

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİMER/OLİGONÜKLEOTİD KOMPLEKSLERİNİN KARAKTERİZASYONU VE
MODELLENMESİ**

ERAY DALGAKIRAN

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. SEVİL DİNÇER**

İSTANBUL, 2013

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİMER/OLİGONÜKLEOTİD KOMPLEKSLERİNİN KARAKTERİZASYONU VE
MODELLENMESİ**

Eray DALGAKIRAN tarafından hazırlanan tez çalışması 08/07/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Sevil DİNÇER
Abdullah Gül Üniversitesi

Eş Danışman

Prof. Dr. Hasan TATLIPINAR
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Sevil DİNÇER
Abdullah Gül Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Ayşe OĞAN
Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Oya OĞUZ
Haliç Üniversitesi

Bu araştırmada yer alan nümerik hesaplamalar TÜBİTAK ULAKBİM, Yüksek Başarım ve Grid Hesaplama Merkezi'nde (TRUBA Kaynaklarında) gerçekleştirilmiştir.

ÖNSÖZ

Bana kendisiyle çalışma fırsatı vererek bu tez çalışmasının ortaya çıkmasına olanak tanıyan, önerileriyle tezime şekil veren, ilgi ve desteğiyle hep yanımda olan danışmanım Doç. Dr. Sevil DİNÇER'e,

Tez çalışmasının modelleme kısmında bilgi ve deneyimiyle beni yönlendiren, aynı zamanda ilgi ve desteğini hiç eksik etmeyen eş danışmanım Prof. Dr. Hasan TATLIPINAR'a,

Bugün aramızda olmayan ancak üzerimde büyük emekleri geçen önceki danışmanlarım rahmetli Prof. Dr. M. Mustafaev AKDESTE'ye ve rahmetli Prof. Dr. Huriye KUZU'ya,

Yaptıkları önerilerle tez çalışmamın ilerlemesine katkı sağlayan ve benden desteklerini esirgemeyen tez izleme jüri üyeleri Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK'a ve Prof. Dr. Ayşe OGAN'a,

Rahat ve huzurlu bir ortamda çalışma fırsatı yaratan Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK'a,

Lisans eğitimimden bu yana hep yanımda yer alan ve bana her konuda motivasyon kaynağı olan değerli hocam Prof. Dr. Handan GÜRBÜZ'e,

Amber programının çalışmasını gösteren Yrd. Doç. Dr. Bülent BALTA'ya,

Çalışmadaki polimerleri sentezleyen ve bana da sentez yapmayı öğreten sevgili arkadaşlarım Ayşe KARAGÖZ'e ve Gürhan UZUNALAN'a,

Modelleme konusunda yardımcı olan arkadaşlarım Dr. Necati VARDAR'a ve Dr. Önder EYECİOĞLU'na,

Bana bugüne kadar sabır gösteren ve kimya bilgisiyle dostluğunu benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli arkadaşım Arş. Gör. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI'na,

Bölümlerimiz farklı olsa da eziyetimiz bir geçen sevgili arkadaşım Arş. Gör. Dr. Mehmet KILIÇ'a,

Tüm hayatım boyunca bana her türlü desteği veren sevgili aileme,

Ve tezde emeği geçen adını sayamadığım herkese çok teşekkür ederim...

Temmuz, 2013

Eray DALGAKIRAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÇİZELGE LİSTESİ	xvi
ÖZET	xviii
ABSTRACT	xx
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez	3
BÖLÜM 2.....	4
POLİMER/DNA KOMPLEKSLERİ	4
2.1 Polimer/Biyomakromolekül Kompleksleri	4
2.1.1 Polimer/Biyomakromolekül Kompleks Türleri	7
2.2 Polimer/DNA Kompleksleri	8
2.2.1 DNA'nın Kimyasal Yapısı	8
2.2.2 DNA Kondensasyonu	11
2.2.3 Polimer/DNA Komplekslerinin Oluşumu	12
2.2.4 Polimer/DNA Komplekslerinin Özellikleri.....	13
2.2.5 Polimer/DNA Komplekslerinin Önemi	14
2.3 Gen Terapisi	15
2.3.1 Viral Olmayan Gen Transferini Sınırlayan Engeller.....	16
2.3.2 Viral Olmayan Polimerik Vektörler	18
2.3.2.1 Poli(etilen imin)	19
2.3.2.2 Amfifilik Polimerler	21

2.4	Oligonükleotid Antisens Terapisi	23
2.5	Polimer/DNA Komplekslerinin Karakterizasyonu	24
2.5.1	Literatürde Polimer/DNA Komplekslerinin Karakterizasyonu	24
2.5.2	Dinamik Işık Saçılması	26
2.5.3	Sedimentasyon Teknikleri	26
2.5.3.1	Temel Teori	27
2.5.3.2	Optik Sistemler	29
2.5.3.3	Ölçümler	30
2.6	Polimer/DNA Komplekslerinin Modellenmesi	33
2.6.1	Geometrik Optimizasyon ve Kısmi Yüklerin Bulunması	34
2.6.2	Moleküler Dinamik	36
BÖLÜM 3		40
GEREÇLER ve YÖNTEMLER		40
3.1	DeneySEL Kısım	40
3.1.1	Kullanılan Cihazlar	40
3.1.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler	41
3.1.3	Blok Kopolimerlerin Sentezi	42
3.1.4	Diblok Kopolimerlere PEI Bağlanması	43
3.1.5	Polimer ve Polimer/ODN Çözeltilerinin Karakterizasyonu	44
3.1.5.1	Çözeltilerin Hazırlanması	44
3.1.5.2	Boyut Analizleri	45
3.1.5.3	Analitik Ultrasontrifüj Deneyleri	45
3.2	Moleküllerin Modellenmesi	46
3.2.1	Geometrik Optimizasyonlar ve Kısmi Yüklerin Hesaplanması	46
3.2.2	Moleküler Dinamik Simülasyonları	47
BÖLÜM 4		50
BULGULAR		50
4.1	Triblok Kopolimerlerin Boyut Analizleri	50
4.2	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN Komplekslerinin Boyut Analizleri	53
4.2.1	Farklı N/P Oranlarındaki Boyut Ölçümleri	53
4.2.2	Bağlanan Molekül Sayıları	56
4.2.3	Komplekslere Seyrelmenin Etkisi	57
4.3	mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN Komplekslerinin Boyut Analizleri	58
4.3.1	Farklı N/P Oranlarındaki Boyut Ölçümleri	58
4.3.2	Bağlanan Molekül Sayıları	60
4.4	mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN Komplekslerinin Boyut Analizleri	61
4.4.1	Farklı N/P Oranlarındaki Boyut Ölçümleri	61
4.4.2	Bağlanan Molekül Sayıları	63
4.5	mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN Komplekslerinin Boyut Analizleri	63
4.5.1	Farklı N/P Oranlarındaki Boyut Ölçümleri	64
4.5.2	Bağlanan Molekül Sayıları	65
4.5.3	Komplekslere Seyrelmenin Etkisi	66
4.6	BSA'nın Sedimentasyon Hız ve Denge Deneyleri	67

4.7	Triblok Kopolimerlerin Sedimentasyon Denge Analizleri	69
4.7.1	Kısmi Spesifik Hacimlerin Bulunması	69
4.7.2	Sedimentasyon Denge Ölçümleri	69
4.8	Polimer/DNA Komplekslerinin Sedimentasyon Denge Analizleri	75
4.8.1	Görünür Kısmi Spesifik Hacimlerin Bulunması	75
4.8.2	Sedimentasyon Denge Ölçümleri	76
4.9	Polimer ve Polimer/DNA Çözeltilerinin Sedimentasyon Hız Analizleri	81
4.10	AUC'de 3.000 rpm'de Yapılan Sedimentasyon Denge Ölçümleri	83
4.11	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN'nin MD Simülasyonları	86
4.12	mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN'nin MD Simülasyonları	97
4.13	mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN'nin MD Simülasyonları	105
4.14	mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN'nin MD Simülasyonları	112
4.15	Bağlanma Enerjileri	119
BÖLÜM 5		122
SONUÇ VE ÖNERİLER		122
KAYNAKLAR		127
EK-A		138
KOPOLİMERLERİN SENTEZİNDE REAKTANT HESABI		138
EK-B		140
TAMPON ÇÖZELTİLERİNİN HAZIRLANMASI		140
B-1	Sodyum Borat Tamponu	140
B-2	Fosfat Tamponu	140
EK-C		141
ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI		141
C-1	Oligonükleotid Çözeltileri	141
C-2	Triblok Kopolimer Çözeltileri	141
EK-D		142
KİSMİ SPESİFİK HACMİN BULUNMASI		142
EK-E		143
BAĞLANAN MOLEKÜL SAYISI HESABI		143
ÖZGEÇMİŞ		145

SİMGE LİSTESİ

$\hat{H}$	Hamiltonyen operatörü
$\bar{v}$	Kısmi spesifik hacim
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
μg	Mikrogram
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
A	Adenin bazı
$\text{\AA}$	Angström
atm	Atmosfer
cP	Santipoise
C	Sitozin bazı
D	Difüzyon katsayısı
d	Hidrodinamik çap
Da	Dalton
dn/dc	Kırılma indisinin konsantrasyona göre diferansiyel değişimi
E	Enerji
f	Sürtünme katsayısı
F_b	Suyun kaldırma kuvveti
F_f	Sürtünme kuvveti
F_s	Santrifüj kuvveti
G	Guanin bazı
Hz	Hertz
J	Saçak kayması
k	Boltzmann sabiti
K	Kelvin
kcal	Kilokalori
kDa	Kilodalton
l	Optik yol
M	Molar kütle
m	Parçacık kütlesi
m_0	Parçacığın sıvı içinde yer değiştirdiği sıvının kütlesi
mM	Milimolar
M Ω .cm	Megaohm.santimetre
N	Avogadro sayısı
N/P	Polimerdeki amin gruplarının DNA'daki fosfat gruplarına mol oranı

nm	Nanometre
ns	Nanosaniye
p	Kompleks başına polimer sayısı
ppb	Milyarda parçacık
ps	Pikosaniye
q	Kompleks başına oligonükleotid sayısı
R	İdeal gaz sabiti
r	Radyal konum, merkezden uzaklık
r_{DCR}	Toplam ışık saçılması için oranlama
rpm	Dakika başına devir sayısı
r_x	Toplam kompleks molekülü için oranlama
s	Çökme katsayısı
S	Svedberg
T	Timin bazı
t	Zaman
U	Urasil bazı
W	Watt
w/w	Ağırlık/ağırlık
x	Toplam kompleks molekülü sayısı
ΔG	Gibbs serbest enerjisi
ϵ	Molar sönmülenme katsayısı
η	Viskozite
λ	Dalga boyu
ρ	Yoğunluk
ϕ	Görünür kısmi spesifik hacim
χ	Uzay-spin orbitali
Ψ	Toplam dalga fonksiyonu
ω	Açısal hız

KISALTMA LİSTESİ

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
AS ODN	Antisens oligonükleotid
AUC	Analitik ultrasantrifüj
CD	Sirküler dikroizm
<i>C-myc</i>	Myc gen ailesinden düzenleyici bir gen türü
C-NMR	Karbon nükleer manyetik rezonansı
DCR	Toplam ışık saçılması
DLS	Dinamik ışık saçılması
DNA	Deoksiribonükleik asit
ELS	Elektroforetik ışık saçılması
EM	Elektron mikroskobu
GAG	Glikoaminoglikan
GPC	Jel geçirgenlik kromatografisi
H-NMR	Proton nükleer manyetik rezonansı
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IR	Kızılötesi
MALDI-TOF-MS	Matriks yardımcı lazer iyonizasyon kütle spektrometresi
mPEG	Metoksi poli(etilen glikol)
mRNA	Mesajcı RNA
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NPT	Eşsılı-eşbasınçlı topluluk
NVT	Kanonik topluluk
ODN	Oligonükleotid
PAA	Poli(amido amin)
PBK	Polimer/biyomakromolekül kompleksi
PBS	Fosfat tamponu
PCL	Poli(ϵ -kaprolakton)
PdI	Polidispersite indisi
PDMAEMA	Poli[2(dimetil amin)etil metakrilat]
pDNA	Plazmid DNA
PEG	Poli(etilen glikol)
PEI	Poli(etilen imin)
PHP	Poli(4-hidroksi-L-prolin)
PLL	Poli(L-laktat)
PTFE	Politetrafloroetilen

PVC	Poli(vinil klorür)
RDF	Radyal dağılım fonksiyonu
RES	Retiküloendotelyal sistemi
RMSD	Karekök standart sapması
RNA	Ribonükleik asit
RNaz H	Ribonükleaz H
ROHF	Sınırlandırılmış açık-kabuk Hartree-Fock
SAXS	Sinkrotron küçük açılı X-ışını saçılması
SK-MEL-30	Bir insan melanoma hücre türü
SLS	Statik ışık saçılması
UV	Morötesi

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1	Çeşitli polimerlerin kimyasal yapıları: (a) poli(vinil klorür) (PVC), (b) polikaprolaktam (naylon-6), (c) politetrafloroetilen (teflon)..... 5
Şekil 2. 2	Yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla adenilat, guanilat, sitidilat ve uridilat nükleotidlerinden oluşmuş bir polinükleotidin kimyasal yapısı 5
Şekil 2. 3	Bir polisakkarit olan amilozun (a) ve bir proteinin (b) genel kimyasal yapısı 6
Şekil 2. 4	Deoksiriboz ve fosfat grubunun kimyasal yapıları 8
Şekil 2. 5	Azotlu bazların kimyasal yapıları..... 8
Şekil 2. 6	DNA'ya ait nükleotid moleküllerinin kimyasal yapıları 9
Şekil 2. 7	Yukarıdan aşağıya doğru deoksiadenilat, deoksiguanilat, deoksisitidilat ve deoksitimidilat nükleotidlerinden oluşmuş bir DNA zinciri..... 10
Şekil 2. 8	DNA çift sarmalının oluşumu [11] 11
Şekil 2. 9	DNA kondensasyonunun adımları [24] 12
Şekil 2. 10	mPEG-b-PCL-b-PEI'nin kimyasal yapısı..... 22
Şekil 2. 11	mPEG-b-PLL-b-PEI'nin kimyasal yapısı 22
Şekil 2. 12	XL-I cihazına ait küvet ve rotorun üstten görünüşü [124] 31
Şekil 2. 13	AUC'de küvet boyunca ölçülen bir absorpsiyon dağılımı [123] 31
Şekil 2. 14	Bir sedimentasyon hız deneyinde düzenli zaman aralıklarıyla küvet boyunca ölçülen tipik absorpsiyon dağılımları 32
Şekil 2. 15	Bir sedimentasyon denge deneyinde düzenli zaman aralıklarıyla küvet boyunca ölçülen tipik saçak kaymaları..... 33
Şekil 2. 16	Standart bir MD'ye ait akış diyagramı [135] 37
Şekil 4. 1	Triblok kopolimerlerin şiddete ve hacme bağlı boyut dağılımları: mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI (A), mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI (B), mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI (C), mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI (D) 51
Şekil 4. 2	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN'ye ait şiddet (A) ve hacim (B) boyut dağılımları: N/P=1 (-), 6 (-), 20 (-), 60 (-) ve 100 (-) 54
Şekil 4. 3	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN'ye ait N/P=1 ve 6 için şiddet ve hacim dağılımları: seyreltme yok (-), 1/10 seyreltme (-), 1/100 seyreltme (-), 1/1000 seyreltme (-) 58
Şekil 4. 4	mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN'ye ait şiddet (A) ve hacim (B) dağılımları: N/P=20 (-), 60 (-), 100 (-) 59
Şekil 4. 5	mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN'ye ait şiddet (A) ve hacim (B) boyut dağılımları: N/P=20 (-), 60(-), 100 (-) 62

Şekil 4. 6	mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN'ye ait şiddet (A) ve hacim (B) boyut dağılımları: N/P=1 (-), 6 (-), 20 (-), 60 (-), 100 (-)	64
Şekil 4. 7	mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN'ye ait N/P=1 ve 6 için şiddet ve hacim dağılımları: seyreltme yok (-), 1/10 seyreltme (-), 1/100 seyreltme (-), 1/1000 seyreltme (-)	67
Şekil 4. 8	BSA/0,1 M NaCl'nin sedimentasyon hız deneyine ait absorbands (A) ve saçak (B) dağılımları	68
Şekil 4. 9	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/PBS'ye ait molekül ağırlığı fit sonucu	70
Şekil 4. 10	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/PBS'ye ait molekül kütlesi, bağlanma sayısı ve bağlanma sabitine göre fit sonucu	71
Şekil 4. 11	mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/PBS'ye ait molekül kütlesi fit sonucu	71
Şekil 4. 12	mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/PBS'ye ait molekül kütlesi fit sonucu	72
Şekil 4. 13	mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/PBS'ye ait molekül kütlesi fit sonucu	72
Şekil 4. 14	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/PBS'ye ait konum-saçak grafiği	73
Şekil 4. 15	mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/PBS'ye ait konum-saçak grafiği	74
Şekil 4. 16	mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI /PBS'ye ait konum-saçak grafiği	74
Şekil 4. 17	mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/PBS'ye ait konum-saçak grafiği	75
Şekil 4. 18	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN, N/P=3 girişim sonucu	77
Şekil 4. 19	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN, N/P=3 260 nm absorbands sonucu	77
Şekil 4. 20	mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN, N/P=3 girişim sonucu.....	78
Şekil 4. 21	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN, N/P=20'ye ait konum-saçak grafiği	79
Şekil 4. 22	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN, N/P=20'ye ait konum-absorbans grafiği	79
Şekil 4. 23	mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN, N/P=100'e ait konum-saçak grafiği	80
Şekil 4. 24	mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN, N/P=100'e ait konum-absorbans grafiği.....	80
Şekil 4. 25	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/PBS'nin sedimentasyon hız sonucu	82
Şekil 4. 26	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN, N/P=20'nin sedimentasyon hız sonucu.....	83
Şekil 4. 27	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN, N/P=1'in 3000 rpm'de konum-absorbans grafiği	84
Şekil 4. 28	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN, N/P=1'in 3000 rpm'de fit sonucu.....	85
Şekil 4. 29	mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN, N/P=1'in 3000 rpm'de konum-absorbans grafiği	85
Şekil 4. 30	mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN, N/P=1'in 3000 rpm'de fit sonucu	86
Şekil 4. 31	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN sisteminin su içindeki görüntüleri: t=0 ns (A), t=50 ns (B); ODN (●), PEI (●), PCL (●), PEG (●).....	87
Şekil 4. 32	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN sisteminin ısıtma sürecine ait sıcaklık; potansiyel (-), kinetik (-) ve toplam (-) enerjiler ile RMSD grafikleri.....	88
Şekil 4. 33	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN sisteminin dengelenme sürecine ait sıcaklık; potansiyel (-), kinetik (-) ve toplam (-) enerjiler ile basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri	89
Şekil 4. 34	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN sisteminin üretim simülasyonlarına ait sıcaklık; potansiyel (-), kinetik (-) ve toplam (-) enerjiler ile basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri	91
Şekil 4. 35	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN sistemine ait 5 ns aralıklarla alınmış anlık görüntüler; ODN (●), PEI (●), PCL (●), PEG (●).....	93
Şekil 4. 36	PEI ve ODN moleküllerinin kütle merkezleri arasındaki uzaklığın zamanla değişimi	94

Şekil 4. 37	ODN'nin fosfor atomlarına 5.4 Å'den yakın bulunan protonlanmış amin azot atomlarının (-) ve Na ⁺ iyonlarının (-) sayılarının zamanla değişimi....	95
Şekil 4. 38	PEI (-), DNA (-) ve PEG (-) için jirasyon yarıçap değerlerinin zamanla değişimi	95
Şekil 4. 39	DNA'nın O1P ve O2P atomları ile PEI'nin protonlanmış amin azot atomları arasındaki radyal dağılım fonksiyonu	96
Şekil 4. 40	mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN sisteminin ısıtma sürecine ait sıcaklık; potansiyel (-), kinetik (-) ve toplam (-) enerjiler ile RMSD grafikleri.....	97
Şekil 4. 41	mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN sisteminin dengelenme sürecine ait sıcaklık; potansiyel (-), kinetik (-) ve toplam (-) enerjiler ile basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri	98
Şekil 4. 42	mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN sisteminin üretim simülasyonlarına ait sıcaklık; potansiyel (-), kinetik (-) ve toplam (-) enerjiler ile basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri	99
Şekil 4. 43	mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN sistemine ait 5 ns aralıklarla alınmış anlık görüntüler; ODN (●), PEI (●), PCL (●), PEG (●).....	101
Şekil 4. 44	PEI ve ODN moleküllerinin kütle merkezleri arasındaki uzaklığın zamanla değişimi.....	102
Şekil 4. 45	ODN'nin fosfor atomlarına 5.4 Å'den yakın bulunan protonlanmış amin azot atomlarının (-) ve Na ⁺ iyonlarının (-) sayılarının zamanla değişimi..	103
Şekil 4. 46	PEI (-), DNA (-) ve PEG (-) için jirasyon yarıçap değerlerinin zamanla değişimi	103
Şekil 4. 47	DNA'nın O1P ve O2P atomları ile PEI'nin protonlanmış amin azot atomları arasındaki radyal dağılım fonksiyonu	104
Şekil 4. 48	mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN sisteminin ısıtma sürecine ait sıcaklık; potansiyel (-), kinetik (-) ve toplam (-) enerjiler ile RMSD grafikleri.....	105
Şekil 4. 49	mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN sisteminin dengelenme sürecine ait sıcaklık; potansiyel (-), kinetik (-) ve toplam (-) enerjiler ile basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri	106
Şekil 4. 50	mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN sisteminin üretim simülasyonlarına ait sıcaklık; potansiyel (-), kinetik (-) ve toplam (-) enerjiler ile basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri	107
Şekil 4. 51	mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN sistemine ait 5 ns aralıklarla alınmış anlık görüntüler; ODN (●), PEI (●), PCL (●), PEG (●).....	108
Şekil 4. 52	PEI ve ODN moleküllerinin kütle merkezleri arasındaki uzaklığın zamanla değişimi.....	109
Şekil 4. 53	ODN'nin fosfor atomlarına 5.4 Å'den yakın bulunan protonlanmış amin azot atomlarının (-) ve Na ⁺ iyonlarının (-) sayılarının zamanla değişimi..	110
Şekil 4. 54	PEI (-), DNA (-) ve PEG (-) için jirasyon yarıçap değerlerinin zamanla değişimi	110
Şekil 4. 55	DNA'nın O1P ve O2P atomları ile PEI'nin protonlanmış amin azot atomları arasındaki radyal dağılım fonksiyonu	111
Şekil 4. 56	mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN sisteminin ısıtma sürecine ait sıcaklık; potansiyel (-), kinetik (-) ve toplam (-) enerjiler ile RMSD grafikleri.....	112

Şekil 4. 57	mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN sisteminin dengelenme sürecine ait sıcaklık; potansiyel (–), kinetik (–) ve toplam (–) enerjiler ile basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri	113
Şekil 4. 58	mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN sisteminin üretim simülasyonlarına ait sıcaklık; potansiyel (–), kinetik (–) ve toplam (–) enerjiler ile basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri	114
Şekil 4. 59	mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN sistemine ait 5 ns aralıklarla alınmış anlık görüntüler; ODN (●), PEI (●), PCL (●), PEG (●).....	116
Şekil 4. 60	PEI ve ODN moleküllerinin kütle merkezleri arasındaki uzaklığın zamanla değişimi.....	117
Şekil 4. 61	DNA'nın fosfor atomlarına 5.4 Å'den yakın bulunan protonlanmış amin gruplarının (–) ve Na ⁺ iyonlarının (–) sayılarının zamanla değişimi.....	118
Şekil 4. 62	PEI (–), DNA (–) ve PEG (–) için jirasyon yarıçap değerlerinin zamanla değişimi	118
Şekil 4. 63	DNA'nın O1P ve O2P atomları ile PEI'nin protonlanmış amin azot atomları arasındaki radyal dağılım fonksiyonu	119

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3. 1	Kopolimer sentezlerinde kullanılan reaktant miktarları 43
Çizelge 4. 1	Triblok kopolimerlerin boyut sonuçları: mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI (A), mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI (B), mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI (C), mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI (D) 52
Çizelge 4. 2	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN'ye ait boyut sonuçları 55
Çizelge 4. 3	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN için hesaplanan kompleks başına polimer molekülü sayısı (p), kompleks başına ODN molekülü sayısı (q), kompleks molekül ağırlığı (M), çözeltideki toplam kompleks molekülü sayısı (x), x için oranlama (r_x) ve DCR için oranlama (r_{DCR}) 56
Çizelge 4. 4	mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN'ye ait boyut sonuçları 60
Çizelge 4. 5	mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN için hesaplanan kompleks başına polimer molekülü sayısı (p), kompleks başına ODN molekülü sayısı (q), kompleks molekül ağırlığı (M), çözeltideki toplam kompleks molekülü sayısı (x), x için oranlama (r_x) ve DCR için oranlama (r_{DCR}) 61
Çizelge 4. 6	mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN'ye ait boyut sonuçları 63
Çizelge 4. 7	mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN için hesaplanan kompleks başına polimer molekülü sayısı (p), kompleks başına ODN molekülü sayısı (q), kompleks molekül ağırlığı (M), çözeltideki toplam kompleks molekülü sayısı (x), x için oranlama (r_x) ve DCR için oranlama (r_{DCR}) 63
Çizelge 4. 8	mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN'ye ait boyut sonuçları 65
Çizelge 4. 9	mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN için hesaplanan kompleks başına polimer molekülü sayısı (p), kompleks başına ODN molekülü sayısı (q), kompleks molekül ağırlığı (M), çözeltideki toplam kompleks molekülü sayısı (x), x için oranlama (r_x) ve DCR için oranlama (r_{DCR}) 66
Çizelge 4. 10	Triblok kopolimerlerin kısmi spesifik hacim değerleri (v) 69
Çizelge 4. 11	Farklı N/P oranları için bulunan görünür kısmi spesifik hacim değerleri (ϕ): mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN (I), mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN (II), mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN (III), mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN (IV) 76
Çizelge 4. 12	Polimer/ODN komplekslerinin ortalama görünür kısmi spesifik hacim değerleri (ϕ) 76
Çizelge 4. 13	PBS içinde farklı N/P oranları için hesaplanan molekül kütleleri: mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN girişim sonucu (I_G) ve aborbans sonucu (I_A), mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN girişim sonucu (II), mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN girişim sonucu (III), mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN girişim sonucu (IV) 81

Çizelge 4. 14	mPEG- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN sistemleri için bağlanma enerjisine katkı yapan terimler (tüm enerjiler kcal/mol birimindedir)	120
Çizelge 4. 15	mPEG- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN sistemleri için bağlanma enerjisine katkı yapan terimler (tüm enerjiler kcal/mol birimindedir)	120
Çizelge 4. 16	Polimer/ODN sistemleri için bağlanma enerjileri	121

POLİMER/OLİGONÜKLEOTİD KOMPLEKSLERİNİN KARAKTERİZASYONU VE MODELLENMESİ

Eray DALGAKIRAN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sevil DİNÇER

Eş Danışman: Prof. Dr. Hasan TATLIPINAR

Bu çalışmada, antisens oligonükleotid (AS ODN) taşıyıcısı olarak daha önce grubumuzda sentezlenmiş olan metoksi poli(etilen glikol)-*b*-poli(ε-kaprolakton)-*b*-poli(etilen imin) (mPEG-*b*-PCL-*b*-PEI) ve metoksi poli(etilen glikol)-*b*-poli(L-laktat)-*b*-poli(etilen imin) (mPEG-*b*-PLL-*b*-PEI) triblok kopolimerlerin model olarak seçilen *c-myc* AS ODN ile etkileşimleri, deneysel ve modelleme yoluyla karakterize edilmiştir. *C-myc*, hücre büyümesinin kontrolünde önemli rol oynayan bir gen türü olup özellikle meme kanserinde tümörlerin çoğunda normal dışı bir *c-myc* aktivitesi bulunduğundan, kanser tedavisine yönelik çalışmalarda yoğun şekilde hedef alınmaktadır. Kusurlu *c-myc* genlerinin ekspresyonunu engellemek için, *c-myc* mRNA'sına karşılık gelen AS ODN'ler kullanılabilir. Bu AS ODN'lerin tümör hücrelerine etkin ve güvenli bir şekilde taşınması amacıyla polikationik vektörlerin kullanımı oldukça yaygın bir yaklaşımdır.

DNA aktarım çalışmalarının başarısı; oluşan kompleksin boyutu, molekül ağırlığı ve yükü gibi fizikokimyasal parametrelere bağlı olduğundan, çalışmanın ilk aşamasında taşıyıcı polimerler ve oluşan polimer/ODN komplekslerinin yapısal karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, farklı azot(N)/fosfor(P) oranlarında hazırlanan polimer/ODN kompleksleri, dinamik ışık saçılması ve sedimentasyon denge analizi ile karakterize edilmiştir. Çalışmanın ikinci kısmında ise, polimerler ile ODN arasındaki

etkileşimler ve oluşan yapılar “Amber” moleküler dinamik yazılımı kullanılarak incelenmiştir.

Deneysel sonuçlara göre çok monodispers ve çözelti içinde kararlı kompleks yapıların oluştuğu, komplekslerin boyut ve molekül ağırlıklarının N/P oranına göre ayarlanabildiği ve sentezlenen polikasyonların yüksek taşıma kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur. Modelleme sonuçlarına göreyse PEI ve ODN moleküllerinin birbirlerine yaklaşmasıyla kısa sürede komplekslerin oluştuğu, kompleks oluşumuyla ODN’nin bir miktar kompaktlaştığı, kompleks oluşumlarının ODN’nin fosfor atomları etrafındaki Na⁺ iyonlarının uzaklaşması ve PEI’nin protonlanmış amin gruplarının yaklaşmasıyla gerçekleştiği, ODN’nin fosfat gruplarındaki oksijen atomları ile PEI’nin amin gruplarının hidrojen atomları arasında H-bağlarının oluştuğu ve hesaplanan bağlanma enerjilerine göre incelenen triblok kopolimerlerin gen terapiye yönelik potansiyel polimerik vektör olarak kullanılabileceği bulunmuştur. Ayrıca, hem modelleme hem de deneysel sonuçlara göre polimerlerin omurgalarında yer alan hidrofobik zincirlerin uzunluğu, kompleks oluşumunu etkilemektedir ve PLL’ye kıyasla daha fazla sayıda hidrofobik alkil zincirlerine sahip PCL içeren triblok kopolimerlerin ODN ile oluşturduğu komplekslerin boyutları, molekül ağırlıkları, bağlanan birim sayıları ve bağlanma enerjileri buna bağlı olarak daha düşük çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antisens oligonükleotid, *c-myc*, gen terapisi, polikasyon/ODN kompleksi, poli(etilen glikol), poli(ε-kaprolakton), poli(L-laktat), poli(etilen imin), ışık saçılması, sedimentasyon dengesi, moleküler dinamik, Amber

**CHARACTERIZATION AND MODELLING OF POLYMER/OLIGONUCLEOTIDE
COMPLEXES**

Eray DALGAKIRAN

Department of Bioengineering

Ph.D. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Sevil DİNÇER

Co-Adviser: Prof. Dr. Hasan TATLIPINAR

In this study, the interactions between triblock copolymers that are synthesized previously by our group as antisense oligonucleotide carriers, methoxy poly(ethylene glycol)-*b*-poly(ϵ -caprolactone)-*b*-poly(ethylene imine) (mPEG-*b*-PCL-*b*-PEI) and methoxy poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lactate)-*b*-poly(ethylene imine) (mPEG-*b*-PLL-*b*-PEI), with *c-myc* AS ODN were characterized by experimentally and modelling. *C-myc* is an important gene type which plays important role in controlling cell growth and it is often targeted in cancer treatment studies because abnormal *c-myc* activities have been observed in especially breast cancer tumors. Corresponding AS ODNs of *c-myc* mRNAs can be used to inhibit expression of damaged *c-myc* genes. The use of polycationic vectors for effective and safe transfer of these AS ODNs into tumor cells is quite a common approach.

In the first part of the study, structural characterizations of the polymeric carriers and polycation/ODN complexes were carried out because the achievement of DNA transfer studies is related with physicochemical parameters such as complex's size, molecular weight and charge. For this purpose, polycation/ODN complexes that were prepared in different nitrogen (N)/phosphor (P) ratios were characterized by using dynamic light scattering and sedimentation equilibrium techniques. In the second part of the study, the interactions between polycations with ODN and formed structures investigated by using Amber molecular dynamics software.

According to the experimental results, highly monodisperse and stable complex structures are formed in the solution. Also, it is found out that the size and molecular weight of the complexes can be adjusted by N/P ratio and synthesized polycations have high delivery capacity. According to the modelling results, complexes are formed by PEI and ODN molecules come closer in a short time, ODN is compacted a little by complexation, complexations occurred by Na^+ ions releasing from vicinity of phosphor atoms of ODN and by approaching of protonated amine nitrogen atoms of PEI to vicinity of phosphor atoms of ODN and H-bondings are formed between oxygen atoms of phosphate groups of ODN and protonated amine nitrogen atoms of PEI. Also, according to the calculated binding energies, triblock copolymers can be used as potential polymeric vectors in gene therapy. Furthermore, according to both modelling and experimental results, the length of hydrophobic chains in backbone of polymers affects complexation and it is found out that the sizes, molecular weights, number of binding units and binding energies of complexes between ODN and triblock copolymers containing PCL are less than complexes between ODN and triblock copolymers containing PLL due to the fact that PCL has more hydrophobic alkyl chains than PLL.

Keywords: Antisense oligonucleotide, *c-myc*, gene therapy, polycation/ODN complex, poly(ethylene glycol), poly(ϵ -caprolactone), poly(L-lactate), poly(ethylene imine), light scattering, sedimentation equilibrium, molecular dynamics, Amber

1.1 Literatür Özeti

Yabancı DNA'yı etkin şekilde hücrelere gönderebilecek tekniklerin geliştirilmesi ile kanser gibi birçok hastalığın gen terapisi kullanılarak tedavi edilmesi sağlanabilir [1]. Tek başına vücuda enjekte edilen DNA derhal tanınır ve parçalanır, bu da terapötik verimliliği neredeyse yok eder [2], [3]. Ayrıca DNA'nın tek başına hücrelere girme yeteneği de çok zayıftır. Dolayısıyla DNA'yı hücrelere taşıyacak araçlara (vektörlere) ihtiyaç vardır. Viral vektörlerin gen aktarma kapasiteleri çok yüksektir ancak güvenlik problemleri kullanımlarını sınırlamaktadır. Viral olmayan vektörler daha güvenlidir ancak gen aktarma verimlilikleri de daha düşüktür [4]. Bu yüzden, hücrelere yüksek verimlilikte gen aktarabilecek viral olmayan vektörlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Hazırlanmaları ve modifiye edilmeleri kolay olan polikasyonların DNA'yı kondanse etme ve taşıma kapasiteleri de yüksektir. Bu sebeple, polikasyonik vektörler üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır [5].

DNA'nın polikasyonik vektörlerle hedef hücrelere taşınması için aşılması gereken bazı engeller vardır. Öncelikle DNA ile polikasyon arasında yeterince kararlı komplekslerin oluşması gerekmektedir. Bu kompleksler, DNA'yı vücut içinde bağışıklık sisteminin savunma bileşenlerine karşı koruyabilmelidir. Ayrıca hedef bölgesine kadar sorunsuz taşınan DNA, ilgili hücrelerin içine girebilmelidir. Hücre içinde ise yıkıma uğramamak için polikasyon/DNA kompleksleri endozom organellerinden kaçabilmelidir. Tüm bu aşamalardan sonra hedef bölgesine ulaşan kompleks yapının açılıp DNA'yı serbest bırakması ve DNA'nın çekirdek içine girmesi sağlanmalıdır [6].

Yapılan araştırmalar, antisens oligonükleotidlerin (AS ODN) kansere karşı gen terapisinde kullanılabilecek potansiyel antitümör ajanları olduğunu göstermiştir. AS ODN'ler, ilgili mRNA'ya müdahale ederek gen transkripsiyonunu inhibe edebilir veya mRNA'nın RNaz H enzimlerince yıkıma uğramasını sağlayabilir. Bu şekilde, kanserli hücrelerin büyümesi durdurulabilmektedir [7], [8]. AS ODN'lerin kanserli dokulara etkin şekilde ulaştırılması için uygun vektörlere ihtiyaç vardır.

1.2 Tezin Amacı

C-myc, hücre büyümesinin kontrolünde rol alan önemli bir gen türüdür. Kötü huylu tümörlerin çoğunda normal dışı bir *c-myc* aktivitesi bulunduğundan, kanser tedavisine yönelik çalışmalarda yoğun şekilde hedef alınmaktadır [9]. Kusurlu *c-myc* genlerinin ekspresyonunu engellemek için, *c-myc* mRNA'sına karşılık gelen AS ODN'ler kullanılabilir. Bu AS ODN'lerin tümör hücrelerine taşınması ise, viral olmayan polikasyonik vektörler ile gerçekleştirilebilir.

