dk bekletilmiştir. 5 dk sonunda asetat filmler arasına alınan membranlardaki antikora spesifik protein bantları ChemiDoc™ görüntüleme sistemi (Bio-Rad) ile görüntülenmiştir. Sonrasında, görüntülenen membranlarda normalizasyon işlemi için β -aktin protein seviyeleri belirlenmiştir. Bu işlem için membranlara bağlanan antikörler strip işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Strip işleminde önceden ısıtılmış “stripping” 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 β -aktin primer antikoruyla muamele edilmiş ve sonrasında sekonder antikörle muamele edilerek görüntülenmiştir (Johnson, 2013). Protein ekspresyon seviyeleri, ImageLab 6.1 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel analiz ve karşılaştırılabilir veri setleri, T Testi ile GraphPad Prism 8.0 yazılımı kullanılarak değerlendirildi. $P < 0,05$ olasılık değerleri istatistiksel olarak

anlamlı kabul edildi. Western Blotting işlemlerinde kullanılan tamponların bileşenleri ve antikorların dilüsyonları sırasıyla Tablo 3.4. ve Tablo 3.5’te verilmiştir.

Tablo 3.4. Western blotlama işlemlerinde kullanılan tampon çözeltiler ve içerikleri.

Çözeltiler	Bileşenler
1X Transfer Tamponu (Bjerrum Schafer-Nielsen tamponu)	48 mM Tris, 39 mM Glisin, pH 9.2 ve % 20 metanol
%5’lik Blotlama Tamponu	% 5 yağsız süt tozu ve TBST
1X Yıkama Solüsyonu (TBST)	20mM Tris (pH:7.5), 150mM NaCl, % 0.1 Tween20
“Stripping” Tamponu	20 mL %10 SDS, 12.5 ml 0.5M Tris (pH:6.8), 67.5 mL ultrasaf su, 800 µl β-merkapto etanol

Tablo 3.5. Western blotlama işlemlerinde kullanılan primer ve sekonder antikor dilüsyonları.

Antikor	Firma ve Kod	Dilüsyon
Cox-2	Abcam-ab52237	1:500
β-aktin	Abcam-ab119716	1:5000
Goat anti-rabbit IgG H&L (HRP)	Abcam-ab205718	1:10000

3.2.17. Hücre migrasyonu analizi

Hücreler proliferasyon analizinden sonra 2 adet 6 kuyucuklu hücre kültürü pleyt 10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde cox-2 geni knock-out yapılan ve yapılmayan hücreler olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler konfluensi duruma gelmeye başladıklarında kuyucukların ortasına 200 µL’lik pipet ucuyla bir çizgi çekilmiş ve böylece standart in-vitro yara modeli oluşturulmuştur. Daha sonra hücreler 37 °C’de, % 5’lik CO₂ ortamında inkübe edilerek hücre migrasyonu 0., 24. ve 48. saatte mikroskop ile görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve yara kapanma oranları ImageJ programı kullanılarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Polimer Sentezi

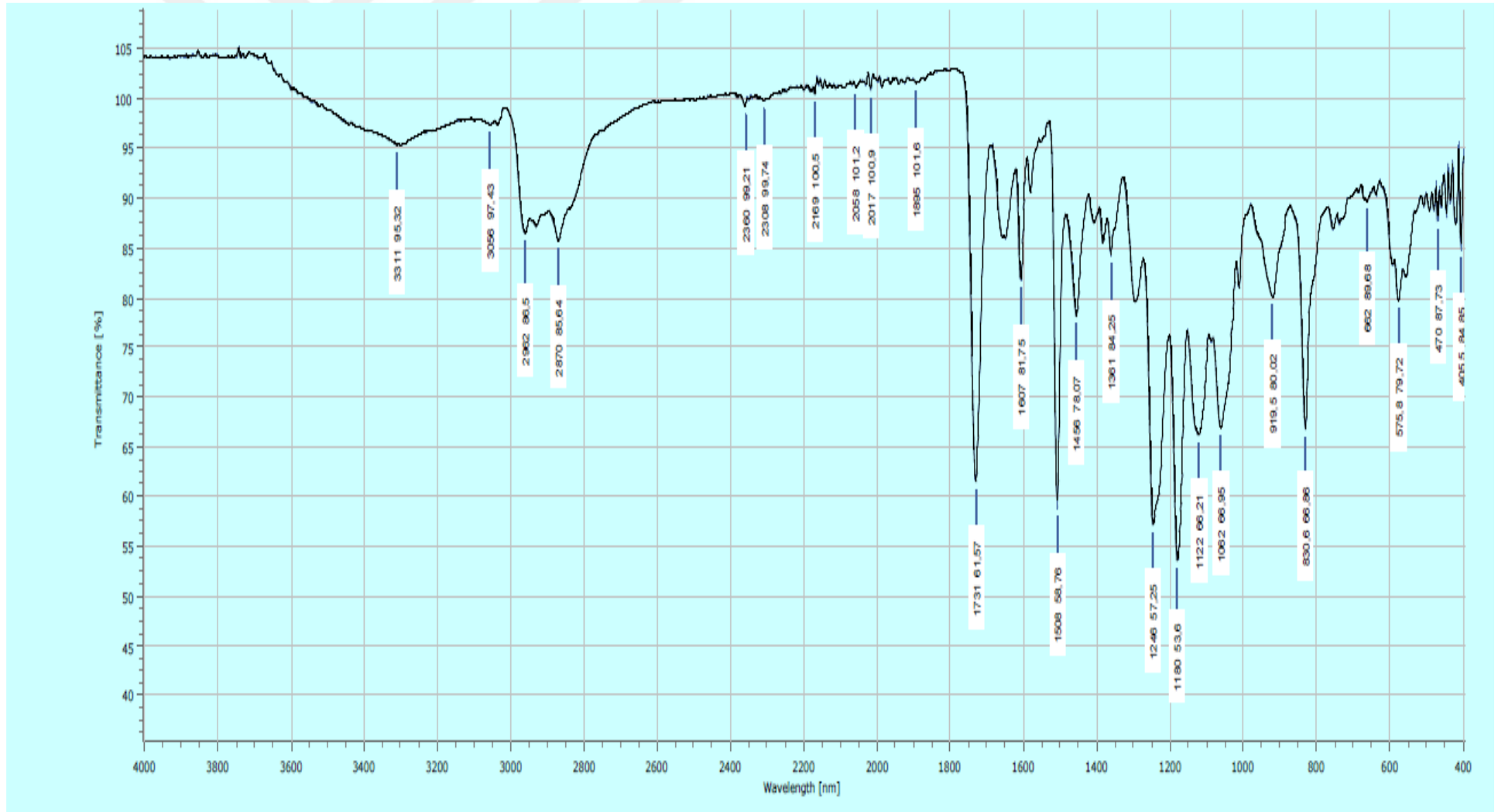
P β AE temelli transfeksiyon ajanının sentezi için monomer olarak diakrilat ve diamin kullanılarak çeker ocakta reaksiyondan azot geçirilerek sentez işlemi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen polimer Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Polimerizasyon işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyonun gerçekleştiği FTIR ile ortaya koyulmuştur.



Şekil 4.1. Sentezlenen polimerin fotoğrafı

4.2. FTIR Analizi

Tüm ürünlerin yapılarının aydınlatılması için, FTIR analizleri FT-IR cihazında, 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında kaydedilmek suretiyle gerçekleştirildi. FTIR analiz sonucu Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

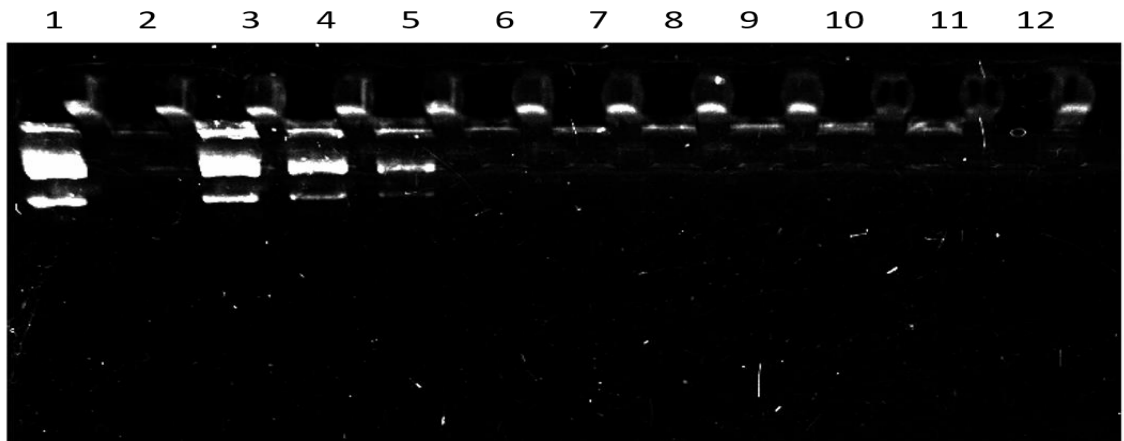


Şekil 4.2. Sentezlenen PβAE'in FTIR analizi

P β AE'nin FTIR spektrasında, yaklaşık 1600-1680 cm⁻¹ bölgesinde 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 3311 cm⁻¹'de olan sentezlenen P β AE'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 beklediği gibi P β AE yapısının oluşumu şeklinde meydana geldiğini kanıtlamaktadır.

4.3. PNP Taşıyıcı Sistemi Hazırlanması

Sentezlenen polimerden 2 mg alınarak 2 mL DMSO da çözülmüştür. Nanopolimer hazırlamak ve oluşan nanopolimerin büyüklüğünün belirlenmesi için ilk olarak nanoçöktürme metodu ile plazmid içermeyen nanopolimerler hazırlanmıştır. DMSO'da çözülen polimer farklı oranlarda (Tablo 3.3'te gösterilmiştir) distile su bulunan mikrosantrifüj tüplerine damla damla konularak ve vorteks işlemi gerçekleştirilerek nanopolimerler oluşturulmuştur. Oluşturulan nanopolimerin plazmid tutma kapasitesi Şekil 4.3'te agaroz jel elektroforezi sonucunda gösterilmektedir. Agaroz jel elektroforezine göre 7 μ L polimer ve 1 μ L plazmid DNA kullanılarak hazırlanan nanopartikülün plazmid DNA'nın tamamını tuttuğu ve en ideal oran olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Polimerin plazmid tutma kapasitesi (plazmid 1 μ g/ μ L konsantrasyonda). kuyucuk plazmid DNA, 2. kuyucuk sentezlenen polimer, 3. Kuyucuk 2 μ L polimer 1 μ L plazmid DNA, 4. Kuyucuk 3 μ L polimer 1 μ L plazmid DNA, 5. Kuyucuk 5 μ L polimer 1 μ L plazmid DNA, 6. Kuyucuk 7 μ L polimer 1 μ L plazmid DNA, 7. Kuyucuk 10 μ L polimer 1 μ L plazmid DNA, 8. Kuyucuk 12 μ L polimer 1 μ L plazmid DNA, 9. Kuyucuk 15 μ L polimer 1 μ L plazmid DNA, 10. Kuyucuk 17 μ L polimer 1 μ L plazmid DNA, 11. Kuyucuk 20 μ L polimer 1 μ L plazmid DNA, 12. Kuyucuk 2 μ L polimer 1 μ L plazmid DNA,

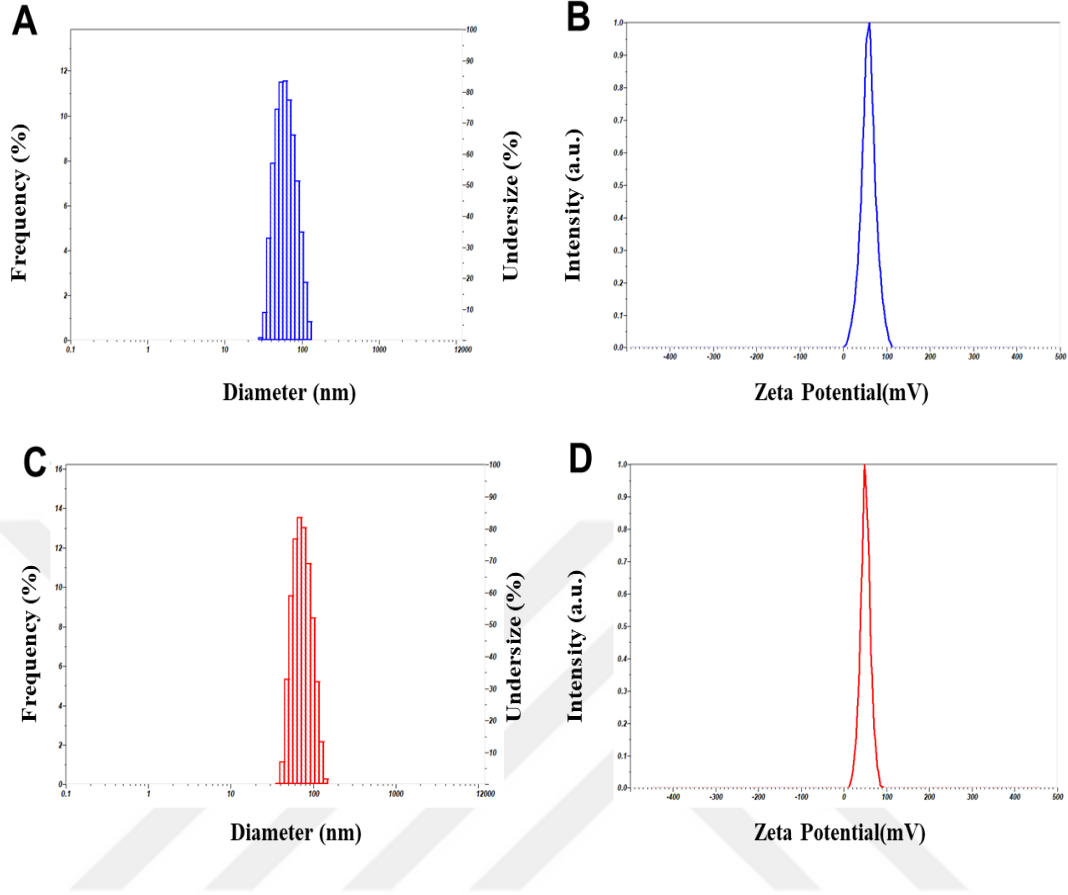
4.4. Zeta Potansiyeli ve Partikül Boyut Analizi Analizi

Sentezlenen nanopolimerik transfeksiyon ajanının zeta potansiyeli ve partikül büyüklüğü zetasizer (Horiba) cihazı ile belirlenmiştir. P β AE temelli taşıyıcı ajanın boyut büyüklüğü ve zeta potansiyeli optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir ve buradaki sonuca göre 200 P β AE 1300 dH₂O oranının çalışmanın gerçekleştirilmesi için en optimum sonuç olarak bulunmuştur. Sonuçlar Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. P β AE’nin farklı çözücü miktarlarıyla muamelenin boyut ve zeta potansiyeline etkisi

P β AE-dH ₂ O Oranı	Partikül Boyutu	PDI	Zeta Potansiyeli
50-1450	53.9 $\pm$ 0,1	0.264 $\pm$ 0.018	+1 $\pm$ 0.1
100-1400	55.0 $\pm$ 0.3	0.204 $\pm$ 0.001	+27.1 $\pm$ 2.5
150-1350	57.5 $\pm$ 1.1	0.180 $\pm$ 0.047	+3 $\pm$ 0.2
200-1300	60.4 $\pm$ 2.8	0.151 $\pm$ 0.016	+54.1 $\pm$ 4.1
250-1250	64.5 $\pm$ 0.3	0.189 $\pm$ 0.006	+60.5 $\pm$ 3.2
300-1200	70.5 $\pm$ 1.2	0.184 $\pm$ 0.039	+6 $\pm$ 0.3
350-1150	72.6 $\pm$ 1.0	0.180 $\pm$ 0.03	+29.2 $\pm$ 0.5
400-1100	73.9 $\pm$ 0.3	0.176 $\pm$ 0.015	+48.6 $\pm$ 2.6
450-1050	77.3 $\pm$ 0.3	0.200 $\pm$ 0.047	+37.7 $\pm$ 3.5
500-1000	81.0 $\pm$ 0.6	0.186 $\pm$ 0.02	+28.1 $\pm$ 1.1
600-900	106.9 $\pm$ 0.9	0.184 $\pm$ 0.002	+16.9 $\pm$ 3.5

Zeta potansiyeli 54.1 mV ve partikül boyutu 60.40 nm olarak belirlenmiştir. Zeta potansiyelin ve partikül boyutu analizi Şekil 4.4’te ve Tablo 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.4. Transfeksiyon işleminde kullanılan PβAE'nin partikül boyutu ve zeta potansiyeli, A) Boş PβAE'nin partikül boyutu, B) Boş PβAE'nin zeta potansiyeli C) Plazmid ile etkileşmiş PβAE'nin partikül boyutu, D) Plazmid ile etkileşmiş PβAE'nin zeta potansiyeli

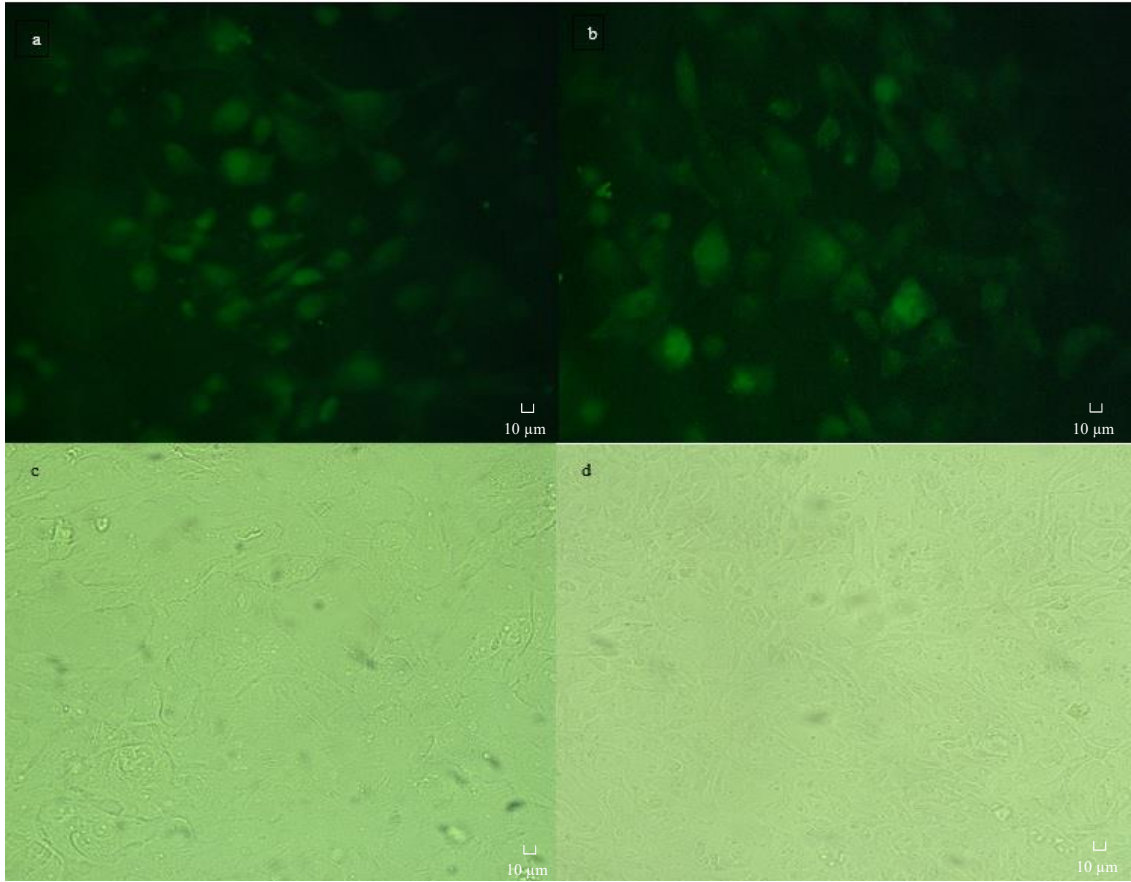
Tablo 4.2. PβAE'nin plazmit ile etkileşimin ve boş halinin partikül boyutu ve zeta potansiyeli

	Plazmit Bulunmayan	Plazmit Yüklenmiş
Boyut	60.4±2.8	71.2±3.2
PDI	0.151±0.016	0.161±0.018
Zeta	+54.4±4.1	+50.5±1.2

4.6. PX601-GFP Plazmidi ile Transfeksiyon Veriminin İncelenmesi

Sentezlenen PNP gerçekleştirilen transfeksiyon verimi PX601-GFP plazmidi ile incelenmiştir. Transfeksiyon işlemi gerçekleştirilen hücreler Şekil 4.5'te yer almaktadır. Plazmid yeşil floresan proteini kodlayan gen dizisi içerdiği için transfeksiyon sonrasında floresan mikroskop altında hücreler yeşil renkli gözükülmektedir. Şekil 4.5'te a ve b

şekillerinde hücrelerin floresan mikroskop altında görüntüsü yer almaktadır. Hücrelerin PX601-GFP plazmidini başarılı bir şekilde aldığı ve sentezlenen PNP ile transfeksiyon işleminin gerçekleştirdiği görülmektedir. Ardından çekilen görüntüler ImageJ programı kullanılarak hücre sayması sekmesiyle aynı alanda normal ışık ve floresans ışık görüntüsü ile sayılan hücrelerin oranları birbirlerine göre % cinsinden hesaplandı. Bulunan sonuca göre sentezlenen PNP ile gerçekleştirilen transfeksiyon verimi % 92 olarak hesaplanmıştır.



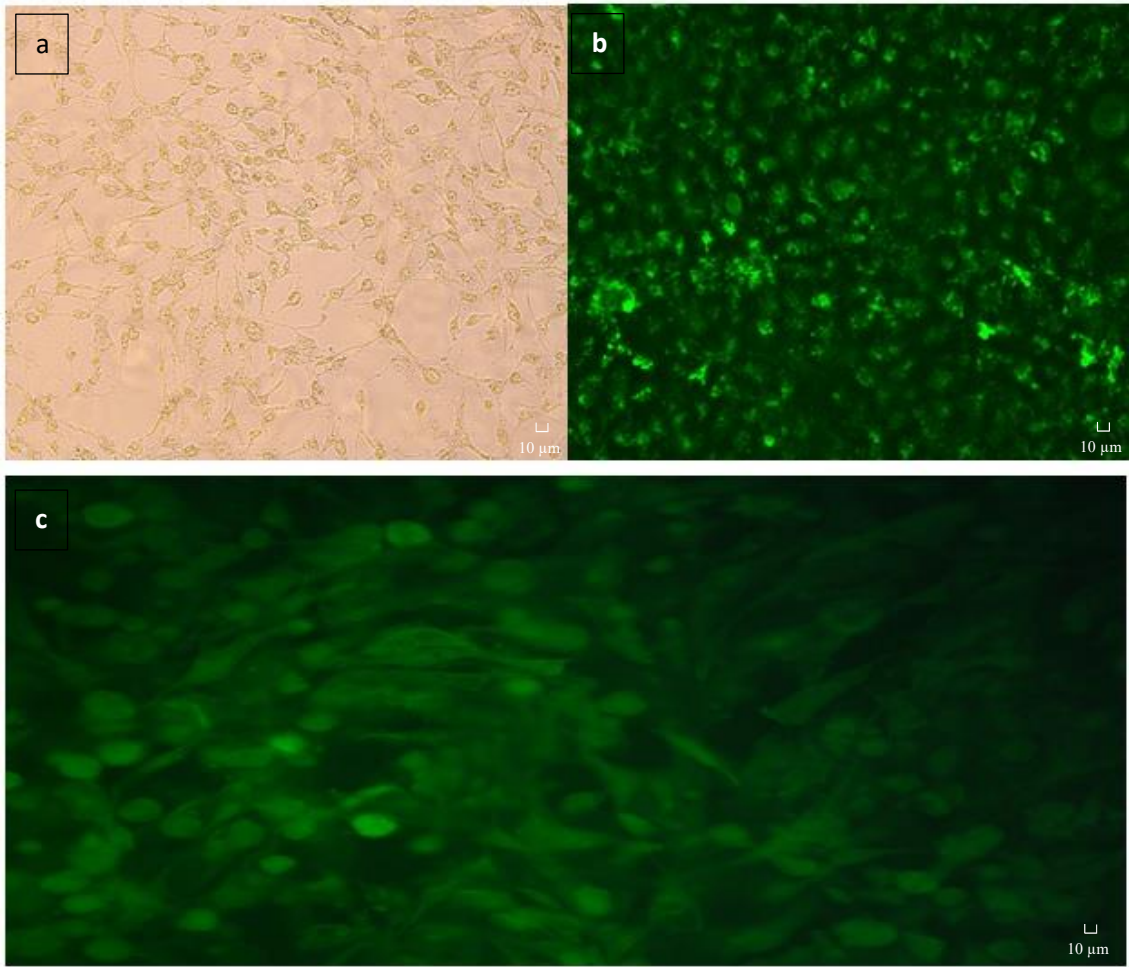
Şekil 4.5. PX601-GFP Plazmidi ile yapılan transfeksiyon sonuçları

a ve b. Transfeksiyon işlemi yapılmış hücrelerin floresan mikroskop altında görünümü, **c ve d.** Transfeksiyon işlemi yapılmış hücrelerin ışık mikroskopunda görünümü

4.7. Cox-2 Genin Knouck-out Yapılması

Sentezlenen PNP gerçekleştirilen COX-2 genini knouck-out yapma işlemi Double Nikaz plazmidi ile gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon işlemi gerçekleştirilen hücreler Şekil 4.6'da yer almaktadır. Double Nikaz Plazmidi transfeksiyonun izlenebilmesi için GFP

proteini kodlayan gen dizisi içerdği için transfeksiyon sonrasında floresan mikroskop altında hücreler yeşil renkli gözükülmektedir. Şekil 4.6'da hücrelerin ışık ve floresan mikroskop altında görüntüsü yer almaktadır. Hücrelerin Double Nikaz plazmidini başarılı bir şekilde aldığı ve sentezlenen PNP ile transfeksiyon işleminin gerçekleştirildiği görülmektedir. Ardından CRISPR veriminin hepsaplanması ve CRISPR işleminin gerçekleştirilip gerçekleştirilmediğinin analizi için Western blot analizi gerçekleştirilmiştir.