Bu tez çalışmasında, tek zincirli insan *c-myc* antisens oligonükleotidlerini taşımak üzere potansiyel vektör olarak önerilen ve grubumuzda sentezlenmiş metoksi poli(etilen glikol)-*b*-poli(ε-kaprolakton)-*b*-poli(etilen imin) (mPEG-*b*-PCL-*b*-PEI) ve metoksi poli(etilen glikol)-*b*-poli(L-laktat)-*b*-poli(etilen imin) (mPEG-*b*-PLL-*b*-PEI) triblok kopolimerlerinin ODN'lerle oluşturdukları komplekslerin karakterizasyonu ve modellenmesi hedeflenmiştir. Polimerler, mPEG:PCL:PEI ve mPEG:PLL:PEI için 4:1:1 mol oranında ve mPEG kısımları 2000 veya 5000 Da, PEI kısımları ise 2000 Da olacak şekilde sentezlenmiştir. Gen aktarım (transfeksiyon) verimliliği; polikasyonların taşıma kapasitesi, komplekslerin stabilite durumu, boyut ve yük gibi fizikokimyasal parametrelere bağlıdır. Bu bağlamda yapı-fonksiyon ilişkisini daha iyi anlayabilmek için, farklı N/P oranlarında hazırlanan polikasyon/ODN komplekslerinin dinamik ışık saçılması ve sedimentasyon denge teknikleriyle analiz edilmeleri ve ayrıca moleküler dinamik programı kullanılarak gerçekleştirilen simülasyonlarda, polikasyon ile ODN arasındaki etkileşimlerin ve oluşan yapıların incelenmesi hedeflenmiştir.

1.3 Hipotez

Tez çalışmasında,

- mPEG-*b*-PCL-*b*-PEI ve mPEG-*b*-PLL-*b*-PEI triblok kopolimerlerinin, tek zincirli insan *c-myc* antisens oligonükleotidleri ile kuvvetli elektrostatik etkileşime girmeleri,
- 20 mM PBS (pH 7,0) ortamında monodispers ve kararlı kompleksler oluşturmaları,
- Triblok kopolimerlerin taşıma kapasitelerinin yüksek olması,
- Kompleks oluşumunun N/P oranına bağlı olması ve buna göre kompleks yapılarının boyutlarının N/P oranına göre değişmesi,
- Kompleks oluşumlarının ODN'nin fosfat grupları ile polimerlerin PEI kısımlarının protonlanmış amin grupları arasındaki çekimden kaynaklanması,
- Komplekslerin bağlanma enerjilerine göre sentezlenen triblok kopolimerlerin gen terapisine yönelik uygun polimerik taşıyıcılar olması,
- Triblok kopolimerlerin ODN ile oluşturduğu komplekslerin boyut, molekül ağırlığı ve bağlanma enerjisi gibi özelliklerinin yapıya bağlılıklarının belirlenmesi,

beklenmektedir.

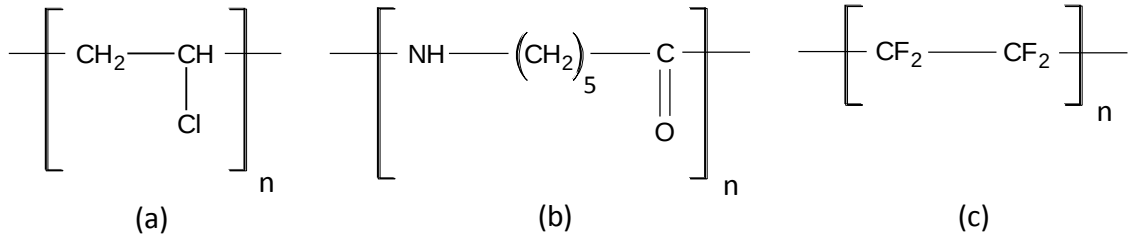
POLİMER/DNA KOMPLEKSLERİ

Polimer/DNA kompleksleri, polimer/biyomakromolekül kompleks türlerinden biridir. Temel olarak negatif yüklü DNA zincirleri ile zıt yüklü polimerler arasındaki elektrostatik etkileşimlere bağlı olarak oluşurlar. Polimer/DNA kompleksleri, özellikle DNA kondensasyonunun anlaşılması ve gen terapisinde vektör olarak kullanımları açısından önemlidir.

2.1 Polimer/Biyomakromolekül Kompleksleri

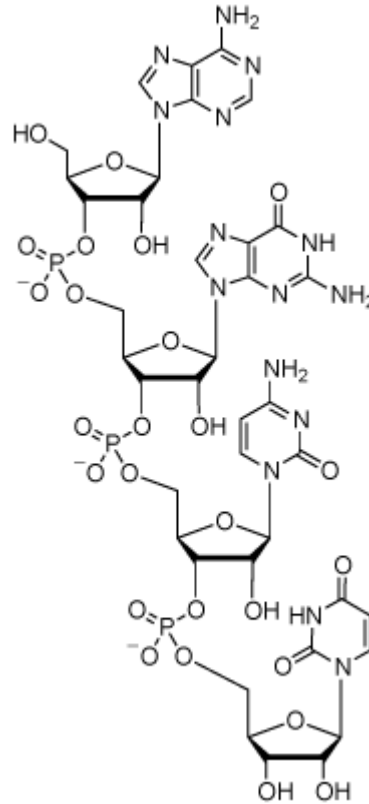
Polimerlerin yapı taşı olan küçük mol kütleli kimyasal maddelere **monomer** denir. Çok sayıda monomerin kovalent bağlarla birbirlerine bağlanarak oluşturdukları büyük moleküllere ise **polimer** denir. Polimer kelimesi, Yunanca çok anlamına gelen “poly” ve küçük parça anlamına gelen “meros” kelimeleri birleştirilerek oluşturulmuştur. Monomer moleküllerinin polimer moleküllerine dönüşümü, polimerizasyon tepkimeleri ile olur. Polimer moleküllerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri, küçük moleküllü maddelerden farklılıklar gösterir [10].

Polimerler, sentetik ve doğal olmak üzere ikiye ayrılabilir. **Sentetik polimerler**, doğada kendiliğinden bulunmayan ancak insanlar tarafından üretilen polimerlerdir. Örnek olarak poli(vinil klorür) (PVC), naylon olarak bilinen poliamidler ve teflon olarak bilinen politetrafloroetilen (PTFE) verilebilir (Şekil 2.1) [10].

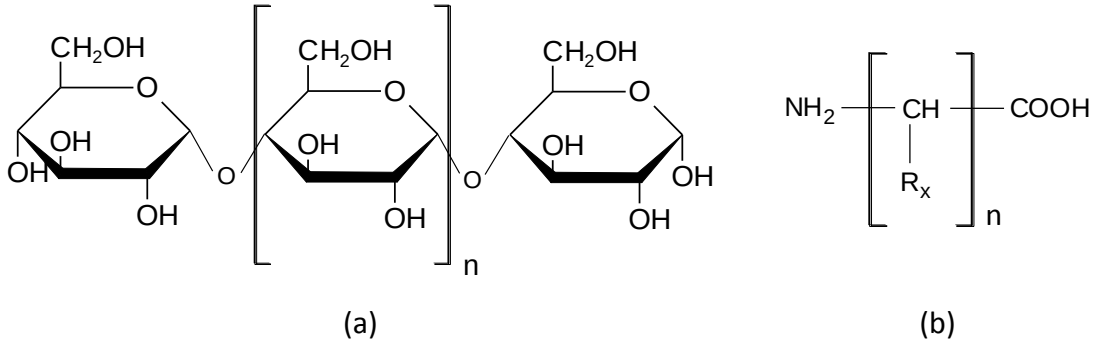


Şekil 2. 1 Çeşitli polimerlerin kimyasal yapıları: (a) poli(vinil klorür) (PVC), (b) polikaprolaktam (nylon-6), (c) politetrafloroetilen (teflon)

Doğal polimerler, canlı organizmalar tarafından üretilen polimerler olup bunlara **biyopolimer** de denir. Üç temel biyopolimer türü vardır: nükleotid monomerlerinden oluşan **polinükleotidler**, amino asit monomerlerinden oluşan **polipeptitler** ve sakkarit monomerlerinden oluşan **polisakkaritler**. Örnek olarak deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) polinükleotid, proteinler polipeptit, karbohidratlar ise polisakkarittir (Şekil 2.2, 2.3) [11].



Şekil 2. 2 Yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla adenilat, guanilat, sitidilat ve uridilat nükleotidlerinden oluşmuş bir polinükleotidin kimyasal yapısı



Şekil 2. 3 Bir polisakkarit olan amilozun (a) ve bir proteinin (b) genel kimyasal yapısı

Proteinler, canlı hücrelerinde sudan sonra en çok bulunan bileşenlerdir. Önemli işlevleri arasında katalitik aktivite, yapısal eleman olma, sinyal reseptörlüğü ile spesifik maddeleri hücre içi ve dışı arasında taşımaları gösterilebilir. Nükleik asitler, genetik bilginin depolandığı moleküllerdir. Ayrıca bazı RNA molekülleri, yapısal ve katalitik işlevlere de sahiptir. Polisakkaritler ise enerji veren birincil yakıt depolarıdır. Ayrıca üzerlerinde belirli proteinler için spesifik bağlanma bölgeleri içeren hücre dışı yapısal elemanlar olarak da görev yaparlar [11].

Canlı organizmalar tarafından üretilen moleküllerin tümüne, genel olarak **biyomolekül** denir. Metabolitler ve vitaminler gibi küçük biyomoleküllerin yanı sıra **biyomakromolekül** adı verilen büyük biyomoleküller de vardır. Biyomakromoleküller dörde ayrılır: polinükleotidler, polipeptitler, polisakkaritler ve lipitler. Bunlardan ilk üçü polimerik makromoleküller olup bunlara aynı zamanda biyopolimer de deniyordu. **Lipitler** ise polimerik yapıda olmayan biyomakromoleküllerdir. Membranların yapısal bileşenleri olan lipitler ayrıca enerji miktarı yüksek yakıt depolarıdır ve hücreler arası sinyalleşmede görev alırlar [11].

Bir polimer molekülü ile bir biyomakromolekülün elektrostatik etkileşimle oluşturduğu birleşik yapıyı, **polimer/biyomakromolekül kompleksi** (PBK) olarak adlandırabiliriz. Buna göre nükleik asitlerin (DNA ve RNA), polipeptitlerin (protein), polisakkaritlerin ve lipitlerin polimerlerle olan kompleksleri, birer polimer/biyomakromolekül kompleksi olur.

2.1.1 Polimer/Biyomakromolekül Kompleks Türleri

Polimer/protein komplekslerinin incelenmesi, 1940'lı yılların sonlarında başlamıştır. İlk çalışmalarda, proteinlerin düşük lineer yük yoğunluğuna sahip doğal polielektrolitlerle etkileşimleri incelenmiştir [12]. Sonraki yıllarda, hem doğal hem de sentetik polielektrolitlerin, düşük ve yüksek lineer yük yoğunluğu ve çeşitli oranlarda çapraz bağ içeren durumları için proteinlerle olan etkileşimleri de incelenmiştir [13]. Kompleks oluşumu; temel olarak pH, iyonik şiddet, polimer/protein oranı ile polimer ve protein türüne bağlıdır. Polimer/protein kompleksleri; protein immobilizasyonu, immünolojik testler, protein saflaştırılması, sentetik aşı geliştirilmesi ve polimer bazlı ilaç yapımı gibi birçok alanda kullanılmaktadır [14], [15].

Zıt yüklü polisakkaritlerle polielektrolitler arasında, temelde elektrostatik etkileşimlere bağlı olarak kompleksler oluşabilir. Ayrıca hidrojen bağları, hidrofobik ve van der Waals etkileşimleri de katkı yapabilir. Polielektrolit/polisakkarit kompleksleri, biyokimyasal fonksiyona sahip yüzey kaplamalarında, doku mühendisliğinde ve ilaç taşıma sistemlerinde kullanılmaktadır. Bu yapıların boyut ve bileşimleri; ortamın pH ve iyonik şiddet değerleri ile moleküllerin yük yoğunlukları ve zincir uzunluklarına bağlıdır [16], [17]. Ayrıca polisakkaritlerin doğal polimerler olan proteinlerle oluşturdukları kompleksler; makromoleküllerin saflaştırılmasında, biyoteknoloji, kozmetik, eczacılık ve tıp alanlarında mikroenkapsülasyon amacıyla, tıp alanında graft ve biyoprotez olarak ve eczacılık alanında emülsiyonların stabilizasyonunda kullanılmaktadır [18], [19].

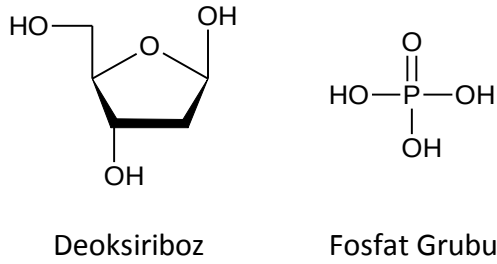
Lipitlerin özellikle küresel kolloit çekirdeklerin yüzeyine tabakalar halinde kaplanmasıyla oluşturulan sistemler, biyoteknoloji alanında ilaç, antijen ve gen taşıma sistemleri olarak kullanılabilir. Bu sistemlerde, çekirdek kısmı lipitlere mekanik stabilite sağlarken, lipit kısmı ise yapıya biyoyumluluk kazandırır. Çekirdek kısmını çeşitli polielektrolitler oluşturabilir. Ayrıca polielektrolitler lipitlerin stabilizasyonunu da sağlar [20], [21]. Bunların dışında katyonik lipitlerle DNA arasında, su ortamında lipopleks adı verilen kompleksler oluşur. Kompleks oluşumu, lipitlerin pozitif yüklü baş grupları ile DNA'nın negatif yüklü fosfat grupları arasındaki elektrostatik çekimden kaynaklanır. Katyonik lipitler, viral olmayan gen transferi için potansiyel taşıyıcı olarak araştırılmaktadır. Bu amaçla oluşturulan lipoplekslerin gen transferini

gerçekleştirebilmesi ve verimlilik, moleküllerin boyut ve yük dağılımlarına bağlıdır [22], [23].

2.2 Polimer/DNA Kompleksleri

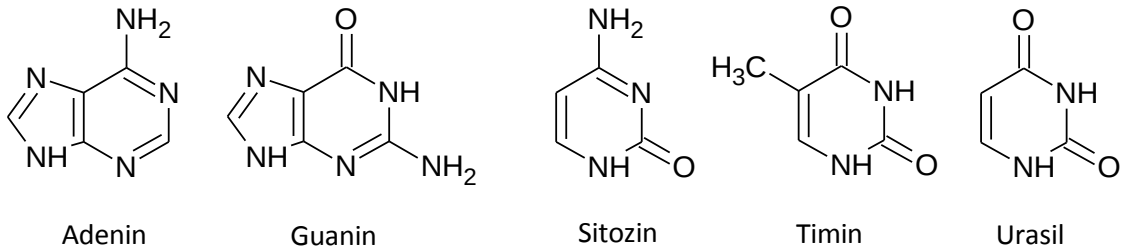
2.2.1 DNA'nın Kimyasal Yapısı

DNA, nükleotid monomerlerinden oluşan doğal bir polielektrolittir. Nükleotidler, birer **azotlu baz**, **5 karbonlu şeker** (pentoz) ve **fosfat grubundan** oluşur. Azotlu bazlar, pürin ve pirimidin türevleridir. Şeker ise RNA için **riboz**, DNA için **deoksiriboz** molekülü olur [11].



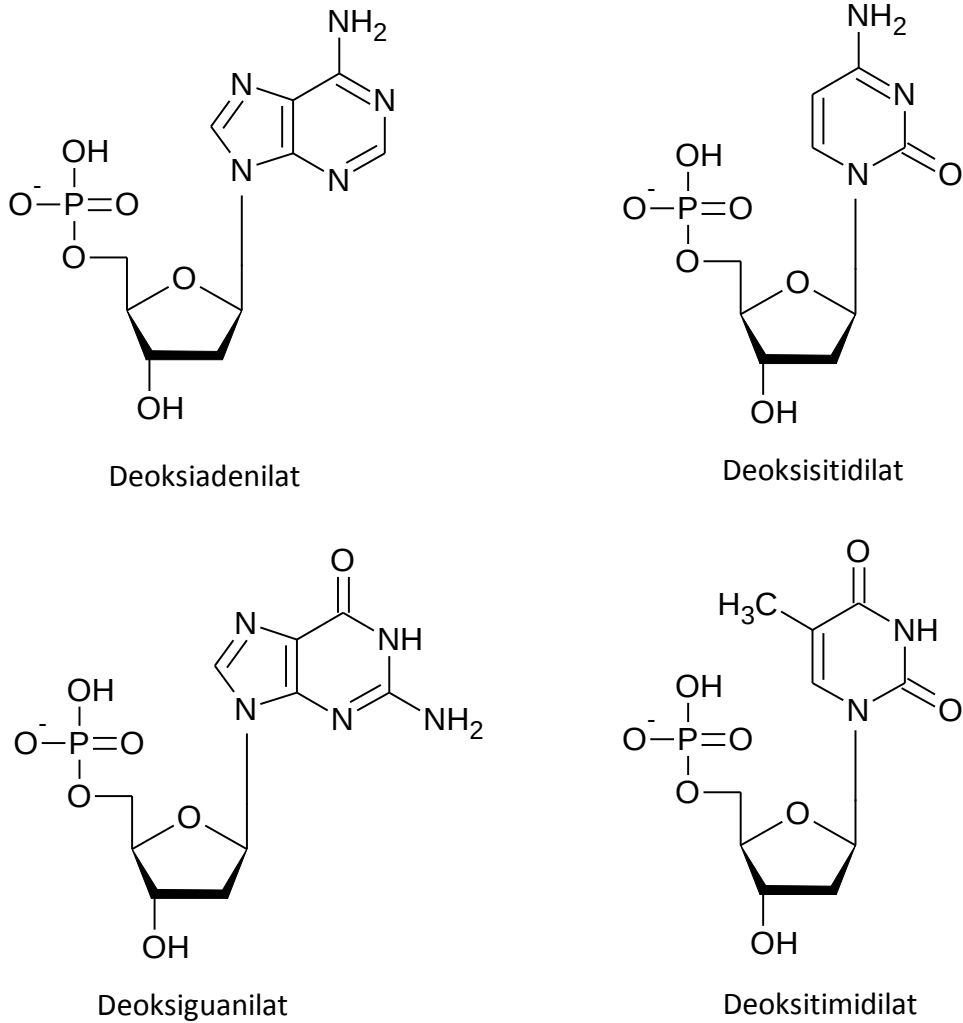
Şekil 2. 4 Deoksiriboz ve fosfat grubunun kimyasal yapıları

DNA için 4 temel azotlu baz vardır: **sitozin** (C), **guanin** (G), **adenin** (A) ve **timin** (T). RNA molekülünde ise timin yerine **urasil** (U) bulunur. Adenin ve guanin, **pürin** adı verilen iki halkalı aromatik organik bileşikleridir. Sitozin, timin ve urasil ise **pirimidin** adı verilen tek halkalı aromatik organik bileşikleridir. DNA'nın çift sarmal yapısında, daima adenin ile timin ve guanin ile sitozin arasında bağlanma olur, yani daima bir pürin ile bir pirimidin arasında bağ kurulur. Bunun temel nedeni, komplementer bazlar üzerindeki amin ve karboksil grupları arasında, ancak A-T ve G-C çiftleri için hidrojen bağları oluşabilmesidir [11].



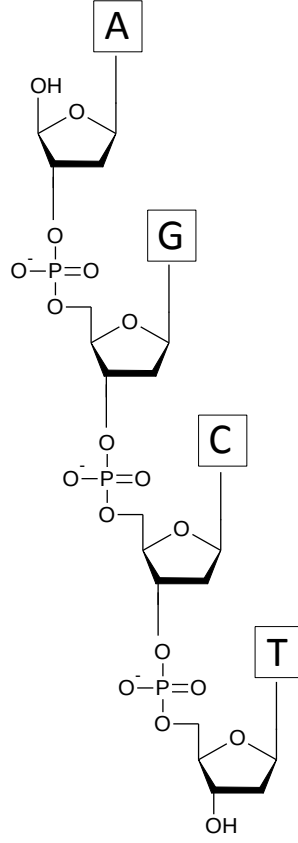
Şekil 2. 5 Azotlu bazların kimyasal yapıları

Bir azotlu baz ile bir deoksiribozun birleşmesiyle **nükleozit** molekülü oluşur. Bunlar da DNA için **deoksiadenozin**, **deoksiguanozin**, **deoksisitidin** ve **deoksitimidin** olarak adlandırılır. Nükleozitlere fosfat grubu eklenmesiyle de **nükleotidler** oluşur: **deoksiadenilat**, **deoksiganilat**, **deoksisitidilat** ve **deoksitimidilat** (Şekil 2.6) [11].



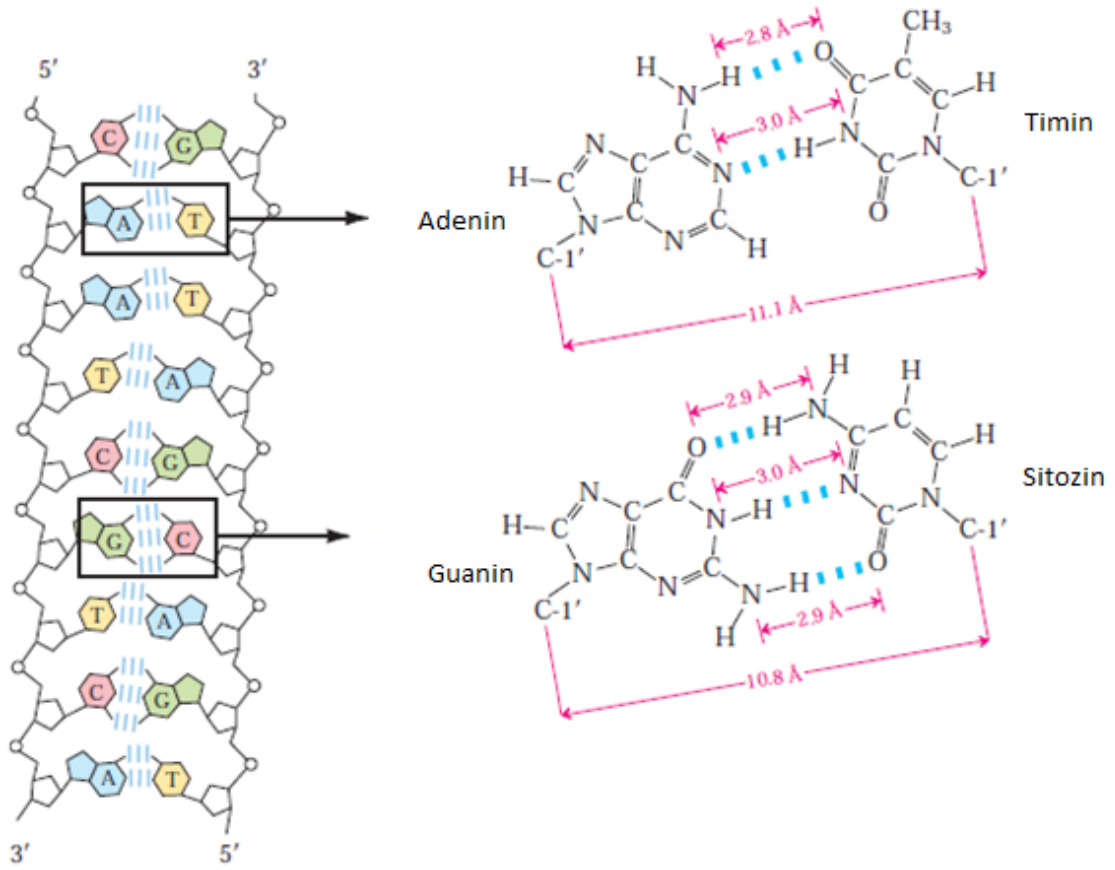
Şekil 2. 6 DNA'ya ait nükleotid moleküllerinin kimyasal yapıları

Fosfodiester bağı, ardışık nükleotid şekerlerinden birisinin 5'-hidroksil grubunun, diğerinin 3'-hidroksil grubuna fosfat köprüsü aracılığı ile bağlanmasıyla oluşur. DNA'nın ana iskeleti, deoksiriboz-fosfat bağı zincirinden oluşmaktadır. Fizyolojik koşullarda (pH 7,2-7,4), DNA omurgasında bulunan bütün fosfat grupları tamamen iyonlaşır, bu yüzden DNA molekülü kuvvetli bir polianyondur [11].



Şekil 2. 7 Yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla deoksiadenilat, deoksiguanilat, deoksisitidilat ve deoksitimidilat nükleotidlerinden oluşmuş bir DNA zinciri

Pürinler ve pirimidinler, zayıf bazik bileşenler olup nötr pH civarında hidrofobiktirler ve suda çözünmezler. Pürinler ve pirimidinler arasında görülen hidrofobik yığılmaya bağlı olarak DNA zincirleri birleşerek çift sarmal yapıyı oluşturur. Bu yapının oluşmasında ayrıca van der Waals ve dipol-dipol etkileşimleri de katkı yapar. Bazların sudan kaçarak kendi aralarında bağ kurup yığınlar oluşturmaları, nükleik asitlerin kararlı üç boyutlu yapılarının oluşmasında çok önemli rol oynar [11].



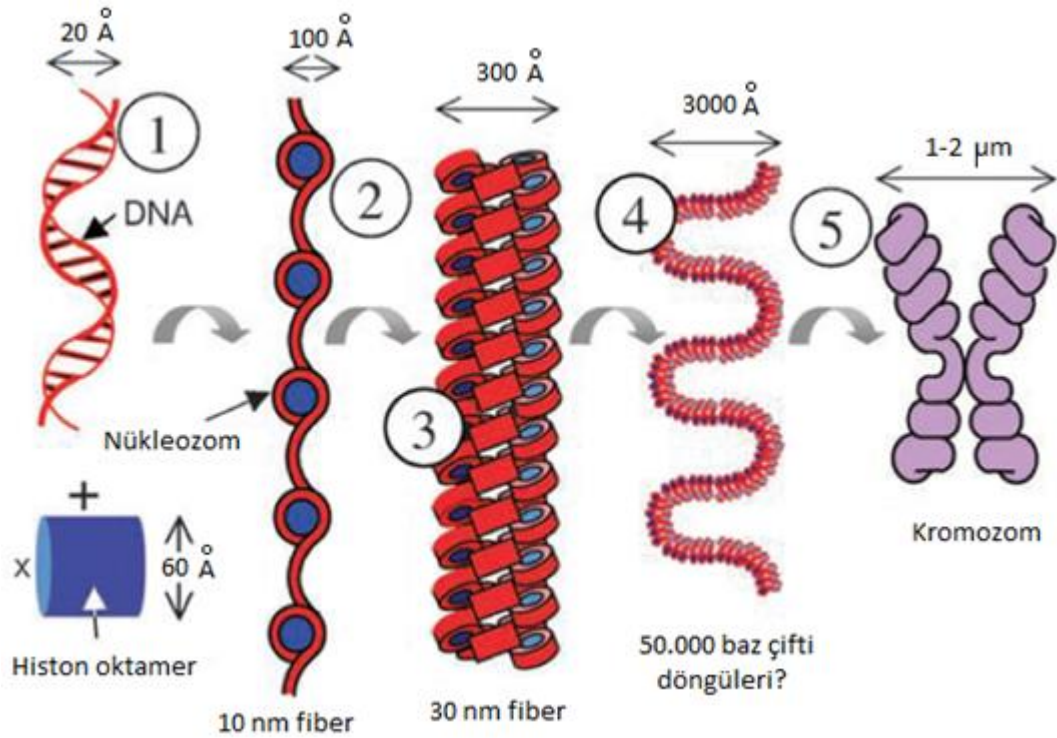
Şekil 2. 8 DNA çift sarmalının oluşumu [11]

2.2.2 DNA Kondensasyonu

Bir insan genomunun DNA'sı, bir uçtan diğer uca yaklaşık 1 m uzunluğundadır. Çoğu insan hücresi diploit olup buna göre her hücre toplam 2 m kadar DNA içerir. Yetişkin bir insan vücudunda yaklaşık 10^{14} hücre bulunur ki bu da toplamda 2×10^{11} km'lik DNA uzunluğuna karşılık gelir. Dünya ile Güneş arasındaki ortalama mesafenin $1,5 \times 10^8$ km olduğu göz önüne alınırsa, insan vücudunun barındırdığı toplam DNA uzunluğunun ne kadar büyük olduğu anlaşılabilir [11].

Bir ökaryot hücresi, yaklaşık 5-100 μm boyutlarındadır. Genetik materyalin bulunduğu hücre çekirdeğinin çapı ise yaklaşık 6 μm kadardır. 2 m uzunluğundaki DNA'nın bu kadar küçük hacimlere sığması için büyük oranda katlanarak çok sıkı paketlenmesi gerekir. Bu paketlenmede, DNA çift sarmalı öncelikle **histon** adı verilen proteinler etrafına sarılır ve **nükleozom** denilen yapılar oluşur. Nükleozomların ayrıca katlanarak sarılmalarıyla **kromatin fiberleri** oluşur. Kromatin fiberlerinin daha da katlanıp

paketlenmesiyle en sonunda mitotik **kromozom** yapıları ortaya çıkar. Nükleozomların ötesindeki daha büyük yapıların oluşması hala tam olarak anlaşılabilmiş değildir [24].



Şekil 2. 9 DNA kondensasyonunun adımları [24]

2.2.3 Polimer/DNA Komplekslerinin Oluşumu

DNA, doğal bir polielektrolittir. Polielektrolit/DNA kompleks oluşumu ve çözelti özellikleri, sentetik polielektrolit kompleks oluşumu ve çözelti özelliklerine benzemektedir [25], [26]. Polikasyon/DNA kompleksleri, DNA ve polikasyon sulu çözeltileri birbirine karıştırıldığında, zincirler arasındaki elektrostatik bağların bir kooperatif sistemi olarak kendiliğinden toparlanmayla meydana gelir. Ayrıca bağlı durumdaki zıt yüklü iyonların salınmasıyla entropi kazanılır [27], [28]. Elektrostatik etkileşimlere ek olarak hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri de kompleks oluşumunda rol oynar [29], [30].

DNA, kuvvetli bir polianyon olup fizyolojik ortamda net negatif yüke sahiptir. Eğer DNA ile zayıf bir polikasyon etkileştirilirse, polikasyonun yük durumu ortam pH'sinden etkileneceğinden dolayı, kompleks oluşumu da ortamın pH değerine bağlı olacaktır. Bu durum, gen terapisi açısından çok önemlidir, zira pH değeri, hücre içinin ve organların farklı bölgelerinde değişkenlik göstermektedir [27].

Polikasyon/DNA komplekslerinin suda çözünebilmesi için, ya polikasyon ya da DNA içeriğinin daha fazla olması gerekir. Böylece stokiyometrik olmayan kompleksler oluşur ve kompleks molekülünün net yükü suda çözünmeyi sağlayacak biçimde pozitif ya da negatif olur. Stokiyometrik kompleksler ise suda çözünmeyip çökerler ve bu yüzden farmasötik formülasyonlarda kullanılamazlar. Katyonik kompleksler suda kararludur ancak farmakokinetik ve biyodağılım özellikleri, katyonik grupların vücuttaki etkileşimlerine kuvvetle bağlıdır [27], [28].

Polikasyonun ana zinciri hidrofobik ise, polikasyon/DNA bağlanmasıyla fosfat gruplarının yükleri nötralize olduğunda hidrofobik bölgeler oluşur. Hidrofobik bölgelerin uzunluğu, polikasyonun polimerizasyon derecesine, sayısı ise polikasyon ve DNA'nın konsantrasyonuna bağlıdır. Bu yüzden, polikasyon/DNA komplekslerinin fizikokimyasal özellikleri, büyük oranda polikasyon/DNA baz mol oranına bağlı olur. Düşük polikasyon konsantrasyonlarında, stokiyometrik olmayan ve suda çözünen kompleksler oluşur. Net yük negatif olur ve polikasyon zincirleri, genellikle DNA moleküllerine eşit olarak dağılır. Polikasyon konsantrasyonu arttırılırsa, kompleksin net yükü azalır ve hidrofobik bölgelerin oranı artar. Belli bir kritik konsantrasyondan sonra, artan hidrofobiklik oranı sebebiyle kompleks moleküllerinde çökmeler başlar. Bu şartlarda, termodinamik açıdan polikasyon zincirlerinin DNA moleküllerine eşit olmayan dağılımı görülür ve net yükü nötralize olmuş kompleks molekülleri çökerken, stokiyometrik olmayan kompleks molekülleri çözünür kalırlar. Polikasyon konsantrasyonunun daha da arttırılmasıyla, polikasyon ve DNA mol oranları eşitlendiğinde, tüm kompleks molekülleri çöker. Ancak ortama daha fazla polikasyon eklenmesiyle, kompleks molekülleri bu kez de pozitif yüklenmeye ve tekrar çözünmeye başlar [27], [31], [32] .

2.2.4 Polimer/DNA Komplekslerinin Özellikleri

Polikasyonun bir DNA'ya bağlanmasıyla:

- (1) DNA kompaktlaşır,
- (2) DNA'nın yükü değişir,
- (3) DNA, enzimlerle sindirilmeye karşı stabilize olur [27].

Polikasyonların DNA'ya bağlanmasıyla, DNA'nın elektrostatik yükleri nötralize olur ve buna bağlı olarak kondensasyon meydana gelir. DNA'nın polikasyonlarla olan paketlenmesi, hücrelerdeki DNA çift sarmalından kromozomlara uzanan doğal kondensasyon mekanizmasına benzer [33]. Kondensasyonun ölçüsü, genel olarak DNA ve polikasyonun baz molar oranına bağlıdır [34]. Bu orana bağlı olarak kompleksler, yaklaşık 100 nm çaplı sıkı toruslar veya sıkı çekirdekler etrafına sarılı poliiyon zincir kabuklarından oluşan daha az kompakt bir yapıda olur [35]. Ayrıca bu yapıların düşük polariteli organik solventlerde de olduğu görülmüştür. Bu koşullarda kompaktlaşmanın sebebi hidrofobik etkileşimler değil, DNA yüklerinin nötralize olduğu koşullarda iyonize çift sarmalın konformasyonel gerilimleri gibi bir sürücü kuvvetin varlığı olmalıdır [36]. Neticede DNA kondensasyonunun bir sonucu olarak, DNA'nın dokulara girmesi ve endositik vesiküllerin içine alımı kolaylaşır [37].

2.2.5 Polimer/DNA Komplekslerinin Önemi

Polimer/DNA komplekslerinin doğal uygulaması olan DNA kondensasyonu, genetik bilginin depolanması ve korunması süreçlerinde anahtar rol oynamaktadır. DNA'nın katyonik polimer varlığında kondensasyonu, DNA'nın keşfedilmesiyle beraber hemen gözlenmiştir. Polipeptitlerle oluşturulan DNA kondensasyonu üzerine ilk çalışmalar, 1950'li yıllarda yayınlanmaya başlamıştır. Bu konuda ilk araştırmacılardan olan Feughelman vd., nükleik asit ve nükleoprotamin karışımlarını X-ışını difraksiyonu ile incelemiş ve temel amino asitlerin fosfat gruplarına oranının değişebileceğini öne sürmüşlerdir [38]. DNA'nın ökaryotik kromozomlarda yüksek oranda kondanse olduğu bulgusu, araştırmacıları değişik polikasyonlarla DNA arasındaki etkileşimleri incelemeye sevk etmiştir. Laemmli [39] ile Gosule ve Schellman [40], yaptıkları çalışmalarla elektron mikroskopunda ayrı şekilde ilk DNA komplekslerini ve morfolojilerini görüntülemişlerdir.

Kondanse DNA'nın çok ve az olduğu fazlar içeren çözeltilerdeki faz ayrıştırması, biyoteknolojide örneğin DNA saflaştırılmasında kullanılmaktadır [41]. DNA-DNA etkileşimleri, polielektrolitlerin ve makro iyonların temel özelliklerinin teorik araştırmalarına bir prototip teşkil etmektedir. Ayrıca yeni tekniklerle etkileşim

kuvvetlerinin doğrudan ölçümü ve tek molekül düzeyinde kompaktlaştırma da mümkün olmuştur [24].

Polimer/DNA komplekslerinin bir diğer önemli uygulaması, son yıllarda gen terapisi alanında görülmektedir. Polileks adı verilen polikasyon/DNA kompleksleri, DNA'nın hücre çekirdeği içine taşınmasında kullanılmaktadır [42], [43], [44]. Polikasyonla elektrostatik etkileşim aracılığıyla kompleks oluşturan DNA kondanse olur ancak aktifliğini yitirmez ve hücrelere transfekte olabilir. Polilekslerin rapor edilen etkin çapları 30 ile 500 nm arasındadır [45], [46]. Polileks, plazmidi enzimatik bozunmaya karşı korur. Polileksin özellikleri, polimerin türüne ve N/P oranına da bağlıdır [47].

2.3 Gen Terapisi

Genlerin ilaç gibi tedavi amacıyla kullanılabileceği fikri, 1970'li yıllarda ortaya çıkmıştır. O dönemde bu fikre yol açan iki önemli gelişme olmuştur. Bunlardan birincisi, genlerin fonksiyonları ve gen mutasyonlarının sonuçları hakkında artan bilgi birikimi, ikincisi ise DNA'nın memeli hücre içine gönderilmesi üzerine etkin yöntemler geliştirilmiş olmasıdır [48]. Gen terapisi, son yıllarda şiddetli bileşik bağışıklık yetmezliği [49], kistik fibrozis [50] ve Parkinson hastalığına [51] yönelik potansiyel bir tedavi yöntemi olarak önem kazanmıştır. Ayrıca kanser tedavisinde kemoterapiye alternatif bir yöntem olması da mümkündür [52].