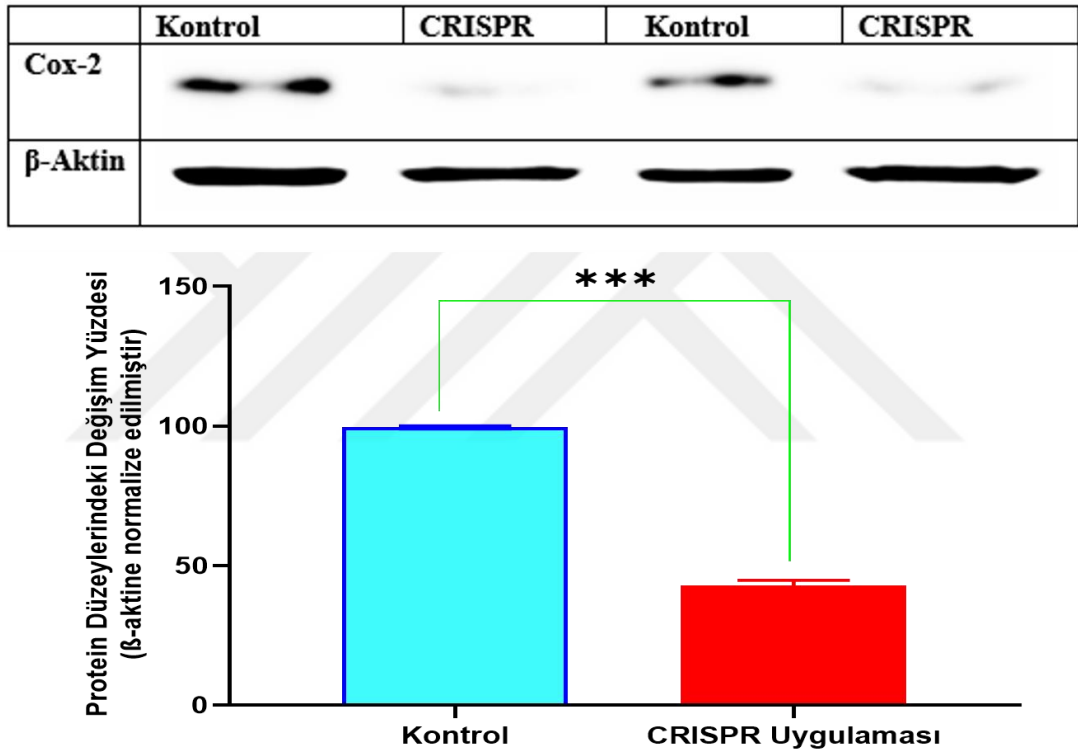


Şekil 4.6. HUVEC hücrelerine yapılan transfeksiyon işlemi sonuçları

- a.** COX-2 geni susturulma işlemi gerçekleştirilmiş hücrelerin ışık mikroskopunda görünümü
b ve c. Transfeksiyon işlemi yapılmış hücrelerin floresan mikroskop altında görünümü

4.8. Western Blot Sonuçları

CRISPR verimin analiz edilmesi için Western blot analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar β -aktin antikoru ile normalize edilerek protein ekspresyon seviyesindeki değişim image lab 6.1 programı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.7’de yer almaktadır. Western blot sonucuna göre CRISPR çalışması uygulanmayan kontrol ile COX-2 geninin susturulması gerçekleştirilmiş hücreler karşılaştırıldığında COX-2 proteinin ifadesi gen susturulması gerçekleştirilen HUVEC hücre kültüründe % 57,12 olarak hesaplanmıştır.

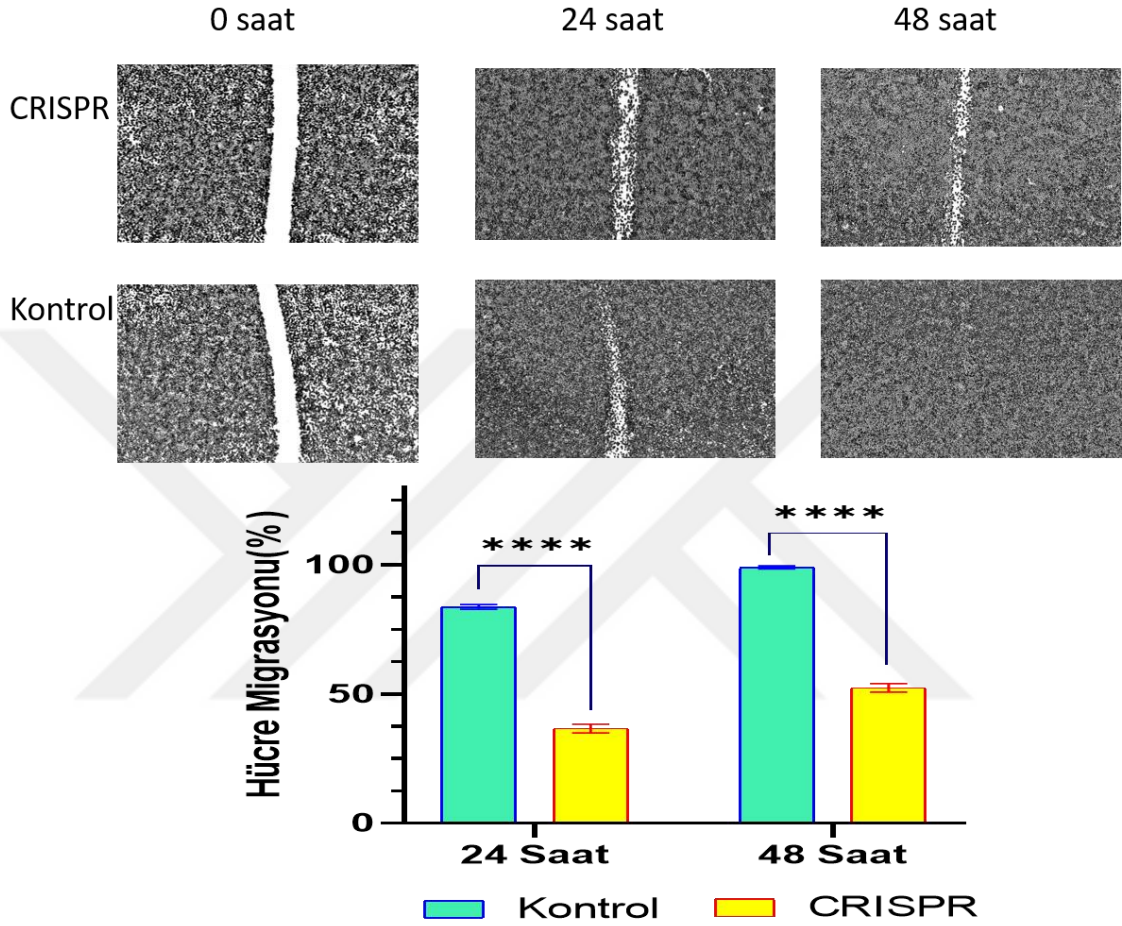


Şekil 4.7. Western blot sonucu (***) $p < 0.001$, kontrol grubuna karşı.)

4.9. HUVEC Hücrelerinde Hücre Migrasyonuna Bakılması

Western blot analizinden sonra CRISPR verimi belirlenmiş ve HUVEC hücrelerinde hücre migrasyonu çalışması gerçekleştirilmiştir. Hücre migrasyonu hızı ImageJ programı kullanılarak belirlenmiştir. Migrasyon sonuçları Şekil 4.8’te gösterilmiştir. CRISPR uygulamasının kontrol ile karşılaştırmasına göre migrasyon oranı daha düşük olduğu görülmektedir. Bu da gen susturma işleminin başarılı olduğunu göstermektedir. Bu bulgular western blot datalarıyla uyumlu bir sonuç göstermektedir. COX-2 geninin

susturulması anjiyogenez mekanizmasını etkileyerek hücre migrasyonu azalttığından dolayı HUVEC hücrelerinin migrasyonu COX-2 geni susturulan hücrelerde kontrole göre daha geç gerçekleşmektedir.



Şekil 4.8. Hücre migrasyonu sonucu (**** p < 0.0001, kontrol grubuna karşı.) Mikroskop görüntüleri 10x yakınlaştırmada gerçekleştirilmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

P β AE'ler ilk olarak Lynn ve Langer tarafından 2000 yılında gen transferi çalışmaları için tanıtılmışlardır (Lynn ve Langer, 2000) ve daha sonra 21 yıl içinde, farklı monomerlerin kombinasyonu kullanılarak 2500'den fazla doğrusal P β AE sentezlenmiştir ve gen iletiminde kullanmak kullanılabilirlikleri araştırılmıştır (Green, Langer ve Anderson, 2008). P β AE'ler, hafif pozitif yüzeyle sahip 150 nm'den küçük nanopartiküller oluşturmak için DNA ile birleşebilmekte ve yoğunlaşabilmektedirler. Bu fizikokimyasal özellikler hücre alımını kolaylaştırmakta ve gen transfeksiyon etkinliğini önemli ölçüde artırmaktadır (Yong ve ark., 2019). P β AE NP'lerin *in vitro* birçok ticari reaktiften daha yüksek transfeksiyon etkinliği sağladığı ve *in vivo* olarak nükleik asitleri etkili bir şekilde ilettiği, hatta çeşitli plazmit DNA kargolarının verilmesi ile çoklu tümör modellerinde gelişmiş hayatta kalma sonuçlarına yol açtığı gösterilmiştir (Mangraviti ve ark., 2015; Min ve ark., 2018; Wilson ve ark., 2019). Shmueli ve arkadaşları İnsan göbek kordonu toplar damarı ve insan retina endotel hücrelerine transfeksiyon etkinliğini araştırmak için formüle edilmiş P β AE kullanmışlardır. Yapılan çalışmada sentezlenen polimerler sırasıyla % 85 ve % 65 transfeksiyon verimliliği göstermiştir (Shmueli ve ark., 2012).

Bu çalışma kapsamında P β AE temelli transfeksiyon ajanının CRISPR plazmidini taşıma ve CRISPR verimi incelenmiştir. Literatüre benzer şekilde (Rui ve ark, 2019; Liu ve ark., 2019; Gao ve ark., 2020; Niu ve ark., 2020; Rui ve ark, 2020) P β AE temelli sentezlenen transfeksiyon ajanıyla gerçekleştirilen transfeksiyon işleminde transfeksiyon sonucu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir ve %95'e varan transfeksiyon verimi gözlemlenmiştir.

Zeta potansiyeli, nanopartikül yüzeyindeki etkili elektrik yükünün bir ölçüsüdür ve yüklerin miktarını belirlemektedir (Selvamani, 2018) ve partiküllerin monodispersitesini (veya aglomerasyonunu) tahmin etmek için kullanılmaktadır. Yüksek zeta potansiyeli (pozitif veya negatif) (> 30 mV) monodispersiteye yol açarken (Joseph ve Singhvi, 2019), düşük zeta potansiyeli (<5 mV) topaklaşmaya neden olabilmektedir (Gumustas ve ark., 2017). Yüzey yüküne bağlı olan zeta potansiyeli, süspansiyondaki nanopartiküllerin stabilitesi için önemlidir ve ayrıca nanopartiküllerin hücre membranına ilk adsorpsiyonunda ana faktördür. Adsorpsiyondan sonra, endositotik alım oranı partikül boyutuna bağlıdır. Zeta potansiyeli ve partikül boyutu bu nedenle nanopartikül

toksitesini etkilemektedir (Choudhury, 2020; Honary ve Zahir, 2013; Rasmussen ve ark., 2020).

CRISPR işlemi için zeta potansiyeli ve partikül boyut analizi yapılan nanopolimerin zeta potansiyeli 54.1 mV ve partikül boyutu 60.40 nm olarak analiz edilmiştir. Zeta potansiyeli ve boyutu literatürdeki ideal değerler arasında yer almaktadır (Shnoudeh ve ark., 2019). CRISPR verimi genom üzerinde yapılması hedeflenen değişiklik oranının ne kadar gerçekleştiğini ifade etmek için kullanılan terimdir. CRISPR verimi transfeksiyon verimine göre genellikle oldukça düşük gerçekleşmektedir.