Gen terapisine yönelik araştırma çalışmaları, günümüzde daha ziyade genetik materyali kompakt hale getirip hücre için taşıyacak etkin vektörlerin tasarımına yöneliktir [53]. Kullanılan ilk vektörler, retrovirüsler ve adenovirüsler gibi viral taşıyıcılar olmuştur [54]; zira virüsler, kendi genetik bilgilerini konak hücrelerine göndermek ve bu sırada hücre takibinden korunmak üzere evrilmişlerdir. Nitekim virüs temelli bu vektörler, hem DNA hem de RNA'nın hücre içine taşınmasında yüksek verimlilik göstermişlerdir. Ancak hedef hücrelere karşı spesifik olmama, yüksek üretim maliyeti ile toksiklik, immünojenlik ve viral genomun da kromozoma eklenmesi gibi güvenlik problemlerinden dolayı, DNA'yı hedef dokulara taşıyacak alternatif vektörlerin geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır [55], [56]. Bu nedenle; katyonik lipidler, polimerler, dendrimerler ve peptitler gibi viral olmayan vektör sistemleri araştırılmaktadır. [6]. Viral olmayan taşıyıcılar, birçok hücre dışı ve içi engelle

karşılaştığından, verimlilikleri viral taşıyıcılar kadar olamamaktadır. Ancak biyoyoumluluk, yüksek DNA paketleme kapasiteleri ve istenen yapılarda kolaylıkla çok miktarda üretilibilmelerinden dolayı, viral olmayan vektörler büyük ilgi çekmektedir [57].

Bir gen transfer prosedürünün başarısı, her şeyden önce nükleik asidin hedeflenen hücrenin içine gönderilebilme verimliliğine bağlıdır. Burada karşılaşılan ilk sorun, apolar ve hidrofobik olan plazma membran lipid çift tabakasının, DNA ve RNA gibi fizyolojik pH değerlerinde negatif yüklü makromoleküller için geçilmez bir bariyer oluşturmaktır. Dolayısıyla gen transferi için, elektroporasyon [58] ya da yüksek basınçlı enjeksiyon [59] gibi *fiziksel*, katyonik lipid ya da polimer gibi *kimyasal* veya viral vektörler gibi *biyolojik* bir araç kullanılmalıdır. DNA'nın ökaryotik hücrelere viral olmayan vektörlerle transferine **transfeksiyon**, viral vektörlerle transferine ise **transdüksiye** denir [48].

2.3.1 Viral Olmayan Gen Transferini Sınırlayan Engeller

Vücudun humoral ve hücresele seviyedeki savunma engelleri, sisteme dış kaynaklı maddelerin girmesine karşı etkin önleme yapar [55]. Viral olmayan gen transferini sınırlayan engeller şöyle sıralanabilir: kararlı komplekslerin oluşması, biyolojik sıvılarda kararlılık, hücrelere ulaşım, hücresele içe alma, endozomdan kaçış, hücre içi trafik, polipleksin açılması ve çekirdeğe giriş. Bu engeller aşağıdaki paragraflarda açıklanmıştır.

DNA ve oligonükleotidler (ODN), nükleazlar tarafından birkaç dakika içinde parçalanırlar [60]. Polimerik taşıyıcılarla kompleks oluşturan DNA'lar ise parçalanmaya karşı korunurlar. Ayrıca pozitif yüke sahip yüzey ile kompleksin hem suda çözünmesi sağlanır hem de negatif yüklü membranlardan geçişi kolaylaştırılır [4], [61]. Nötr yüzey yüklü polipleksler ve yüksek iyonik şiddet içeren ortam içinse agregatlaşma eğilimi görülmektedir [62]. Dolayısıyla, kararlı komplekslerin oluşabilmesi için, polikasyonların kimyasal yapılarının, çözeltinin iyonik şiddetinin ve polikasyon/DNA stokiometrik oranının ayarlanması gerekmektedir.

Pozitif yüklü polipleksler, serum bileşenleri ile kolayca etkileşerek büyük agregatlar oluşturur. Poliplekslerin serum proteinlerle spesifik olmayan etkileşimlerini azaltmak

için, polikasyonlar poli(etilen glikol) (PEG) gibi hidrofilik polimerlerle bağlanabilir [63], [64], [65]. Polikasyonlara PEG bağlamak, aynı zamanda bu yapıların vücut içinde dolaşma sürelerini de arttırır [66]. PEG'in varlığı, serum bileşenlerinin polikasyonlarla etkileşiminde sterik engel oluşturur, parçacıklar arasındaki agregatlaşmayı azaltarak yapıları daha kararlı yapar ve ayrıca suda çözünürlüğü arttırır [67], [68], [69].

Kan akışı içinde korunan poliplekslerin, bütünlüğü bozulmadan taşıdıkları genetik materyali hedef hücrelere ulaştırması gerekir. Hedef hücrelere ulaşımında endotelial duvarlar ve hücre dışı matrikste yer alan çeşitli polianyonlar engel oluşturmaktadır [70], [71], [72].

Büyük ve polar makromoleküllerin fizyolojik koşullarda hücre içine alınması, **endositoz** adı verilen bir mekanizmayla gerçekleşir. Bu mekanizmada, hücre yüzeyinde oluşan vesiküller ilgili makromolekülü sarıp içine alır, sonra bu vesiküller hücre içine geçer. Çeşitli endositoz türleri vardır. Bunlardan en iyi bilinen dört tanesi fagositoz, makropinositoz, Clathrin bağımlı endositoz (reseptör aracılı endositoz) ve Caveolar endositozdur [48]. **Fagositoz**, ökaryotik hücrelerde çapı 500 nm'den büyük olan parçacıkların hücre içine alınma yöntemlerinden birisidir. **Makropinositoz** ile çapı 500 nm'den büyük olan endositik kofullar aracılığıyla hücre içine alım olur ve reseptörler kullanılmadığından spesifik değildir. **Clathrin bağımlı endositozda**, yüzeyi sitozolik Clathrin proteinleri ile kaplı çukur bölgeler yaklaşık 100 nm çaplı bir koful oluşturarak hücre içi alımı gerçekleştirir. **Caveolar endositoz** mekanizmasında da Caveolae ile kaplı çukurlar içine aldıkları yabancı maddeleri sararak oluşturdukları yaklaşık 50 nm çaplı kofulları hücre içine alırlar. Polipleksler hedef hücreye ulaştığı zaman, pozitif yüklü parçacıklar anyonik plazma membranıyla etkileşir ve ATP kullanımlı hücresel içe alma gerçekleşir. Hücre içine giren polipleksler, endozomal bölümlere alınır. Burada, membrana bağlı ATP kullanımlı proton pompaları ile pH yaklaşık 5'e düşmektedir. Gen terapisi açısından poliplekslerin bir şekilde endozomdan uzaklaştırılması gerekmektedir [55]. Endozomdan kaçış için poli(etilen imin) (PEI) ve poliamidoaminler gibi polimerler de kullanılabilir. Bu polimerler yapılarında pKa değerleri 7,4-4,5 olan ikincil ve üçüncül aminler içermektedirler. Böylelikle sitozolden gelen protonları alarak endozom içinde ozmotik şişmeye sebep olurlar ve bu şişme sonucunda endozom membranının

parçalanmasına yol açarak polileksi endozomdan uzaklaştırırlar (proton sünger hipotezi) [73], [74].

Endozomdan kaçmayı başaran plazmid DNA'nın, sitoplazmada ilerleyerek çekirdek yakınına gelmesi gerekmektedir. Hücre içi trafiğini de atlatan polileksinin ise sonunda açılarak DNA'yı serbest bırakması gerekir. Yüksek kararlılıktaki polileksler, DNA'yı çok iyi korurlar ancak son aşamada DNA'nın transkripsiyonunu da sınırladıkları için transfeksiyon verimlilikleri yeterli değildir. Düşük kararlılıktaki polileksler ile DNA'nın son aşamada salınması kolaydır ancak bu polileksler de DNA'yı yeterince koruyamazlar. Dolayısıyla maksimum transfeksiyon için orta kararlılıktaki polileks yapılarına ihtiyaç bulunmaktadır [75].

Çekirdeğe etkin olarak giriş, gen terapisinin son aşaması olarak kabul edilir ancak günümüzde halen DNA'nın çekirdeğe giriş mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır [55]. Genel olarak makromoleküllerin çekirdeğe girişi, spesifik çekirdek nakil proteinleri yardımıyla ve enerji kullanılarak gerçekleşir. Ayrıca PEI/DNA komplekslerinin, düzenli yapılarını kaybetmeden çekirdeğe girdiği rapor edilmiştir [76], [77].

2.3.2 Viral Olmayan Polimerik Vektörler

Viral vektörlerin dezavantajlarından dolayı viral olmayan vektörler ile çalışmalar hız kazanmış durumdadır. Bu tür taşıyıcılar lipozom, katyonik lipid veya katyonik polimerler kullanılarak hazırlanmaktadır. Literatüre bakıldığında en öne çıkanlar arasında poli(etilen imin), poli(L-lizin), polimetilmetakrilat ve çeşitli biyobozunur polimerler bulunmaktadır. Poli(L-lizin), DNA'yı etkin şekilde kondanse etme kapasitesine sahiptir ancak göreceli olarak yüksek bir sitotoksik etki göstermektedir [78]. Bu toksisite, çeşitli poli(L-lizin) türevleri oluşturularak aşılmaya çalışılmaktadır [79], [80]. İçerdiği doğal katyonik yükten dolayı, poli[2-(dimetilamino)etil metakrilat] (PDMAEMA) polimerleri potansiyel gen transfer ajanı olarak araştırılmakta olup PDMAEMA polilekslerinin *in vitro* transfeksiyon verimliliği, polimerin endozomların yapısını bozma kabiliyeti ve sitozol içinde girdikten sonra plazmidi kolaylıkla serbest bırakmasından kaynaklanmaktadır [81]. Ayrıca poli(4-hidroksi-L-prolin) (PHP), poli(β -amino ester)'ler ve polifosfoesterler gibi biyobozunur polimerlerin vektör olarak kullanımları araştırılmaktadır [82], [83], [84].

2.3.2.1 Poli(etilen imin)

Poli(etilen imin) (PEI) aracılı oligonükleotid transferi, ilk kez 1995 yılında Behr vd. tarafından gerçekleştirilmiştir [73]. Sonraki yıllarda PEI türevlendirilerek poliplekslerin fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri daha da arttırılmıştır [85]. PEI'nin transfeksiyon verimliliğinde, proton süngerı doğası önemli rol oynamaktadır [86]. PEI hem lineer hem de dallı yapıda olabilmektedir. Dallı yapıdaki PEI, her üçüncü atomunda azot içerdiğinden dolayı yüksek yük yoğunluk kapasitesine sahiptir. Böylelikle ortam pH'sine bağlı olarak PEI'nin yük durumu da değişmektedir. Bu tamponlama etkisiyle PEI içeren polipleksler, lizozomal trafikten kaçarak bozunmaya karşı korunmuş olurlar [77].

PEI'nin transfeksiyon verimliliği geniş bir molekül ağırlığı aralığı için incelenmiştir. Godbey vd., PEI poliplekslerinin transfeksiyon verimliliklerinin 600'den 70000 Da'a çıktıkça arttığını göstermişlerdir [87]. Ancak molekül ağırlığı arttıkça sitotoksiklik de artmaktadır [88]. Kissei vd., bu toksikliğin agregatlaşma ve hücre yüzeyine tutunma sonucu önemli miktarda nekroz oluşmasına bağlı olduğunu göstermiştir [89]. Molekül ağırlığı dışında dallanmış yapı da DNA kompleks oluşumunu ve stabilitesini etkilemektedir. Dunlap vd., aynı molekül ağırlığı için dallanmış yapıdaki PEI'nin lineer yapıya göre DNA'yı daha etkin şekilde kondanse ettiğini göstermişlerdir [90]. Ayrıca polipleks oluşumunun kararlılığı, birincil amin sayısı arttıkça artmaktadır ki buna göre dallı yapıda daha çok birincil amin olduğundan, dallanmış yapıdaki PEI lineer PEI'ye göre daha uygun bir transfeksiyon vektörü olmaktadır [91].

Transfeksiyon verimliliğini arttırmak için PEI'nin yapısında çeşitli modifikasyonlar denenmiştir. Bunlardan en çok yapılanı PEG eklemektir. PEG, hidrofilik bir dış katman oluşturarak polipleksin plazma proteinleri ve eritrositlerle olan etkileşimlerini azaltır [6]. Ayrıca PEG zincirlerinin uzunlukları ve yoğunlukları, *in vitro* transfeksiyon verimliliğini etkilemektedir. DNA, oligonükleotidler ve ribozomlar, kısa zincirli ve yüksek yoğunluklu PEG aşılı PEI ile daha verimli transfekte olmaktadır [64], [92]. Bununla birlikte, PEI-g-PEG kopolimerlerin *in vivo* çalışmalarında kanda dolaşım süresinin arttığı ancak 25 µg dozlu pDNA'nın fare deneylerinde gen ekspresyonunun gerçekleşmediği görülmüştür [93]. Bunun bir sebebi, PEI-g-PEG kopolimerlerinin yüzey yüklerinin

azalması sonucu hücre membranıyla etkileşimin azalması olabilir. Böylelikle PEI polipekslerinin hücre içi trafiği engellenmiş olmaktadır [76].

PEI aminlerinin kuarternleştirilmeleri sonucu transfeksiyon verimliliğinin azaldığı görülmüştür ki bu durum proton süngeri hipotezini desteklemektedir [94]. Aminlere kolesterol eklenmesi sonucu düşük molekül ağırlıklı PEI için transfeksiyon verimliliğinin arttığı ve toksikliğin azaldığı bulunmuştur [95], [96]. Siklodekstran modifikasyonlu PEI'lerde de transfeksiyon verimliliğinin modifikasyonsuz PEI'lere kıyasla arttığı gözlenmiştir [97].

Mikos vd., PEI'nin sitotoksikliğinin iki mekanizmadan kaynaklandığını öne sürmüşlerdir. Bunlardan birincisi, serbest haldeki PEI'nin hücre içine alınma basamağı öncesinde membranı parçalayarak hücre ölümüne sebep olmasıdır. İkincisi ise, hücre içine alındıktan 7-9 saat sonra polipeks yapısının açılmasıyla serbest kalan PEI'nin endotelial hücre aktivasyonu gibi hücrel stres yaratmasıdır [98]. İkinci mekanizmadaki etkiyi azaltmak için daha az toksik olan daha düşük molekül ağırlıklı yapılara ihtiyaç vardır. Ayrıca biyobozunur PEI bileşiklerinin sentezlenmesi de toksikliği azaltır. Örneğin Kim vd., düşük molekül ağırlıklı (600, 1200, 1800 Da) PEI ile PEG süksinimidil süksinatı (2000 Da) kullanarak oluşturdukları biyobozunur PEI-PEG konjugatlarıyla yaptıkları çalışmada, bu konjugatın 25 kDa'luk PEI'ye kıyasla daha az sitotoksik etki oluşturduğunu ve 1,8 kDa'luk PEI'ye kıyasla daha yüksek gen transfer verimliliğine sahip olduğunu bulmuşlardır [99].

Kissel vd., poli(etilen glikol) (PEG) ve poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) ile hiper dallanmış PEI arasında aşı kopolimerleri sentezlemiştir. Bu yapılar, daha düşük sitotoksiklik göstermiştir, ayrıca 25 kDa PEI'ye kıyasla bazı polipeks yapılarında daha iyi transfeksiyon verimliliği elde edilmiştir [100]. Kissel vd. bir başka çalışmalarında, düşük molekül ağırlıklı (1200 Da) dallanmış PEI ile sentezledikleri oligo(L-laktik asit-co-süksinik asit)'i reaksiyon etmişlerdir. Bu amid bağlı bileşiklerin sitotoksiklikleri 25 kDa'luk PEI'ye göre daha az, 1,2 kDa'luk PEI'ye göre transfeksiyon verimlilikleri ise daha iyi çıkmıştır [101].

2.3.2.2 Amfifilik Polimerler

Amfifilik blok kopolimerler, bir hidrofobik (suyu sevmeyen) ve bir de hidrofilik (suyu seven) bloktan oluşan polimerlerdir. Bu blok kopolimerler, sulu fazda misel oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Hidrofobik blok, miselin çekirdeğini ve hidrofilik bloksa miselin dış kısmını oluşturur. Miselin yapısı, kullanılan polimerlerin türüne ve oranına bağlı olarak çeşitli şekillerde olabilmektedir. Miseller, sentetik biyobozunur blok kopolimerlerinden hazırlanabilirler ve ilaç salım sistemleriyle gen terapisinde taşıyıcı vektör olarak kullanılma potansiyeline sahiptirler.

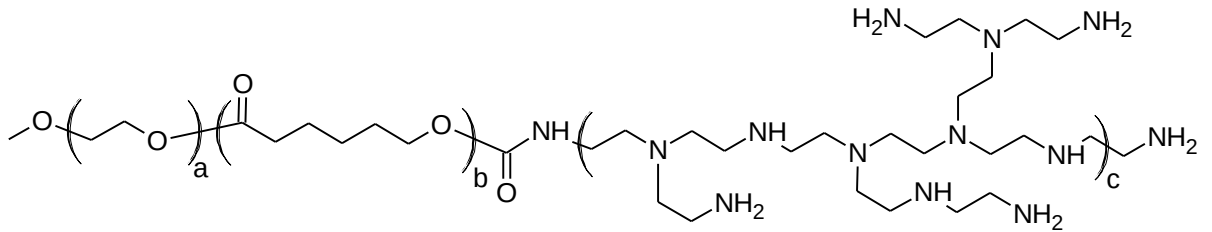
Önceki kısımlarda açıklandığı üzere, gen terapisinde kullanılacak polimerik vektörün DNA'yı öncelikle kondanse etmesi, daha sonra organizma içinde koruyarak hedef hücrelere taşınması ve en son olarak da burada serbest bırakması gerekmektedir. DNA negatif yüklü olduğundan, DNA ile kompleks oluşturması için pozitif yüklü polimerler yani polikasyonlar kullanılır. Polikasyon olarak farklı molekül ağırlıklarındaki ve farklı yapılarıdaki PEI'ler, gen terapisinde yaygın olarak incelenmektedir.

Bu tez çalışmasında, ortalama molekül ağırlığı 2000 Da olan dallanmış yapıdaki PEI kullanılmıştır. PEI, sadece pozitif yüküyle DNA'yı kondanse etmekle kalmaz, aynı zamanda içerdiği amin gruplarının endozom içinde proton süngerisi gibi çalışması sayesinde kompleks yapının endozomdan kaçmasını da sağlar. Dallanmış yapı, DNA'nın daha iyi kondanse edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca dallanmış yapıda daha çok birincil amin grubu bulunur ve birincil amin grubunun çokluğu, kompleksin stabilitesini arttırmaktadır. Düşük molekül ağırlığı ise, sitotoksik etkinin azalmasını sağlamaktadır.

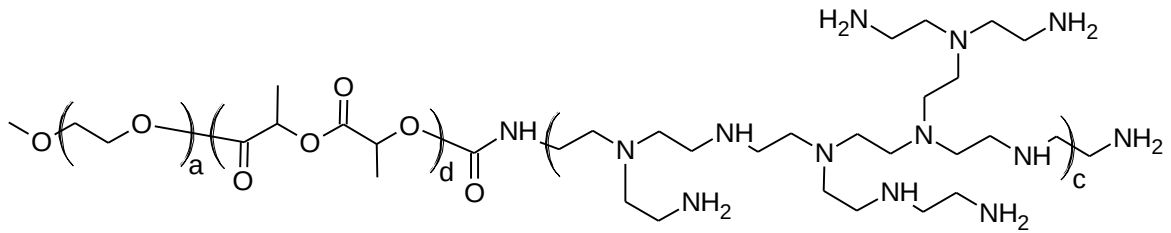
PEI, gen transferi verimliliğinin artırılması için sıklıkla modifiye edilmektedir. PEI'ye PEG eklenmesinin birçok avantajı vardır. PEG, hidrofilik olduğundan suda çözünmeyi artırır ve biyouyumludur. Kompleks yapısında DNA'nın etrafını çevreleyerek, oluşturduğu sterik engel sayesinde DNA'nın serum bileşenleriyle olan etkileşimini azaltır böylece biyolojik sıvılarda DNA'nın daha iyi korunmasına yardım eder. Ayrıca PEG bağlı PEI'nin kanda dolaşım süresi de artmaktadır. Bu tez çalışmasında, ortalama molekül ağırlığı 2000 ve 5000 Da olan metoksi PEG'leri kullanılmıştır. Düşük molekül ağırlığı, yine sitotoksik etkiyi azaltmak içindir.

Bir polimerik vektörde aranması gereken bir başka önemli özellik biyobozunur olmasıdır. Bu amaçla örneğin biyobozunur olan poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) ve poli(L-laktat) (PLL) kullanılabilir. Ahmed ve Discher, biyouyumlu ve biyobozunur sistemler olan PEG-PCL ve PEG-PLL kullanarak kontrollü ilaç salım polimer vesikülleri hazırlamıştır[102]. Ayrıca ilaç yüklenen bu sistemler, hızla büyüyen bir tümörün durdurulması çalışmalarında da kullanılmıştır [103]. Daha önce PEG-PCL ile hiperdallanmış PEI arasında aşı kopolimerleri sentezlenmiştir. Bu tez çalışmasında ise, halka açılmalı polimerizasyonları ile sentezlenmiş aşağıdaki triblok kopolimerleri kullanılmıştır:

- Metoksi poli(etilen glikol)-*b*-poli(ϵ -kaprolakton)-poli(etilen imin) (mPEG-*b*-PCL-*b*-PEI)
- Metoksi poli(etilen glikol)-*b*-poli(L-laktat)-*b*-poli(etilen imin) (mPEG-*b*-PLL-*b*-PEI)



Şekil 2. 10 mPEG-*b*-PCL-*b*-PEI'nin kimyasal yapısı



Şekil 2. 11 mPEG-*b*-PLL-*b*-PEI'nin kimyasal yapısı

Metoksi PEG'in (mPEG) 2000 veya 5000 Da olmasına göre toplamda 4 farklı kopolimer oluşturulmuştur:

- mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI
- mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI
- mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI
- mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI

2.4 Oligonükleotid Antisens Terapisi

Bir antisens oligonükleotidi (AS ODN) hücreye girdiği zaman, hedef mRNA veya genomik DNA'yı melezleştirerek, mRNA'nın yıkımına ve/veya transkripsiyonunun, uçbirleştirmesinin ya da translasyonunun inhibe edilmesine yol açar [8]. Tümör hücrelerinin büyük çoğunluğu, gen ekspresyonu profili açısından normal hücrelerden farklı olduğundan, AS ODN'ler kullanılarak normal hücreleri minimum düzeyde etkileyecek şekilde tümör büyümesi durdurulabilir. *C-myc*, birçok hücre türünde yer alan ve hücre büyümesinde önemli rol oynayan düzenleyici bir gendir [104]. Ancak *c-myc*'nin yanlış ekspresyonu sonucu hücrede kötü huylu dönüşümler görülebilmektedir. Bu duruma bağlı olarak lösemi, melanoma, prostat, meme ve kolon gibi kanserler gelişebilmektedir [105]. Yapılan *in vitro* deneylerinde, insan *c-myc* AS ODN'leri kullanılarak kanserli hücrelerin büyümesinin inhibe edilebildiği saptanmıştır [106], [107]. Bu yaklaşımı insan vücudunda kullanabilmek içinse AS ODN'leri hedef hücrelere taşıyacak vektörlere ihtiyaç vardır.

Antisens *c-myc* oligonükleotidleri kullanılarak SK-MEL-30 insan melanoma hücrelerinin büyüme inhibasyonu üzerine grubumuzca daha önce çalışmalar yapılmıştır. ODN'leri taşımak üzere poli(N-izopropilakrilamid)/poli(etilen imin) kopolimerleri kullanılmış ve inhibasyon durumu MTT testi ile incelenmiştir [108]. Ayrıca sentezlenen mPEG-PCL-PEI ve mPEG-PLL-PEI triblok kopolimerleri kullanılarak yine inhibasyon etkisi incelenmiştir [109]. Sonuçlar, bu polimerik vektörlerin ODN'leri melanoma hücrelerine göndermede potansiyel aday olduğunu göstermiştir. Ancak polimerik vektörlerin transfeksiyon verimlilikleri ve ayrıca sitotoksiklik durumları; boyut ve molekül ağırlığı gibi fizikokimyasal parametrelere bağlı olup bu parametreler ise hem kullanılan polimerlerin türüne, hem de sıcaklık, iyonik şiddet ve pH gibi ortamın özelliklerine bağlıdır. Dolayısıyla bu polimerik vektörlerle oluşturulan ODN komplekslerinin daha iyi karakterize edilmesine ihtiyaç vardır. Bu tez çalışmasında, grubumuzda sentezlenen mPEG-*b*-PCL-*b*-PEI ve mPEG-*b*-PLL-*b*-PEI triblok kopolimerleri ile model olarak seçilen *c-myc* AS ODN'leri (5'-AACGTTGAGGGGCAT-3') arasında çeşitli N/P oranlarında hazırlanan komplekslerin karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca polimer/ODN etkileşimlerini daha iyi anlayabilmek için moleküler dinamik programıyla simülasyonları gerçekleştirilmiştir.

2.5 Polimer/DNA Komplekslerinin Karakterizasyonu

Bu bölümde, literatürde geçen polimer/DNA karakterizasyonları özetlenmiş ve tez çalışmasında polimer/DNA komplekslerinin karakterizasyonunda, dinamik ışık saçılması ve sedimentasyon teknikleri kullanıldığından bu teknikler ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

2.5.1 Literatürde Polimer/DNA Komplekslerinin Karakterizasyonu

Polimer/DNA komplekslerinin araştırılmasında bugüne kadar birçok yöntemden yararlanılmıştır. Örneğin Slita vd., farklı molekül ağırlıklarındaki değişik polikasyonların farklı DNA'larla oluşturdukları kompleksleri viskozimetri, dinamik ışık saçılması (DLS), sirküler dikroizm (CD), UV-görünür bölge spektroskopisi ve elektron mikroskobu (EM) ile incelemişlerdir [110]. UV-görünür bölge spektroskopisi ile komplekslerdeki DNA miktarını bulmuşlardır. Ayrıca DLS, CD ve EM ile üç boyutlu yapıları analiz etmişlerdir. Sonuç olarak, kompleks oluşumunun, polimerin yapısı ile molekül ağırlığına ve çözeltinin iyonik şiddetine bağlı olduğunu, ayrıca DNA'nın ikincil yapısının kompleks içinde değişmediğini ve DNA'nın protonlanmaya karşı korunduğunu bulmuşlardır.

Sarkar vd., polikasyon/DNA komplekslerinin fraktal yapılarını inceledikleri çalışmalarında, dinamik, statik ve elektroforetik ışık saçılması (DLS, SLS ve ELS) tekniklerini kullanmışlardır [111]. Vektör parçacıklarının fraktal boyutlarının pH, iyonik şiddet ve sıcaklık gibi fizikokimyasal koşullara bağlı olduğunu ve komplekslerin hazırlanması ve depolanmasında fraktal boyutlarının önemli bir etken olduğunu göstermişlerdir.

Lee vd., DLS ve ELS tekniklerini kullandıkları çalışmalarında, polikasyon/DNA komplekslerinin fiziksel stabilitelerini incelemişlerdir [112]. Plazmid DNA ile poli(L-lizin) arasında oluşan komplekslerin zamanla boyutları artan agregatlar oluşturduklarını göstermişlerdir. Agregasyonun; başlangıç boyut dağılımı, çözeltinin pH ve iyonik şiddet değerleri ile sıcaklık gibi sistemin fizikokimyasal özelliklerinin karışık bir fonksiyonu olduğunu öne sürmüşlerdir. Düşük pH, düşük iyonik şiddet, düşük sıcaklık ve dar bir başlangıç boyut dağılımıyla *in vitro* deneylerinde daha kararlı yapıların oluştuğunu bulmuşlardır.

DeRouchey vd., değişik polikasyonlar ile DNA arasında oluşan komplekslerin i yapılarını sinkrotron küçük açılı X-ışını saçılması (SAXS) tekniği ile incelemişlerdir [25]. Komplekslerin i boşluklarında ve uzun erimli düzende görülen varyasyonların, hem polikasyon türüne hem de eklenen tuz miktarına bağlı olduğunu bulmuşlardır. Monovalent tuz miktarı arttırıldığında, kesikli faz geçişleri oluştuğunu ve bu geçişlerin polipleks yapısından bağımsız olduğunu göstermişlerdir.

Eldred vd., lizin türevli katyonik polimerlerin DNA ile komplekslerini incelemişlerdir [5]. Bunun için lizinle çeşitli oligomer ve laktam arasında sentez yapmışlardır. Bu yapıların saflaştırılmasında yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), saflık oranlarının bulunmasında nükleer manyetik rezonans (H-NMR ve C-NMR) ve kızıl tesi (IR) spektroskopilerini kullanmışlardır. Ayrıca matris yardımlı lazer iyonizasyon kütle spektroskopisi (MALDI-TOF-MS), jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ve DLS ile de yapıları analiz etmişlerdir. D- ve L-lizin içeren oligomer ve polimerleri kıyaslamış ve kompleks yapılarında önemli bir fark olmadığını bulmuşlardır.

Slinkin ve Shevelev, plazmid DNA'yı bir polikasyon ve bir polianyonla beraber farklı oranlarda l kompleks olarak hazırlamış ve oluşan yapıları turbidimetri ile incelemişlerdir [113]. Bu şekilde bir polianyonun eklenmesiyle, kompleks molekülleri arasında görülen büyük agregat oluşumlarının önüne geilebildiğini göstermişlerdir.

Iacomino vd., lineer polikasyonlar olan poliaminlerle DNA arasında oluşan kompleks yapılarını atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile analiz etmişlerdir [114]. Poliaminlerin DNA sarmalı etrafında tp benzeri bir düzenleme oluşturduklarını göstermişlerdir.

Reschel vd., polikasyon/DNA komplekslerini, hazırlanma koşulları, kimyasal yapıları ve polikasyonların molekül ağırlıkları yönünden incelemişlerdir [91]. Sentezledikleri değişik polikasyonların molekül ağırlıklarını, ışık saçılması detektörü bağlı HPLC ile ölçmüşler, birim kütle başına amino grubu (N/kütle) oranını bulmak için de elementel analizle potansiyometrik titrasyonu birleştirmişlerdir. Floresans spektrofotometresi ile polikasyondaki amin gruplarının DNA'daki fosfat gruplarına olan mol oranını (N/P) belirlemişlerdir. SLS ile molekül ağırlığı, DLS ile boyut ölçümleri gerçekleştirmişler ve AFM ile kompleks yapılarının görüntülerini analiz etmişlerdir. Sonuç olarak komplekslerin molekül ağırlıklarının ve boyutlarının, artan sıcaklık ve pH ile arttığını;

polikasyonların moleköl ağırlıklarının azalmasıyla, düşük pH değerlerinde oluşan komplekslerin kararsızlaşarak koagölasyon oluşturma eğilimi gösterdiklerini bulmuşlardır.

2.5.2 Dinamik Işık Saçılması

Dinamik ışık saçılmasında, çözelti içinde çözünmüş halde bulunan parçacıkların yaptıkları Brown hareketi dolaylı olarak ölçölür. Bunun için çözelti üzerine lazer ışığı gönderilir ve parçacıklardan saçılan ışık detekte edilir. Parçacıklar Brown hareketine bağılı olarak sürekli hareket ettiklerinden dolayı, saçılan ışığın şiddeti de sürekli değışir. Küçük parçacıklar büyük parçacıklara göre daha hızlı hareket ederler. Buna bağılı olarak saçılan ışık şiddetinin değışim hızı, küçük parçacıklarda daha büyük olur. DLS yönteminde, saçılan ışık şiddetinin değışim hızı küçük zaman aralıklarıyla analiz edilerek parçacıklara ait difüzyon katsayısı (D) bulunur. Difüzyon katsayısının Stokes-Einstein denkleminde (2.1) uygulanmasıyla boyut hesaplanır [115]:

$$d = \frac{k \cdot T}{3\pi \cdot \eta \cdot D} \quad (2.1)$$

Burada d , parçacıkların çapı; k , Boltzmann sabiti; T , mutlak sıcaklık ve η ise viskozite değıeridir.

Saçılan ışık şiddeti değışiminden difüzyon katsayısını hesaplamak için çeşitli algoritmalar vardır. Kümölant analizi ile çözeltideki tüm parçacıklara ait ortalama tek bir boyut değıeri olan Z-ortalama ve bir polidispersite sabiti (Pdl) bulunurken [116], CONTIN analizi ile boyut dağılımı elde edilmektedir [117].

2.5.3 Sedimentasyon Teknikleri

1920'li yılların başlarında Theodor Svedberg öncölüğünde geliştirilen analitik ultrasantrifölj (AUC) cihazı ile çözelti içindeki parçacıklar santrifölj alanı altında incelenebilmektedir. AUC ile homojenlik durumu, moleköl ağırlığı, boyut, sedimentasyon katsayısı, difüzyon katsayısı gibi parametreler ölçöllebilmekte ve çözelti ortamında etkileşen sistemler analiz edilebilmektedir [118], [119], [120]. AUC ile temelde iki tür ölçölüm yapılabilir: sedimentasyon hızı ve sedimentasyon dengesi.

Tez çalışmasında, Beckman Coulter marka XL-I analitik ultrasantrifüj cihazı kullanılmıştır.

2.5.3.1 Temel Teori

Bir gravitasyonel alan altındaki kütle topluluğu, gravitasyon potansiyel enerjisi kimyasal potansiyel enerjisini her radyal konumda tam olarak dengeleyene kadar yer değiştirir. Bu düzenlenme sırasında hareket eden moleküllerin sınırlarının hızları izlenirse, sedimantasyon hız deneyi gerçekleştirilmiş olur. Eğer dengeye ulaşıldıktan sonra konsantrasyon dağılımı belirlenirse, bu da sedimantasyon denge deneyi olur [121].

Çözelti içinde çözünmüş bir parçacığa bir gravitasyon alanı olan santrifüj alanı altında üç kuvvet etki eder:

(1) Santrifüj kuvveti (F_s):

$$F_s = m(\omega^2 r) = \frac{M}{N}(\omega^2 r) \quad (2.2)$$

Burada m , tek bir parçacığın kütlesi; ω , açısal hız; r , parçacığın dönme eksenine olan uzaklığı; $\omega^2 r$, dönmeden dolayı parçacığa etkiyen ivme; M , çözünen maddenin mol kütlesi ve N ise Avogadro sayısıdır.

(2) Sıvının kaldırma kuvveti (F_b):

$$F_b = -m_0(\omega^2 r) = m\bar{v}\rho = \frac{M}{N}\bar{v}\rho \quad (2.3)$$

Burada m_0 , parçacık sıvıya battığında parçacık tarafından yer değiştirilen sıvı kütlesi; $\bar{v}$, parçacıkların kısmi spesifik hacmi ve ρ ise çözücünün yoğunluğudur.

(3) Sürtünme kuvveti (F_f):

$$F_f = -fu \quad (2.4)$$

Burada f , sürtünme katsayısı ve u ise parçacığın radyal hızıdır.

Santrifüj etkisiyle parçacıklar sıvı içinde ivmelenir ancak hız arttıkça sürtünme kuvveti de artar ve harekete karşı koyar. Çok kısa bir süre içinde üç kuvvet dengelenir ve parçacığın hızı sabitlenir:

$$F_s + F_b + F_f = 0 \quad (2.5)$$

Denge durumu için (2.5) denklemi; (3.3), (3.4) ve (3.5) denklemleri kullanılarak tekrar düzenlenirse, s çökme katsayısı elde edilir:

$$\frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{Nf} = \frac{u}{\omega^2 r} \equiv s \quad (2.6)$$

Burada $M(1 - \bar{v}\rho)$ terimine etkin mol kütlesi de denir ve sıvının kaldırma kuvvetinin dahil edilmesiyle oluşan kütleyi ifade eder. Çökme katsayısının birimi saniye olup, çoğu molekül için genellikle 10^{-13} - 10^{-11} s aralığında çıkmaktadır. Svedberg'in anısına, 10^{-13} s'ye Svedberg (S) adı verilmiştir. Örneğin sığır serum albümin proteinin tipik değeri 4,5 S'dir.

Çökme katsayısının bulunması için, santrifüj alanı altındaki parçacık dağılımlarının belli aralıklarla belirlenmesi gerekir. Bunun için, bir detektör kullanılarak küvet boyunca çözelti içindeki konsantrasyon taramaları yapılır. Belli bir santrifüj ivmesi altında, küvet boyunca konsantrasyonda zaman içinde görülen değişimler, moleküllerin çökme ve difüzyon katsayılarına bağlıdır. Çökme katsayısı, Lamm denklemi çözülerek bulunur [122]:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} - \frac{1}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right) - s\omega^2 \left(r \frac{\partial C}{\partial r} + 2C \right) \quad (2.7)$$

Burada r , radyal yönde konumu ve t geçen süreyi göstermektedir.

Ayrıca s/D oranından, Svedberg denklemiyle molekül ağırlığı da hesaplanabilir [123]:

$$M = \frac{s}{D} \frac{RT}{(1 - \bar{v}\rho)} \quad (2.8)$$

Denge durumunda, konsantrasyonun zamanla değişimi sıfırlanır. Buna göre $\partial C / \partial t = 0$ alınarak denklem (2.8) tekrar düzenlenirse:

$$C_r = C_{r_0} \exp \left[\frac{\omega^2}{2RT} M(1 - \bar{v}\rho)(r^2 - r_0^2) \right] \quad (2.9)$$

Burada r_0 , referans konumunu; C_r , bir r konumundaki konsantrasyonu ve C_{r_0} ise referans konumundaki konsantrasyonu göstermektedir.

2.5.3.2 Optik Sistemler

Çözelti içindeki konsantrasyon doğrudan ölçülmez, bunun yerine konsantrasyona bağlı başka bir parametreye ait sinyal ölçülür ve hesaplama konsantrasyona geçilir. Konsantrasyon hesabı için absorptans, floresans, saçak kayması ve türbidimetri gibi parametreler ölçülebilir. Beckman Coulter'ın XL-I model AUC cihazında iki tür optik sistemi vardır: absorptans ve Rayleigh girişim optik sistemleri [124].

Absorptans optik sistemi, bilinen UV-görünür bölge spektroskopileri ile aynıdır. Tek başına çözücünün olduğu referansa karşılık örnek çözeltisinin absorptansı ölçülür. Beer-Lambert yasasına göre absorptans (A) ile konsantrasyon (C) doğru orantılıdır:

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (2.10)$$

Burada ε , molar sönmelenme katsayısı, l ise optik yol uzunluğudur. AUC'nin çift sektörlü 12 mm standart kuvvetlerinde optik yol uzunluğu 1,2 cm'dir. Eğer çözünen moleküllerin sönmelenme katsayıları da biliniyorsa, konuma bağlı ölçülen absorptans değerlerinden kuvvet boyunca olan konsantrasyon dağılımı bulunabilir. Ayrıca A ile C doğru orantılı olduğundan ve (2.7) Lamm denkleminin her iki tarafında da C değişkeni bulunduğundan, Lamm denkleminin çözülerek sedimantasyon katsayısının bulunması için ε değerinin bilinmesine de gerek yoktur, Lamm denkleminde C yerine ölçülen A değerleri doğrudan kullanılabilir. ε değeri, denge reaksiyonlarında konsantrasyon bilgisinden denge sabitinin hesaplanması sırasında gereklidir. XL-I cihazında absorptans ışık kaynağı ksenon flaş lambasıdır [124].

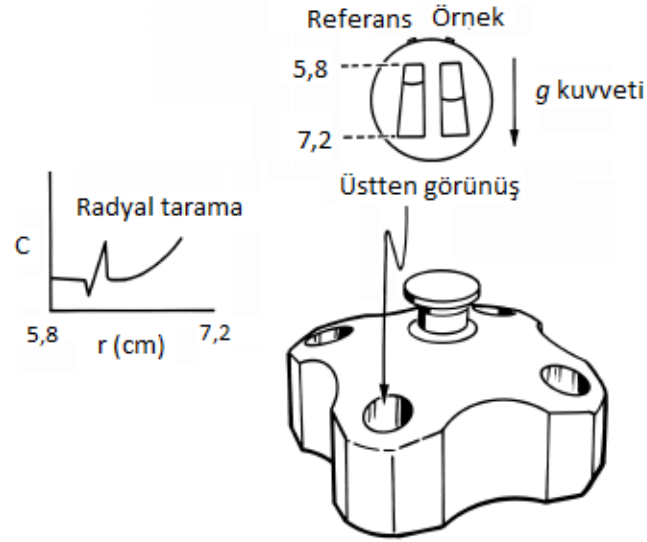
Diğer optik sistem olan Rayleigh girişiminde, belli bir referansa göre kırılma indisindeki değişim ölçülür. Ortamın kırılma indisi, ışığın ortam içindeki hızına etki ettiğinden, farklı kırılma indisli ortamlarda ışık farklı hızda hareket eder. Fizikte iyi bilinen bir süreçle, bu durum sonucunda girişim desenleri oluşur. Girişim desenlerindeki saçaklarda görülen kaymalar, kırılma indisi farkıyla doğru orantılıdır. Kırılma indisi farkı ise konsantrasyonla değişmektedir. Böylece, tek başına çözücünün olduğu referansa göre örnek çözeltisinin girişim deseninde oluşturduğu saçak kayması ölçülür. Saçak kayması (J) ile konsantrasyon arasında, Denklem (2.11)'de verilen ilişki vardır:

$$J = \frac{l(dn/dc)}{\lambda} C \quad (2.11)$$

Burada dn/dc , kırılma indisinin konsantrasyona bağlı diferansiyel değişimi ve λ ise ışığın dalga boyudur. Absorbans ölçümlerinde olduğu gibi, Lamm denkleminde C yerine J yazılarak hesap yapılabilir. Ancak denge reaksiyonlarında konsantrasyon bilgisinden denge sabitinin hesaplanması için dn/dc değerinin bilinmesi gerekir. XL-I cihazının girişim optik sisteminde darbeli lazer diyonu kullanılmakta olup dalga boyu ise 675 nm'dir [124].

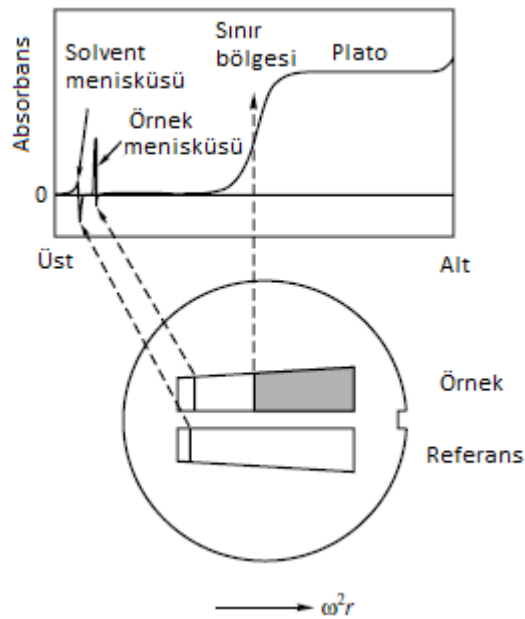
2.5.3.3 Ölçümler

XL-I cihazının çift sektörlü kuvvetlerinde, sektörlerden birine referans olmak üzere tek başına çözücü, diğerine ise örnek çözeltisi konulur. Kuvvetler cihazın rotoruna yerleştirilir. Santrifüj alanı altında moleküller dönme ekseninden uzaklaşacak şekilde radyal doğrultuda çökerler. Bu sırada absorbans ve/veya girişim detektörleriyle kuvvet boyunca konsantrasyon taramaları yapılır. Kuvvetlerin çözelti konulan kısımları, dönme ekseninden 5,8 ile 7,2 cm uzaklıklar arasındadır (Şekil 2.12).



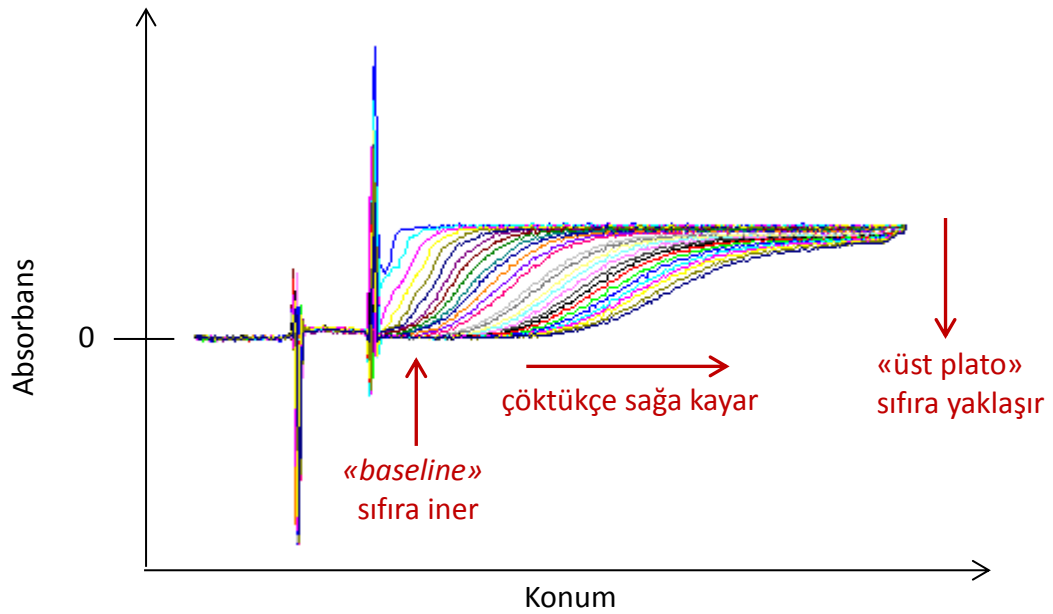
Şekil 2. 12 XL-I cihazına ait kuvet ve rotorun üstten görünüşü [124]

Şekil 2.13’de, AUC’ye ait kuvet boyunca yapılan tipik bir absorbans taraması görülmektedir. Örnek konulmuş sektörde gri bölgede hala moleküller vardır, beyaz renkli bölgede ise santrifüj sonucu çökme meydana geldiğinden artık molekül kalmamıştır. Buna göre absorbans-konum grafiğinde, gri bölgeye kadar absorbans sıfır çıkmakta, gri bölgede ise belli bir absorbans değeri okunmaktadır.



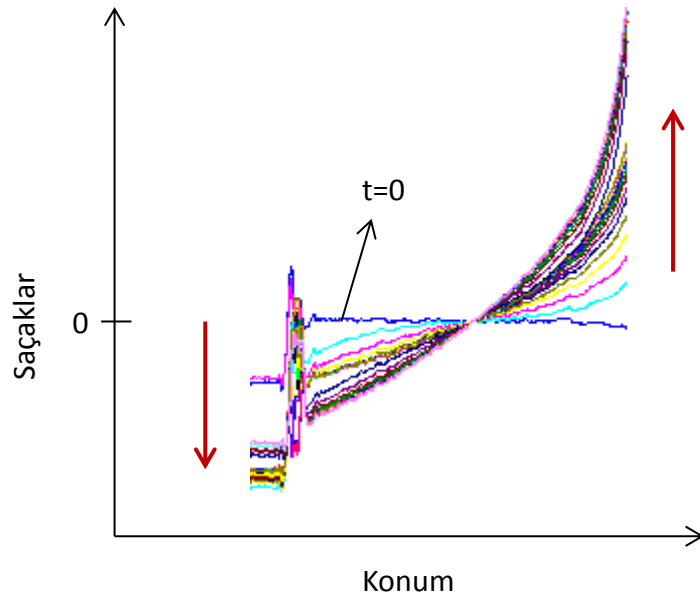
Şekil 2. 13 AUC’de kuvet boyunca ölçülen bir absorbans dağılımı [123]

Şekil 2.14’de, bir sedimentasyon hız deneyinde elde edilebilecek tipik absorbans dağılımları görülmektedir. Deneyin başında, tüm küvet boyunca aynı absorbans değerini verecek düzgün bir konsantrasyon dağılımı vardır. Deney başladıktan sonra ise moleküllerin çökerek boşalttığı küvet kısımlarında konsantrasyon sıfıra iner. Bu sıfır absorbanslı bölge ile deney başındaki absorbans değerini veren bölge arasında bir sınır vardır. Bu sınır, çökme oldukça çökme yönünde hareket eder. Ayrıca küvetlerin enine kesitleri radyal yönde artmaktadır. Bu yüzden aynı miktar madde, küvette radyal yönde çökerken küvetin bu bölgesinde hacim arttığından dolayı, giderek daha düşük absorbans sinyali verir, dolayısıyla plato zamanla azalır.



Şekil 2. 14 Bir sedimentasyon hız deneyinde düzenli zaman aralıklarıyla küvet boyunca ölçülen tipik absorbans dağılımları

Şekil 2.15’de bir sedimentasyon denge deneyinde elde edilebilecek tipik saçak kaymaları görülmektedir. $t=0$ anında küvet boyunca saçak kayması 0 civarındadır. Deney başladıktan sonra moleküller dengeye gelmek üzere harekete geçer. Bu sırada saçak kaymaları başlar. Zamanla dengeye yaklaşıldıkça, eğrilerdeki değişim azalır. Ölçümlerin üst üste çıkmaya başlaması, dengeye ulaşıldığının göstergesidir.



Şekil 2. 15 Bir sedimantasyon denge deneyinde düzenli zaman aralıklarıyla kuvvet boyunca ölçülen tipik saçak kaymaları

2.6 Polimer/DNA Komplekslerinin Modellenmesi

Negatif yüklü DNA ile pozitif yüklü polikasyonlar arasındaki kompleks oluşumları, bu sistemlerin gen terapiye yönelik kullanımlarının önemi açısından modellenme çalışmalarında da yoğun olarak ilgi görmektedir. Ayrıca DNA'nın çok değerlikli ligandlarla kondanse olması da polimer/DNA kompleksleşmesinin daha iyi anlaşılması için çeşitli modelleme teknikleriyle incelenmesini gerekli kılmaktadır. Bu amaçla, Monte Carlo ve kabalaştırılmış yaklaşım moleküler dinamik simülasyon teknikleri kullanılarak çeşitli araştırmalar yapılmıştır [125], [126], [127], [128], [129] ancak kompleks oluşumlarının ve etkileşimlerin daha iyi anlaşılması için DNA ve polikasyon moleküllerinin atom seviyesinde ele alınması gerekmektedir. Gelişen bilgisayar teknolojisine bağlı olarak son zamanlarda bu sistemlerin atomistik moleküler dinamik (MD) simülasyonları da yapılmaya başlanmıştır [130], [131], [132]. Bu simülasyonlarda kısa zincirli poli(etilen imin) ve polilizin gibi polikasyonların 10-20 bazlık model DNA'lar ile kompleks oluşumları incelenmiştir. Özellikle belirgin olarak su ortamında gerçekleştirilen atomistik MD simülasyonları çok uzun sürdüğünden, uzun zincirli (yüksek molekül ağırlıklı) veya daha kompleks yapıdaki polimerlerin DNA ile etkileşimlerinin bu yöntemle incelenmesinde eksiklikler vardır. Bu tez çalışmasında, M_n değerleri yaklaşık 4500-7500 Da olan 4 farklı mPEG-*b*-PCL-*b*-PEI ve mPEG-*b*-PLL-*b*-PEI

triblok kopolimerlerinin 15 bazlık *c-myc* AS ODN ile kompleks oluşumları belirgin olarak su molekülleri varlığında atomistik MD yaklaşımı ile incelenmiştir.

Tez çalışmasında, polimer/ODN kompleks moleküllerinin modellenmesinde temel olarak Amber moleküler dinamik programı kullanılmıştır. Ayrıca Amber'in yanı sıra GAMESS kuantum mekanik programı ile Avogadro ve VMD gibi görüntüleme programları da kullanılmıştır.

Modelleme çalışmaları, aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır:

- (1) mPEG, PCL, PLL ve PEI polimerlerinin geometrik optimizasyonlarının yapılması
- (2) mPEG, PCL, PLL ve PEI polimerlerinin kısmi yüklerinin bulunması
- (3) *c-myc* ODN yapısının oluşturulması
- (4) Polimer/ODN sistemlerinin MD simülasyonlarının yapılması
- (5) Tüm simülasyonların analizlerinin yapılması

2.6.1 Geometrik Optimizasyon ve Kısmi Yüklerin Bulunması

Bir MD simülasyonu için sistemdeki her atomun kısmi yükünün bilinmesi gerekmektedir. Kısmi yükleri bulabilmek içinse öncelikle sistemin minimum enerjili konformasyonu bulunmalı yani geometrik optimizasyon gerçekleştirilmelidir. Geometrik optimizasyon ve kısmi yük hesabında, GAMESS (genel atomik ve moleküler elektronik yapı sistemi) *ab initio* kuantum kimya paket programı kullanılmıştır [133]. Bunun için öncelikle mPEG, PCL, PLL ve PEI polimerleri Avogadro programında çizilmiş ve GAMESS için girdi dosyaları oluşturulmuştur. Daha sonra girdi dosyaları GAMESS'te çalıştırılmıştır.

Moleküllerin geometrik optimizasyonu ve atomların kısmi yük hesabında kuantum mekaniği kullanılmaktadır. Kuantum mekaniğine göre parçacıklar dalga fonksiyonları ile betimlenir. Dalga fonksiyonlarının değişimi ise Schrödinger dalga denklemi ile bulunur [134]:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (2.12)$$

Burada $\hat{H}$, Ψ dalga fonksiyonuna etkiyen Hamiltonyen operatörü, E ise enerji özdeğeridir.

M çekirdekli ve N elektronlu bir sistemin toplam dalga fonksiyonu, Slater determinantı ile bulunur:

$$\Psi = \begin{vmatrix} \chi_1(1) & \chi_2(1) & \dots & \chi_N(1) \\ \chi_1(2) & \chi_2(2) & \dots & \chi_N(2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_1(N) & \chi_2(N) & \dots & \chi_N(N) \end{vmatrix} \quad (2.13)$$

Burada χ_i , i. uzay-spin orbitali olup her satır sistemdeki bir elektrona karşılık gelmektedir. Sistemin toplam Hamiltonyeni de şöyle olur:

$$\hat{H} = \sum_{i=1}^N \left\{ -\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{j=A}^M \frac{Z_j}{r_{ij}} \right\} + \sum_{i=1}^N \sum_{k=i+1}^N \frac{1}{r_{ik}} \quad (2.14)$$

Burada i, elektron numarasını; j, çekirdek numarasını; Z, çekirdeğin yük sayısını ve r, iki elektron arasındaki uzaklığı göstermektedir. Parantez içindeki ifade sistemin kinetik ve elektron-çekirdek arasındaki potansiyel enerjilerinin toplamına eşittir ve bir-elektron integralleri olarak adlandırılır. İkinci terim ise elektron-elektron arasındaki potansiyel enerjileri olup iki-elektron integralleri olarak adlandırılır.

Sistemin toplam enerjisi, (2.15) denklemiyle hesaplanır:

$$E = \frac{\int \Psi^* \hat{H} \Psi d\tau}{\int \Psi^* \Psi d\tau} \quad (2.15)$$

GAMESS programı, yukarıda verilen denklemleri kullanarak moleküllerin enerjilerini hesaplar ve buna bağlı olarak minimum enerjili konformasyona karşılık gelen geometrik optimizasyonu gerçekleştirir. Minimum enerjili konformasyon üzerinden atomların birbirleriyle olan durumları hesaba katılarak her atomun kısmi yükleri bulunur. Bulunan bu kısmi yükler, daha sonra Amber programında MD simülasyonlarında kullanılmıştır.

2.6.2 Moleküler Dinamik

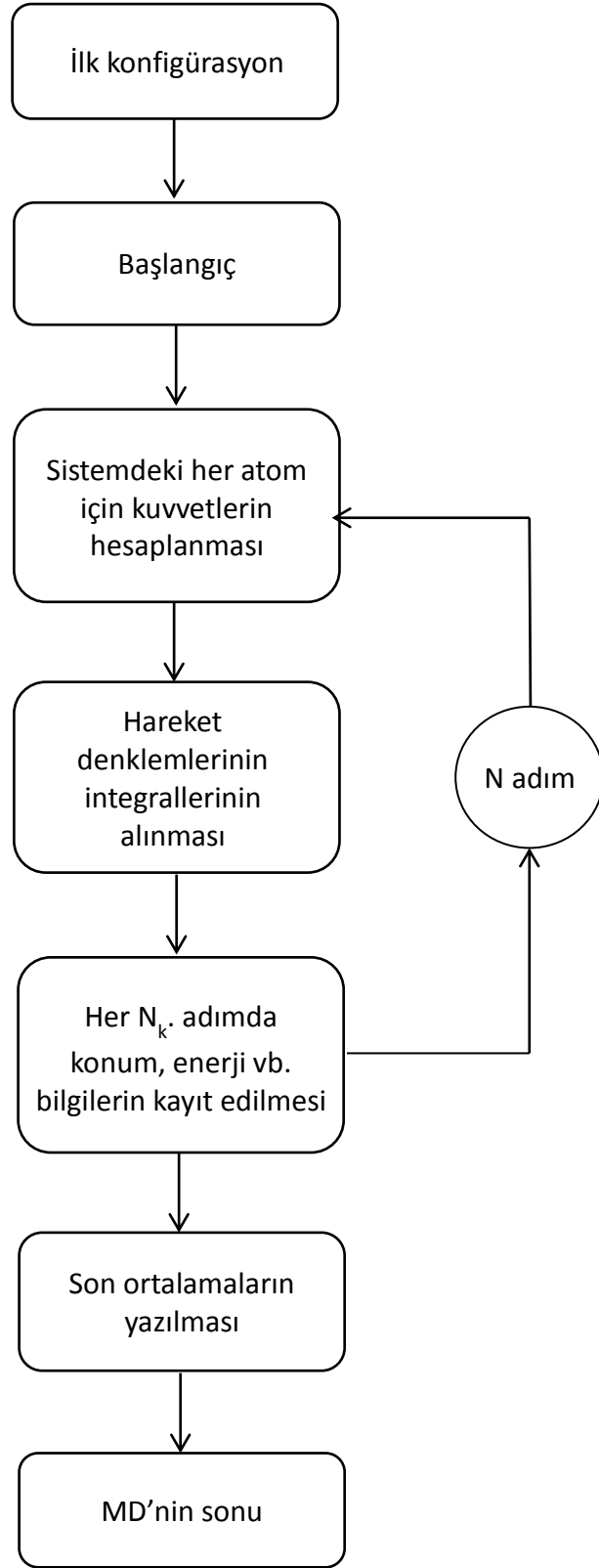
Moleküler dinamik, klasik çok parçacıklı sistemlerin denge ve dinamik özelliklerinin hesaplanmasında kullanılan güçlü bir tekniktir. Bilgisayar teknolojisinin gelişmesine paralel olarak, polimer gibi sistemlerin incelenmesinde MD simülasyonlarının kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır [135].

MD tekniği, sistemdeki her atomun konumlarını ve hızlarını verecek şekilde nümerik integrallerin alınması şeklinde klasik hareket denklemlerinin çözümü üzerine kuruludur [136], [137]. Fiziksel sistemin kuantum mekanik yerine klasik hareket denklemleriyle betimlenmesi, ardışık enerji seviyeleri arasındaki aralığın $h\nu < k_B T$ koşulunu sağladığı durumlarda iyi bir yaklaşım olmaktadır. Oda sıcaklığındaki tipik bir sistem için bu değer $< 0,6 \times 10^{-13}$ Hz'dir. Buna göre hareket için ilgili zaman aralığı $t > 1,6 \times 10^{-13}$ s veya 0,16 ps olur [135].

Standart bir MD algoritması şu adımlardan oluşur:

- (1) Fiziksel sistemi molekül düzeyinde gösteren bir ilk model konfigürasyonun seçilmesi ya da oluşturulması ve sistemdeki her parçacığın ilk konumları ve ilk hızlarıyla başlangıç koşullarının belirlenmesi.
- (2) Sistem içindeki tüm parçacıkların üzerlerine etkiyen kuvvetlerin hesaplanması. Polimerik sistemlerde böyle bir kuvvetin iki bileşeni olur: moleküller arası (farklı zincirlerdeki atomlar arasında) ve molekül içi (aynı zincir içindeki atomlar arasında) kuvvetler.
- (3) Uygun bir yöntemle hareket denklemlerine ait integrallerin alınması.
- (4) Sistem dengeye ulaştıktan sonra periyodik olarak her N_k adımda bir ölçümlerin alınması yani konum, hız, enerji vb. parametrelerin kaydedilmesi.
- (5) Gerekli N adım geçildikten sonra, büyüklüklerin ortalamalarının alınması ve buna bağlı olarak istenen özelliklerin hesaplanması.

Buna göre Şekil 2.16'daki akış diyagramı çizilebilir.



Şekil 2. 16 Standart bir MD'ye ait akış diyagramı [135]

Moleküler dinamikte, sisteme ait peş peşe konfigürasyonlar Newton'un hareket yasasının integralleriyle bulunur. Bunun sonucunda sistemdeki parçacıkların zaman içindeki konum ve hız değişimleri hesaplanır.

Parçacıkların zaman içindeki konumları veya yörüngeleri Newton'un ikinci hareket yasasının ($F=ma$) diferansiyel denklemlerinin çözülmesiyle elde edilir:

$$\frac{d^2x_i}{dt^2} = \frac{F_{x_i}}{m_i} \quad (2.16)$$

(2.16) denklemi, m_i kütleli parçacığın x_i koordinatında F_{x_i} kuvvetinin etkisiyle hareketini betimlemektedir [137]. Böylelikle moleküler dinamikte, belli bir anda sistemdeki tüm atomların koordinatları belirlenir ve kullanılan kuvvet alanına göre bu konumlar için her atom üzerine etkiyen kuvvet hesaplanır. Daha sonra atomlar önceki hızları ve konumları üzerine bu kuvvetin etkisiyle belli bir süre hareket ettirilirler. Bu hareket sonucunda tekrar tüm atomların konumları belirlenir, tekrar kuvvetler hesaplanır ve atomlar tekrar kısa bir süre için yeni kuvvetlerle hareket ettirilir. Bu süreç istenildiği kadar tekrar edilir. Hareket adımlarının süresi ne kadar küçük olursa, simülasyon o kadar hassas olur ancak toplam simülasyon süresi de buna bağlı olarak artar. Neticede sıcaklık, enerji ve ortalama karekök sapması (RMSD) gibi değerlerin dengeye gelmesiyle simülasyonlar sonlandırılabilir.

Tez çalışmasında, özellikle biyolojik moleküllerin simülasyonları için özelleştirilmiş Amber MD programı kullanılmıştır[138]. Amber'de MD hesaplamaları için tanımlanmış genel kuvvet alanı şöyledir [139]:

$$\begin{aligned} V(\mathbf{r}) = & \sum_{\text{bağlar}} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{\text{açılar}} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 \\ & + \sum_{\text{dihedraller}} \left(\frac{V_n}{2} \right) (1 + \cos[n\phi - \delta]) \\ & + \sum_{\text{nonbonding}} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} \right) - \left(\frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + \left(\frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right) \end{aligned} \quad (2.17)$$

Burada birinci terim bağlardan, ikinci terim açılardan ve üçüncü terim dihedrallerden kaynaklanan potansiyel enerjileri vermektedir. K_b ve K_θ sırasıyla bağ ve açı için yay veya kuvvet sabiti, b ve θ ise bağ uzunluğu ve açı değişkenleridir. Son toplamdaki ilk iki terim van der Waals etkileşme terimleri, üçüncü terim ise Coulomb etkileşme terimidir.

Bu kuvvet alanına ayrıca şu polarizasyon terimi de eklenebilmektedir:

$$E_{pol} = -2 \sum_i \mu_i E_{i0} \quad (2.18)$$

GEREÇLER ve YÖNTEMLER

3.1 Deneyisel Kısım

Bu çalışmada amaç, mPEG-*b*-PCL-*b*-PEI ve mPEG-*b*-PLL-*b*-PEI triblok kopolimerleri ile DNA arasında farklı N/P oranlarında hazırlanan komplekslerin karakterizasyonu ve modellenmesidir. Çalışmanın ilk aşaması dinamik ışık saçılmasıyla, ikinci aşama ise analitik ultrasantrifüj cihazı ile karakterizasyondur. Son aşama, moleküler dinamik programıyla simülasyonlar gerçekleştirilmesidir.

Bu kısımda, deneyisel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve kimyasal maddeler belirtilmiş, ayrıca blok kopolimerlerin sentezi ve cihazlarda alınan ölçümler açıklanmıştır.

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Deneylerde kullanılan cihazlar şöyledir:

- Analitik ultrasantrifüj (Beckman Coulter – ProteomeLab XL-I)
- Çalkalamalı su banyosu (GFL – 1083)
- Dansimetre (Anton Paar – DMA 5000)
- Etüv (Binder – ED 153; MMM – Ecocel 111)
- Hassas terazi (Kern – ABS; Sartorius – CP225D)
- Isıtıcı manyetik karıştırıcı (Heidolph – MR 3001)
- Liyofilizatör (Telstar – Cryodos)
- Mikrodalga sentez cihazı (Milestone – MicroSYNTH)

- pH metre (WTW – inoLab pH Level 1 & pH 315i)
- Santrifüj (Hettich – EBA 20; ThermolEC – Micromax RF)
- Soğutmalı santrifüj (Sigma – 2-16PK)
- Ultra saf su sistemi (Millipore – Milli-Q Gradient & Synthesis)
- UV-görünür bölge spektrofotometre (Spectrum – SP-2000UV)
- Vakumlu etüv (Binder – VD 53)
- Vorteks (Heidolph – Reax Top)
- Ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex – RK 52 H)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern – ZEN 3600)

3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler şöyledir:

- 1,1'-Karbonildiimidazol (Aldrich – 115533)
- 1,4-Dioksan (Sigma-Aldrich – 296309)
- Borik asit (Sigma-Aldrich – B0394)
- Dietil eter (Merck – 100926)
- Diklormetan (Sigma-Aldrich – D65100)
- Etanol (Sigma-Aldrich – 32221)
- Hidroklorik asit (Riedel-de Haën – 30721)
- Kalay(II) 2-etilhekzanoat (SnOct_2) (Aldrich – S3252)
- Kloroform (Sigma-Aldrich – 472476)
- L-Laktat (Aldrich – 367044)
- Poli(etilen glikol) metil eter (ort. $M_n=2000$ Da) (Aldrich – 202509)
- Poli(etilen glikol) metil eter (ort. $M_n=5000$ Da) (Aldrich – 81323)
- Poli(etilen imin) (Aldrich – 408700)

- Sığır serum albümin (BSA) (Sigma – A4503)
- Sodyum fosfat dibazik heptahidrat (Fluka – 71647)
- Sodyum fosfat monobazik dihidrat (Riedel-de H  en – 04269)
- Sodyum hidroksit (Sigma-Aldrich – 221465)
- Sodyum klor  r (Sigma – S5886)
- Toluen (Merck – 108323)
-  -Kapolakton (Aldrich – 167363)

3.1.3 Blok Kopolimerlerin Sentezi

Tez  alışmasında ODN ile oluşturulacak kompleksleri incelemek   zere, grubumuzca daha önceden sentezlenmiş metoksi poli(etilen glikol)-*b*-poli( -kaprolakton)-*b*-poli(etilen imin) (mPEG-*b*-PCL-*b*-PEI) ve metoksi poli(etilen glikol)-*b*-poli(L-laktat)-*b*-poli(etilen imin) (mPEG-*b*-PLL-*b*-PEI) triblok kopolimerleri kullanılmıştır [109]. Tez  alışması boyunca bu polimerlerin sentezi de gerçekleştirildiğinden, sentez ve karakterizasyona kısaca yer verilmiştir.

Bu amaçla öncelikle L-laktat dimeri saflaştırılmış ve kopolimerizasyona geçilmiştir. Kısaca bahsedilecek olursa; 2,5 mg L-laktat tartılarak üzerine yaklaşık 10-12 ml toluen eklenmiştir. Çözelti, L-laktat eriyene kadar 70  C'lik su banyosunda karıştırılmıştır. L-laktat tamamen eridikten sonra çözelti, buzlu suyun içine konarak kristallenme sağlanmıştır. Ardından kristallenmiş bu   zelti, Gooch krozesinde vakum pompasıyla s   lerek krozenin üzerinde kalan L-laktatlar petri kabına alınmış ve vakumlu et  de kurutulmuştur.

mPEG-*b*-PCL ve mPEG-*b*-PLL diblok kopolimerlerin sentezinde, mPEG:PCL ve mPEG:PLL mol oranları 1:4 olarak alınmıştır. Ayrıca katalizör olarak toplam mol sayısının % 1,5'  kadar kalay(II) 2-etilhekzanoat (SnOct₂) kullanılmıştır [140]. Sentezler, Milestone marka MicroSYNTH model mikrodalga sentez cihazında yapılmıştır. Ek A'daki hesaba göre  izelge 3.1'deki reaktant miktarları belirlenmiştir. Her kopolimer sentezi için gerekli maddeler mikrodalga cihazının sentez t  plerine konulmuş ve t  plerden 15-20 dakika azot gazı ge irilmıştir. mPEG-*b*-PCL sentezleri 300 W ve 100  C'de, mPEG-*b*-PLL

sentezleri ise 400 W ve 120 °C’de gerçekleştirilmiştir. İlk ısıtma süreleri mPEG-*b*-PCL ve mPEG-*b*-PLL için sırasıyla 3 ve 5 dakika, sentez süreleri 30 dakika ve soğutma süreleri 10 dakika seçilmiştir [140].

Çizelge 3. 1 Kopolimer sentezlerinde kullanılan reaktant miktarları

	mPEG2000 (g)	mPEG5000 (g)	ε-kaprolakton (μl)	L-laktat (g)	SnOct ₂ (μl)
mPEG2000-PCL	2,000	-	443	-	24,8
mPEG5000-PCL	-	2,000	177	-	9,7
mPEG2000-PLL	2,000	-	-	0,576	24,8
mPEG5000-PLL	-	2,000	-	0,231	9,7

Polimerler kloroformda çözülüp dietil eterden çöktürülerek saflaştırılmışlardır. Bu şekilde dietil eterle yapılan çöktürme işlemi 3 kez tekrar edilerek diblok kopolimerlerin saf olarak eldesi sağlanmıştır. Daha sonra polimerler vakumlu etüvde 1 gece kurutulmuştur.

3.1.4 Diblok Kopolimerlere PEI Bağlanması

Bu amaçla öncelikle diblok kopolimerler 1,1’-karbonildiimidazol (CDI) ile aktive edilmiştir. Aktivasyon işlemi dioksan içerisinde ve 0,08 M CDI varlığında, 3-4 saat boyunca 37 °C’deki çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda ürün dietil eter ile çöktürülerek saf halde elde edilmiştir. İşlem yine 3 kez tekrarlanmıştır. CDI ile aktive edilmiş polimerler vakumlu etüvde 1 gece kurutulmuştur.

Aktivasyon işleminin ardından PEI ile bağlama aşamasına geçilmiştir. Kurumuş CDI-aktif kopolimerler tartılarak üzerlerine 0,3-0,4 g başına 10 ml olacak şekilde sodyum borat tamponu eklenmiştir. mPEG-*b*-PCL veya mPEG-*b*-PLL ile poli(etilen imin) (PEI) arasında 1:1 mol oranı sağlanacak biçimde PEI eklenmiştir. Bu çözeltiler, 300 rpm’de 24 saat boyunca karıştırılmış ve son olarak tüm çözeltiler ultrafiltrasyon ile filtre edilmiştir. Polimerlerin 2000 veya 5000 Da’luk mPEG içermesine göre, *cutoff* değerleri sırasıyla 3000 ve 5000 Da olan membranlar kullanılmıştır. Filtre işlemi sonrası örnekler petri kaplarına alınarak liyofilizatörde kurutulmuşlardır.

3.1.5 Polimer ve Polimer/ODN Çözeltilerinin Karakterizasyonu

3.1.5.1 Çözeltilerin Hazırlanması

Triblok kopolimerlerinin Zetasizer’da boyut ölçümleri için, 20 mM PBS içinde 5,0 mg/ml konsantrasyonunda çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler 2 saat karıştırılmışlardır ve ölçümlerden önce 0,2 µm’lik rejenere selüloz filtresinden geçirilmişlerdir.

Triblok kopolimerlerinin dansimetre ölçümleri için, 6’şar ml 9,0 mg/ml’lik polimer/PBS stok çözeltileri hazırlanmış, bu stok çözeltilerinden seyreltmeler yapılarak 7,0, 5,0, 3,5 ve 2,0 mg/ml’lik çözeltiler elde edilmiştir. Tüm çözeltiler, en az ½ saat karıştırılmışlardır.

Ayrıntıları genel bilgilerde verilen polimer/DNA kompleks çözeltilerinin hazırlanmasında 2,0 mg/ml’lik polimer/PBS stok çözeltileri ile 100 µM’lık ODN/PBS stok çözeltisi kullanılmıştır. N/P oranı 1, 6, 20, 60 ve 100 olan kompleks çözeltileri hazırlanmıştır. Burada N, polimerlerin içerdiği ve PEI’den gelen primer amin gruplarının mol sayısı, P ise ODN’nin içerdiği fosfat gruplarının mol sayısıdır. Polimerlerin taşıdığı primer amin grubu miktarları, Karagöz ve Dinçer tarafından daha önce TNBS yöntemiyle tespit edilmiştir [140]. Buna göre 2,0 mg/ml mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI, mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI, mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI ve mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI triblok kopolimer çözeltileri, sırasıyla 3,73, 2,67, 4,00 ve 4,00 mM primer amin grubu içermektedir. ODN ise 15 bazlık olduğundan, 100 µM’lık ODN stok çözeltisinde 1,5 mM fosfat grubu bulunmaktadır.

Zetasizer deneyleri için, ayrıntıları genel bilgiler kısmında belirtilen polimer/DNA kompleks çözeltileri, endorf tüpleri içinde ve toplam hacim 300 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Polimer ve ODN stok çözeltileri, 0,2 µm’lik rejenere selüloz filtresinden geçirilmiştir. 2,0 mg/ml’lik polimer/PBS çözeltilerinin üzerine, ilgili N/P oranını sağlayacak miktarda 100 µM’lık ODN/PBS çözeltisi eklenmiştir. Eklemeden sonra çözeltiler 1-2 s vortekslenmiş ve ½ saat bekletilmiştir. Daha sonra, ilgili N/P oranında varsa, 1/10 ve 1/100 seyreltmeleri yapılmıştır. Yine 1-2 s vortekslenmişler ve ½ saat bekletilmişlerdir. Hesaplamalar, (3.1) denklemine göre yapılmıştır:

$$\frac{N}{P} = \frac{M_N V_N}{M_P V_P} \quad (3.1)$$

Burada M_N , polimer stoğundaki primer amin gruplarının molaritesini; V_N , polimer stoğundan alınan hacmi; M_P , ODN stoğundaki fosfat gruplarının molaritesini ve V_P de ODN stoğundan alınan hacmi göstermektedir.

Dansimetre ve AUC deneyleri için, toplam hacim yaklaşık 2,0 ml olacak şekilde çözeltiler hazırlanmıştır.