HUVEC gibi birincil hücrelerin transfekte edilmesi zordur ve transfeksiyon reaktiflerinin toksik etkilerine karşı hücreler hassastır. HUVEC hücre hattı birincil endotel hücrelerinin *in vitro* genetik modifikasyonu, gen fonksiyonu, anjiyogenez ve gen terapisindeki uygulamalar için yaygın olarak kullanılmaktadır (Kocherova ve ark., 2019). Bu çalışmada HUVEC hücrelerinde, genom düzenleme çalışmalarının hücrelerin migrasyonunu nasıl etkilediği ve bu sayede kanser hücrelerinde anjiyogenezi inhibe etmek için genom düzenleme çalışmalarının kullanılabilirliği araştırılmıştır. CRISPR ile COX-2 geninin knock-out yapılması hedef alınmıştır.

Yapılan literatür araştırmaları COX-2'nin karsinogeneizde önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır (Brown ve DuBois, 2005; Ghosh ve ark., 2010; H. Sun ve ark., 2017; Hashemi ve ark., 2019; Hu ve Jiang, 2020). COX-2 geninin inhibi edilmesi, kanserle mücadele için bir hedef olabileceği düşünülmektedir (Diederich ve ark., 2010). PTGS2 up-regülasyonu özellikle kolon kanserlerinde önem arz etmektedir. COX-2'nin normal kolonik mukozada ekspresyonu çok az iken kolorektal karsinomların % 85'inde artmış olarak bulunmuştur (Brown ve DuBois, 2005).

Fugati ve arkadaşlarının gerçekleştirmiş olduğu çalışmada COX-2 inhibitörleri kullanarak yaptıkları uygulamalarda, yara iyileşmesinin erken safhasında yeniden epitelizasyonun geciktirildiğini ve ayrıca COX-2'nin inhibisyonunun anjiyogenezi inhibe ettiğini göstermiştir. (Futagami ve ark., 2002). Bu nedenle, COX-2 indüksiyonu hücre migrasyonu ve yara iyileşmesinde önemli olabilirken COX-2'nin inhibisyonu kanser hücreleri için anjiyogenizi önlemek için yeni yaklaşımlar vaat etmektedir. COX-2 inhibitörlerinin ve COX-2 geninin inhibe edilmesi bir dizi farklı kanser hücresi modelinde hücre proliferasyonunun inhibisyonundan sorumlu olmasından dolayı, COX-2

inhibitörlerinin ve COX-2 geninin susturulması gelecekteki önemli terapötik hedeflerden biri olacağını düşündürmektedir.

Sonuç olarak gerçekleştirilen bu tez kapsamında P β AE temelli transfeksiyon ajanını kullanarak HUVEC hücre hattında CRISPR işlemi gerçekleştirilerek transfeksiyon verimi ve COX-2 knock-out yapma verimi incelenmiştir. Bu tez çalışması sonucu HUVEC hücre hattı için sentezlenen ve kullanılan P β AE transfeksiyon ajanının transfeksiyon verimi % 90-95 arasındadır ve CRISPR verimi Western blot sonucuna göre % 57.12 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda P β AE temelli transfeksiyon ajanının HUVEC hücre hattına başarılı bir şekilde transfeksiyon işlemini gerçekleştirdiği görülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A. ve McNeil, S. E. (2009). Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi:10.1016/j.addr.2009.03.009
- Aghamiri, S., Mehrjardi, K. F., Shabani, S., Keshavarz-Fathi, M., Kargar, S. ve Rezaei, N. (2019). Nanoparticle-siRNA: A potential strategy for ovarian cancer therapy? *Nanomedicine*. doi:10.2217/nnm-2018-0379
- Aldair, T. ve Montani, J. (2010). Chapter 1. Overview of Angiogenesis. *Angiogenesis*.
- Alexander, J. F., Kozlovskaya, V., Chen, J., Kuncewicz, T., Kharlampieva, E. ve Godin, B. (2015). Role of Shape in Tumor Environment: Cubical Shape Enhances the Interaction of Layer-by-Layer Polymeric Particles with Breast Cancer Cells (Adv. Healthcare Mater. 17/2015). *Advanced Healthcare Materials*. doi:10.1002/adhm.201570096
- Allémann, E., Leroux, J. C. ve Gurny, R. (1998). Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 34(2–3), 171–189. doi:10.1016/S0169-409X(98)00039-8
- Anderson, J. M. ve Shive, M. S. (2012). Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi:10.1016/j.addr.2012.09.004
- Arnida, Janát-Amsbury, M. M., Ray, A., Peterson, C. M. ve Ghandehari, H. (2011). Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. doi:10.1016/j.ejpb.2010.11.010
- Bae, Y., Rhim, H. S., Lee, S., Ko, K. S., Han, J. ve Choi, J. S. (2017). Apoptin Gene Delivery by the Functionalized Polyamidoamine Dendrimer Derivatives Induces Cell Death of U87-MG Glioblastoma Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. doi:10.1016/j.xphs.2017.01.034
- Basu, S., Aryan, A., Overcash, J. M., Samuel, G. H., Anderson, M. A. E., Dahlem, T. J., ... Adelman, Z. N. (2015). Silencing of end-joining repair for efficient site-specific gene insertion after TALEN/CRISPR mutagenesis in *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi:10.1073/pnas.1502370112
- Baylis, F. ve McLeod, M. (2017). First-in-human Phase 1 CRISPR Gene Editing Cancer Trials: Are We Ready? *Current Gene Therapy*. doi:10.2174/1566523217666171121165935
- Biasco, L., Baricordi, C. ve Aiuti, A. (2012). Retroviral integrations in gene therapy trials. *Molecular Therapy*. doi:10.1038/mt.2011.289
- Bishop, C. J., Majewski, R. L., Guiriba, T. R. M., Wilson, D. R., Bhise, N. S., Quiñones-Hinojosa, A. ve Green, J. J. (2016). Quantification of cellular and nuclear uptake rates of polymeric gene delivery nanoparticles and DNA plasmids via flow cytometry. *Acta Biomaterialia*. doi:10.1016/j.actbio.2016.03.036
- Bisht, S. ve Maitra, A. (2009). Nanoparticles for Solid Tumor. *Cancer*, 1(4), 415–425. doi:10.1002/wnan.043
- Björnmalm, M., Cui, J., Bertleff-Zieschang, N., Song, D., Faria, M., Rahim, M. A. ve

- Caruso, F. (2017). Nanoengineering particles through template assembly. *Chemistry of Materials*. doi:10.1021/acs.chemmater.6b02848
- Blasi, P. (2019). Poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid)-based microparticles: an overview. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. doi:10.1007/s40005-019-00453-z
- Bolhassani, A., Javan zad, S., Saleh, T., Hashemi, M., Aghasadeghi, M. R. ve Sadat, S. M. (2014). Polymeric nanoparticles Potent vectors for vaccine delivery targeting cancer and infectious diseases. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. doi:10.4161/hv.26796
- Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. a ve Horvath, P. (2007). Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, 315(March), 1709–1712. doi:10.1126/science.1138140
- Brissault, B., Kichler, A., Guis, C., Leborgne, C., Danos, O. ve Cheradame, H. (2003). Synthesis of linear polyethylenimine derivatives for DNA transfection. *Bioconjugate Chemistry*. doi:10.1021/bc0200529
- Brooks, D., Okeefe, P. ve Buncke, H. J. (2001). Dextran-induced acute renal failure after microvascular muscle transplantation. *Plastic and Reconstructive Surgery*. doi:10.1097/00006534-200112000-00034
- Brown, J. R. ve DuBois, R. N. (2005). COX-2: A molecular target for colorectal cancer prevention. *Journal of Clinical Oncology*. doi:10.1200/JCO.2005.09.051
- Burks, J., Nadella, S., Mahmud, A., Mankongpaisarnrung, C., Wang, J., Hahm, J. I., ... Smith, J. P. (2018). Cholecystokinin Receptor-Targeted Polyplex Nanoparticle Inhibits Growth and Metastasis of Pancreatic Cancer. *CMGH*. doi:10.1016/j.jcmgh.2018.02.013
- Canine, B. F. ve Hate, A. (2010). Development of recombinant cationic polymers for gene therapy research ☆, 62, 1524–1529. doi:10.1016/j.addr.2010.04.001
- Carrstensen, H., Müller, R. H. ve Müller, B. W. (1992). Particle size, surface hydrophobicity and interaction with serum of parenteral fat emulsions and model drug carriers as parameters related to RES uptake. *Clinical Nutrition*. doi:10.1016/0261-5614(92)90006-C
- Caster, J. M., Yu, S. K., Patel, A. N., Newman, N. J., Lee, Z. J., Warner, S. B., ... Wang, A. Z. (2017). Effect of particle size on the biodistribution, toxicity, and efficacy of drug-loaded polymeric nanoparticles in chemoradiotherapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. doi:10.1016/j.nano.2017.03.002
- Cebrian-Serrano, A. ve Davies, B. (2017). CRISPR-Cas orthologues and variants: optimizing the repertoire, specificity and delivery of genome engineering tools. *Mammalian Genome*. doi:10.1007/s00335-017-9697-4
- Cedervall, T., Lynch, I., Foy, M., Berggård, T., Donnelly, S. C., Cagney, G., ... Dawson, K. A. (2007). Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angewandte Chemie - International Edition*. doi:10.1002/anie.200700465
- Chandrasekharan, N. V. ve Simmons, D. L. (2004). The cyclooxygenases. *Genome Biology*. doi:10.1186/gb-2004-5-9-241
- Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N. ve Lieber, M. R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi:10.1038/nrm.2017.48
- Chattopadhyay, M. (2013). Targeted Delivery of Growth Factors by HSV-Mediated Gene Transfer for Peripheral Neuropathy. *Current Gene Therapy*. doi:10.2174/156652321305131212123237

- Chen, J., Kozlovskaya, V., Goins, A., Campos-Gomez, J., Saeed, M. ve Kharlampieva, E. (2013). Biocompatible shaped particles from dried multilayer polymer capsules. *Biomacromolecules*. doi:10.1021/bm4008666
- Chen, T. H., Bae, Y. ve Furgeson, D. Y. (2008). Intelligent Biosynthetic Nanobiomaterials (IBNs) for Hyperthermic Gene Delivery, 25(3). doi:10.1007/s11095-007-9382-5
- Cheng, R., Peng, J., Yan, Y., Cao, P., Wang, J., Qiu, C., ... Zhang, P. (2014). Efficient gene editing in adult mouse livers via adenoviral delivery of CRISPR/Cas9. *FEBS Letters*. doi:10.1016/j.febslet.2014.09.008
- Choi, Y. H., Liu, F., Kim, J. S., Choi, Y. K., Park, J. S. ve Kim, S. W. (1998). Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carder. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/S0168-3659(97)00174-0
- Choudhury, A. (2020). Liposome: a carrier for effective drug delivery. *Journal of Applied Pharmaceutical Research*. doi:10.18231/j.joapr.2019.v.8.i.1.003
- Church, G. M., Esvelt, K. M., Guell, M., Mali, P., Norville, J. E., Yang, L., ... DiCarlo, J. E. (2013). RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*, 339(823), 823–826. [http://www.sciencemag.org.cyber.usask.ca/content/339/6121/823.full.pdf%5Cnfile:///Articles/2013/Mali/Science 2013 Mali.pdf](http://www.sciencemag.org.cyber.usask.ca/content/339/6121/823.full.pdf%5Cnfile:///Articles/2013/Mali/Science%2013%20Mali.pdf) adresinden erişildi.
- Chylinski, K., Makarova, K. S., Charpentier, E. ve Koonin, E. V. (2014). Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 42(10), 6091–6105. doi:10.1093/nar/gku241
- Cockrell, A. S. ve Kafri, T. (2007). Gene delivery by lentivirus vectors. *Molecular Biotechnology*. doi:10.1007/s12033-007-0010-8
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. doi:10.1126/science.1231143
- Conley, W. ve Deferrari, R. (1952). *Principles and Applications*. *The Journal of Higher Education* (C. 23). doi:10.2307/1976787
- Cordeiro, R. A., Serra, A., Coelho, J. F. J. ve Faneca, H. (2019). Poly(β -amino ester)-based gene delivery systems: From discovery to therapeutic applications. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2019.08.024
- Cox, D. G., Pontes, C., Guino, E., Navarro, M., Osorio, A., Canzian, F. ve Moreno, V. (2004). Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) and risk of colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. doi:10.1038/sj.bjc.6601906
- Cunningham, F. J., Goh, N. S., Demirer, G. S., Matos, J. L. ve Landry, M. P. (2018). Nanoparticle-Mediated Delivery towards Advancing Plant Genetic Engineering. *Trends in Biotechnology*. doi:10.1016/j.tibtech.2018.03.009
- D'Astolfo, D. S., Pagliero, R. J., Pras, A., Karthaus, W. R., Clevers, H., Prasad, V., ... Geijsen, N. (2015). Efficient intracellular delivery of native proteins. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2015.03.028
- Deptuła, T., Warowicka, A., Woźniak, A., Grzeszkowiak, M., Jarzebski, M., Bednarowicz, M., ... Słomski, R. (2015). Cytotoxicity of thermo-responsive polymeric nanoparticles based on N-isopropylacrylamide for potential application as a bioscaffold. *Acta Biochimica Polonica*. doi:10.18388/abp.2015_1007
- Diederich, M., Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M. ve Ghibelli, L. (2010). The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies.