3.1.5.2 Boyut Analizleri

Ölçümler, Malvern marka Zetasizer Nano ZS cihazında ve 25,0 °C’de gerçekleştirilmiştir. Polimer/DNA kompleks çözeltileri 50 µl’lik düşük hacimli kuvars küvetinde, polimer çözeltileri ise 750 µl hacimli beyaz renkli zeta küvetinde (*clear disposable zeta cell*) ölçülmüştür. Dispersantın viskozitesi 0,8872 cP, kırılma indisi (RI) 1,330 ve dielektrik sabiti 78,5 alınmıştır. Adım sayıları ve süreleri ile küvet konumlanması ve atenüasyon, otomatik ayarlanmıştır. Ölçümlerden önce dengelenme için 120 s beklenilmiştir. Boyut ölçümlerinde, aynı örneğin en az 3 tekrar ölçüm sonucunun ortalaması alınmıştır. Data analizi için, Malvern’in Zetasizer yazılımı (v6.34) kullanılmıştır.

Polimer/DNA kompleks çözeltilerinde stok çözeltiler hazırlandıktan sonra, diğer örneklerde ise hazırlanan çözeltiler ölçümden önce 0,2 µm’lik rejenere selüloz filtresinden geçirilmişlerdir. Ölçümlerden önce tüm çözeltiler 1-2 s ultrasonik banyoda tutulmuşlardır.

3.1.5.3 Analitik Ultrasantrifüj Deneyleri

Analitik Ultrasantrifüj deneylerinden önce, Ek D’de anlatıldığı şekilde moleküllerin kısmi spesifik hacim değerleri bulunmuştur. Bunun için Anton Paar marka DMA 5000 model dansimetre cihazı ile moleküllerin yoğunlukları ölçülmüştür. Dansimetre ölçümleri için, 6’şar ml 9,0 mg/ml’lik polimer/PBS stok çözeltileri hazırlanmış, bu stok çözeltilerinden seyreltmeler yapılarak 7,0, 5,0, 3,5 ve 2,0 mg/ml’lik çözeltiler elde edilmiştir. Tüm çözeltiler ölçümden önce 1-2 s vortekslenmiştir. Ölçümler 20,0 °C’de gerçekleştirilmiş

olup her örnek 10'ar kez ölçölüp yoğunluk sonuçlarının ortalaması alınmıştır. Ortalama yoğunluk değerlerinden (D.1) denklemi kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır.

Sedimentasyon ölçümlerinde, Beckman Coulter marka ProteomeLab XL-I model analitik ultrasantrifüj cihazı kullanılmıştır. Tüm ölçümler, 20,0 °C'de ve An-50 Ti rotorunda, safir camları ve standart çift sektörlü 12 mm Epon kömür-dolgulu orta parçası (*centerpiece*) içeren küvetlerde gerçekleştirilmiştir. Rotorun 8. deliğinde, küvetlerin konumlarının tespitinde kullanılan denge-yükü (*counterbalance*) bulunmaktadır. Buna göre aynı anda mevcut 3 küvet ile 3 örneğin analizi yapılmıştır. Küvetler, her ölçüm sonrasında sökülerek tüm parçalar tek tek yıkanmıştır.

Polimer ve polimer/ODN çözeltilerinin sedimentasyon denge deneyleri 20,0 °C'de ve 16.000 rpm'de gerçekleştirilmiştir. Tüm ölçümlerde girişim detektörü kullanılmıştır. Ayrıca ODN içeren örneklerde absorbands detektörü de (260 nm) kullanılmıştır. Taramalar 1'er saat ara ile yapılmıştır. Veri analizleri yine Beckman'ın yazılımıyla ve "kendiliğinden toparlanma modeli" metodu ile yapılmıştır. Sedimentasyon hız deneyleri ise 20,0 °C'de ve 42.000 rpm'de gerçekleştirilmiştir. Taramalar 10-20 dakikada bir alınmıştır. Veriler, Beckman'ın yazılımıyla ve "sedimentasyon zamana göre türev" metodu kullanılarak analiz edilmiştir. Ayrıca en son olarak 3.000 rpm'de denge analizleri yapılmıştır.

3.2 Moleküllerin Modellenmesi

Tez çalışmasında kullanılan polimer ve ODN molekülleri arasında oluşan kompleks yapılarının modellenmesinde atomistik moleküler dinamik yaklaşımı kullanılmıştır. Bu yaklaşımla, hem polimerler hem de ODN tek tek atom seviyesinde oluşturulmuş ve etkileşimler atom seviyesinde hesaplanmıştır.

3.2.1 Geometrik Optimizasyonlar ve Kısmi Yüklerin Hesaplanması

Polimerlerin geometrik optimizasyonları ve kısmi yüklerinin bulunması işlemlerinde GAMESS programı kullanılmıştır. Bunun için öncelikle polimerler Avogadro programıyla çizilmiş ve GAMESS girdi dosyaları oluşturulmuştur. Polimerlerin yapıları Şekil 2.10 ve Şekil 2.11'de verilmişti. Bu şekillerde "a" değeri, 2000 Da'luk mPEG için yaklaşık 45,

5000 Da'luk mPEG içinse yaklaşık 113'tür. Şekillerdeki "b" ve "d" değerleri 4'e eşittir. 2000 Da'luk PEI için "c" değeri de yaklaşık 4'tür. mPEG için a=11 alınarak oluşturulan molekülün geometrik optimizasyonu yapılmış ve atomlarının kısmi yükleri bulunmuştur. Diğer polimerik kısımlar için b=d=4 ve c=1 alınarak oluşturulan moleküllerin yine geometrik optimizasyonları yapılmış ve atomların kısmi yükleri bulunmuştur. PCL-PEI ve PLL-PEI arasında kalan COOH-NH grubu, PCL veya PLL'ye bağlı olarak hesaplar yapılmıştır. PEI monomerinde (Şekil 2.10'da "c" ile gösterilen kısım) 4 adet primer amin grubu bulunmaktadır. Deneyisel olarak TNBS yöntemiyle primer amin gruplarının yarısının yüklendiği bulunduğundan, modelleme çalışmalarında da monomerde bulunan 4 primer amin grubundan 2 tanesine H⁺ atomları eklenerek protonlanmış amin grupları elde edilmiştir. Ayrıca monomerlere gerekli şekilde H₃CO veya NH₂ başlıkları eklenmiş, optimizasyon ve kısmi yüklerin hesabı başlıklar varken yapılmıştır ve sonra başlıklar uygun şekilde çıkartılarak mPEG-*b*-PCL-*b*-PEI ve mPEG-*b*-PLL-*b*-PEI triblok kopolimerlerin yapıtaşları oluşturulmuştur. Daha sonra MD çalışması için triblok kopolimerler oluşturulurken, 2000 Da'luk mPEG için a=11 alınarak oluşturulmuş mPEG'den 4 tanesi, 5000 Da'luk mPEG içinse 10 tanesi birbirine bağlanmıştır. Ayrıca PCL veya PLL ile 4 tane PEI monomeri mPEG'lere bağlanarak triblok kopolimerler elde edilmiştir.

Önceki paragrafta anlatıldığı şekilde polimerlerin gerekli yapıtaşları Avogadro'da oluşturulduktan sonra, tüm polimerler için önce sınırlandırılmış açık-kabuk Hartree-Fock (ROHF) yöntemi ve 6-31G* baz seti kullanılarak geometrik optimizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen minimum enerjili konfigürasyonlar için elektrostatik potansiyel hesabı ile atomların kısmi yükleri bulunmuştur. Tüm hesaplamalar su ortamı içinde yapılmıştır. Tüm hesaplamalarda mPEG, PCL ve PLL kısımlarının net yükü 0, PEI monomerinin net yükü ise +2 olarak alınmıştır.

3.2.2 Moleküler Dinamik Simülasyonları

Tüm atomistik MD simülasyonları ve analizleri, Amber 11 ve Amber Tools 15 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kuvvet alanı olarak ff99bsc0 seçilmiştir. Tek zincirli 15 bazlık *c-myc* ODN molekülü (5'-AACGTTGAGGGGCAT-3'), önce baz dizisi üzerinden Amber'in NAB modülünde kanonik B-formunda ve çift zincirli DNA olarak oluşturulmuş,

daha sonra komplementer zincir silinerek tek zincirli ODN elde edilmiştir. ODN molekülü, fosfat gruplarından gelen -14 birimlik net yüke sahiptir. Polimerler, xleap modülünde çizilmiş ve kısmi yüklerine GAMESS programında bulunan değerler yazılmıştır. Triblok kopolimerlerde +2'şer net yüke sahip 4 adet PEI monomeri ile nötr PCL veya PLL ve mPEG kısımları bulunmaktadır. Buna göre tam polimerlerin net yükü +8 birim olmaktadır.

Bir triblok kopolimeri ve bir ODN molekülü, xleap modülünde aralarında belli bir uzaklık kalacak şekilde yan yana konularak polimer/ODN sistemleri oluşturulmuştur. Tüm sistemler, uçları kesilmiş oktahedral periyodik kutular içinde ve TIP3P tipi belirgin olarak su molekülleri ile çözündürülmüştür. Polimer/ODN sistemlerinin toplam yüklerinin sıfır olması için, her sisteme 14 adet Na^+ ve 8 adet Cl^- iyonu eklenmiştir. Kutunun tüm kenarları, moleküllerden en az 12.0 Å uzakta olacak şekilde ayarlanmıştır. Uzun erimli elektrostatik etkileşimlerin hesaplamalarında, 10.0 Å kesme değeri altında parçacık örgülü Ewald (PME) yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca hidrojen içeren bağlar için SHAKE algoritmasından faydalanılmış ve böylece adım süresi 2 fs seçilebilmiştir.

Simülasyonlar 4 aşamadan oluşmuştur: minimizasyon, ısıtma, dengelenme ve üretim simülasyonları. Tüm sistemlerde önce, H dışındaki tüm atomlara 1,0 kcal/molxÅ²'lik uygulanan harmonik kısıtlama altında 200 adımlık minimizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından tüm sistemler kanonik topluluk olarak (NVT) 70 ps'de 0 K'den 300 K'e gelecek şekilde ısıtılmıştır. Isıtma sürecinde yine H dışındaki tüm atomlara 1,0 kcal/molxÅ²'lik harmonik kısıtlama uygulanmıştır. Isıtmadan sonra 100 ps dengelenme süresi beklenilmiştir. Dengelenme süreci, eşsılı-eşbasıncılı topluluk (NPT) olarak, 300 K'de ve 1,0 atm basınç olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Dengelenme sırasında 1,0 kcal/molxÅ²'lik harmonik kısıtlama kademeli olarak azaltılarak sıfırlanmıştır. En son aşamada 300 K'de ve 1,0 atm basınçta toplam 50 ns'lik üretim simülasyonları yapılmıştır. Tüm simülasyonlarda basınç ayarlaması için durulma süresi 1,0 ps alınmış, sıcaklık ayarlamaları içinse çarpışma frekansı 1,0 ps⁻¹ olmak üzere Langevin termostadı kullanılmıştır. Isıtma ve dengelenme süreçlerinde adım süreleri 1 fs, üretim simülasyonlarında ise SHAKE algoritmasıyla beraber 2 fs alınmıştır. Veriler, ısıtma ve dengelenme süreçlerinde 200 veya 400 adımda bir, üretim simülasyonlarında ise 5000 adımda bir kaydedilmiştir.

Simülasyonlara ait anlık görüntülerin eldesinde ve videoların oluşturulmasında VMD programı kullanılmıştır. Sıcaklık, enerji, basınç, hacim, yoğunluk, RMSD, moleküller arası uzaklıklar, DNA'nın fosfor atomları etrafındaki Na⁺ ve protonlanmış amin azot atomlarının sayıları, radyal dağılım fonksiyonları (RDF) ve jirasyon yarıçapları grafiklerinin çizimi ile kompleks oluşumlarının bağlanma enerji hesaplamaları, Amber içinde çeşitli ptraj komut dosyaları ile gerçekleştirilmiştir.

Bağlanma enerjisi; polikasyon, DNA ve kompleks moleküllerinin ayrı ayrı ΔG serbest Gibbs enerjileri hesaplandıktan sonra Denklem (3.2) ile bulunmuştur:

$$\Delta G_{bağlanma} = \Delta G_{kompleks} - (\Delta G_{polikasyon} - \Delta G_{DNA}) \quad (3.2)$$

ΔG 'ler, genel olarak vakum ve çözünme olmak üzere iki terimden oluşmaktadır:

$$\Delta G = \Delta G_{vakum} + \Delta G_{çözünme} \quad (3.3)$$

$$\Delta G_{vakum} = \Delta E_{MM} = \Delta E_{iç} + \Delta E_{elektrostatik} + \Delta E_{VDW} \quad (3.4)$$

$$\Delta E_{iç} = \Delta E_{bağ} + \Delta E_{açıl} + \Delta E_{dihedral} \quad (3.5)$$

$$\Delta G_{çözünme} = \Delta G_{elektrostatik} + \Delta G_{hidrofobik} \quad (3.6)$$

Denklem (3.4)'te "MM" indisi moleküler mekaniği göstermektedir. Denklem (3.4)'te "VDW" indisi van der Waals'i göstermektedir. Tüm vakum enerjileri Amber'in sander modülünde hesaplanmıştır. Çözünmeye ait Gibbs serbest enerji değişimlerinin elektrostatik katkısı Poisson-Boltzmann (PB) denklemleri ile, hidrofobik katkı ise LCPO yöntemiyle ve kavite hesabı yapılarak bulunmuştur. Ayrıca bağlanma enerjilerinin hesaplamaları, tek yörünge yaklaşımı ile gerçekleştirilmiş olup bunun için polimer, ODN ve polimer/ODN sistemlerine ait girdi dosyaları xleap modülünde ve aynı PBRadii değeri kullanılarak tek seferde oluşturulmuştur.

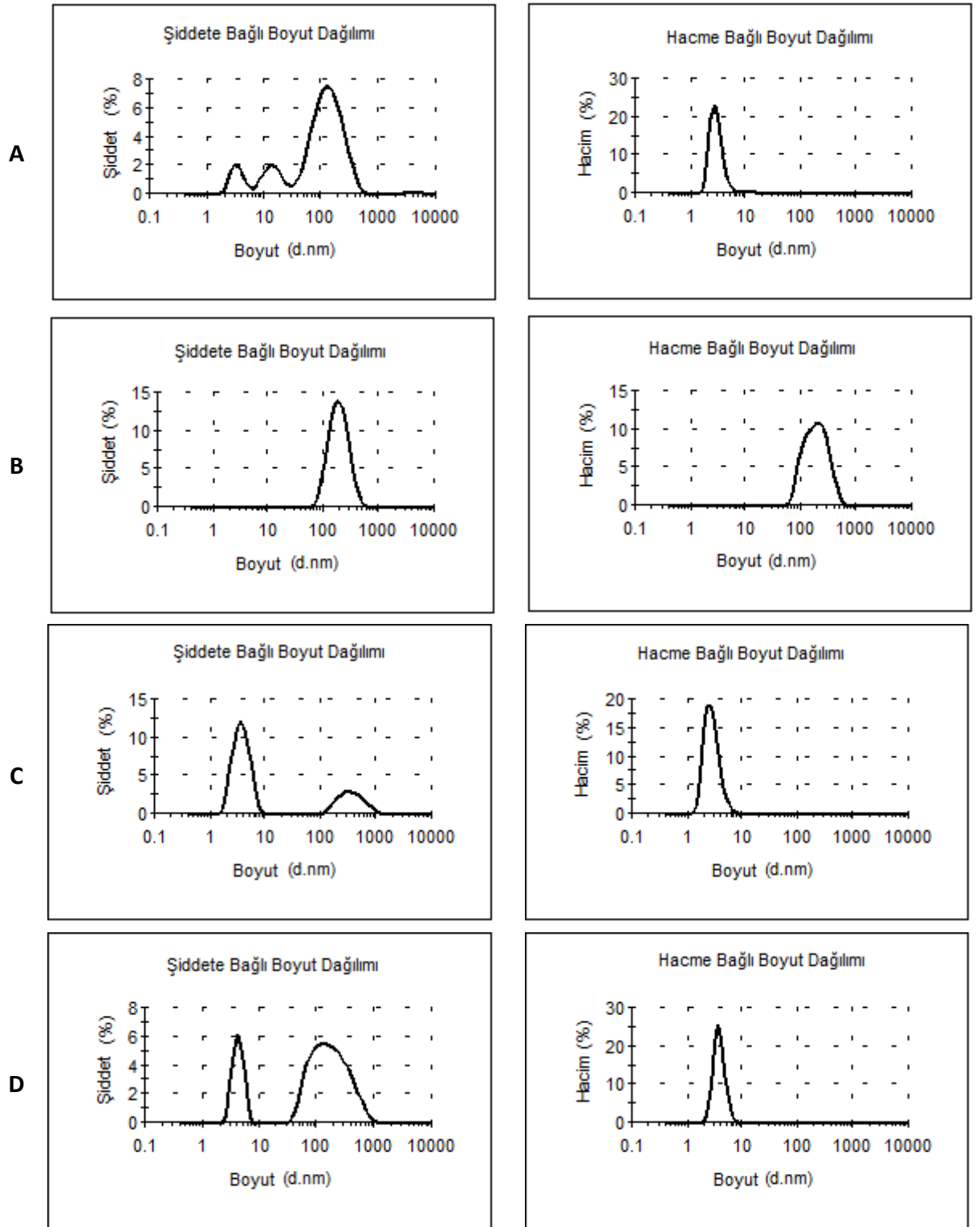
BÖLÜM 4

BULGULAR

Tez çalışması; Zetasizer cihazında boyut ölçümleri, analitik ultrasantrifüj (AUC) cihazında molekül ağırlığı ölçümleri ve Amber programında etkileşimlerin incelenmesi gibi üç aşamadan oluşmaktadır. Boyut ölçümleri dinamik ışık saçılması, molekül ağırlığı ölçümleri sedimantasyon dengesi ve etkileşimlerin incelenmesi moleküler dinamik (MD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm ölçümlerde öncelikle tek başına polimerlere bakılmış, ardından polimer/DNA komplekslerine geçilmiştir.

4.1 Triblok Kopolimerlerin Boyut Analizleri

Polimer/ODN komplekslerinin incelenmesinden önce, 20 mM PBS (pH 7,0) içinde hazırlanan triblok kopolimer çözeltilerinin boyut analizleri yapılmıştır. Şekil 4.1’de, şiddete ve hacme bağlı boyut dağılımları verilmiştir. Şiddete bağlı sonuçlardaki piklerin, hacme bağlı dağılımlarla karşılaştırılması gerekir, zira çözelti içinde büyük moleküller varsa, bunlardan sayıca çok az bile olsa şiddet dağılımları çok etkilenir. Nitekim mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI hariç (Şekil 4.1-B), diğer kopolimerlerin şiddet dağılımlarında görülen >100 nm pikleri hacim dağılımlarında çıkmamıştır. Bunun anlamı, bu pik değerlerini veren moleküllerden ortamda çok az olmasıdır, dolayısıyla ihmal edilebilirler.



Şekil 4. 1 Triblok kopolimerlerin şiddete ve hacme bağlı boyut dağılımları: mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI (A), mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI (B), mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI (C), mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI (D)

Çizelge 4.1'e göre mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI kopolimerinin şiddet dağılımında, çap değerleri yaklaşık 3,6, 14,7 ve 149 nm olan üç pik çıkmıştır. Hacim dağılımındaysa bunlardan sadece ilk ikisi görülmektedir. DLS yönteminde şiddete bağlı dağılımlar doğrudan ölçülüp hacme bağlı dağılımlar sonradan hesaplandığından, çap değerleri şiddet piklerinde gerçeğe daha yakındır. Ancak piki oluşturan moleküllerin ortamdaki yüzdeleri ise hacim pikleri için daha doğrudur çünkü şiddet piklerinin yüzdeleri büyük moleküllerden çok etkilenmektedir. Dolayısıyla çap değerlerini şiddet piklerinden, yüzdeleri ise hacim piklerinin alanlarından kullanmak daha doğru bir yaklaşım olmaktadır. Buna göre mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI kopolimerinin yaklaşık 3,6 ve 14,7 nm'lik piklerini oluşturan moleküller, çözeltideki toplam molekül kütlesinin sırasıyla % 97,7 ve % 2,3'ünü oluşturmaktadır. Burada 3,6 nm'lik moleküller kopolimerin tek başına boyut değeri olurken, 14,7 nm'lik moleküller ise bu kopolimerlerin birleşmesiyle oluşmuş agregat ya da misel yapılar olabilir.

Çizelge 4. 1 Triblok kopolimerlerin boyut sonuçları: mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI (A), mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI (B), mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI (C), mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI (D)

	Şiddet						Hacim			
	Pik 1 (nm)	Alan 1 (%)	Pik 2 (nm)	Alan 2 (%)	Pik 3 (nm)	Alan 3 (%)	Pik 1 (nm)	Alan 1 (%)	Pik 2 (nm)	Alan 2 (%)
A	3,628	9,70	14,73	12,8	149,4	76,8	3,019	97,7	11,20	2,30
B	202,4	100	-	-	-	-	205,0	100	-	-
C	3,863	73,5	385,7	26,5	-	-	2,882	100	-	-
D	4,352	24,0	207,4	76,0	-	-	3,857	100	-	-

mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI kopolimeri, hem şiddet hem de hacim dağılımlarında tek pik vermiştir. Çizelge 4.1'e göre şiddet piki yaklaşık 202 nm'dir. Zetasizer sonucuna göre bu kopolimer çözelti içinde misel yapı oluşturmuş olmalıdır.

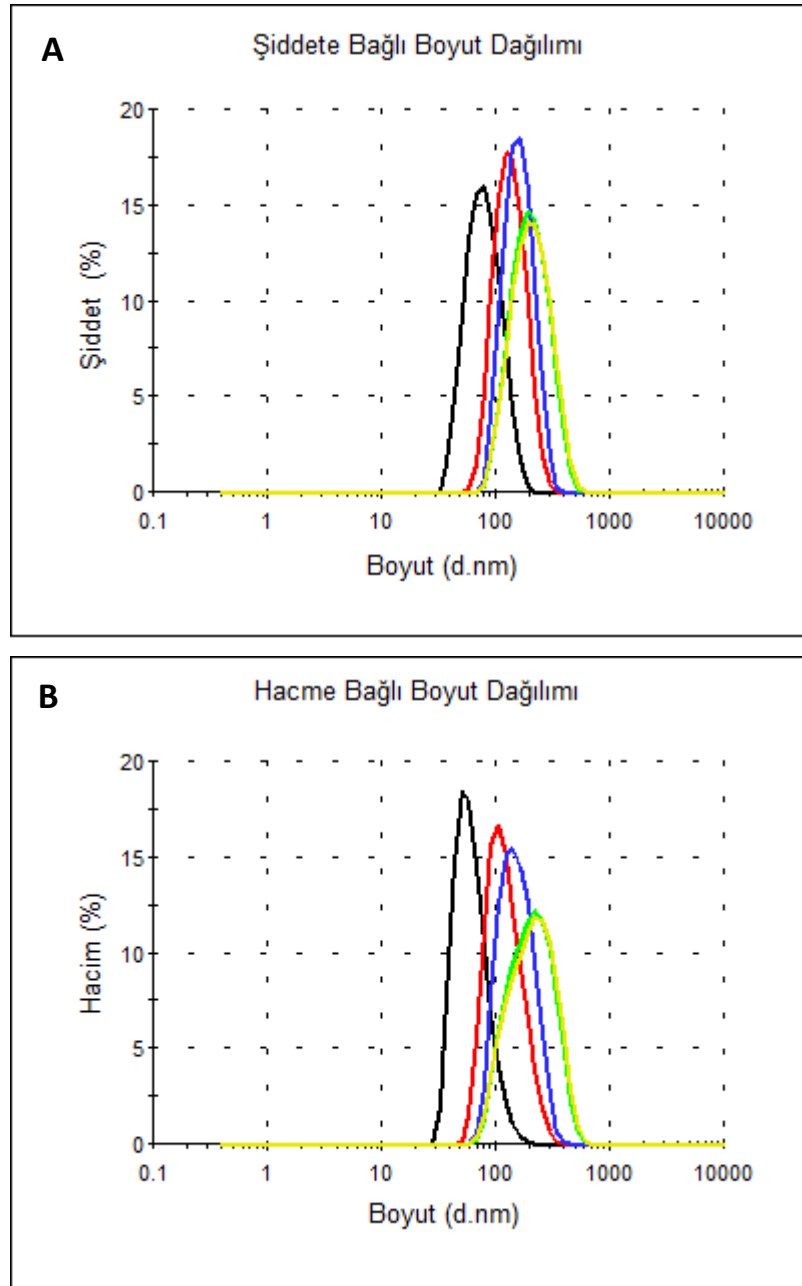
mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI ve mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI kopolimerlerinin şiddet dağılımlarında çıkan ikinci pikler hacim dağılımlarında yoktur. Buna göre bu kopolimerler çözelti içinde monomer halde bulunmaktadır. Şiddet piklerinin çap değerleri de sırasıyla yaklaşık 3,9 ve 4,4 nm'dir.

4.2 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN Komplekslerinin Boyut Analizleri

2,0 mg/ml mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/PBS polimer stok çözeltisi ile 100 µM'lık ODN/PBS stok çözeltisi kullanılarak hazırlanan farklı N/P oranlarındaki kompleks çözeltilerinin boyut analizleri yapılmıştır.

4.2.1 Farklı N/P Oranlarındaki Boyut Ölçümleri

Şekil 4.2'de farklı N/P oranlarına ait boyut dağılımları görülmektedir. N/P=1 oranı, seyreltme olmadan gerekli ODN miktarı çok fazla olup sağlanamadığından, diğer oranlara göre 1/10 seyreltik çözeltide ölçülmüştür. Tüm oranlarda çok düzgün tek bir pik çıkmıştır. Ayrıca N/P oranı arttıkça hem şiddet hem de hacim pikleri sağa kaymış, yani boyut büyümüştür.



Şekil 4. 2 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN'ye ait şiddet (A) ve hacim (B) boyut dağılımları:
N/P=1 (—), 6 (—), 20 (—), 60 (—) ve 100 (—)

Çizelge 4.2'ye göre, şiddet çapları oran arttıkça düzenli şekilde artmıştır, öyle ki en küçük oran olan N/P=1'de boyut 82 nm iken N/P=100'de 217 nm'ye çıkmıştır. Tüm örnekler tek pik vermiştir. Polidispersite indisi (Pdl) değerleri 0,2 veya daha düşüktür. Kümülant analizi ile hesaplanan Pdl değerleri 0-1 arasında olup, 0'a yakınlık monodispersliği, 1'e yakınlık ise polidispersliği ifade etmektedir. Pdl'nın 0,2 olması, örneklerin monodispers olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlara göre tüm oranlarda monodispers yapıda kompleksler oluştuğu net şekilde anlaşılmaktadır.

Çizelge 4. 2 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN'ye ait boyut sonuçları

N/P	Z-Ortalama (nm)	Pdl	DCR (kcps)	Şiddet		Hacim	
				Pik 1 (nm)	Alan 1 (%)	Pik 1 (nm)	Alan 1 (%)
1	74,09	0,108	3013	82,44	100	63,4	100
6	126,7	0,079	60862	138,4	100	124,1	100
20	151,6	0,062	30477	163,9	100	157,5	100
60	179,9	0,155	24007	211,8	100	219,9	100
100	174,8	0,202	14758	217,0	100	226,4	100

Toplam ışık saçılma miktarları (DCR), N/P oranı arttıkça azalmıştır. Oran 1'in kendisi değil 1/10 seyreltik hali bakıldığından, Çizelge 4.2'deki oran 1'in küçük DCR vermiş olması normaldir. Ancak oran 6 ve sonrası için N/P oranı arttıkça DCR değerlerinin düzgün şekilde azaldığı açıkça görülmektedir. Bu durum ilgi çekicidir zira N/P oranı arttıkça boyut artıyor olmasına rağmen, DCR değerleri azalmıştır. İlk bakışta büyük boyutta daha çok saçılma olması beklendiğinden, bu durumun açıklanabilmesi ise ışık saçılmasının doğasını göz önüne almak gerekmektedir. Işık saçılması, genel olarak şu üç şeye bağlıdır:

- (1) Parçacıkların saçılma hacmi içindeki sayılarına (yani sayıca konsantrasyona)
- (2) Parçacıkların molekül ağırlıklarına (ya da boyutlarına)
- (3) Parçacıkların şekline

Sondan başa gidecek olursak, oluşan komplekslerin şeklini tam olarak bilmek mümkün olmasa da, binlerce molekülün elektrostatik etkileşimle bir araya gelmesinden ötürü, şeklin küreye yakın olması beklenmektedir. Ayrıca tüm oranlarda binlerce molekül bir araya geldiğinden dolayı, en azından her orandaki kompleks şekli yaklaşık benzer olmalıdır. Eğer bir oranda 1 ODN'ye 10 polimer bağlanıyor ve diğer bir oranda ise 100 ODN'ye 100 polimer bağlanıyor olsaydı, o zaman şekilde dramatik bir değişim olması gerekirdi ancak her oranda binlercesi var olduğundan bu söylenemez. Dolayısıyla oranlar değişse de şekillerin aynı kaldığını varsaymak uygun olmaktadır.

Parçacıkların boyut durumu için, normalde artan boyutla beraber DCR'lerin de artması beklenir. Ancak deneylerde tam tersi çıktığından, bunu sağlayacak başka bir faktör olmalıdır.

Deneylerde görülen durumu 2. ve 3. şıkların açıklayamadığı anlaşılmaktadır. Buna göre geriye tek olasılık olarak 1. şık kalmaktadır. 1. şıkka göre DCR'lerin azalması için parçacık sayısının azalması gerekmektedir. Çözeltilerde çökme olmadığından bu durum ancak şöyle gerçekleşmiş olabilir: Başlangıçta belli sayıda polimer ve ODN molekülü vardır. Kompleks oluşunca boyut çok artmakta ve bu boyutlardaki kompleks molekülleri de çok daha büyük saçılmalar yapmaktadır. Ancak ışık saçılması yapacak molekül sayısı çok azalmaktadır. Böylelikle yeni oluşan büyük moleküller tek tek daha çok saçılma yapsalar da, toplam molekül sayısı çok azaldığından, toplam ışık saçılması miktarı azalmaktadır. Yani sayıca toplam parçacık konsantrasyonu, DCR'leri azaltacak kadar düşmektedir. Sonraki kısımda Çizelge 4.3'de verilen kompleks sayılarına ve DCR'ye bağlı oranlamalar, bu açıklamayı desteklemektedir.

4.2.2 Bağlanan Molekül Sayıları

Boyut sonuçları kullanılarak, polimer/ODN kompleks yapısını oluşturan yani bağlanan molekül sayıları hesaplanmıştır. Hesaplamalarda yapılan varsayımlar ve kullanılan denklemler Ek E'de açıklanmıştır. Ayrıca mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI kopolimeri için boyut değeri 3,6 nm alınmıştır. Hesaplamaların sonuçları Çizelge 4.3'de özet olarak verilmiştir.

Çizelge 4. 3 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN için hesaplanan kompleks başına polimer molekülü sayısı (p), kompleks başına ODN molekülü sayısı (q), kompleks molekül ağırlığı (M), çözeltideki toplam kompleks molekülü sayısı (x), x için oranlama (r_x) ve DCR için oranlama (r_{DCR})

N/P	p ($\times 10^4$)	q ($\times 10^3$)	M ($\times 10^7$ Da)	x ($\times 10^{11}$)	r_x	r_{DCR}
1	1,02	5,42	6,86	22,2	8,6	-
6	5,52	4,88	25,8	10,2	4,0	4,1
20	9,35	2,48	41,0	5,44	2,1	2,1
60	20,3	1,79	87,3	2,79	1,1	1,6
100	21,9	1,16	93,6	2,59	1,0	1,0

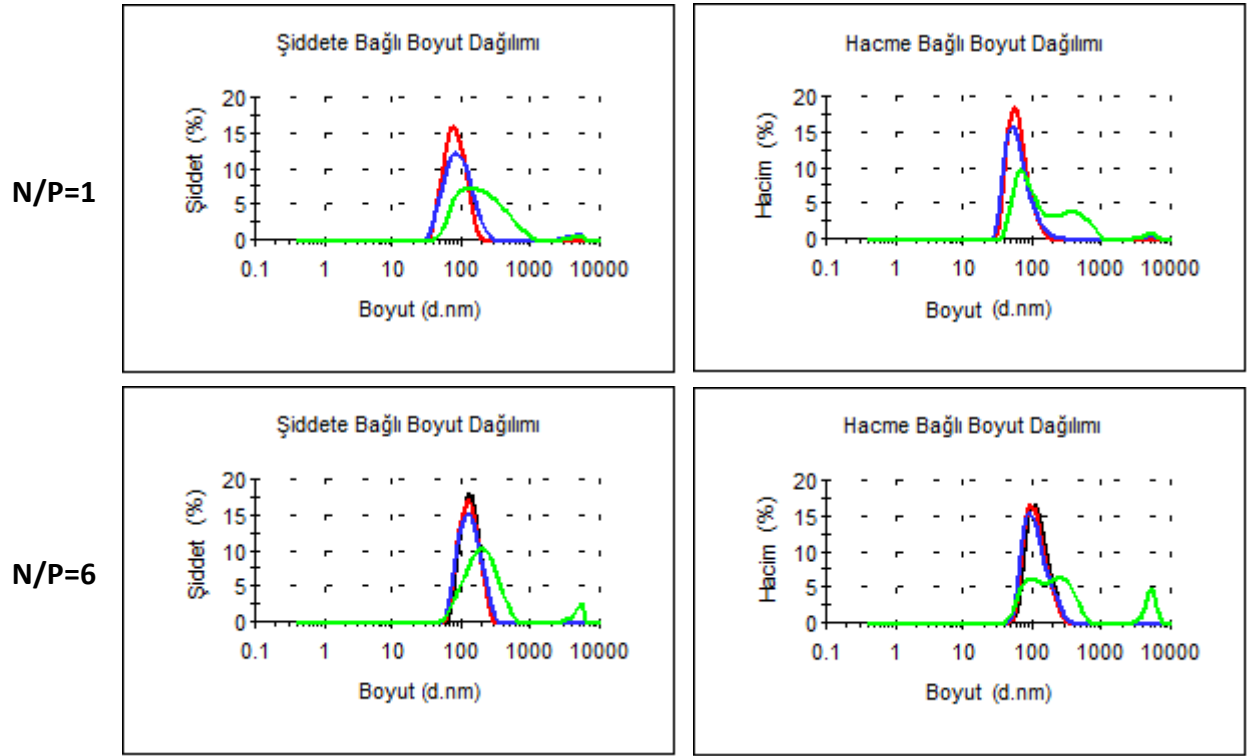
Hesaplamalara göre kompleks başına ODN sayıları binlerce çıkmıştır. Polimer sayıları ise on binleri aşmaktadır. Molekül ağırlıkları da 10^7 - 10^8 Da mertebelerindedir. Bu sonuçlar, çok sayıda polimer ve ODN'nin birleşerek çok büyük kompleks yapıları oluşturduğunu göstermektedir.

Çizelgede ayrıca toplam molekül sayısı ve DCR için sırasıyla r_x ve r_{DCR} oranlamaları verilmiştir. Oranlamalar; r_x için, tüm x değerleri en küçük x değeri olan $2,59 \times 10^{11}$ 'e ve r_{DCR} için, Çizelge 4.2'deki tüm DCR değerleri en küçük DCR değeri olan 14758'e bölünerek bulunmuştur. r_{DCR} hesabında N/P=1 oranı kullanılmamıştır. Molekül sayıları ve DCR değerleri doğrudan birbiriyle kıyaslanamamaktadır ancak elde edilen oranlamalarla dolaylı şekilde bir kıyas yapabilmek mümkün olmaktadır. Önceki kısımda, N/P oranı artarken boyutun arttığı ancak buna karşılık beklenmedik şekilde DCR'lerin azaldığı görülmüştü ve bu durum, çözeltideki toplam parçacık sayısının azalmasıyla açıklanmıştı. Bu açıklamaya uygun olarak Çizelge 4.3'deki toplam molekül sayısı x'in oran arttıkça azaldığı görülmektedir. Yine x değerlerinden hesaplanan r_x oranlamaları da artan N/P oranıyla azalmaktadır. Ayrıca r_{DCR} oranlamaları, DCR'lerin azalmasına paralel olarak, artan N/P oranıyla azalmaktadır. Bundan başka her N/P oranı için r_x ve r_{DCR} değerleri birbirlerine çok yakın çıkmıştır. Tüm bu sonuçlar, önceki kısımda yapılan açıklamayı desteklemektedir.

4.2.3 Komplekslere Seyrelmenin Etkisi

AUC'de N/P oranları 1 ve 6 için seyreltik çözeltilerin de ölçümleri alındığından, seyrelmenin polimer-ODN etkileşimleri üzerine etkisi ayrıca incelenmiştir.

Şekil 4.3'de 1/10, 1/100 ve 1/1000 seyreltmelerin şiddet ve hacim boyut dağılımları verilmiştir. Görüldüğü üzere, 1/1000 seyreltmeye kadar boyut sonucu değişmemiştir. 1/1000 seyreltmede ise pikler kaymaya başlamış olup bu da 1/1000 seyreltmenin artık güvenilir sonuç vermeyecek kadar düşük bir konsantrasyon olduğunu göstermektedir. Ayrıca kompleks molekülleri büyük olduğundan, 1/100 seyreltmede bile düzgün ölçüm almaya yetecek miktarda ışık saçılması yapılmıştır. Bu sonuçlara göre 1/10 ve 1/100 seyreltme ile kompleks yapısında bir değişim oluşmamaktadır. AUC deneylerinde bu iki seyreltmenin yapılmasında sakınca yoktur.