- International Journal of Cell Biology*. doi:10.1155/2010/215158
- Doudna, J. A. ve Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213). doi:10.1126/science.1258096
- Dowdy, S. F. (2017). Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. *Nature Biotechnology*. doi:10.1038/nbt.3802
- Du, F., Fischer, J. E. ve Winey, K. I. (2003). Coagulation method for preparing single-walled carbon nanotube/poly(methyl methacrylate) composites and their modulus, electrical conductivity, and thermal stability. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*. doi:10.1002/polb.10701
- E., H. ve R.J., S. (2015). Adeno-Associated Virus at 50: A Golden Anniversary of Discovery, Research, and Gene Therapy Success - A Personal Perspective. *Human Gene Therapy*.
- El-Sayed, M., Ginski, M., Rhodes, C. ve Ghandehari, H. (2002). Transepithelial transport of poly(amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/S0168-3659(02)00087-1
- Eligini, S., Barbieri, S. S., Cavalca, V., Camera, M., Brambilla, M., De Franceschi, M., ... Colli, S. (2005). Diversity and similarity in signaling events leading to rapid Cox-2 induction by tumor necrosis factor- α and phorbol ester in human endothelial cells. *Cardiovascular Research*. doi:10.1016/j.cardiores.2004.10.024
- Entian, K., Gene, D., Untersuchungen, D., Lantibiotika, B., Artikel, D., Gruppe, Z., ... Mersacidin, L. (1993). *Naturwissenschaften*, 460, 454–460.
- Fam, S. Y., Chee, C. F., Yong, C. Y., Ho, K. L., Mariatulqabtiah, A. R. ve Tan, W. S. (2020). Stealth coating of Nanoparticles in drug-delivery systems. *Nanomaterials*. doi:10.3390/nano10040787
- Feliu, J. X., Knight, A., Coutelle, C. ve Villaverde, A. (y.y.). Exploiting Viral Cell-Targeting Abilities in a Single Polypeptide , Non-Infectious , Recombinant Vehicle for Integrin-Mediated DNA Delivery and Gene Expression.
- Ferreira da Silva, J., Salic, S., Wiedner, M., Datlinger, P., Essletzbichler, P., Hanzl, A., ... Loizou, J. I. (2019). Genome-scale CRISPR screens are efficient in non-homologous end-joining deficient cells. *Scientific Reports*. doi:10.1038/s41598-019-52078-9
- Fischer, D., Bieber, T., Li, Y., Elsässer, H. P. ve Kissel, T. (1999). A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: Effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharmaceutical Research*. doi:10.1023/A:1014861900478
- Fitzgerald, K., Frank-Kamenetsky, M., Shulga-Morskaya, S., Liebow, A., Bettencourt, B. R., Sutherland, J. E., ... Simon, A. (2014). Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: A randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *The Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(13)61914-5
- Forrest, M. L. ve Kwon, G. S. (2008). Clinical developments in drug delivery nanotechnology. *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi:10.1016/j.addr.2008.02.013
- Friedland, A. E., Tzur, Y. B., Esvelt, K. M., Colaiácovo, M. P., Church, G. M. ve Calarco, J. A. (2013). Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nature Methods*. doi:10.1038/nmeth.2532
- Froger, A. ve Hall, J. E. (2007). Transformation of Plasmid DNA into *E. Coli* using the heat shock method. *Journal of Visualized Experiments*. doi:10.3791/253

- Futagami, A., Ishizaki, M., Fukuda, Y., Kawana, S. ve Yamanaka, N. (2002). Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. *Laboratory Investigation*. doi:10.1097/01.LAB.0000035024.75914.39
- Gaj, T., Gersbach, C. A. ve Barbas, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7), 397–405. doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004
- Galindo-Rodriguez, S., Allémann, E., Fessi, H. ve Doelker, E. (2004). Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research*, 21(8), 1428–1439. doi:10.1023/B:PHAM.0000036917.75634.be
- Gao, X., Jin, Z., Tan, X., Zhang, C., Zou, C., Zhang, W., ... Hu, Z. (2020). Hyperbranched poly(β -amino ester) based polyplex nanoparticles for delivery of CRISPR/Cas9 system and treatment of HPV infection associated cervical cancer. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2020.02.045
- Gao, Y., Huang, J. Y., O’Keeffe Ahern, J., Cutlar, L., Zhou, D., Lin, F. H. ve Wang, W. (2016). Highly Branched Poly(β -amino esters) for Non-Viral Gene Delivery: High Transfection Efficiency and Low Toxicity Achieved by Increasing Molecular Weight. *Biomacromolecules*, 17(11), 3640–3647. doi:10.1021/acs.biomac.6b01120
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. ve Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(39), 2579–2586. doi:10.1073/pnas.1208507109
- Genetic Home Reference. (2020). What are genome editing and CRISPR-Cas9? - Genetics Home Reference - NIH. *U.S. National Library of Medicine*.
- Ghosh, N., Chaki, R., Mandal, V. ve Mandal, S. C. (2010). Cox-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacological Reports*. doi:10.1016/S1734-1140(10)70262-0
- Godbey, W. T., Wu, K. K. ve Mikos, A. G. (1999). Size matters: Molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *Journal of Biomedical Materials Research*. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19990605)45:3<268::AID-JBM15>3.0.CO;2-Q
- Godbey, W. T., Wu, K. K. ve Mikos, A. G. (2001). Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability. *Biomaterials*. doi:10.1016/S0142-9612(00)00203-9
- Gori, J. L., Hsu, P. D., Maeder, M. L., Shen, S., Welstead, G. G. ve Bumcrot, D. (2015). Delivery and Specificity of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy. *Human Gene Therapy*. doi:10.1089/hum.2015.074
- Green, J. J., Langer, R. ve Anderson, D. G. (2008). A combinatorial polymer library approach yields insight into nonviral gene delivery. *Accounts of Chemical Research*. doi:10.1021/ar7002336
- Grosse, S., Aron, Y., Thévenot, G., Monsigny, M. ve Fajac, I. (2007). Cytoskeletal involvement in the cellular trafficking of plasmid/PEI derivative complexes. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2007.06.015
- Guk, K., Lim, H., Kim, B., Hong, M., Khang, G. ve Lee, D. (2013). Acid-cleavable ketal containing poly(β -amino ester) for enhanced siRNA delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.06.021
- Gumustas, M., Sengel-Turk, C. T., Gumustas, A., Ozkan, S. A. ve Uslu, B. (2017). Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems. *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and*

- Diagnostics içinde* . doi:10.1016/b978-0-323-52725-5.00005-8
- Gupta, P., Elkins, C., Long, T. E. ve Wilkes, G. L. (2005). Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): Exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer*. doi:10.1016/j.polymer.2005.04.021
- Hadjichristidis, N., Iatrou, H., Pispas, S. ve Pitsikalis, M. (2000). Anionic polymerization: high vacuum techniques. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*. doi:10.1002/1099-0518(20000915)38:18<3211::AID-POLA10>3.0.CO;2-L
- Han, X., Liu, Z., Jo, M. C., Zhang, K., Li, Y., Zeng, Z., ... Qin, L. (2015). CRISPR-Cas9 delivery to hard-to-transfect cells via membrane deformation. *Science Advances*. doi:10.1126/sciadv.1500454
- Hashemi Goradel, N., Najafi, M., Salehi, E., Farhood, B. ve Mortezaee, K. (2019). Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *Journal of Cellular Physiology*. doi:10.1002/jcp.27411
- Heinze, T., Michealis, N. ve Hornig, S. (2007). Reactive polymeric nanoparticles based on unconventional dextran derivatives. *European Polymer Journal*, 43(3), 697–703. doi:10.1016/j.eurpolymj.2006.12.009
- Heler, R., Samai, P., Modell, J. W., Weiner, C., Gregory, W., Bikard, D. ve Marraffini, L. A. (2015). Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation, 519(7542), 199–202. doi:10.1038/nature14245.Cas9
- Hill, A. B., Chen, M., Chen, C. K., Pfeifer, B. A. ve Jones, C. H. (2016). Overcoming gene-delivery hurdles: Physiological considerations for nonviral vectors. *Trends in Biotechnology*. doi:10.1016/j.tibtech.2015.11.004
- Hinz, B. ve Brune, K. (2002). Cyclooxygenase-2 - 10 Years later. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. doi:10.1124/jpet.300.2.367
- Hirsch, F., Iphofen, R. ve Koporc, Z. (2019). Ethics assessment in research proposals adopting CRISPR technology. *Biochemia Medica*. doi:10.11613/BM.2019.020202
- Honary, S. ve Zahir, F. (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. doi:10.4314/tjpr.v12i2.19
- Hong, J. W., Park, J. H., Huh, K. M., Chung, H., Kwon, I. C. ve Jeong, S. Y. (2004). PEGylated polyethylenimine for in vivo local gene delivery based on lipiodolized emulsion system. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2004.05.012
- Horii, T., Arai, Y., Yamazaki, M., Morita, S., Kimura, M., Itoh, M., ... Hatada, I. (2014). Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Scientific Reports*. doi:10.1038/srep04513
- Hosseinkhani, H., Abedini, F., Ou, K. L. ve Domb, A. J. (2015). Polymers in gene therapy technology. *Polymers for Advanced Technologies*, 26(2), 198–211. doi:10.1002/pat.3432
- Hsu, Patrick, Eric S. Lander, F. Z. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *HHs*, 157(6), 1262–1278. doi:10.1016/j.cell.2014.05.010.Development
- Hu, Z., Hu, Y. ve Jiang, H. (2020). Overexpression of COX-2 and clinicopathological features of gastric cancer: A meta-analysis. *Translational Cancer Research*. doi:10.21037/tcr.2020.03.52
- Hunt, M. A., Currie, M. J., Robinson, B. A. ve Dachs, G. U. (2010). Optimizing transfection of primary human umbilical vein endothelial cells using commercially

- available chemical transfection reagents. *Journal of Biomolecular Techniques*.
- Hyland, K. A., Aronovich, E. L., Olson, E. R., Bell, J. B., Rusten, M. U., Gunther, R., ... Scott Mcivor, R. (2017). Transgene Expression in Dogs after Liver-Directed Hydrodynamic Delivery of Sleeping Beauty Transposons Using Balloon Catheters. *Human Gene Therapy*. doi:10.1089/hum.2017.003
- Ilium, L., Hunneyball, I. M. ve Davis, S. S. (1986). The effect of hydrophilic coatings on the uptake of colloidal particles by the liver and by peritoneal macrophages. *International Journal of Pharmaceutics*. doi:10.1016/0378-5173(86)90199-7
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. ve Nakamura, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–5433. doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
- Iwasaki, R. S. ve Batey, R. T. (2020). SPRINT: A Cas13a-based platform for detection of small molecules. *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/gkaa673
- Jain, A. K., Swarnakar, N. K., Godugu, C., Singh, R. P. ve Jain, S. (2011). The effect of the oral administration of polymeric nanoparticles on the efficacy and toxicity of tamoxifen. *Biomaterials*. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.09.037
- Jain, R. A. (2000). The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*. doi:10.1016/S0142-9612(00)00115-0
- Jang, J. H., Schaffer, D. V. ve Shea, L. D. (2011). Engineering biomaterial systems to enhance viral vector gene delivery. *Molecular Therapy*. doi:10.1038/mt.2011.111
- Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gaastra, W. ve Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x
- Jeong, Y. Il, Cho, C. S., Kim, S. H., Ko, K. S., Kim, S. Il, Shim, Y. H. ve Nah, J. W. (2001). Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles without surfactant. *Journal of Applied Polymer Science*, 80(12), 2228–2236. doi:10.1002/app.1326
- Jevprasesphant, R., Penny, J., Jalal, R., Attwood, D., McKeown, N. B. ve D'Emanuele, A. (2003). The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *International Journal of Pharmaceutics*. doi:10.1016/S0378-5173(02)00623-3
- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., ... Doudna, J. A. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 343(6176). doi:10.1126/science.1247997
- Johnson, M. (2013). Western Blot Protocol. *Materials and Methods*. doi:10.13070/mm.en.3.195
- Joseph, E. ve Singhvi, G. (2019). Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: A potential nanocarrier. *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy içinde* . doi:10.1016/B978-0-12-816505-8.00007-2
- Juliana, A., Lasprilla, R., Andres, G., Martinez, R., Hoss, B., Efren, J., ... Maciel, R. (2010). Synthesis and Characterization of Poly (Lactic Acid) for Use in Biomedical Field.
- Kabachinski, G. ve Schwartz, T. U. (2015). The nuclear pore complex - Structure and function at a glance. *Journal of Cell Science*. doi:10.1242/jcs.083246
- Kadlecova, Z., Rajendra, Y., Matasci, M., Baldi, L., Hacker, D. L., Wurm, F. M. ve Klok, H. A. (2013). DNA delivery with hyperbranched polylysine: A comparative study

- with linear and dendritic polylysine. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2013.01.019
- Kafil, V. ve Omid, Y. (2011). Cytotoxic impacts of linear and branched polyethylenimine nanostructures in A431 cells. *BioImpacts*. doi:10.5681/bi.2011.004
- Kang, Y. K., Kwon, K., Ryu, J. S., Lee, H. N., Park, C. ve Chung, H. J. (2017). Nonviral Genome Editing Based on a Polymer-Derivatized CRISPR Nanocomplex for Targeting Bacterial Pathogens and Antibiotic Resistance. *Bioconjugate Chemistry*, 28(4), 957–967. doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00676
- Katz, M. G., Fargnoli, A. S., Williams, R. D. ve Bridges, C. R. (2013). Gene therapy delivery systems for enhancing viral and nonviral vectors for cardiac diseases: Current concepts and future applications. *Human Gene Therapy*. doi:10.1089/hum.2013.2517
- Keshavarz, A., Karimi-sabet, J., Fattahi, A., Golzary, A., Rafiee-tehrani, M. ve Dorkoosh, F. A. (2012). The Journal of Supercritical Fluids Preparation and characterization of raloxifene nanoparticles using Rapid Expansion of Supercritical Solution (RESS). *The Journal of Supercritical Fluids*, 63, 169–179. doi:10.1016/j.supflu.2011.12.005
- Kiani, K., Hill, D. J. T., Rasoul, F., Whittaker, M. ve Rintoul, L. (2007). Raft mediated surface grafting of t-butyl acrylate onto an ethylene-propylene copolymer initiated by gamma radiation. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*. doi:10.1002/pola.21868
- Kimura, Y., Hisano, Y., Kawahara, A. ve Higashijima, S. I. (2014). Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Scientific Reports*. doi:10.1038/srep06545
- Kocherova, I., Bryja, A., Mozdziak, P., Angelova Volponi, A., Dyszkiewicz-Konwińska, M., Piotrowska-Kempisty, H., ... Kempisty, B. (2019). Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Grafts. *Journal of Clinical Medicine*. doi:10.3390/jcm8101602
- Kopatz, I., Remy, J. S. ve Behr, J. P. (2004). A model for non-viral gene delivery: Through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *Journal of Gene Medicine*. doi:10.1002/jgm.558
- Kotterman, M. A., Chalberg, T. W. ve Schaffer, D. V. (2015). Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook. *Annual Review of Biomedical Engineering*. doi:10.1146/annurev-bioeng-071813-104938
- Kubisa, P. (2009). Ionic liquids as solvents for polymerization processes-Progress and challenges. *Progress in Polymer Science (Oxford)*. doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.09.001
- Kuhn, J., Lin, Y., Krhac Levacic, A., Al Danaf, N., Peng, L., Höhn, M., ... Lächelt, U. (2020). Delivery of Cas9/sgRNA Ribonucleoprotein Complexes via Hydroxystearyl Oligoamino Amides. *Bioconjugate Chemistry*. doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00853
- Kunath, K., Von Harpe, A., Fischer, D., Petersen, H., Bickel, U., Voigt, K. ve Kissel, T. (2003). Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: Comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/S0168-3659(03)00076-2
- L Moore, T. (2014). Polymer-Coated Hydroxyapatite Nanoparticles for the Delivery of

- Statins. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*. doi:10.4172/2157-7439.1000237
- Lai, W. F. ve He, Z. D. (2016). Design and fabrication of hydrogel-based nanoparticulate systems for in vivo drug delivery. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2016.10.013
- Lai, W. F. ve Wong, W. T. (2018). Design of Polymeric Gene Carriers for Effective Intracellular Delivery. *Trends in Biotechnology*. doi:10.1016/j.tibtech.2018.02.006
- Laonud, P., Chaikut, N. ve Ksapabutr, B. (2010). Poly (lactic acid) preparation by polycondensation method, 4(8), 1200–1202.
- Lazzari, S., Moscatelli, D., Codari, F., Salmona, M., Morbidelli, M. ve Diomede, L. (2012). Colloidal stability of polymeric nanoparticles in biological fluids. *Journal of Nanoparticle Research*. doi:10.1007/s11051-012-0920-7
- Lee, J., Cho, E. C. ve Cho, K. (2004). Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(D,L-lactide)-block-poly(ethylene oxide) micelles. *Journal of Controlled Release*, 94(2–3), 323–335. doi:10.1016/j.jconrel.2003.10.012
- Lemoine, D. ve Pr  at, V. (1998). Polymeric nanoparticles as delivery system for influenza virus glycoproteins. *Journal of Controlled Release*, 54(1), 15–27. doi:10.1016/S0168-3659(97)00241-1
- Li, D., van Nostrum, C. F., Mastrobattista, E., Vermonden, T. ve Hennink, W. E. (2017). Nanogels for intracellular delivery of biotherapeutics. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2016.12.020
- Li, F., Ren, G. S., Li, H. Y., Wang, X. Y., Chen, L. ve Li, J. (2009). A Novel Single Nucleotide Polymorphism of the Cyclooxygenase-2 Gene Associated with Breast Cancer. *Clinical Oncology*. doi:10.1016/j.clon.2008.12.005
- Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M. ve Zhao, X. (2020). Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). doi:10.1038/s41392-019-0089-y
- Li, L., He, Z. Y., Wei, X. W., Gao, G. P. ve Wei, Y. Q. (2015). Challenges in CRISPR/CAS9 Delivery: Potential Roles of Nonviral Vectors. *Human Gene Therapy*, 26(7), 452–462. doi:10.1089/hum.2015.069
- Lim, J., You, M., Li, J. ve Li, Z. (2017). Emerging bone tissue engineering via Polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffolds. *Materials Science and Engineering C*. doi:10.1016/j.msec.2017.05.132
- Link, C., Alexis, F., Pridgen, E. ve Molnar, L. K. (2015). Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Molecular pharmaceuticals*.
- Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P. ve Timlin, J. A. (2018). Delivering crispr: A review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*. doi:10.1080/10717544.2018.1474964
- Liu, B. Y., He, X. Y., Xu, C., Xu, L., Ai, S. L., Cheng, S. X. ve Zhuo, R. X. (2018). A Dual-Targeting Delivery System for Effective Genome Editing and in Situ Detecting Related Protein Expression in Edited Cells. *Biomacromolecules*. doi:10.1021/acs.biomac.8b00511
- Liu, C., Zhang, L., Liu, H. ve Cheng, K. (2017). Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *Journal of Controlled Release*, 266(June), 17–26. doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.012
- Liu, D., Ji, L., Wang, Y. ve Zheng, L. (2013). Cyclooxygenase-2 Expression, Prostacyclin

- Production and Endothelial Protection of High-density Lipoprotein. *Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets*. doi:10.2174/1871529x11202020098
- Liu, M., Zhou, Z., Wang, X., Xu, J., Yang, K., Cui, Q., ... Zhang, Q. (2007). Formation of poly(l,d-lactide) spheres with controlled size by direct dialysis. *Polymer*, 48(19), 5767–5779. doi:10.1016/j.polymer.2007.07.053
- Liu, S., Gao, Y., Zhou, D., Zeng, M., Alshehri, F., Newland, B., ... Wang, W. (2019). Highly branched poly(β -amino ester) delivery of minicircle DNA for transfection of neurodegenerative disease related cells. *Nature Communications*. doi:10.1038/s41467-019-11190-0
- Liu, T. Y., Liu, J. J., Aditham, A. J., Nogales, E. ve Doudna, J. A. (2019). Target preference of Type III-A CRISPR-Cas complexes at the transcription bubble. *Nature Communications*, 10(1). doi:10.1038/s41467-019-10780-2
- Liu, Yang, Zhao, G., Xu, C. F., Luo, Y. L., Lu, Z. D. ve Wang, J. (2018). Systemic delivery of CRISPR/Cas9 with PEG-PLGA nanoparticles for chronic myeloid leukemia targeted therapy. *Biomaterials Science*. doi:10.1039/c8bm00263k
- Liu, Yong, Li, Y., Keskin, D. ve Shi, L. (2019). Poly(β -Amino Esters): Synthesis, Formulations, and Their Biomedical Applications. *Advanced Healthcare Materials*. doi:10.1002/adhm.201801359
- Lungwitz, U., Breunig, M., Blunk, T. ve Göpferich, A. (2005). Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* içinde . doi:10.1016/j.ejpb.2004.11.011
- Lynn, D. M. ve Langer, R. (2000). Degradable poly(β -amino esters): Synthesis, characterization, and self-assembly with plasmid DNA. *Journal of the American Chemical Society*. doi:10.1021/ja0015388
- Mahmood Aljamali, N. (2015). Zetasizer Technique in Biochemistry. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*. doi:10.4172/2161-1009.1000168
- Makarova, K. S., Aravind, L., Wolf, Y. I. ve Koonin, E. V. (2011). Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biology Direct*, 6, 1–27. doi:10.1186/1745-6150-6-38
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., ... Garrett, R. A. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature reviews Microbiology*, 13(11), 722–736. doi:10.1038/nrmicro3569
- Malzahn, A., Lowder, L. ve Qi, Y. (2017). Plant genome editing with TALEN and CRISPR. *Cell and Bioscience*. doi:10.1186/s13578-017-0148-4
- Manghwar, H., Lindsey, K., Zhang, X. ve Jin, S. (2019). CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. *Trends in Plant Science*. doi:10.1016/j.tplants.2019.09.006
- Mangraviti, A., Tzeng, S. Y., Kozielski, K. L., Wang, Y., Jin, Y., Gullotti, D., ... Green, J. J. (2015). Polymeric nanoparticles for nonviral gene therapy extend brain tumor survival in vivo. *ACS Nano*. doi:10.1021/nn504905q
- Marchini, C., Montani, M., Amici, A., Amenitsch, H., Marianecci, C., Pozzi, D. ve Caracciolo, G. (2009). Structural stability and increase in size rationalize the efficiency of lipoplexes in serum. *Langmuir*. doi:10.1021/la8033726
- Martens, T. F., Remaut, K., Demeester, J., De Smedt, S. C. ve Braeckmans, K. (2014). Intracellular delivery of nanomaterials: How to catch endosomal escape in the act. *Nano Today*. doi:10.1016/j.nantod.2014.04.011
- Martin, O. ve Avérous, L. (2001). Poly(lactic acid): Plasticization and properties of

- biodegradable multiphase systems. *Polymer*. doi:10.1016/S0032-3861(01)00086-6
- Mashiko, D., Fujihara, Y., Satouh, Y., Miyata, H., Isotani, A. ve Ikawa, M. (2013). Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Scientific Reports*. doi:10.1038/srep03355
- Masotti, A., Miller, M. R., Celluzzi, A., Rose, L., Micciulla, F., Hadoke, P. W. F., ... Caporali, A. (2016). Regulation of angiogenesis through the efficient delivery of microRNAs into endothelial cells using polyamine-coated carbon nanotubes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. doi:10.1016/j.nano.2016.02.017
- Medina, S. H. ve El-Sayed, M. E. H. (2009). Dendrimers as carriers for delivery of chemotherapeutic agents. *Chemical Reviews*. doi:10.1021/cr900174j
- Michael Garavito, R., Malkowski, M. G. ve DeWitt, D. L. (2002). The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. doi:10.1016/S0090-6980(02)00026-6
- Midoux, P., Breuzard, G., Gomez, J. ve Pichon, C. (2008). Polymer-Based Gene Delivery: A Current Review on the Uptake and Intracellular Trafficking of Polyplexes. *Current Gene Therapy*. doi:10.2174/156652308786071014
- Min, S., Jin, Y., Hou, C. Y., Kim, J., Green, J. J., Kang, T. J. ve Cho, S. W. (2018). Bacterial tRNase-Based Gene Therapy with Poly(β -Amino Ester) Nanoparticles for Suppressing Melanoma Tumor Growth and Relapse. *Advanced Healthcare Materials*. doi:10.1002/adhm.201800052
- Mintzer, M. A. ve Grinstaff, M. W. (2011). Biomedical applications of dendrimers: A tutorial. *Chemical Society Reviews*. doi:10.1039/b901839p
- Mohammed J. Meziani, Pankaj Pathak, Razvan Hurezeanu, Mark C. Thies, Robert M. Enick, and Y.-P. S. (2004). Supercritical-Fluid Processing Technique for Nanoscale Polymer Particles**, 704–707. doi:10.1002/anie.200352834
- Mout, R., Ray, M., Yesilbag Tonga, G., Lee, Y. W., Tay, T., Sasaki, K. ve Rotello, V. M. (2017). Direct Cytosolic Delivery of CRISPR/Cas9-Ribonucleoprotein for Efficient Gene Editing. *ACS Nano*. doi:10.1021/acsnano.6b07600
- Müller, R. H., Wallis, K. H., Tröster, S. D. ve Kreuter, J. (1992). In vitro characterization of poly(methyl-methacrylate) nanoparticles and correlation to their in vivo fate. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/0168-3659(92)90126-C
- Nagavarma, B. V. N., Yadav, H. K. S., Ayaz, A., Vasudha, L. S. ve Shivakumar, H. G. (2012). Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(SUPPL. 3), 16–23.
- Nakagawa, Y., Sakuma, T., Sakamoto, T., Ohmuraya, M., Nakagata, N. ve Yamamoto, T. (2015). Production of knockout mice by DNA microinjection of various CRISPR/Cas9 vectors into freeze-thawed fertilized oocytes. *BMC Biotechnology*. doi:10.1186/s12896-015-0144-x
- Nicolaÿ, R., Kwak, Y. ve Matyjaszewski, K. (2010). A green route to well-defined high-molecular-weight (co)polymers using ARGET ATRP with alkyl pseudohalides and copper catalysis. *Angewandte Chemie - International Edition*. doi:10.1002/anie.200905340
- Nienhuis, A. W., Dunbar, C. E. ve Sorrentino, B. P. (2006). Genotoxicity of Retroviral Integration In Hematopoietic Cells. *Molecular Therapy*. doi:10.1016/j.ymthe.2006.03.001
- Niu, G., Jin, Z., Zhang, C., He, D., Gao, X., Zou, C., ... Hu, Z. (2020). An effective vaginal gel to deliver CRISPR/Cas9 system encapsulated in poly (β -amino ester)