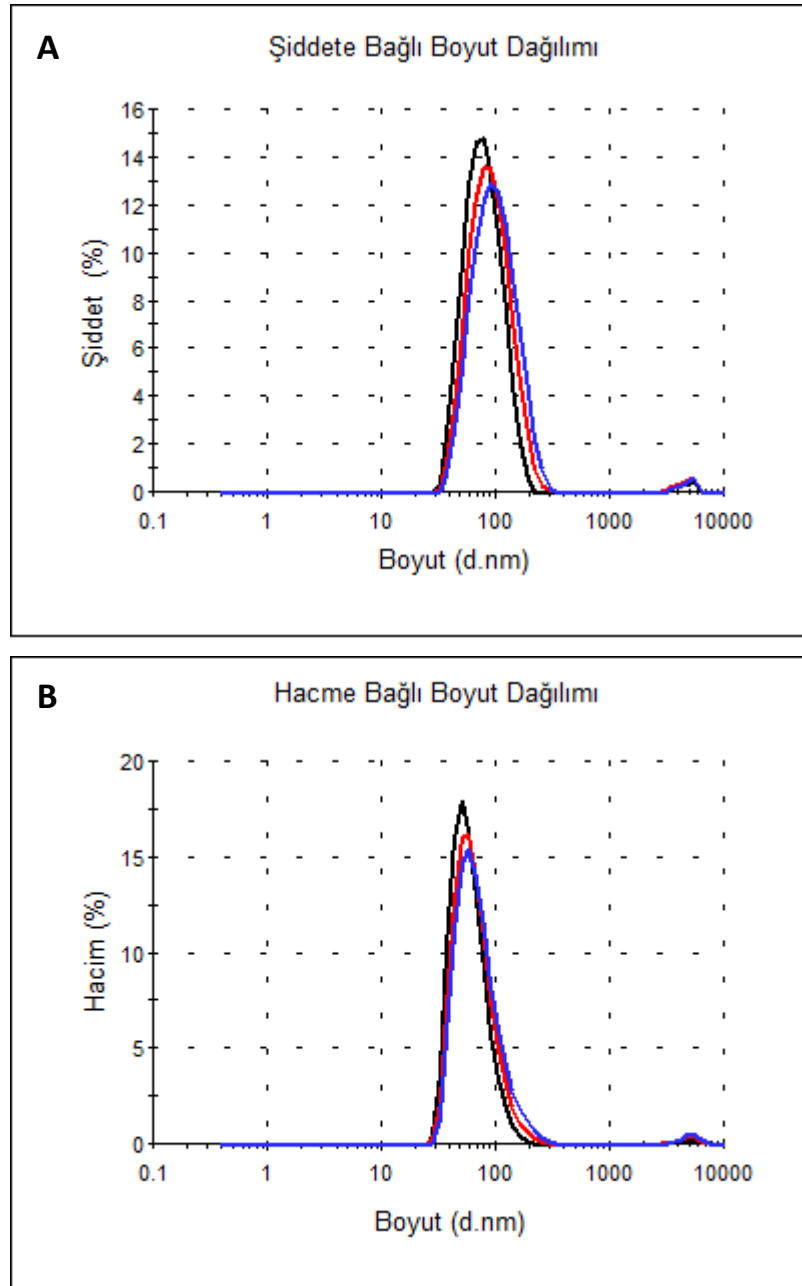
Şekil 4. 3 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN'ye ait N/P=1 ve 6 için şiddet ve hacim dağılımları: seyreltme yok (–), 1/10 seyreltme (–), 1/100 seyreltme (–), 1/1000 seyreltme (–)

4.3 mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN Komplekslerinin Boyut Analizleri

2,0 mg/ml mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI/PBS polimer stok çözeltisi ile 100 μ M'lık ODN/PBS stok çözeltisi kullanılarak hazırlanan farklı N/P oranlarındaki kompleks çözeltilerinin boyut analizleri yapılmıştır.

4.3.1 Farklı N/P Oranlarındaki Boyut Ölçümleri

Şekil 4.4'de farklı N/P oranlarına ait boyut dağılımları görülmektedir. Genel olarak tüm oranlarda 100 nm civarında dar bir pik ile mikrometre mertebesinde ikinci bir pik çıkmıştır. Tüm oranlarda kompleks oluştuğu çok net görülmektedir.



Şekil 4. 4 mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN'ye ait şiddet (A) ve hacim (B) dağılımları:
N/P=20 (—), 60 (—), 100 (—)

Çizelge 4.4'e göre, N/P oranı 20, 60 ve 100 için şiddet pikleri sırasıyla 82,2, 94,6 ve 105 nm çıkmıştır. Buna göre artan oranla beraber boyut değerleri de artmıştır. Ayrıca şiddet dağılımlarında 4,5-5,0 μ m arasında ikinci pikler çıkmıştır. Hacim dağılımlarındaki alanlara göre bu pikler çözeltideki toplam kütleinin % 2'sinden azını oluşturmaktadır. Bu moleküllerin boyutları çok büyüktür. Bu ölçümlerin alındığı kuvvetlerde başka ölçümler de alınmış ve böyle büyük pikler çıkmamıştır. Dolayısıyla piklerin kaynağı parmak izi gibi

küvetten kaynaklanan bir problem olmayıp pikler gerçektir. Bunlar komplekslerin bir araya gelerek oluşturdukları devasa agregatlar olabilir.

Çizelge 4. 4 mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN'ye ait boyut sonuçları

N/P	Z-Ortalama (nm)	Pdl	DCR (kcps)	Şiddet				Hacim			
				Pik 1 (nm)	Alan 1 (%)	Pik 2 (nm)	Alan 2 (%)	Pik 1 (nm)	Alan 1 (%)	Pik 2 (nm)	Alan 2 (%)
20	74,33	0,156	5922	82,20	98,9	4685	1,1	60,98	99,3	4919	0,7
60	83,32	0,190	2998	94,61	98,2	4585	1,8	68,09	98,5	4849	1,5
100	90,12	0,204	2176	105,0	98,5	4819	1,5	74,19	98,4	5018	1,6

mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI kopolimerinin tek başına çözeltisine bakıldığında şiddet piki 202 nm bulunmuştu. Bu polimerin ODN ile oluşturduğu komplekslerin boyutları ise yarı yarıya düşük çıkmıştır. Buna göre bu polimerin çözeltisine ODN eklendiğinde, 202 nm'lik muhtemel misel yapılarında değişim olmakta ve polimer molekülleri ODN ile etkileşerek yeniden düzenlenmektedir. Bu düzenlenme sonucunda, polimer ve ODN moleküllerinin büyük kısmı 82,2-105 nm arasında değişen çaplarda kompleksler oluşturmakta, ayrıca toplam madde miktarının % 0,7-1,6 kadarını oluşturan ve komplekslerle denge kuracak şekilde 4,5-5,0 µm'lik devasa agregatlar oluşmaktadır.

Pdl değerleri 0,1-0,2 arasında olup örnekler monodispers bir dağılım göstermektedir. DCR değerleri de oran arttıkça azalmıştır. Oran artarken boyut bir miktar arttığından, DCR değerlerindeki azalış çözeltideki toplam molekül sayısının azalmasından kaynaklanmış olmalıdır.

4.3.2 Bağlanan Molekül Sayıları

Bağlanan molekül sayıları, Ek E'de açıklandığı gibi hesaplanmıştır. Bu polimere ait monomer boyut değeri ölçülememiştir ancak molekül ağırlığı ve mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI'nin boyut değeri göz önüne alınarak monomer çapının yaklaşık 4,3 nm olduğu varsayılmıştır. Ayrıca 4,5-5,0 µm'lik moleküller ihmal edilmiştir. Hesaplamaların sonuçları Çizelge 4.5'de özet olarak verilmiştir.

Çizelge 4. 5 mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN için hesaplanan kompleks başına polimer molekülü sayısı (p), kompleks başına ODN molekülü sayısı (q), kompleks molekül ağırlığı (M), çözeltideki toplam kompleks molekülü sayısı (x), x için oranlama (r_x) ve DCR için oranlama (r_{DCR})

N/P	p (10^3)	q	M ($\times 10^7$ Da)	x ($\times 10^{12}$)	r_x	r_{DCR}
20	6,94	224	5,14	4,54	2,0	3,0
60	10,6	114	7,77	3,12	1,4	1,4
100	14,5	94	10,6	2,28	1,0	1,0

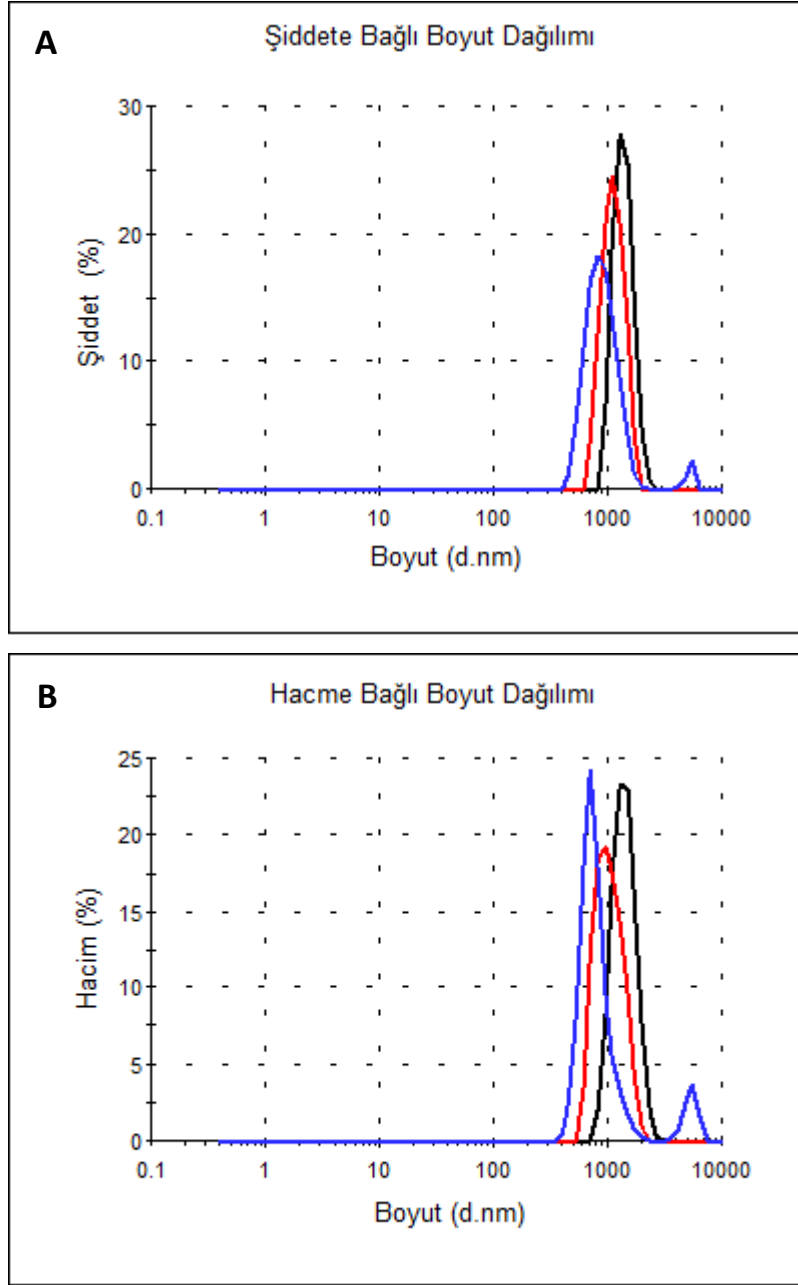
Hesaplamalara göre kompleks başına ODN sayıları yaklaşık 94-224 arasındadır. Polimer sayıları ise binlercedir. Molekül ağırlıkları da 10^7 Da mertebesinde çıkmıştır. Oran arttıkça molekül ağırlıkları artmaktadır. Toplam molekül sayısı artan oranla beraber azalmıştır. Ayrıca r_x ve r_{DCR} oranlamaları da birbirine çok yakın çıkmıştır. Bu sonuçlara göre mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI kopolimeri, mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI kopolimerine göre daha az sayıda ODN taşıma kapasitesine sahiptir.

4.4 mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN Komplekslerinin Boyut Analizleri

2,0 mg/ml mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/PBS polimer stok çözeltisi ile 100 μ M'lık ODN/PBS stok çözeltisi kullanılarak hazırlanan farklı N/P oranlarındaki kompleks çözeltilerinin boyut analizleri yapılmıştır.

4.4.1 Farklı N/P Oranlarındaki Boyut Ölçümleri

Şekil 4.5'de farklı N/P oranları bir arada görülmektedir. Polimer ODN ile karıştırıldıktan sonra, polimerin boyutuna kıyasla çok büyük pikler çıkmıştır. Hacim dağılımında da aynı pikler vardır. Önceki kopolimerlerde görülen durumdan farklı olarak N/P oranı arttıkça pikler sola kaymıştır, yani boyut azalmıştır.



Şekil 4. 5 mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN'ye ait şiddet (A) ve hacim (B) boyut dağılımları:
N/P=20 (—), 60(—), 100 (—)

Çizelge 4.6'ya göre bu polimerde 1.000 nm civarında ve daha büyük pikler çıkmıştır. Konsantrasyon arttıkça Z-ortalama ve şiddet pikleri azalmaktadır ancak 5 µm'de ikinci bir pikin varlığı da bu sonuçları etkiliyor gözükmemektedir. Polidispersite (Pdl) değerleri 0,2-0,4 aralığında çıkmıştır.

Çizelge 4. 6 mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN'ye ait boyut sonuçları

N/P	Z-Ortalama (nm)	Pdl	DCR (kcps)	Şiddet				Hacim			
				Pik 1 (nm)	Alan 1 (%)	Pik 2 (nm)	Alan 2 (%)	Pik 1 (nm)	Alan 1 (%)	Pik 2 (nm)	Alan 2 (%)
20	1997	0,385	5880	1377	100	-	-	1405	100	-	-
60	1203	0,207	2455	1132	100	-	-	1053	100	-	-
100	945	0,250	1108	902,1	96,8	5280	3,2	782	91,5	5358	8,5

4.4.2 Bağlanan Molekül Sayıları

Bağlanan molekül sayıları, Ek E'de açıklandığı gibi hesaplanmıştır. Polimerin şiddet çapı 3,9 nm alınmıştır. Hesaplamaların sonuçları Çizelge 4.7'de özet olarak verilmiştir. Kompleks başına ODN ve polimer sayıları binlerce çıkmıştır. Molekül ağırlıkları ise 10^{10} Da mertebesindedir. Önceki polimerden farklı olarak oran arttıkça boyut ve molekül ağırlıkları azalmakta ve toplam molekül sayısı artmaktadır. Bu durum, r_x ve r_{DCR} değerlerine de yansımış olup en büyük N/P oranında r_x ve r_{DCR} 1 olacak şekilde hesap yapıldığında, bu kez diğer N/P oranlarında uyum olmadığı ve r_x azalırken r_{DCR} 'nin arttığı görülmektedir.

Çizelge 4. 7 mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN için hesaplanan kompleks başına polimer molekülü sayısı (p), kompleks başına ODN molekülü sayısı (q), kompleks molekül ağırlığı (M),çözeltideki toplam kompleks molekülü sayısı (x), x için oranlama (r_x) ve DCR için oranlama (r_{DCR})

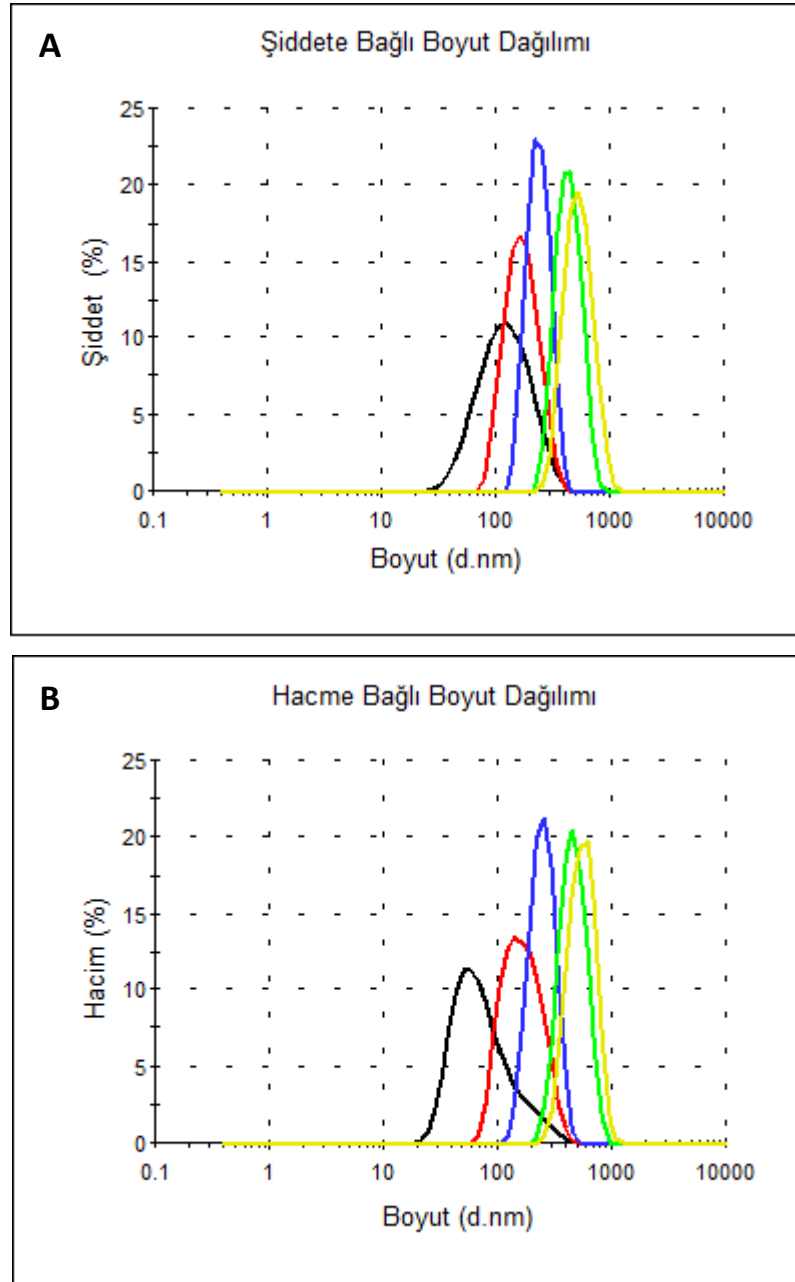
N/P	p (10^7)	q (10^4)	M ($\times 10^{10}$ Da)	x (10^9)	r_x	r_{DCR}
20	4,37	127	32,3	1,10	0,3	5,3
60	2,44	23,7	17,8	2,20	0,5	2,2
100	1,24	7,21	9,00	4,34	1,0	1,0

4.5 mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN Komplekslerinin Boyut Analizleri

2,0 mg/ml mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/PBS polimer stok çözeltisi ile 100 μ M'lık ODN/PBS stok çözeltisi kullanılarak hazırlanan farklı N/P oranlarındaki kompleks çözeltilerinin boyut analizleri yapılmıştır.

4.5.1 Farklı N/P Oranlarındaki Boyut Ölçümleri

Şekil 4.6’da farklı N/P oranları bir arada görülmektedir. N/P=1 oranı, seyreltme olmadan gerekli ODN miktarı çok fazla olup sağlanamadığından, diğer çözeltilere göre 1/10 seyreltik çözeltide ölçülmüştür. Tüm oranlarda çok düzgün tek bir pik çıkmıştır. Oran arttıkça pikler sağa kaymış, yani boyut artmıştır.



Şekil 4. 6 mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN’ye ait şiddet (A) ve hacim (B) boyut dağılımları:
N/P=1 (—), 6 (—), 20 (—), 60 (—), 100 (—)

Çizelge 4.8'e göre gerek Z-ortalama değerleri gerekse de şiddet çapları oran arttıkça düzenli şekilde artmıştır. Tüm örnekler tek pik vermiştir. Polidispersite indeksleri oran 1'de 0,19 diğerlerinde ise hep <0,1 çıkmıştır yani tüm örnekler çok monodispersdir. Bu sonuçlara göre tüm oranlarda monodispers yapıda kompleksler oluşmuş olmalıdır.

DCR değerleri oran arttıkça azalmıştır. Oran 1'in kendisi değil 1/10 seyreltik hali bakıldığından, tablodaki oran 1'in küçük DCR vermiş olması normaldir. Ancak oran 6 ve sonrası için N/P oranı arttıkça DCR değerlerinin düzgün şekilde azaldığı açıkça görülmektedir. Oran artarken boyutun artmasına karşılık DCR'lerin azalması, yine toplam molekül sayısının azalmasıyla gerçekleşmiş olmalıdır.

Çizelge 4. 8 mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN'ye ait boyut sonuçları

N/P	Z-ortalama (nm)	Pdl	DCR (kcps)	Şiddet		Hacim	
				Pik 1 (nm)	Alan 1 (%)	Pik 1 (nm)	Alan 1 (%)
1	106,0	0,189	2691	133,2	100	85,24	100
6	159,5	0,095	83279	176,8	100	173,0	100
20	230,0	0,033	40837	241,4	100	252,3	100
60	418,7	0,046	7337	444,6	100	470,0	100
100	505,6	0,070	4379	547,1	100	558,4	100

4.5.2 Bağlanan Molekül Sayıları

Bağlanan molekül sayıları, Ek E'de açıklandığı gibi hesaplanmıştır. Polimerin şiddet çapı 4,4 nm alınmıştır. Hesaplamaların sonuçları Çizelge 4.9'da özet olarak verilmiştir.

Kompleks başına ODN ve polimer sayıları binlercedir. Molekül ağırlıkları ise 10^8 Da mertebesinde. Çizelge 4.8'e göre oran arttıkça boyut artmış ancak DCR değerleri azalmıştır. Buna paralel olarak Çizelge 4.9'da toplam molekül sayısının artan oranla azaldığı görülmektedir. DCR'lerin azalması yine çözeltideki saçılma yapan moleküllerin azalmasından kaynaklanmış olmalıdır. r_x ve r_{DCR} oranlamalarının çok yakın çıkması bu durumu desteklemektedir.

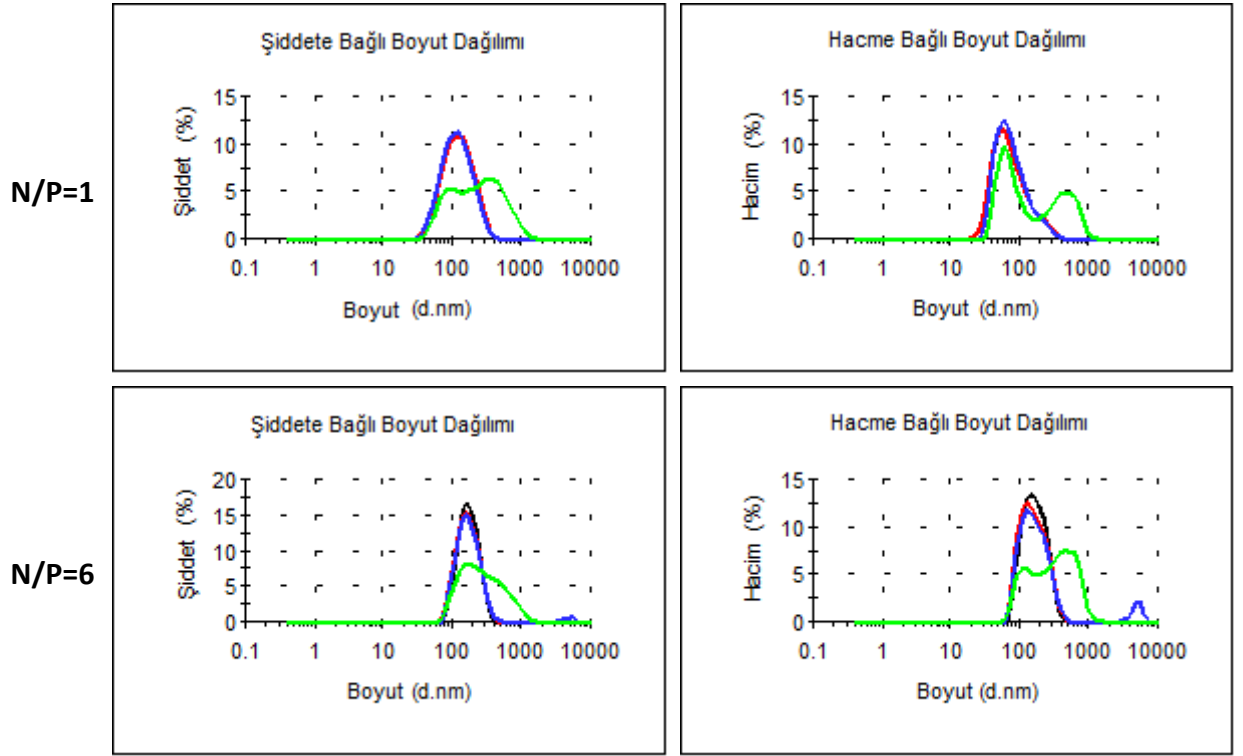
Çizelge 4. 9 mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN için hesaplanan kompleks başına polimer molekülü sayısı (p), kompleks başına ODN molekülü sayısı (q), kompleks molekül ağırlığı (M),çözeltideki toplam kompleks molekülü sayısı (x), x için oranlama (r_x) ve DCR için oranlama (r_{DCR})

N/P	p (10^4)	q (10^3)	M ($\times 10^8$ Da)	x (10^{10})	r_x	r_{DCR}
1	2,35	23,1	2,08	26,4	15,9	-
6	6,30	10,3	3,16	25,7	15,5	19,0
20	16,4	8,04	7,34	17,5	10,5	9,3
60	103	16,9	44,6	3,10	1,9	1,7
100	192	18,9	82,6	1,66	1,0	1,0

4.5.3 Komplekslere Seyrelmenin Etkisi

AUC’de N/P oranları 1 ve 6 için seyreltik çözeltilerin de ölçümleri alındığından, seyrelmenin polimer-ODN etkileşimleri üzerine etkisi ayrıca incelenmiştir.

Şekil 4.7’de 1/10, 1/100 ve 1/1000 seyreltmelerin şiddet ve hacim boyut dağılımları verilmiştir. N/P=1 için 1/1000 seyreltmeye kadar boyut sonucu değişmemiştir. N/P=6’da 1/100 seyreltmede asıl pik değişmemiş ancak mikron mertebesinde ikinci bir pik belirmiştir. 1/1000 seyreltmede ise piklerin yapısı değişmiştir. Bu sonuçlara göre 1/10 seyreltme ile kompleks yapısında bir değişim oluşmamaktadır.



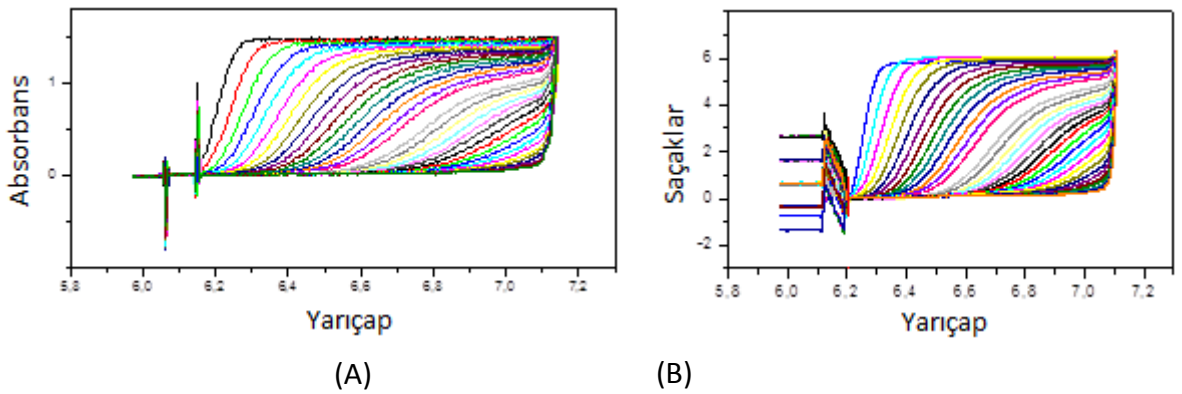
Şekil 4. 7 mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN'ye ait N/P=1 ve 6 için şiddet ve hacim dağılımları: seyreltme yok (–), 1/10 seyreltme (–), 1/100 seyreltme (–), 1/1000 seyreltme (–)

4.6 BSA'nın Sedimentasyon Hız ve Denge Deneyleri

Polimer ve polimer/DNA çözeltilerinin AUC ile karakterizasyonuna geçmeden önce, cihazın doğru çalıştığını doğrulamak açısından siğir serum albümin (BSA) ile denemeler yapılmıştır. Bu bağlamda, 0,1 M NaCl içinde farklı konsantrasyonlarda (0,6-10 mg/ml) hazırlanan BSA çözeltilerinin öncelikle dansimetrede yoğunluk ölçümleri alınmış ve elde edilen sonuçlardan Ek D'de anlatıldığı şekilde BSA'nın kısmi spesifik hacmi bulunmuştur. Bulunan kısmi spesifik hacim $0,75 \text{ cm}^3/\text{g}$ olup, bu değer denge deneylerinde molekül ağırlığı hesabında kullanılmıştır.

Kısmi spesifik hacmin bulunmasının ardından, 0,1 M NaCl içinde farklı konsantrasyonlarda (0,13-2,67 mg/ml) hazırlanan BSA çözeltilerinin sedimentasyon hız ve denge deneylerine geçilmiştir. Hız deneyleri, 20°C 'de ve 42.000 rpm'de 5'er dakika arayla 6 saat boyunca hem absorbans (280 nm) hem de girişim detektörleri ile tarama yapılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.8'de 2,0 mg/ml konsantrasyonundaki BSA çözeltisine ait 10'ar dakika arayla alınan absorbans ve saçak dağılımları verilmiştir.

Şekilde her renkteki eğri, belli bir zamandaki konsantrasyon taramasıdır. İlk tarama en soldaki eğri olup 10 dakika sonra yapılan tarama sağındaki ilk eğridir ve zaman ilerledikçe yapılan taramalarla sağa doğru yeni eğriler eklenmektedir. Başlangıç anında küvet boyunca yaklaşık 1,5 absorbans veren madde dağılımı vardır (Şekil 4.8-A). Zamanla BSA molekülleri çöker ve küvetin 6,2 cm'ye yakın baş taraflarında madde kalmadığından bu bölgede absorbans değerleri sıfıra yaklaşır. Yeterince beklenirse, küvet içindeki tüm çözünen maddeler çöker ve absorbans tüm küvet boyunca sıfıra iner. Benzer şekilde, Şekil 4.8-B'de başlangıçta küvet boyunca yaklaşık 6 birimlik saçak kayması olduğu ve zamanla BSA moleküllerinin çökmesiyle saçak kaymasının da sıfıra gittiği görülmektedir.



Şekil 4. 8 BSA/0,1 M NaCl'nin sedimentasyon hız deneyine ait absorbans (A) ve saçak (B) dağılımları

Hız deneyleri sonucunda, konsantrasyon düzeltmesi de yapılarak sedimentasyon katsayısı ve molekül ağırlığı değerleri hesaplanmıştır. Buna göre sedimentasyon katsayısı, absorbans detektöründen 4,48 S ve girişim detektöründen 3,79 S; molekül ağırlığı ise absorbans detektöründen 69,6 kDa ve girişim detektöründen 67,5 kDa olarak bulunmuştur. Literatürde 0,1 M NaCl içinde BSA çözeltisi için sedimentasyon katsayısı 4,42 S olarak verilmiştir [141]. BSA'nın molekül ağırlığı ise 66,5 kDa'dur [142]. Buna göre bulunan değerler literatürle uyumlu olmaktadır.

Sedimentasyon denge deneyleri; 20 °C'de, üç farklı hızda (18000, 20000 ve 24000 rpm), hem absorbans (280 nm) hem de girişim detektörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak ve konsantrasyon düzeltmesi de yapılarak molekül ağırlığı hesaplanmıştır. Molekül ağırlığı, absorbans detektöründen 78,7 kDa ve girişim detektöründen 90,0 kDa olarak bulunmuştur. Bu değerler, BSA'nın bilinen molekül

kütlesi olan 66,5 kDa'dan bir miktar farklıdır. Aradaki farkın sebebi şöyle açıklanabilir: Öncelikle, kullanılan hesap metodu sadece ortalama bir molekül kütlesi değeri vermektedir, bir dağılım elde edilmemektedir. Tek başına monomerik BSA çözeltisi hazırlamak çok zor olup, burada bakılan çözeltilerde de dimer ve trimer gibi oligomerler ve hatta az miktarda olsa bile daha büyük agregatlar bulunduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, monomerik olmayan bileşenler, ortalama molekül kütlesini monomer değerinden daha büyük çıkarmıştır. Sedimentasyon hız deneylerinde 66,5 kDa'a yakın sonuçlar bulunmuş olmasının sebebi ise, o teknikte hıza bağlı olarak farklı molekül türlerinin birbirinden ayrılmasıdır.

4.7 Triblok Kopolimerlerin Sedimentasyon Denge Analizleri

4.7.1 Kısmi Spesifik Hacimlerin Bulunması

Sedimentasyon denge analizlerinden önce farklı konsantrasyonlarda PBS içinde hazırlanan triblok kopolimerlerin dansimetrede yoğunlukları ölçülmüş ve bu değerler kullanılarak Ek D'de açıklandığı şekilde kısmi spesifik hacimler bulunmuştur (Çizelge 4.10). Bulunan bu kısmi spesifik hacim değerleri, daha sonra sedimentasyon denge deneylerinin veri analizlerinde molekül ağırlığı hesaplamalarında kullanılmıştır.

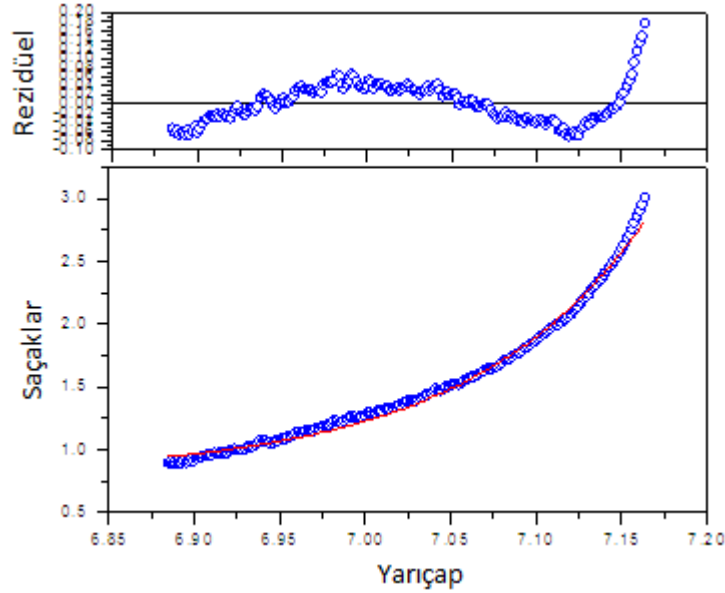
Çizelge 4. 10 Triblok kopolimerlerin kısmi spesifik hacim değerleri ($\bar{v}$)

	$\bar{v}$ (cm ³ /g)
mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI	0,8202
mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI	0,8205
mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI	0,8111
mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI	0,8274

4.7.2 Sedimentasyon Denge Ölçümleri

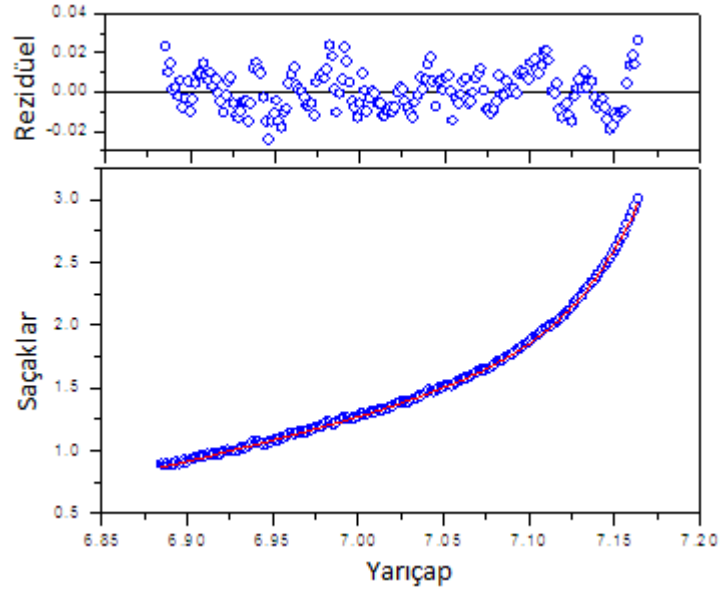
PBS içinde 2,0 mg/ml konsantrasyonlarında hazırlanan triblok kopolimer çözeltilerinin 20,0 °C'de ve 16000 rpm'de sedimentasyon denge ölçümleri gerçekleştirilmiştir. 1'er saat arayla tarama yapılmış ve tarama sonuçlarının üst üste çıktığı denge durumuna ait verilerden analiz yapılmıştır. Polimerlerde absorban yapan grup olmadığından dolayı, sadece girişim detektörü kullanılmış, absorban ölçümü alınmamıştır.

Şekil 4.9'da, mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI polimerinin, sadece molekül kütlesine (M) göre yapılmış fit sonucu verilmiştir. Mavi noktalar ölçüm sonuçları olup, saçak grafiğindeki kırmızı çizgi ise bu noktalara uygulanan fit eğrisidir. Özellikle uçlarda fit eğrisinin iyi uymadığı görülmektedir. Ayrıca rezidüel grafiğindeki eğri, ortamda birleşme olduğuna işaret etmektedir. Buna göre fit işlemi yenilenmelidir.