- nanoparticles for vaginal gene therapy. *EBioMedicine*. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102897
- Niu, Y., Shen, B., Cui, Y., Chen, Y., Wang, J., Wang, L., ... Sha, J. (2014). Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2014.01.027
- Norman, M. E., Williams, P. ve Illum, L. (1992). Human serum albumin as a probe for surface conditioning (opsonization) of block copolymer-coated microspheres. *Biomaterials*. doi:10.1016/0142-9612(92)90177-P
- Ogino, S., Kirkner, G. J., Noshio, K., Irahara, N., Kure, S., Shima, K., ... Fuchs, C. S. (2008). Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer. *Clinical Cancer Research*. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1841
- Oh, J. K. (2011). Polylactide (PLA)-based amphiphilic block copolymers: Synthesis, self-assembly, and biomedical applications. *Soft Matter*. doi:10.1039/c0sm01539c
- Ohsaki, M., Okuda, T., Wada, A., Hirayama, T., Niidome, T. ve Aoyagi, H. (2002). In vitro gene transfection using dendritic poly(L-lysine). *Bioconjugate Chemistry*. doi:10.1021/bc015525a
- Osakabe, Y. ve Osakabe, K. (2015). Genome editing with engineered nucleases in plants. *Plant and Cell Physiology*. doi:10.1093/pcp/pcu170
- Otsuka, H., Nagasaki, Y. ve Kataoka, K. (2012). PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi:10.1016/j.addr.2012.09.022
- Oude Blenke, E., Evers, M. J. W., Mastrobattista, E. ve van der Oost, J. (2016). CRISPR-Cas9 gene editing: Delivery aspects and therapeutic potential. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2016.08.002
- Owens, D. E. ve Peppas, N. A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.010
- Peracchia, M. T., Fattal, E., Desmaële, D., Besnard, M., Noël, J. P., Gomis, J. M., ... Couvreur, P. (1999). Stealth® PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/S0168-3659(99)00063-2
- Plard, J. P. ve Bazile, D. (1999). Comparison of the safety profiles of PLA50 and Me.PEG-PLA50 nanoparticles after single dose intravenous administration to rat. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. doi:10.1016/S0927-7765(99)00068-5
- Poly, T., Zhang, Y., Wang, R., Hua, Y., Baumgartner, R. ve Cheng, J. (2014). Trigger-Responsive Poly(β -amino ester) Hydrogels, (Scheme 1), 3–7.
- Popovic, N., Maingay, M., Kirik, D. ve Brundin, P. (2005). Lentiviral gene delivery of GDNF into the striatum of R6/2 Huntington mice fails to attenuate behavioral and neuropathological changes. *Experimental Neurology*. doi:10.1016/j.expneurol.2004.12.009
- Prencipe, G., Tabakman, S. M., Welsher, K., Liu, Z., Goodwin, A. P., Zhang, L., ... Dai, H. (2009). PEG branched polymer for functionalization of nanomaterials with ultralong blood circulation. *Journal of the American Chemical Society*. doi:10.1021/ja809086q
- Puchta, H. (2017). Applying CRISPR/Cas for genome engineering in plants: the best is yet to come. *Current Opinion in Plant Biology*, 36, 1–8. doi:10.1016/j.pbi.2016.11.011
- Qiu, Y., Liu, Y., Wang, L., Xu, L., Bai, R., Ji, Y., ... Chen, C. (2010). Surface chemistry

- and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials*. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.06.051
- Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H. ve Doelker, E. (1998). Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24(12), 1113–1128. doi:10.3109/03639049809108571
- Raghavan, A., Wang, X., Rogov, P., Wang, L., Zhang, X., Mikkelsen, T. ve Musunuru, K. (2016). High-Throughput Screening and CRISPR-Cas9 Modeling of Causal Lipid-Associated Expression Quantitative Trait Locus Variants. *bioRxiv*. doi:10.1101/056820
- Rai, R., Alwani, S. ve Badea, I. (2019). Polymeric nanoparticles in gene therapy: New avenues of design and optimization for delivery applications. *Polymers*. doi:10.3390/polym11040745
- Ramakrishna, S., Kwaku Dad, A. B., Beloor, J., Gopalappa, R., Lee, S. K. ve Kim, H. (2014). Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Research*. doi:10.1101/gr.171264.113
- Ramsay, R. G., Ciznadija, D., Vanevski, M. ve Mantamadiotis, T. (2003). Transcriptional regulation of cyclo-oxygenase expression: Three pillars of control. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*.
- Rao, J. P. ve Geckeler, K. E. (2011). Progress in Polymer Science Polymer nanoparticles : Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36(7), 887–913. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001
- Rasmussen, M. K., Pedersen, J. N. ve Marie, R. (2020). Size and surface charge characterization of nanoparticles with a salt gradient. *Nature Communications*. doi:10.1038/s41467-020-15889-3
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A. ve Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119–128. doi:10.1016/j.biochi.2015.03.025
- Reis, C. P. ve Neufeld, R. J. (2006). Nanoencapsulation I . Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, 2, 8–21. doi:10.1016/j.nano.2005.12.003
- Remy, S., Chenouard, V., Tesson, L., Usal, C., Ménoret, S., Brusselle, L., ... Anegón, I. (2017). Generation of gene-edited rats by delivery of CRISPR/Cas9 protein and donor DNA into intact zygotes using electroporation /631/1647/1511 /631/61 /42 /42/41 article. *Scientific Reports*. doi:10.1038/s41598-017-16328-y
- Ricciotti, E. ve Fitzgerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207449
- Robert, J. L. ve Aubrecht, K. B. (2008). Ring-Opening Polymerization of Lactide To Form a Biodegradable Polymer, 85(2), 258–260.
- Roser, M., Fischer, D. ve Kissel, T. (1998). Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: Effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. doi:10.1016/S0939-6411(98)00038-1
- Rouzer, C. A. ve Marnett, L. J. (2009). Cyclooxygenases: Structural and functional insights. *Journal of Lipid Research*. doi:10.1194/jlr.R800042-JLR200
- Rui, Y., Varanasi, M., Mendes, S., Yamagata, H. M., Wilson, D. R. ve Green, J. J. (2020). Poly(Beta-Amino Ester) Nanoparticles Enable Nonviral Delivery of CRISPR-Cas9 Plasmids for Gene Knockout and Gene Deletion. *Molecular Therapy - Nucleic*

- Acids*. doi:10.1016/j.omtn.2020.04.005
- Rui, Y., Wilson, D. R., Choi, J., Varanasi, M., Sanders, K., Karlsson, J., ... Green, J. J. (2019). Carboxylated branched poly(β -amino ester) nanoparticles enable robust cytosolic protein delivery and CRISPR-Cas9 gene editing. *Science Advances*. doi:10.1126/sciadv.aay3255
- Ryu, N., Kim, M. A., Park, D., Lee, B., Kim, Y. R., Kim, K. H., ... Kim, U. K. (2018). Effective PEI-mediated delivery of CRISPR-Cas9 complex for targeted gene therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. doi:10.1016/j.nano.2018.06.009
- Ryu, S. M., Hur, J. W. ve Kim, K. (2019). Evolution of CRISPR towards accurate and efficient mammal genome engineering. *BMB Reports*. doi:10.5483/BMBRep.2019.52.8.149
- Sakuma, T., Barry, M. A. ve Ikeda, Y. (2012). Lentiviral vectors: Basic to translational. *Biochemical Journal*. doi:10.1042/BJ20120146
- Sambrook, J. ve Russell, D. W. (2006). The Hanahan Method for Preparation and Transformation of Competent E. coli: High-efficiency Transformation . *Cold Spring Harbor Protocols*. doi:10.1101/pdb.prot3942
- Sansbury, B. M., Hewes, A. M. ve Kmiec, E. B. (2019). Understanding the diversity of genetic outcomes from CRISPR-Cas generated homology-directed repair. *Communications Biology*. doi:10.1038/s42003-019-0705-y
- Santos-Carballal, B., Fernández, E. F. ve Goycoolea, F. M. (2018). Chitosan in non-viral gene delivery: Role of structure, characterization methods, and insights in cancer and rare diseases therapies. *Polymers*. doi:10.3390/polym10040444
- Sasaki, H., Yoshida, K., Hozumi, A. ve Sasakura, Y. (2014). CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Development Growth and Differentiation*. doi:10.1111/dgd.12149
- Savić, R., Luo, L., Eisenberg, A. ve Maysinger, D. (2003). Micellar nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles. *Science*. doi:10.1126/science.1078192
- Segovia, N., Dosta, P., Cascante, A., Ramos, V. ve Borrós, S. (2014). Oligopeptide-terminated poly(β -amino ester)s for highly efficient gene delivery and intracellular localization. *Acta Biomaterialia*. doi:10.1016/j.actbio.2013.12.054
- Selvamani, V. (2018). Stability Studies on Nanomaterials Used in Drugs. *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery: Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery içinde* . doi:10.1016/B978-0-12-814031-4.00015-5
- Semete, B., Booyesen, L., Lemmer, Y., Kalombo, L., Katata, L., Verschoor, J. ve Swai, H. S. (2010). In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. doi:10.1016/j.nano.2010.02.002
- Seow, Y. ve Wood, M. J. (2009). Biological gene delivery vehicles: Beyond viral vectors. *Molecular Therapy*. doi:10.1038/mt.2009.41
- Shadrack, D. M., Mubofu, E. B. ve Nyandoro, S. S. (2015). Synthesis of polyamidoamine dendrimer for encapsulating tetramethylscutellarein for potential bioactivity enhancement. *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms161125956
- Sharei, A., Zoldan, J., Adamo, A., Sim, W. Y., Cho, N., Jackson, E., ... Jensen, K. F. (2013). A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

- doi:10.1073/pnas.1218705110
- Sharma, A., Madhunapantula, S. V. ve Robertson, G. P. (2012). Toxicological considerations when creating nanoparticle-based drugs and drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. doi:10.1517/17425255.2012.637916
- Shirley, J. L., de Jong, Y. P., Terhorst, C. ve Herzog, R. W. (2020). Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors. *Molecular Therapy*. doi:10.1016/j.ymthe.2020.01.001
- Shmueli, R. B., Sunshine, J. C., Xu, Z., Duh, E. J. ve Green, J. J. (2012). Gene delivery nanoparticles specific for human microvasculature and macrovasculature. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. doi:10.1016/j.nano.2012.01.006
- Shnoudeh, A. J., Hamad, I., Abdo, R. W., Qadumii, L., Jaber, A. Y., Surchi, H. S. ve Alkelany, S. Z. (2019). Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles. *Biomaterials and Bionanotechnology* içinde . doi:10.1016/B978-0-12-814427-5.00015-9
- Siegel, S. J., Kahn, J. B., Metzger, K., Werner, K., Dan, N. ve Winey, K. I. (2006). Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices, 64, 287–293. doi:10.1016/j.ejpb.2006.06.009
- Simmons, D. L., Botting, R. M. ve Hla, T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological Reviews*. doi:10.1124/pr.56.3.3
- Singh, R. P. ve Ramarao, P. (2013). Accumulated polymer degradation products as effector molecules in cytotoxicity of polymeric nanoparticles. *Toxicological Sciences*. doi:10.1093/toxsci/kft179
- Sinkunas, T., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P. ve Siksnys, V. (2011). Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO Journal*, 30(7), 1335–1342. doi:10.1038/emboj.2011.41
- Slade, N. (2001). Viral vectors in gene therapy. *Periodicum Biologorum* içinde . doi:10.3390/diseases6020042
- Song, C. X., Labhasetwar, V., Murphy, H., Qu, X., Humphrey, W. R., Shebuski, R. J. ve Levy, R. J. (1997). Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 43(2–3), 197–212. doi:10.1016/S0168-3659(96)01484-8
- Song, H., Wang, G., He, B., Li, L., Li, C., Lai, Y., ... Gu, Z. (2012). Cationic lipid-coated PEI/DNA polyplexes with improved efficiency and reduced cytotoxicity for gene delivery into mesenchymal stem cells. *International Journal of Nanomedicine*. doi:10.2147/IJN.S33923
- Song, W., Tang, Z., Li, M., Lv, S., Yu, H., Ma, L., ... Chen, X. (2012). Tunable pH-Sensitive Poly(β -amino ester)s Synthesized from Primary Amines and Diacrylates for Intracellular Drug Delivery. *Macromolecular Bioscience*, 12(10), 1375–1383. doi:10.1002/mabi.201200122
- Stewart, M. P., Sharei, A., Ding, X., Sahay, G., Langer, R. ve Jensen, K. F. (2016). In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery. *Nature*. doi:10.1038/nature19764
- Stripecke, R. ve Kasahara, N. (2007). Lentiviral and Retroviral Vector Systems. *Gene Therapy for Cancer* içinde . doi:10.1007/978-1-59745-222-9_3

- Su, C., Liu, Y., He, Y. ve Gu, J. (2018). Analytical methods for investigating in vivo fate of nanoliposomes: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. doi:10.1016/j.jpha.2018.07.002
- Sun, H., Zhang, X., Sun, D., Jia, X., Xu, L., Qiao, Y. ve Jin, Y. (2017). COX-2 expression in ovarian cancer: An updated meta-analysis. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.21538
- Sun, W., Ji, W., Hall, J. M., Hu, Q., Wang, C., Beisel, C. L. ve Gu, Z. (2015). Self-Assembled DNA Nanoclews for the Efficient Delivery of CRISPR-Cas9 for Genome Editing. *Angewandte Chemie - International Edition*. doi:10.1002/anie.201506030
- Suresh, B., Ramakrishna, S. ve Kim, H. (2017). Cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA for genome editing. *Methods in Molecular Biology* içinde . doi:10.1007/978-1-4939-6518-2_7
- Svenson, S. ve Tomalia, D. A. (2005). Dendrimers in biomedical applications - Reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi:10.1016/j.addr.2005.09.018
- Syeda, F., Grosjean, J., Houliston, R. A., Keogh, R. J., Carter, T. D., Paleolog, E. ve Wheeler-Jones, C. P. D. (2006). Cyclooxygenase-2 induction and prostacyclin release by protease-activated receptors in endothelial cells require cooperation between mitogen-activated protein kinase and NF- κ B pathways. *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M509292200
- Tang, X., Lowder, L. G., Zhang, T., Malzahn, A. A., Zheng, X., Voytas, D. F., ... Qi, Y. (2017). A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. *Nature Plants*, 3(February), 1–5. doi:10.1038/nplants.2017.18
- Tao, Y., Hou, X., Zuo, F., Li, X., Pang, Y. ve Jiang, G. (2019). Application of nanoparticle-based siRNA and CRISPR/Cas9 delivery systems in gene-targeted therapy. *Nanomedicine*. doi:10.2217/nnm-2018-0522
- Thakur, V., Gonzalez, M., Pennington, K. ve Chattopadhyay, M. (2016). Viral vector mediated continuous expression of interleukin-10 in DRG alleviates pain in type 1 diabetic animals. *Molecular and Cellular Neuroscience*. doi:10.1016/j.mcn.2016.01.006
- Thomas, T. J., Tajmir-Riahi, H. A. ve Pillai, C. K. S. (2019). Biodegradable polymers for gene delivery. *Molecules*. doi:10.3390/molecules24203744
- Timin, A. S., Muslimov, A. R., Lepik, K. V., Epifanovskaya, O. S., Shakirova, A. I., Mock, U., ... Sukhorukov, G. B. (2018). Efficient gene editing via non-viral delivery of CRISPR–Cas9 system using polymeric and hybrid microcarriers. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. doi:10.1016/j.nano.2017.09.001
- Trubetskoy, V. S., Torchilin, V. P., Huang, L., Trubetskoy, V. S., Torchilin, V. P., Kennel, S. J. ve Huang, L. (1992). Use of N-Terminal Modified Poly(L-Lysine)-Antibody Conjugate as a Carrier for Targeted Gene Delivery in Mouse Lung Endothelial Cells. *Bioconjugate Chemistry*. doi:10.1021/bc00016a011
- Turecek, P. L., Bossard, M. J., Schoetens, F. ve Ivens, I. A. (2016). PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. doi:10.1016/j.xphs.2015.11.015
- Tzeng, S. Y., Guerrero-Cázares, H., Martinez, E. E., Sunshine, J. C., Quiñones-Hinojosa Alfredo, A. ve Green, J. J. (2011). Non-viral gene delivery nanoparticles based on Poly(β -amino esters) for treatment of glioblastoma. *Biomaterials*, 32(23), 5402–

5410. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.016
- Van der Donk, W. A., Tsai, A. L. ve Kulmacz, R. J. (2002). The cyclooxygenase reaction mechanism. *Biochemistry*. doi:10.1021/bi026938h
- van Dongen, J. E., Berendsen, J. T. W., Steenbergen, R. D. M., Wolthuis, R. M. F., Eijkel, J. C. T. ve Segerink, L. I. (2020). Point-of-care CRISPR/Cas nucleic acid detection: Recent advances, challenges and opportunities. *Biosensors and Bioelectronics*. doi:10.1016/j.bios.2020.112445
- Vandebroek, A. ve Schrijvers, D. (2007). Gene therapy. *ESMO Handbook on Principles of Translational Research* içinde . doi:10.5005/jp/books/14244_72
- Vasir, J. K. ve Labhasetwar, V. (2006). Polymeric nanoparticles for gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. doi:10.1517/17425247.3.3.325
- Vaughan, E. E. ve Dean, D. A. (2006). Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules. *Molecular Therapy*. doi:10.1016/j.ymthe.2005.10.004
- Vaughan, E. E., Geiger, C. R., Miller, A. M., Loh-Marley, P. L., Suzuki, T., Miyata, N. ve Dean, D. A. (2008). Microtubule acetylation through HDAC6 inhibition results in increased transfection efficiency. *Molecular Therapy*. doi:10.1038/mt.2008.190
- Volpers, C. ve Kochanek, S. (2004). Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *Journal of Gene Medicine*. doi:10.1002/jgm.496
- von Gersdorff, K., Sanders, N. N., Vandenbroucke, R., De Smedt, S. C., Wagner, E. ve Ogris, M. (2006). The Internalization Route Resulting in Successful Gene Expression Depends on both Cell Line and Polyethylenimine Polyplex Type. *Molecular Therapy*. doi:10.1016/j.ymthe.2006.07.006
- Von Harpe, A., Petersen, H., Li, Y. ve Kissel, T. (2000). Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *Journal of Controlled Release*. doi:10.1016/S0168-3659(00)00317-5
- Wang, H., Shi, H. B. ve Yin, S. K. (2011). Polyamidoamine dendrimers as gene delivery carriers in the inner ear: How to improve transfection efficiency (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. doi:10.3892/etm.2011.296
- Wang, M., Zuris, J. A., Meng, F., Rees, H., Sun, S., Deng, P., ... Xu, Q. (2016). Efficient delivery of genome-editing proteins using bio-reducible lipid nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi:10.1073/pnas.1520244113
- Wani, T. U., Raza, S. N. ve Khan, N. A. (2020). Nanoparticle opsonization: forces involved and protection by long chain polymers. *Polymer Bulletin*. doi:10.1007/s00289-019-02924-7
- Ways, T. M. M., Lau, W. M. ve Khutoryanskiy, V. V. (2018). Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems. *Polymers*. doi:10.3390/polym10030267
- Wilson, D. R., Suprenant, M. P., Michel, J. H., Wang, E. B., Tzeng, S. Y. ve Green, J. J. (2019). The role of assembly parameters on polyplex poly(beta-amino ester) nanoparticle transfections. *Biotechnology and Bioengineering*. doi:10.1002/bit.26921
- Wold, W. ve Toth, K. (2014). Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy. *Current Gene Therapy*. doi:10.2174/1566523213666131125095046
- Wu, G. F., Luo, J., Rana, J. S., Laham, R., Sellke, F. W. ve Li, J. (2006). Involvement of COX-2 in VEGF-induced angiogenesis via P38 and JNK pathways in vascular

- endothelial cells. *Cardiovascular Research*. doi:10.1016/j.cardiores.2005.09.019
- Xu, C., Lu, Z., Luo, Y., Liu, Y., Cao, Z., Shen, S., ... Wang, J. (2018). Targeting of NLRP3 inflammasome with gene editing for the amelioration of inflammatory diseases. *Nature Communications*. doi:10.1038/s41467-018-06522-5
- Yamagata, M., Kawano, T., Shiba, K., Mori, T., Katayama, Y. ve Niidome, T. (2007). Structural advantage of dendritic poly(l-lysine) for gene delivery into cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15(1), 526–532. doi:10.1016/j.bmc.2006.09.033
- Yan, Q., Zhang, Q., Yang, H., Zou, Q., Tang, C., Fan, N. ve Lai, L. (2014). Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system. *Cell Regeneration*. doi:10.1186/2045-9769-3-12
- Yanwu Huo, Ki Hyun Nam, Fang Ding, Heejin Lee, Lijie Wu, Yibei Xiao¹, F. Daniel Farchione¹, Sharleen Zhou, Raj Rajashankar, Igor Kurinov⁴, Rongguang Zhang, and A. K. (2011). Structures of CRISPR Cas3 offer mechanistic insights into Cascade-activated DNA unwinding and degradation. *Physiology & behavior*, 176(1), 139–148. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
- Yarmush, M. L., Golberg, A., Serša, G., Kotnik, T. ve Miklavčič, D. (2014). Electroporation-based technologies for medicine: Principles, applications, and challenges. *Annual Review of Biomedical Engineering*. doi:10.1146/annurev-bioeng-071813-104622
- Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R. ve Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics*, 15(8), 541–555. doi:10.1038/nrg3763
- Yin, H., Song, C. Q., Dorkin, J. R., Zhu, L. J., Li, Y., Wu, Q., ... Anderson, D. G. (2016). Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nature Biotechnology*. doi:10.1038/nbt.3471
- Yip, B. H. (2020). Recent advances in CRISPR/Cas9 delivery strategies. *Biomolecules*. doi:10.3390/biom10060839
- York, P. ve York, P. (1999). Strategies for particle design using supercritical fluid technologies, 2(11).
- Zambaux, M. F., Bonneaux, F., Gref, R., Maincent, P., Dellacherie, E., Alonso, M. J., ... Vigneron, C. (1998). Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *Journal of Controlled Release*, 50(1–3), 31–40. doi:10.1016/S0168-3659(97)00106-5
- Zhang, F., Wen, Y. ve Guo, X. (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics*, 23(R1), 40–46. doi:10.1093/hmg/ddu125
- Zhang, Zhen, Wan, T., Chen, Y., Chen, Y., Sun, H., Cao, T., ... Huang, J. (2019). Cationic Polymer-Mediated CRISPR/Cas9 Plasmid Delivery for Genome Editing. *Macromolecular Rapid Communications*. doi:10.1002/marc.201800068
- Zhang, Zheng, Grijpma, D. W. ve Feijen, J. (2006). Poly(trimethylene carbonate) and monomethoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(trimethylene carbonate) nanoparticles for the controlled release of dexamethasone. *Journal of Controlled Release*, 111(3), 263–270. doi:10.1016/j.jconrel.2005.12.001
- Zhao, J., Yang, L., Huang, P., Wang, Z. Y., Tan, Y., Liu, H., ... Chen, Z. Y. (2016). Synthesis and characterization of low molecular weight polyethyleneimine-terminated Poly(β -amino ester) for highly efficient gene delivery of minicircle DNA. *Journal of Colloid and Interface Science*. doi:10.1016/j.jcis.2015.10.025

- Zhu, D., Shen, H., Tan, S., Hu, Z., Wang, L., Yu, L., ... Wang, H. (2018). Nanoparticles Based on Poly (β -Amino Ester) and HPV16-Targeting CRISPR/shRNA as Potential Drugs for HPV16-Related Cervical Malignancy. *Molecular Therapy*. doi:10.1016/j.ymthe.2018.07.019
- Zhuang, J., Tan, J., Wu, C., Zhang, J., Liu, T., Fan, C., ... Zhang, Y. (2020). Extracellular vesicles engineered with valency-controlled DNA nanostructures deliver CRISPR/Cas9 system for gene therapy. *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/gkaa683
- Zielinska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Nagasamy Venkatesh, D., ... Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*. doi:10.3390/molecules25163731
- Zu, G., Liu, M., Zhang, K., Hong, S., Dong, J., Cao, Y., ... Pei, R. (2016). Functional Hyperbranched Polylysine as Potential Contrast Agent Probes for Magnetic Resonance Imaging. *Biomacromolecules*. doi:10.1021/acs.biomac.6b00605
- Zugates, G. T., Anderson, D. G., Little, S. R., Lawhorn, I. E. B. ve Langer, R. (2006). Synthesis of poly(β -amino ester)s with thiol-reactive side chains for DNA delivery. *Journal of the American Chemical Society*, 128(39), 12726–12734. doi:10.1021/ja061570n
- Zuris, J. A., Thompson, D. B., Shu, Y., Guilinger, J. P., Bessen, J. L., Hu, J. H., ... Liu, D. R. (2015). Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nature Biotechnology*. doi:10.1038/nbt.3081