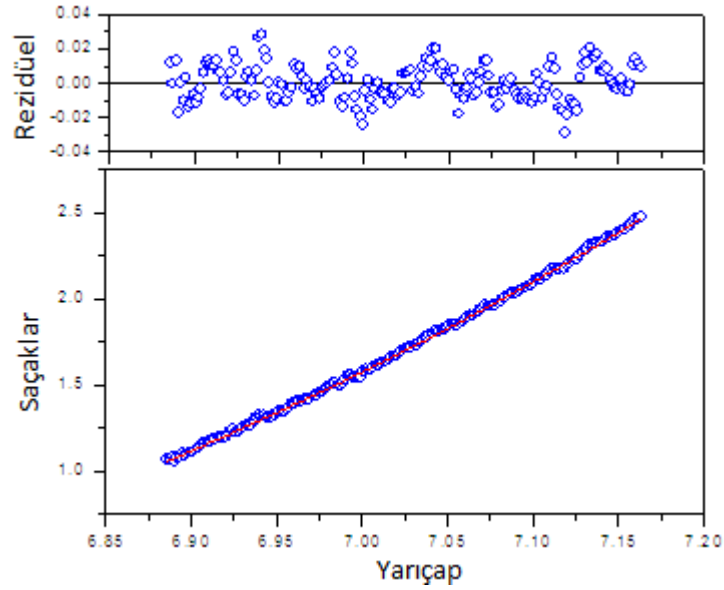
Şekil 4. 9 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/PBS'ye ait molekül ağırlığı fit sonucu

Şekil 4.10'da, aynı örneğin molekül kütlesi, bağlanma sayısı (N) ve bağlanma sabiti (Ka) değişkenleri için uygulanan fit sonucu verilmiştir. Saçak grafiğindeki fit daha iyidir. Ayrıca rezidüel grafiğinde de düzgün bir dağılım olmuştur. Buna göre M, N ve Ka değişkenlerine göre yapılmış fit işlemi doğrudur.

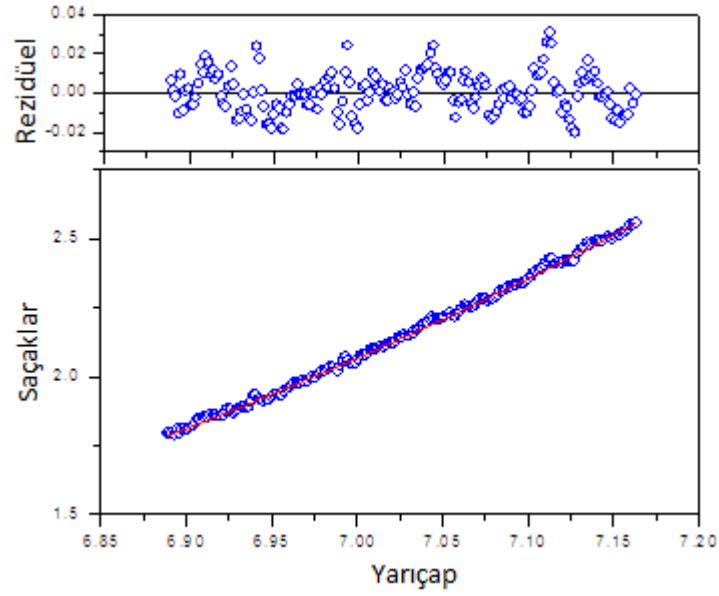


Şekil 4. 10 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/PBS'ye ait molekül kütlesi, bağlanma sayısı ve bağlanma sabitine göre fit sonucu

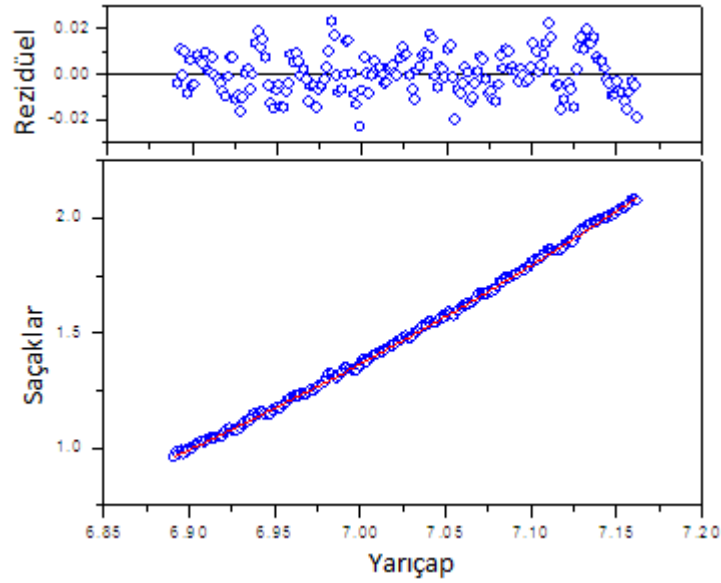
Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13'de, sırasıyla mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI, mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI ve mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI'ye ait sonuçlar görülmektedir. Sadece M değişkenine göre fit işlemi uygulanmıştır. Rezidüellerde düzgün dağılım vardır. Saçak fit sonuçları da düz doğru şeklinde çıkmıştır ki buna göre çözeltilerde birleşme reaksiyonu olmamaktadır.



Şekil 4. 11 mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI/PBS'ye ait molekül kütlesi fit sonucu



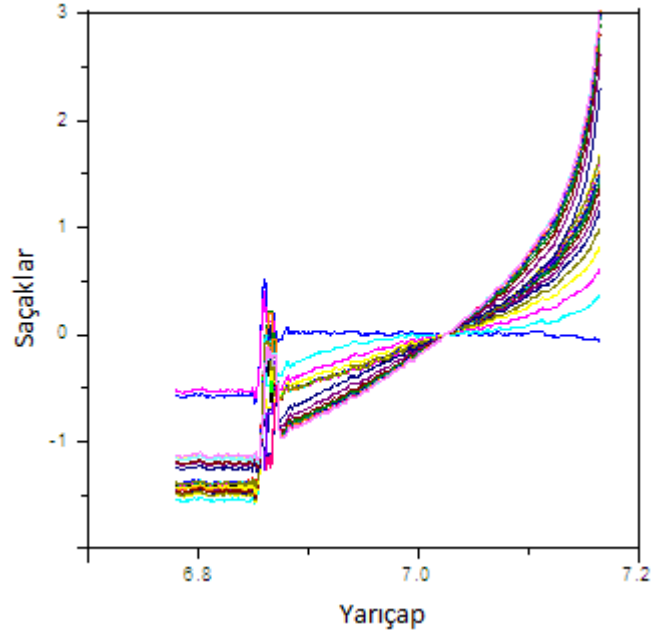
Şekil 4. 12 mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/PBS'ye ait molekül kütlesi fit sonucu



Şekil 4. 13 mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/PBS'ye ait molekül kütlesi fit sonucu

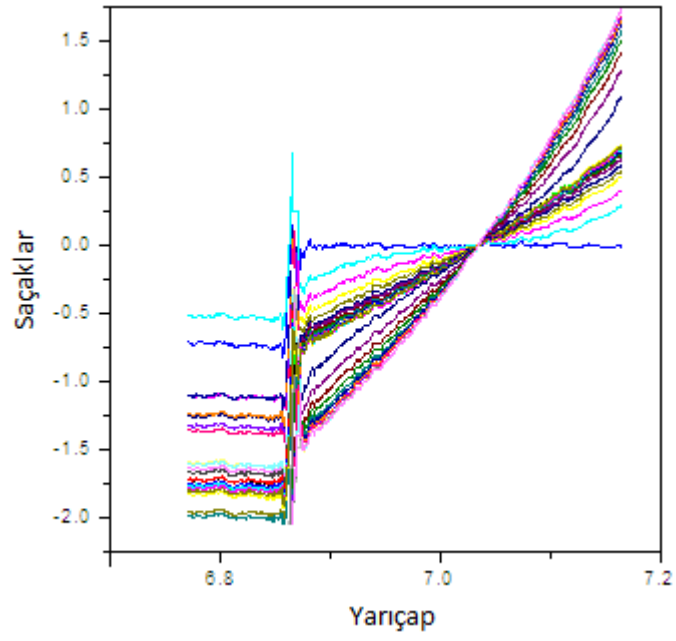
Şekil 4.14'de, mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI'nin konum-saçak grafiği verilmiştir. Her eğri, bir taramaya karşılık gelmektedir. Başlangıç anında mavi renkli düz eğri şeklinde bir dağılım varken, santrifüj alanı altında moleküllerin yer değiştirmesi sonucu zamanla dengeye gidilmiştir. Eğriler arasında 1'er saat vardır. İkinci ölçüm açık mavi, üçüncü ölçüm pembe ve dördüncü ölçüm sarı renkli eğridir. Başlarda eğrilerdeki değişim daha büyüktür ancak zaman ilerledikçe değişimler azalmaktadır. 12 saatten sonra eğriler üst

üste çıkmaya başlamıştır yani dengeye ulaşılmıştır. Denge anı için eğrinin yukarı yönde kavisli olması, birleşme durumu olduğuna bir işarettir.

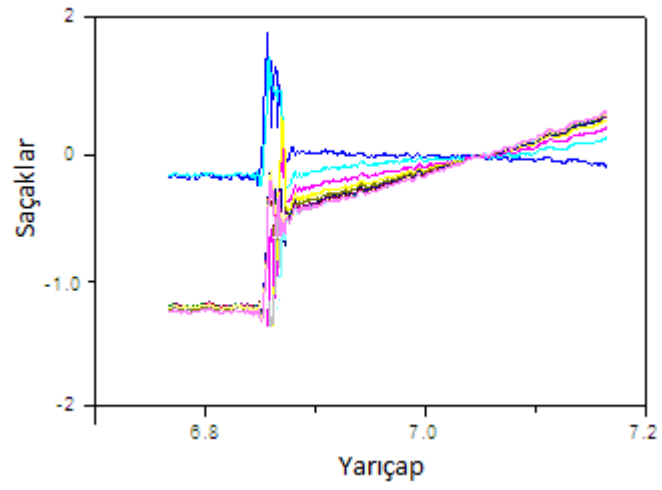


Şekil 4. 14 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/PBS'ye ait konum-saçak grafiği

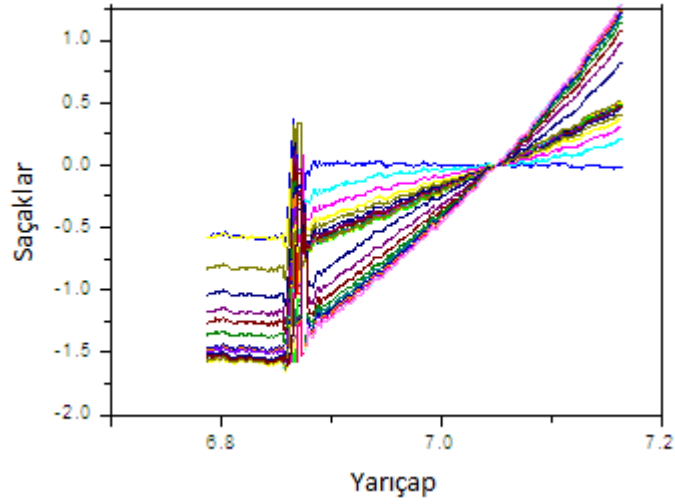
Şekil 4.15'te, mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI'nin konum-saçak grafiği verilmiştir. Denge anı için düz bir doğru çıkmıştır ki bu durum çözeltide birleşme olmadığına bir işarettir. Aynı durum, Şekil 4.16 ve 4.17'deki mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI ve mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI ölçümlerinde de görülmektedir.



Şekil 4. 15 mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI/PBS'ye ait konum-saçak grafiği



Şekil 4. 16 mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI /PBS'ye ait konum-saçak grafiği



Şekil 4. 17 mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/PBS'ye ait konum-saçak grafiği

mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI, mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI, mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI ve mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI polimer çözeltilerinin denge analizleri sonucu bulunan molekül kütleleri sırasıyla 64,6, 7,91, 7,23 ve 9,01 kDa'dur. Analizlerde, Çizelge 4.10'daki kısmi spesifik hacim değerleri kullanılmıştır. Bu sonuçlara göre mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI polimerinin PBS içinde misel oluşturduğu söylenebilir.

4.8 Polimer/DNA Komplekslerinin Sedimentasyon Denge Analizleri

4.8.1 Görünür Kısmi Spesifik Hacimlerin Bulunması

Sedimentasyon denge analizlerinden önce farklı N/P oranlarında hazırlanan polimer/ODN kompleks çözeltilerinin dansimetrede yoğunlukları ölçülmüş ve bu değerler kullanılarak Ek D'de açıklandığı şekilde görünür kısmi spesifik hacimler bulunmuştur (Çizelge 4.11). Kısmi spesifik hacmi bulmak için farklı konsantrasyonlarda alınan ölçümlerin sonuçları kullanılmaktadır ancak polimer/ODN komplekslerinde her N/P oranı sadece tek bir konsantrasyonda hazırlandığından, kompleks çözeltileri için kısmi spesifik hacim değerleri bulunamamıştır. Ayrıca farklı N/P oranlarının görünür spesifik hacim değerleri yaklaşık aynı çıktığından, sedimentasyon denge deneylerinin veri analizlerindeki molekül ağırlığı hesaplamalarında, her polimer türüne ait komplekslerin görünür kısmi spesifik hacim değerlerinin ortalamaları kullanılmıştır. Hesaplanan ortalama görünür kısmi spesifik hacim değerleri Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4. 11 Farklı N/P oranları için bulunan görünür kısmi spesifik hacim değerleri (ϕ): mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN (I), mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN (II), mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN (III), mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN (IV)

N/P	ϕ (cm ³ /g)			
	I	II	III	IV
1	0,8154	0,8137	0,8042	0,8178
6	0,8069	0,8144	0,8149	0,8201
20	0,8020	0,8078	0,8229	0,8114
60	0,8100	0,8124	0,8049	0,8293
100	0,8097	0,8083	0,7850	0,8176

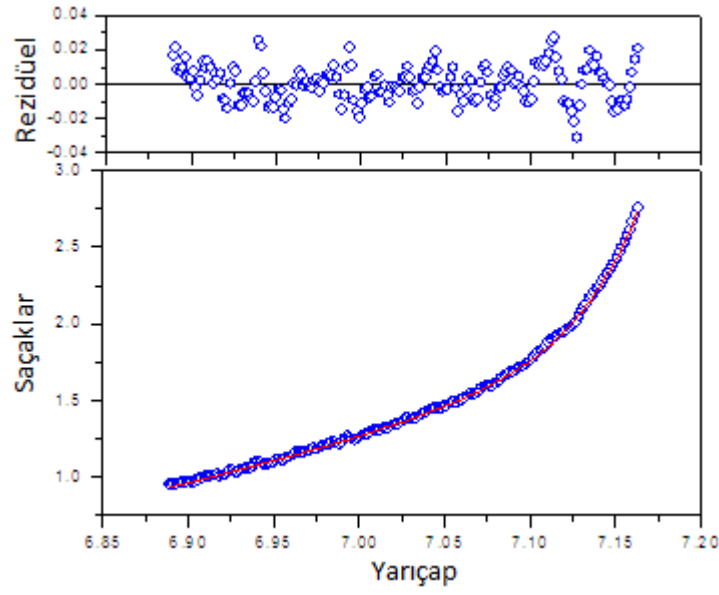
Çizelge 4. 12 Polimer/ODN komplekslerinin ortalama görünür kısmi spesifik hacim değerleri (ϕ)

	ϕ (cm ³ /g)
mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN	0,8107
mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN	0,8128
mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN	0,8057
mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN	0,8171

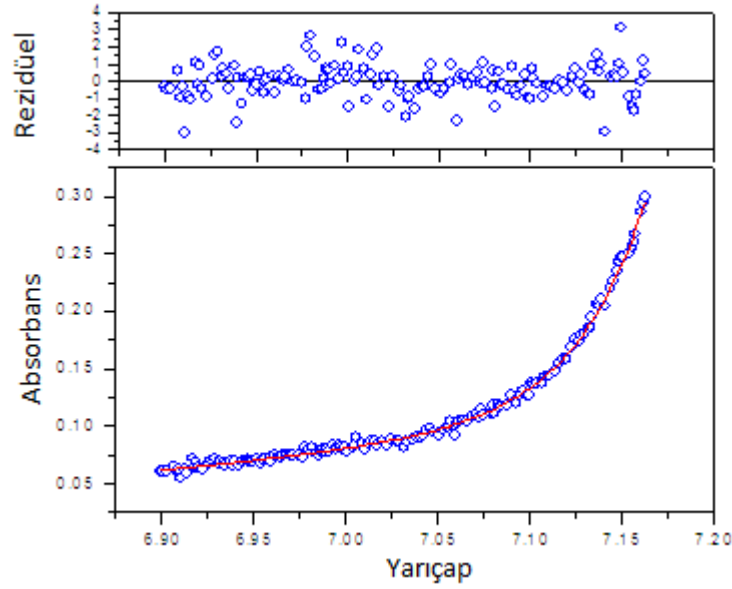
4.8.2 Sedimentasyon Denge Ölçümleri

PBS içinde farklı N/P oranlarında hazırlanan polimer/ODN çözeltilerinin sedimentasyon denge analizleri yapılmıştır. Ölçümler 20,0 °C’de ve 16000 rpm’de gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerin toplam konsantrasyonları yaklaşık 1,9 mg/ml’dir. Hem girişim hem de absorbands detektörü (260 nm) kullanılmıştır. 1’er saat ara ile taramalar yapılmış ve dengeye ulaşıldıktan sonraki verilerden hesaplamalar yapılmıştır.

Şekil 4.18’de örnek olarak seçilmiş N/P=3 oranında mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN’ye ait girişim sonucu verilmiştir. Rezidüel düzgün dağılım göstermiştir. Saçak fiti de kavislidir. Şekil 4.19’da ise aynı örneğin 260 nm’deki absorbands sonucu verilmiştir. Girişim sonucuna benzemektedir. mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN kompleks çözeltilerine ait diğer N/P oranlarının sonuçları da bu sonuçlar gibi çıkmıştır.

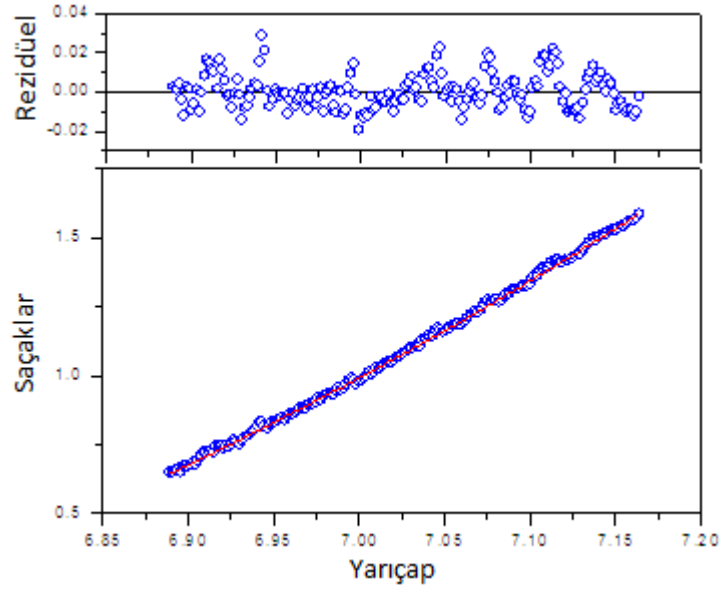


Şekil 4. 18 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN, N/P=3 girişim sonucu



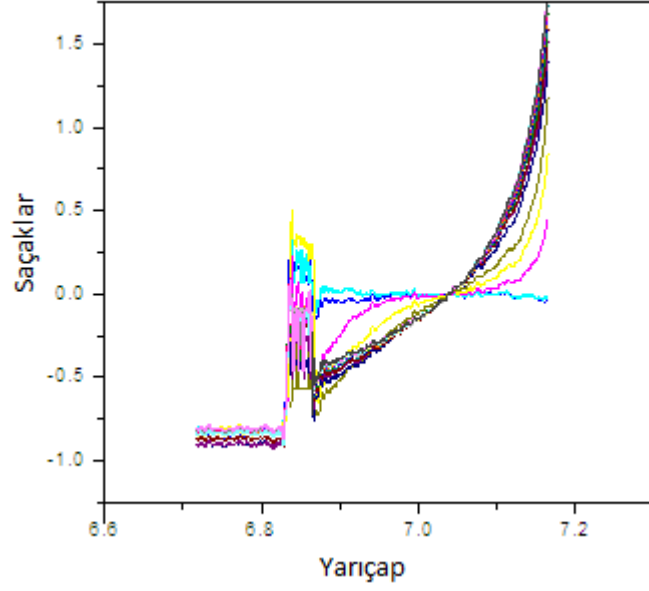
Şekil 4. 19 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN, N/P=3 260 nm absorbans sonucu

Diğer polimerlere ait kompleks çözeltilerinin analizlerinde 260 nm’de fit verecek sonuçlar çıkmamıştır. Girişim sonuçlarında ise fit işlemi düz doğrular vermiştir. Örnek olarak Şekil 4.20’de mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN’ye ait N/P=3 oranı verilmiştir.

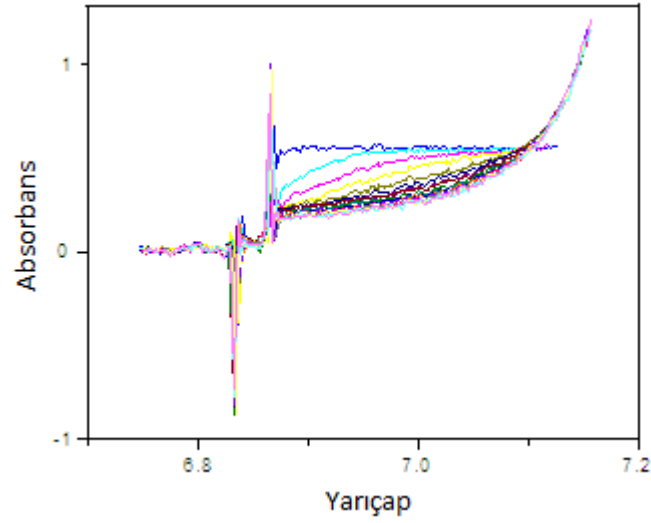


Şekil 4. 20 mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN, N/P=3 girişim sonucu

Şekil 4.21’de konum-saçak grafiklerine örnek olarak mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN’ye ait N/P=20 oranının sonucu verilmiştir. İlk ölçüm mavi renkli eğridir. 1’er saat arayla alınmış diğer ölçümlerden ikincisi açık mavi, üçüncüsü pembe, dördüncüsü sarı renkli eğridir. Zaman ilerledikçe küvetteki konsantrasyon dağılımına bağlı olarak saçak grafiğinde de dengeye gidilmektedir. Denge eğrilerinin kavisli çıkması yine birleşme olduğunu göstermektedir. Şekil 4.22’de ise aynı örneğin absorbans sonucu verilmiştir. Bu polimere ait diğer N/P oranları için konum-saçak ve konum-absorbans grafikleri benzer şekilde çıkmıştır.

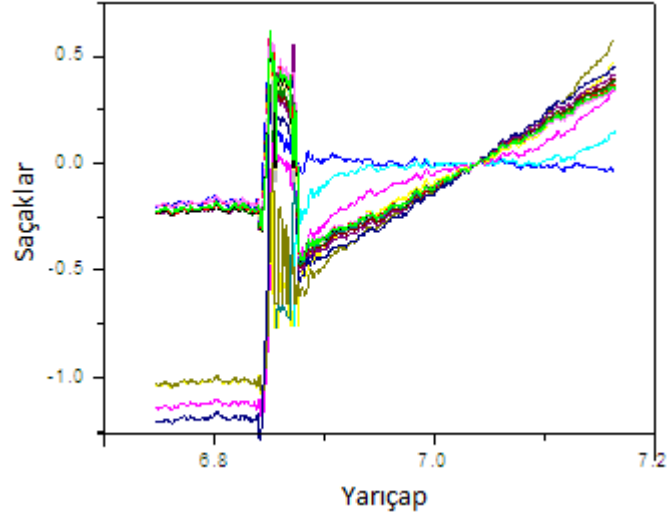


Şekil 4. 21 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN, N/P=20'ye ait konum-saçak grafiği

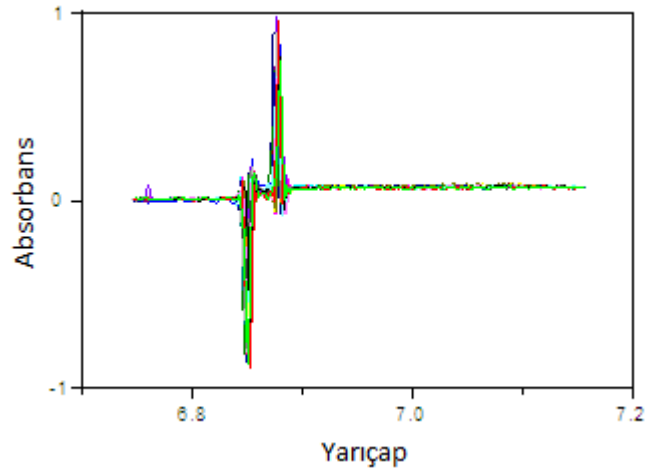


Şekil 4. 22 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN, N/P=20'ye ait konum-absorbans grafiği

Diğer polimerlerin kompleks çözeltilerinin denge anlarında düz doğrular çıkmıştır. Örnek olarak Şekil 4.23 ve 4.24'te, mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN'nin N/P=100 oranına ait sırasıyla konum-saçak ve konum-absorbans grafikleri verilmiştir. Absorbans değerinin neredeyse sıfır olduğu görülmektedir. mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN, mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN ve mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN komplekslerinin tüm N/P oranlarında aynı durum çıkmıştır. Bu yüzden bu polimerlerin absorbans sonuçlarına fit işlemi uygulanamamıştır.



Şekil 4. 23 mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN, N/P=100'e ait konum-saçak grafiği



Şekil 4. 24 mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN, N/P=100'e ait konum-absorbans grafiği

Analizler sonucu bulunan molekül kütleleri Çizelge 4.13'de verilmiştir. Hesaplamalarda Çizelge 4.12'de verilen ortalama görünür kısmi spesifik hacim değerleri kullanılmıştır. Bu sonuçlara göre mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN içeren çözeltilerin molekül kütleleri, ODN'siz tek başına polimer çözeltisinin sonucuna yakın yani misel kütleleri gibi çıkmıştır. Diğer polimer/ODN içeren çözeltilerde de sonuçlar ODN'siz tek başına polimer çözeltilerinin sonuçları gibi çıkmıştır. Zetasizer sonuçlarına göre monodispers kompleksler olduğu çok net görülmüştü ancak AUC'de 16000 rpm'de gerçekleştirilen sedimentasyon denge sonuçlarında bu durum görülmemektedir.

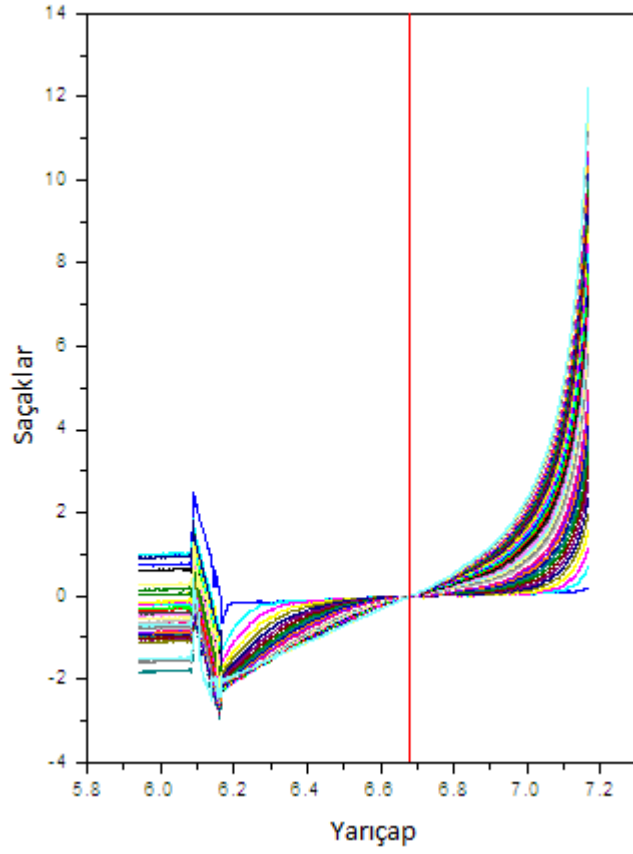
Çizelge 4. 13 PBS içinde farklı N/P oranları için hesaplanan molekül kütleleri: mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN girişim sonucu (I_G) ve aborbans sonucu (I_A), mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN girişim sonucu (II), mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN girişim sonucu (III), mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN girişim sonucu (IV)

N/P	Molekül Kütlesi (kDa)				
	I_G	I_A	II	III	IV
1	73,9	101	7,56	7,04	7,17
6	66,5	86,1	7,62	6,17	8,35
20	88,4	109	8,45	4,40	6,22
60	96,0	-	8,68	6,88	5,65
100	100	-	6,90	7,37	8,92

4.9 Polimer ve Polimer/DNA Çözeltilerinin Sedimentasyon Hız Analizleri

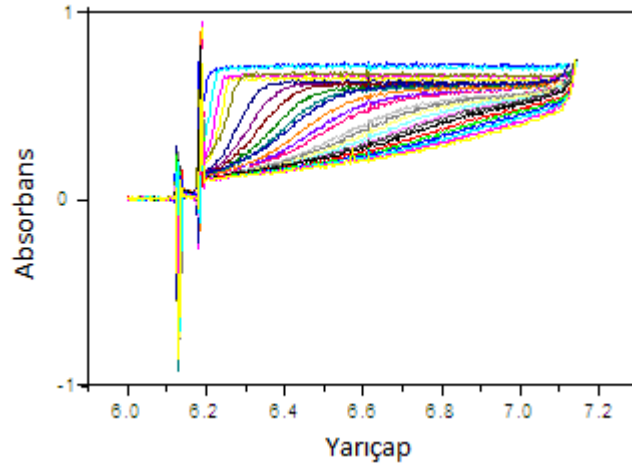
2,0 mg/ml konsantrasyonlarında hazırlanan polimer ve farklı N/P oranlarında hazırlanan polimer/ODN çözeltilerinin sedimentasyon hız analizleri yapılmıştır. Ölçümler 20,0 °C’de ve 42000 rpm’de gerçekleştirilmiştir. Polimerler girişim detektörüyle, polimer/ODN çözeltileri ise hem girişim hem de absorbans detektörüyle analiz edilmiştir.

Şekil 4.25’de mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/PBS’ye ait sonuç verilmiştir. Zamanla çökme yerine dengeye gitme durumu görülmektedir. Diğer polimerler içinde benzer sonuçlar bulunmuştur, yani polimer çözeltileri 42.000 rpm’de çökmeyip dengeye gitmektedirler.



Şekil 4. 25 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/PBS'nin sedimentasyon hız sonucu

Şekil 4.26'da ise, mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN'ye ait N/P=20 oranının absorbans sonucu verilmiştir. Üst platonun sıfıra indiği ancak "*baseline*"ın sıfıra inmediği görülmektedir. Konsantrasyon azaldığından dolayı bir miktar madde çökmüş olmalıdır ancak "*baseline*" sıfıra inmediğinden dolayı da çözeltide çökmeyen maddeler olduğu anlaşılmaktadır. Üstelik eğriler S şeklinde değildir, bunun yerine denge durumlarına benzer eğriler çıkmıştır. Bakılan tüm polimer ve polimer/ODN çözeltilerinde aynı durum gözlenmiştir. Buna bağlı olarak sayısal olarak analiz yapılamamıştır.



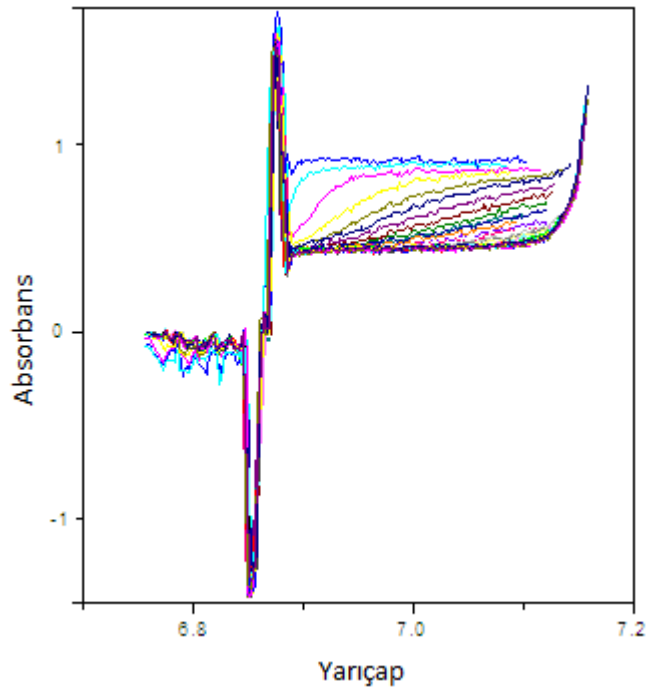
Şekil 4. 26 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN, N/P=20'nin sedimentasyon hız sonucu

4.10 AUC'de 3.000 rpm'de Yapılan Sedimentasyon Denge Ölçümleri

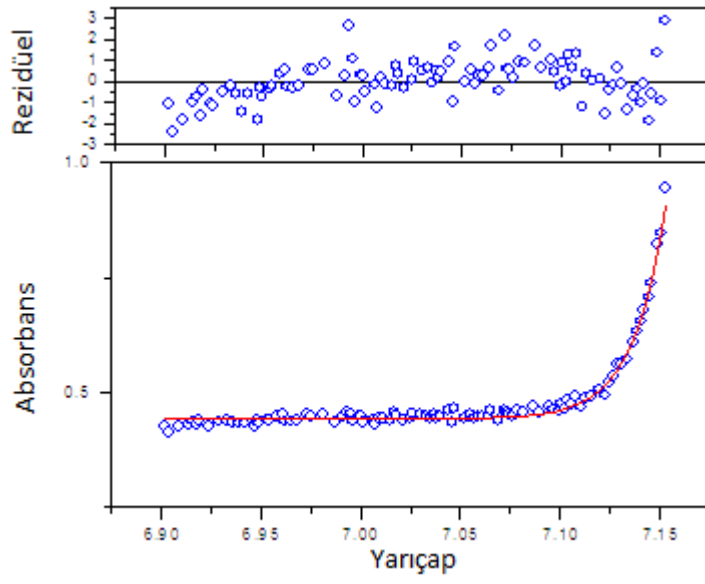
Farklı N/P oranlarındaki polimer/DNA çözeltilerinin 16000 rpm'deki sedimentasyon denge ve 42000 rpm'deki hız deneylerinde, kompleks molekülleri gözlenememiştir. Ancak Zetasizer cihazında yapılan analizlerde, çok monodispers kompleks moleküllerinin olduğu net şekilde görülmüştü. Dolayısıyla, AUC deneylerindeki şartların bir şekilde kompleks moleküllerinin tespitini engellediği düşünülmüştür. Bunun en önemli sebebi, Zetasizer sonuçlarına göre, oluşan komplekslerin çok büyük molekül kütlelerine sahip olmasıdır. Yani kompleks moleküllerinin yapıları çok büyük olduğundan, AUC'de santrifüj alanı uygulandığı anda hemen çöküyor olmalıdırlar. Geride çözeltide çökmeyen az miktarda madde kalmaktadır. Denge analizlerinde, absorbans değerlerinin sıfıra yakın olduğu görülmüştü. Demek ki tüm ODN'ler çöküyor olmalıdır. Sonuç olarak ortamda polimer/ODN ve az miktarda bağlanmamış polimer molekülleri vardır ve santrifüj alanında kompleks molekülleri hemen çökerken geride az miktarda bağlanmamış polimer molekülleri kalmış olmalıdır.

Polimer/ODN kompleks moleküllerini AUC'de inceleyebilmek için deney şartlarının değiştirilmesi düşünülmüştür. Önce seyreltik çözeltiler denenmiştir. Buna göre N/P=1 ve 6 oranlarında, 1/10 ve/veya 1/100 seyreltik mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN ve mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN kompleks çözeltileri hazırlanmıştır. Ancak bu çözeltilerin 16000 rpm'deki sedimentasyon denge ölçümleri, önceki sonuçlar gibi çıkmıştır, yani seyrelme ile bir değişim olmamıştır.

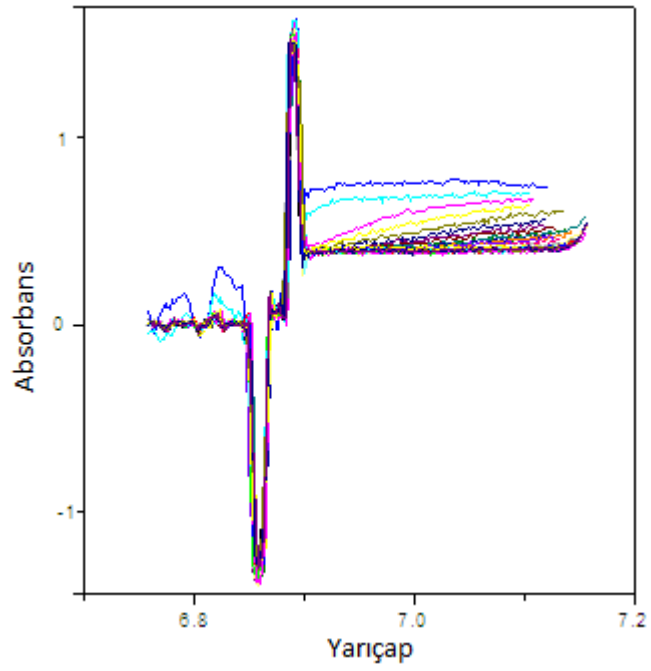
İkinci olarak kullanılan hız değiştirilmiş ve daha düşük hızda deneyler yapılmıştır. Bunun için, N/P=1 oranında mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN ve mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN çözeltilerinin 3000 rpm’de sedimentasyon denge ölçümleri alınmıştır. Şekil 4.27 ve 4.28’de mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN’ye ait sonuçlar görülmektedir. Yine bir miktar madde çökse de, fit grafiği çizilebilecek kadar kompleks molekülü çözelti içinde kalmıştır. Şekil 4.29 ve 4.30’da da mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN’ye ait sonuçlar görülmektedir. Burada da benzer bir durum söz konusudur. Dolayısıyla fit eğrilerinden hesaplamalar yapılabilmiş ve kompleks moleküllerinin molekül kütleleri bulunabilmiştir.



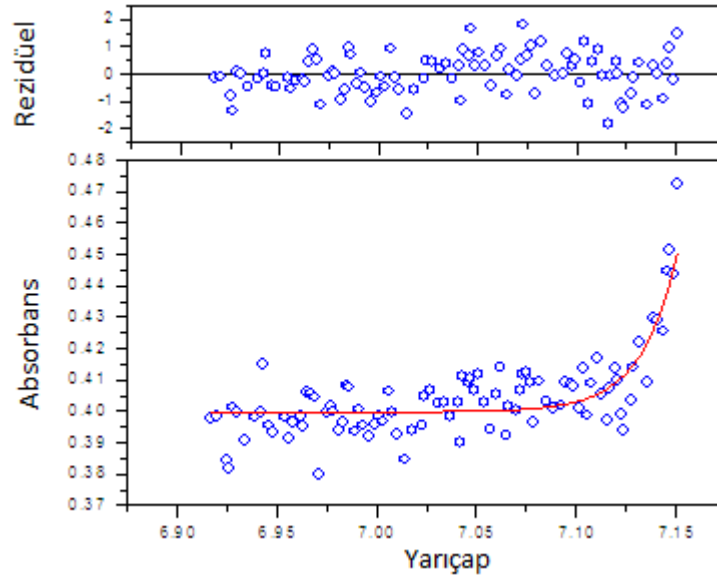
Şekil 4. 27 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN, N/P=1’in 3000 rpm’de konum-absorbans grafiği



Şekil 4. 28 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN, N/P=1'in 3000 rpm'de fit sonucu



Şekil 4. 29 mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN, N/P=1'in 3000 rpm'de konum-absorbans grafiği



Şekil 4. 30 mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN, N/P=1'in 3000 rpm'de fit sonucu

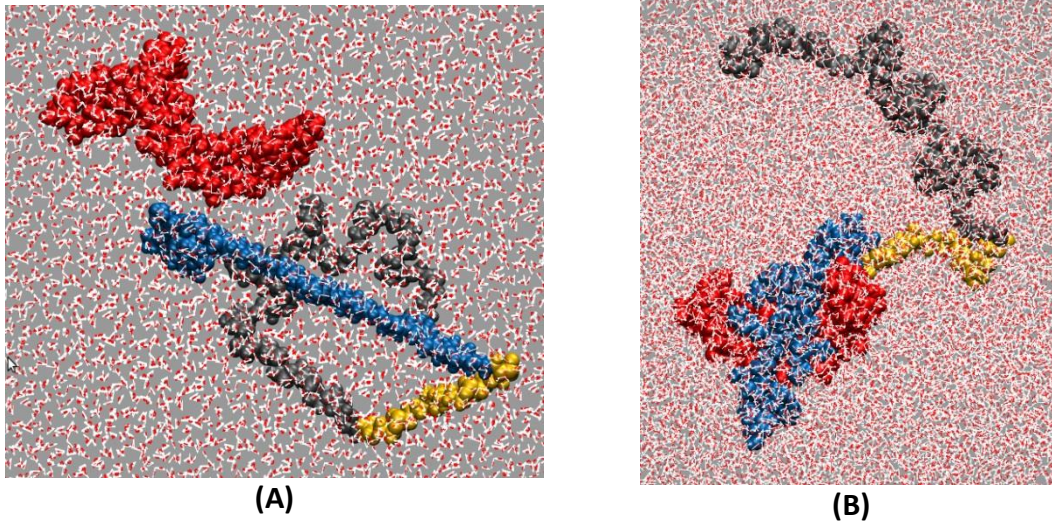
3000 rpm'de alınan ölçümlere göre, mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN komplekslerinin molekül ağırlığı $1,18 \times 10^7$ Da ve mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN komplekslerinin molekül ağırlığı ise $1,06 \times 10^7$ Da çıkmıştır. Bu polimerlerin N/P=1 oranı için DLS yöntemiyle bulunan boyut sonuçları kullanılarak hesaplanan molekül ağırlığı değerleri sırasıyla $6,86 \times 10^7$ Da ve $2,08 \times 10^8$ Da olup AUC ve DLS yöntemleriyle bulunan molekül ağırlıkları birbirleriyle uyumludur.

Deneyisel çalışmalarda incelenen polimer/ODN kompleks yapılarının boyutları, bağlanan birim sayıları ve molekül ağırlıklarının bulunması hedeflenmiştir. Hem DLS hem de AUC sonuçlarına göre mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI ve mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI triblok kopolimerlerinin ODN ile kuvvetli etkileşim vererek çok sayıda polimer ve ODN molekülünün birleşerek çok büyük kompleks yapıları oluşturduğu bulunmuştur. Ayrıca molekül ağırlıkları 10^7 Da ve üzerinde çıkmıştır.

4.11 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN'nin MD Simülasyonları

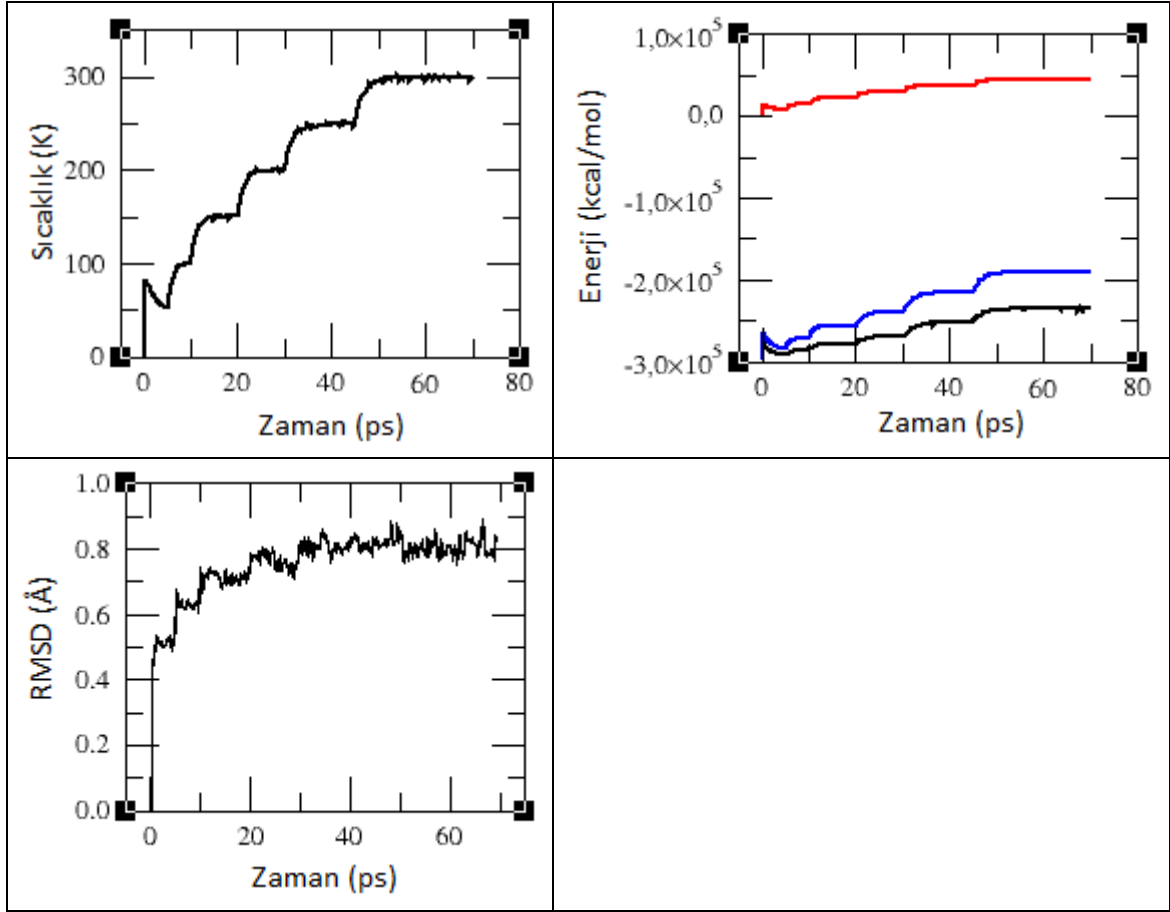
Tüm MD simülasyonları, birim hücre içinde ve su molekülleri varlığında gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.31'de mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI polimeri ve ODN molekülünün t=0 ve 50 ns'deki su içindeki anlık görüntüleri verilmiştir. Polimer ve ODN atomları, van der Waals (VDW) gösterim şekliyle büyük çaplı atomlar olarak çizilmiştir. Buna göre büyük kırmızı renkli atomlar ODN'ye, mavi renkli atomlar polimerin PEI kısmına,

turuncu renkli atomlar polimerin PCL kısmına ve gri atomlar polimerin PEG kısmına aittir. Gri arka fon üzerindeki noktasal kırmızı atomlar sudaki oksijen, beyaz atomlar ise sudaki hidrojen atomlarıdır. Su molekülleri içinde ODN ve polimer moleküllerinin görülmesi zor olduğundan, tez çalışmasında bundan sonra verilen anlık görüntülerde su molekülleri çıkarılmış sadece ODN ve polimer molekülleri gösterilmiştir.



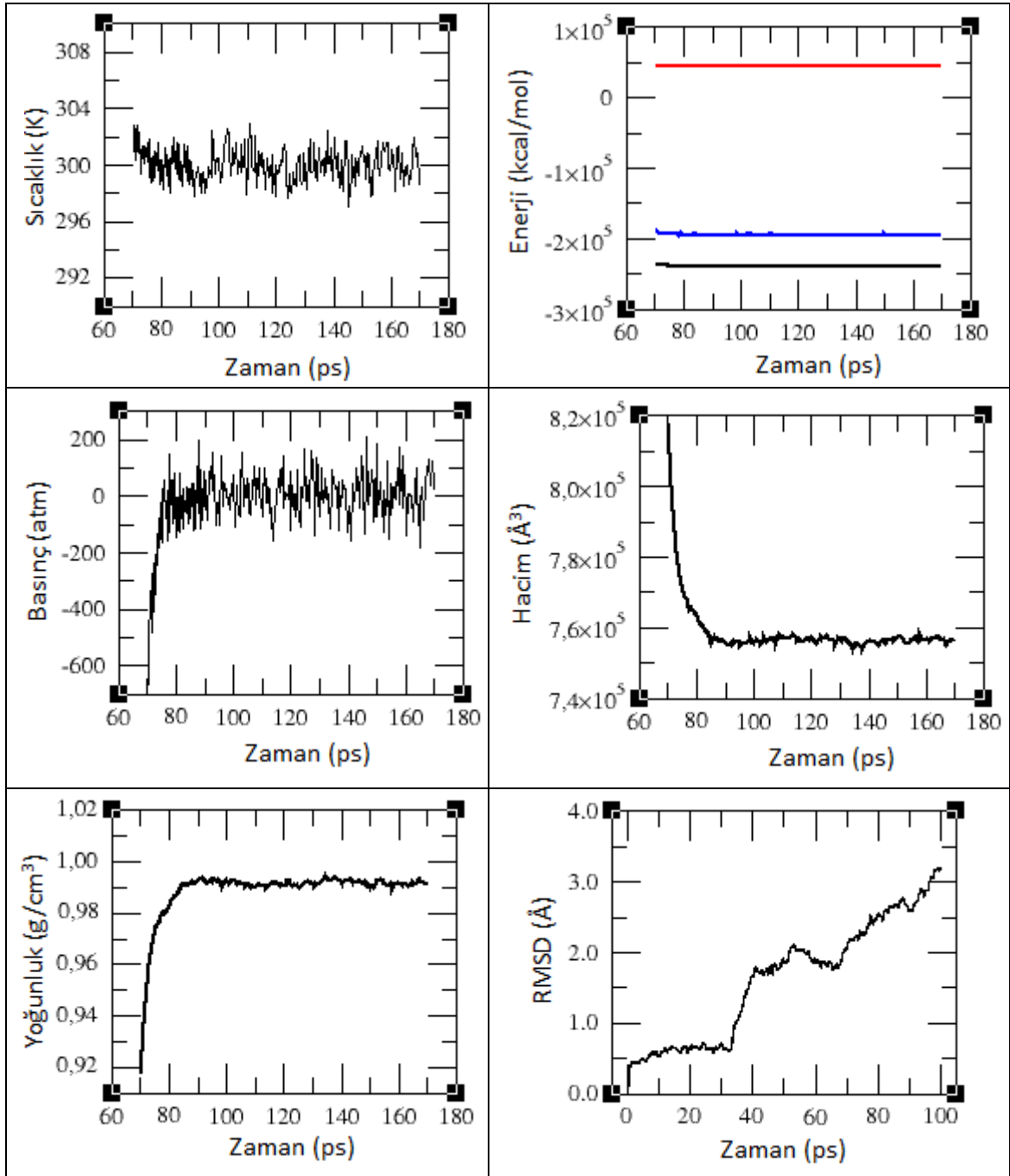
Şekil 4. 31 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN sisteminin su içindeki görüntüleri: t=0 ns (A), t=50 ns (B); ODN (●), PEI (●), PCL (●), PEG (●)

Tüm polimer/ODN simülasyonlarında, asıl simülasyonlara başlamadan önce sırasıyla minimizasyon, ısıtma ve dengelenme işlemleri yapılmıştır. Minimizasyon ve ısıtma işlemlerinde, hidrojen dışındaki diğer atomların hareket etmelerini engellemek için kısıtlamalar kullanılmıştır. Buna göre 200 adımlık minimizasyon işleminden sonra 70 ps'lik ısıtma gerçekleştirilmiştir. Isıtma süreci, her adımda 50 K'lık artışlarla toplam 6 adımdan oluşmakta ve süreç sonunda 0 K'den 300 K'e ulaşılmaktadır. Isıtma sürecine ait sıcaklık, enerji ve RMSD grafikleri Şekil 4.32'de görülmektedir. Isıtmada Langevin termostadı kullanıldığından her adım başlangıcında sıcaklıklarda hızlı artışlar olmakta ve ardından istenilen sıcaklıkta sabit kalınmaktadır. Yine ısıtma sürecine bağlı olarak artan sıcaklıkla beraber kinetik enerji artmakta ve her adımda kısa sürede dengeye ulaşılmaktadır. Sistemdeki ODN ve polimer moleküllerinin omurgalarına göre hesaplanan RMSD değeri de başlangıçta artış göstermekte ancak sonrasında dengeye yaklaşmaktadır. Bu grafiklere göre, başlangıçta 0 K'de ve ilk hızsız duran sistemdeki tüm atomlar, ısıtma süreciyle başarılı şekilde 300 K'e ulaştırılmıştır.



Şekil 4. 32 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN sisteminin ısıtma sürecine ait sıcaklık; potansiyel (—), kinetik (—) ve toplam (—) enerjiler ile RMSD grafikleri

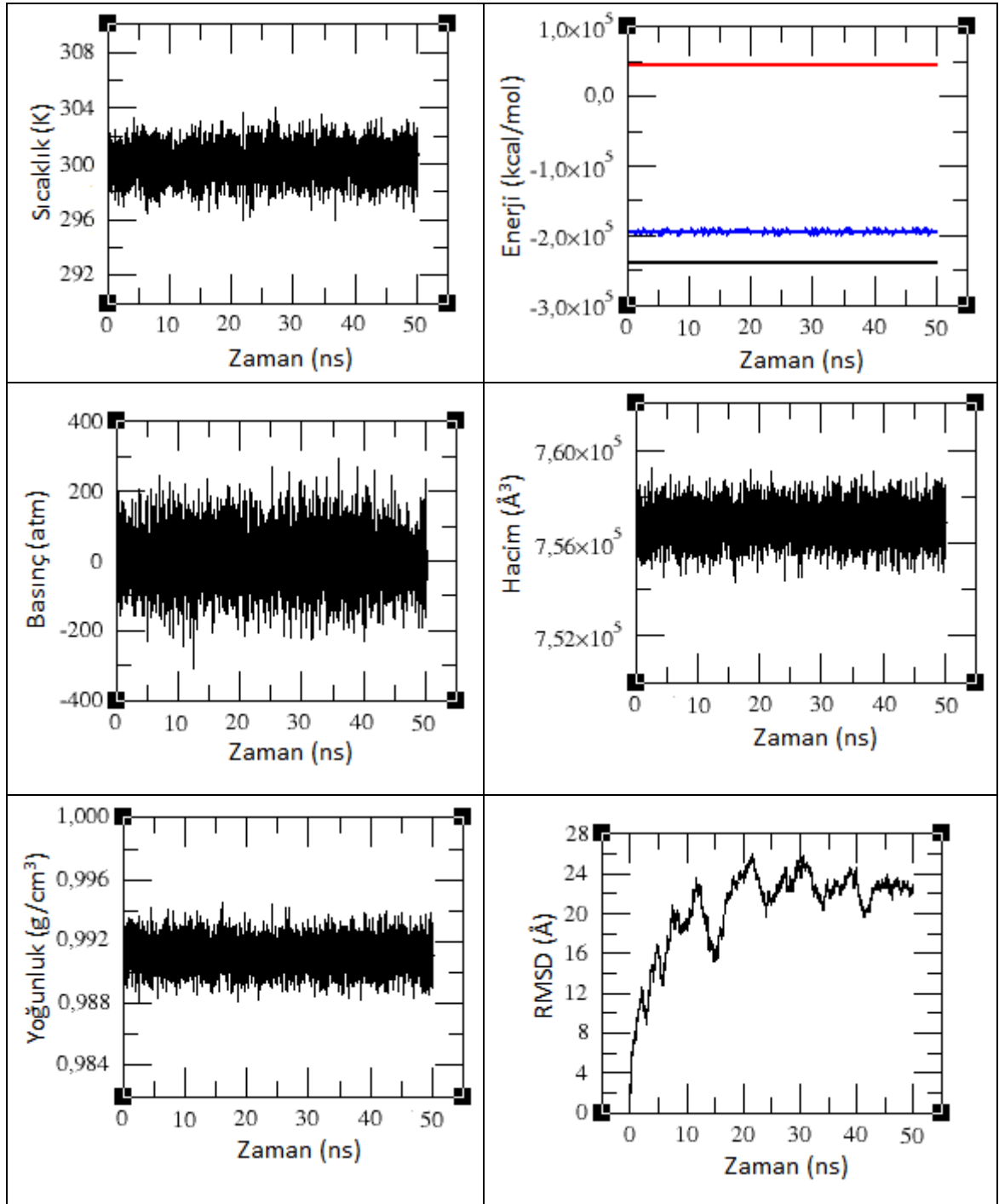
Şekil 4.33’de ısıtmadan sonra ve asıl simülasyonlardan önce gerçekleştirilen 100 ps’lik dengelenme sürecine ait analiz grafikleri verilmiştir. Grafikler, ısıtmanın sona erdiği 70. ps’den 170. ps’ye kadar çizilmiştir. Ancak RMSD grafiği farklı bir komut dosyasıyla oluşturulduğundan, zaman eksenini 0-100 ps arasında göstermektedir. Şekil 4.33’e göre sıcaklık değeri 300 K civarında sabit kalmaktadır. Yine potansiyel, kinetik ve toplam enerji grafikleri zamanla değişmemektedir. Dengelenme sürecinin başlangıcıyla beraber basınç 1 atm’e ayarlanmakta, buna bağlı olarak hacimde düşüş ve yoğunlukta artış olmuş ve 20 ps içinde dengelenme gerçekleşmiştir. RMSD grafiği, kısıtlamaların kademeli olarak kaldırılmasına bağlı olarak bir miktar artış göstermiştir. Bu grafiklere göre sistemin sıcaklık, enerji, basınç, hacim ve yoğunluk değerlerinin dengeye ulaştığı görülmektedir.



Şekil 4. 33 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN sisteminin dengelenme sürecine ait sıcaklık; potansiyel (–), kinetik (–) ve toplam (–) enerjiler ile basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri

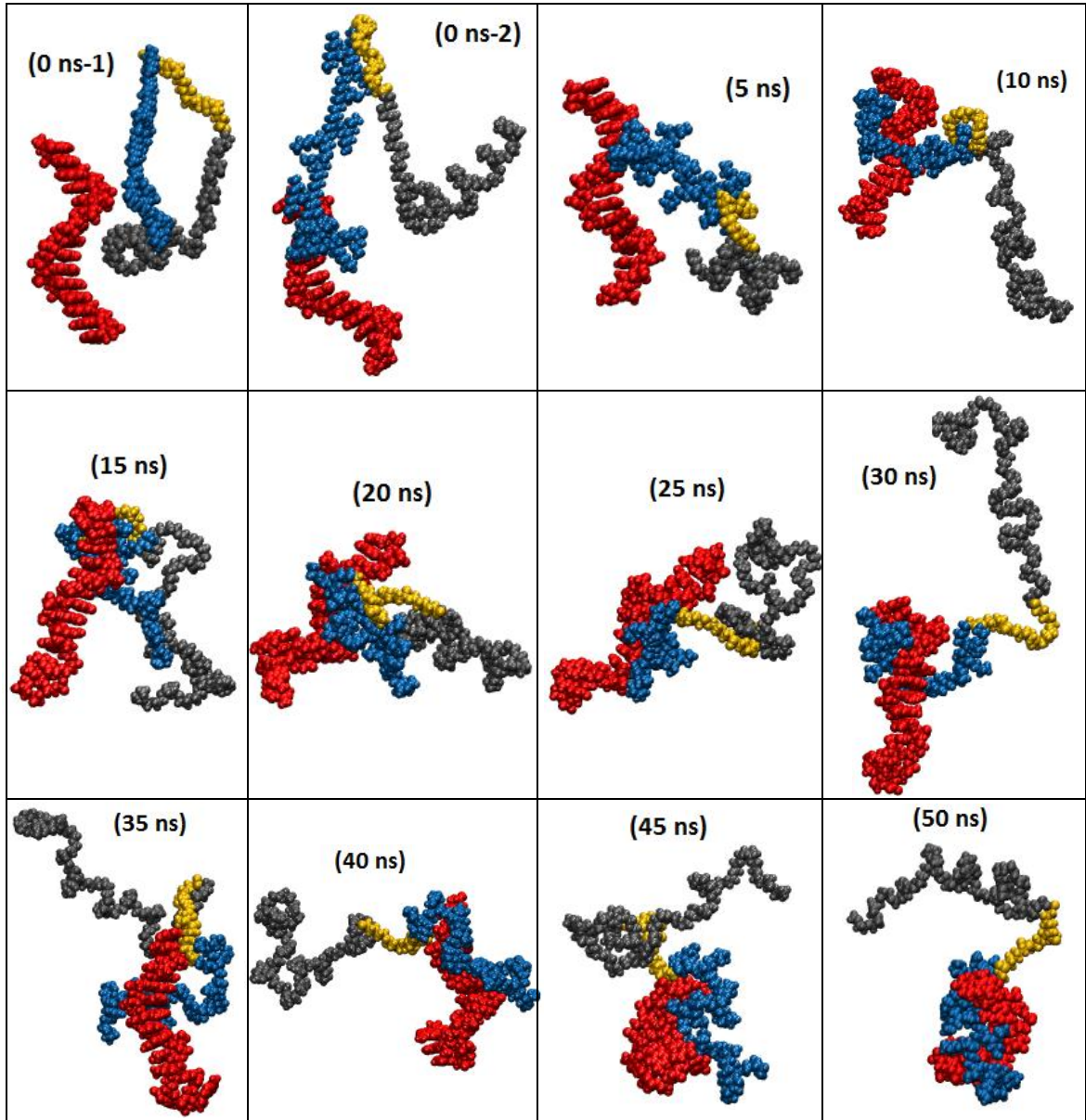
Şekil 4.34'te 50 ns'lik üretim simülasyonuna ait grafikler verilmiştir. Sistemin sıcaklık, enerji, basınç, hacim ve yoğunluk değerlerinin ortalama olarak sabit kaldığı görülmektedir. Buna göre simülasyonun sorunsuz şekilde gerçekleştirilmiş olduğu anlaşılmaktadır. Sistemdeki polimer ve ODN moleküllerinin omurga atomlarına göre hesaplanan RMSD değerleri ilk 10 ns'de sürekli artmıştır. Birbirlerinden belli uzaklıkta

bırakılan polimer ve ODN moleküllerinin birbirlerine yaklaşması ve kompleks oluşturması sırasında RMSD değerinin artması beklenmektedir. 10 ns'den sonra yaklaşık 22 Å değeri etrafında salınım olmaya başlamakta, bu salınımlar da süre ilerledikçe gittikçe küçülmektedir. Polimerin uzun zincirli olmasından dolayı polimer ve ODN arasında oluşan kompleksin yapısı zamanla bir miktar değişmekte ve kararlı kompleks yapısının bulunması zaman almaktadır. Ancak polimerin PEI ucu ile ODN arasında kompleks oluşumu gerçekleştikten sonra da polimerin PEG zinciri kendi başına hareket ettiğinden, kompleks yapısı bundan etkilenmeyi sürdürmektedir. Yaklaşık 40 ns'den sonra RMSD değerlerinin de dengelendiği görülmektedir.



Şekil 4. 34 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN sisteminin üretim simülasyonlarına ait sıcaklık; potansiyel (–), kinetik (–) ve toplam (–) enerjiler ile basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri

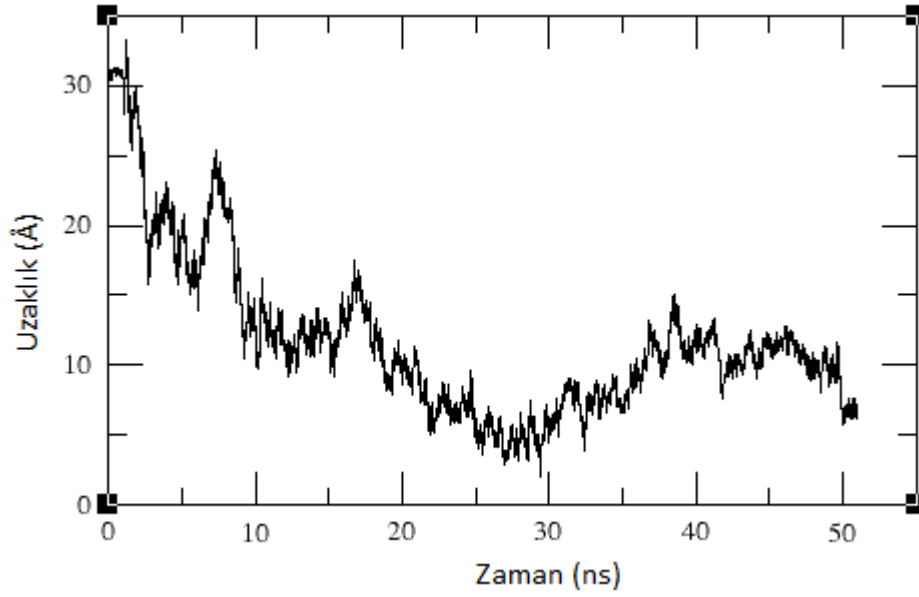
Üretim simülasyonlarının sonuçlarına göre, $t=0$ anında belli uzaklıkta ayrı ayrı duran mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI polimeri ile ODN molekülü simülasyon başladıktan sonra yaklaşmış ve hemen kompleks oluşturmuştur. Kompleks oluşumu ODN ile polimerin pozitif yüklü olan PEI kısmı arasında gerçekleşmiştir. Şekil 4.35'te simülasyona ait 5 ns aralıklarla alınmış anlık görüntüler verilmiştir. (0 ns-1) şeklinde ODN ve polimerin ayrı ayrı durduğu gözükmemektedir ancak PEG ve PEI kısımları da üst üste çıkmıştır. (0 ns-2) şeklinde sistem kendi etrafında bir miktar döndürülmüştür, bu şekilde PEG ve PEI kısımlarının ayrı ayrı durduğu net şekilde görülmektedir. Sistem bu şekilde başlatıldıktan sonra ODN ve PEI atomlarının birbirlerine çekilmesiyle kompleks oluşumu gerçekleşmiştir. Tüm simülasyon boyunca ODN ve PEI atomları birbirlerine yakın dururken PEG zinciri ODN'nin uzağında kalmış ve su ortamı içinde konformasyonunda rastgele ve sürekli değişimler meydana gelmiştir. Bir ucu PEI'ye diğer ucu PEG'e bağlı olan PCL kısmı ise, bir yandan PEI tarafından ODN'ye yaklaştırılmaya çalışılırken diğer yandan PEG tarafından uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. PEG zincirinin rastgele hareketinin PCL aracılığıyla PEI'ye etki etmesi, PEI'nin ODN ile oluşturduğu kompleks yapısını etkilemekte ve PEI'nin bu ucunun ODN'ye tam sarılması engellenebilmektedir.



Şekil 4. 35 mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN sistemine ait 5 ns aralıklarla alınmış anlık görüntüler; ODN (●), PEI (●), PCL (●), PEG (●)

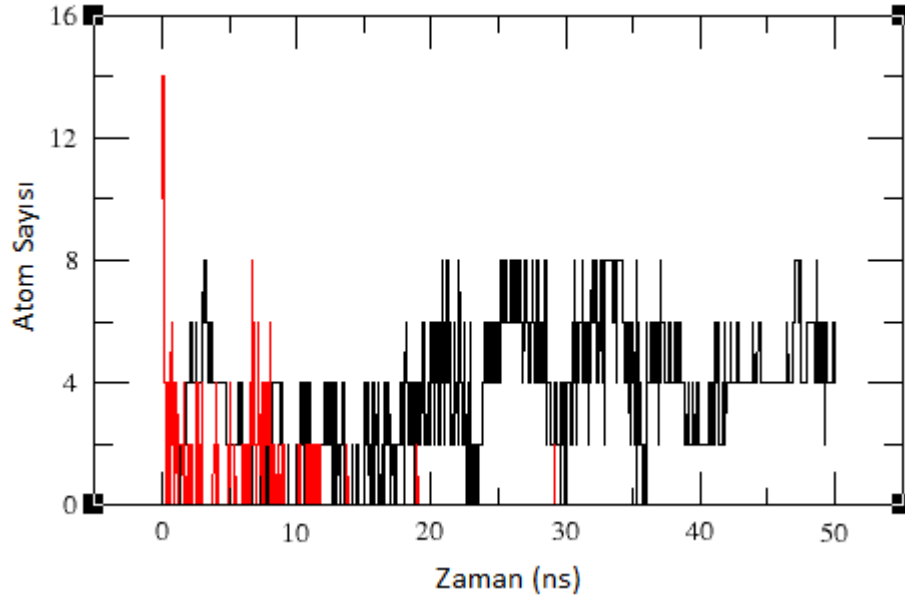
Şekil 4.36'da PEI ve ODN moleküllerinin kütle merkezleri arasındaki uzaklığın zamanla değişimi görülmektedir. $t=0$ anında kütle merkezleri arasında yaklaşık 30 Å mesafe bulunurken, simülasyon başladıktan sonra moleküllerin birbirlerine yaklaşmaları sonucu 20 ns içinde bu mesafe 10 Å'nın altına düşmüştür. Bu durum, polimer ve DNA'nın çok kısa bir süre içinde bağlandığını göstermektedir. Kütle merkezleri arasındaki uzaklık 30 ns'ye kadar bir miktar daha azalmış, daha sonra 40 ns'ye kadar biraz artmış ve 50 ns sonunda yine 10 Å'nın altında kalmıştır. Kütle merkezleri arasındaki uzaklığın bu şekilde salınmasının, PCL ve PEG zincirlerinin PEI'yi etkilemesi

sonucu PEI'nin ODN ile oluşturduğu kompleks yapısındaki değişimler olduğu düşünülmektedir.



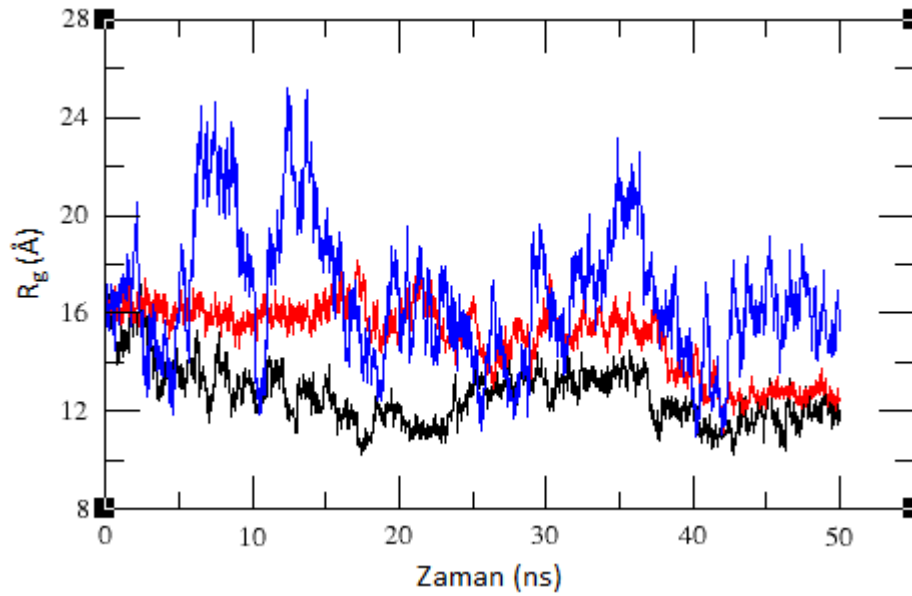
Şekil 4. 36 PEI ve ODN moleküllerinin kütle merkezleri arasındaki uzaklığın zamanla değişimi

Şekil 4.37’de birbirlerine 5.4 Å’den yakın olan atomların sayıları verilmiştir. Şekildeki kırmızı çizgiler ODN’nin fosfor atomlarıyla Na^+ iyonları için, siyah çizgiler ise ODN’nin fosfor atomlarıyla PEI’nin protonlanmış amin azot atomları için çizilmiştir. Grafiğe göre başlangıçta fosfor atomlarının etrafında Na^+ iyonları bulunurken, simülasyon sırasında bu iyonlar uzaklaşmış ve protonlanmış amin azotları yaklaşmıştır. Bu durum, kompleks oluşumunun ODN etrafından Na^+ iyonlarının salınması ve protonlanmış azot atomlarının çekilmesi ile oluştuğunu göstermektedir.



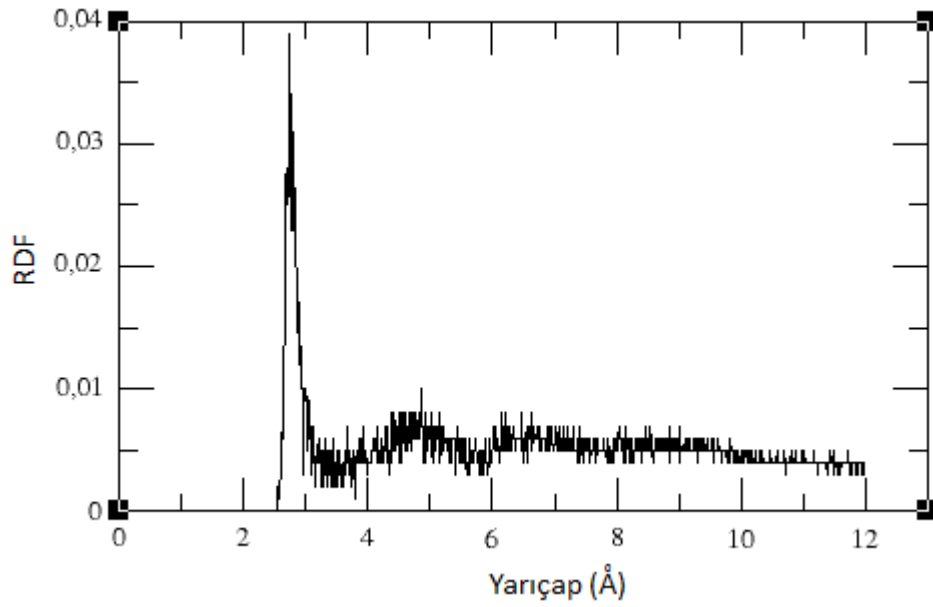
Şekil 4. 37 ODN'nin fosfor atomlarına 5.4 Å'den yakın bulunan protonlanmış amin azot atomlarının (–) ve Na⁺ iyonlarının (–) sayılarının zamanla değişimi

Şekil 4.38'de PEI, DNA ve PEG moleküllerinin ayrı ayrı R_g jirasyon yarıçaplarının zamanla değişimi verilmiştir. PEI ve DNA'nın yarıçapları zamanla azalmakta ve başlangıçta yaklaşık 16 Å olan yarıçap değerleri 50 ns sonunda yaklaşık 12 Å'e düşmektedir. Bunun sonucunda DNA'nın daha kompakt hale geçtiği söylenebilir. PEG zincirinde ise geniş bir salınım olmakla beraber ilk ve son andaki değerleri yaklaşık 16 Å olup net bir kompaktlaşma olmamaktadır.



Şekil 4. 38 PEI (–), DNA (–) ve PEG (–) için jirasyon yarıçap değerlerinin zamanla değişimi

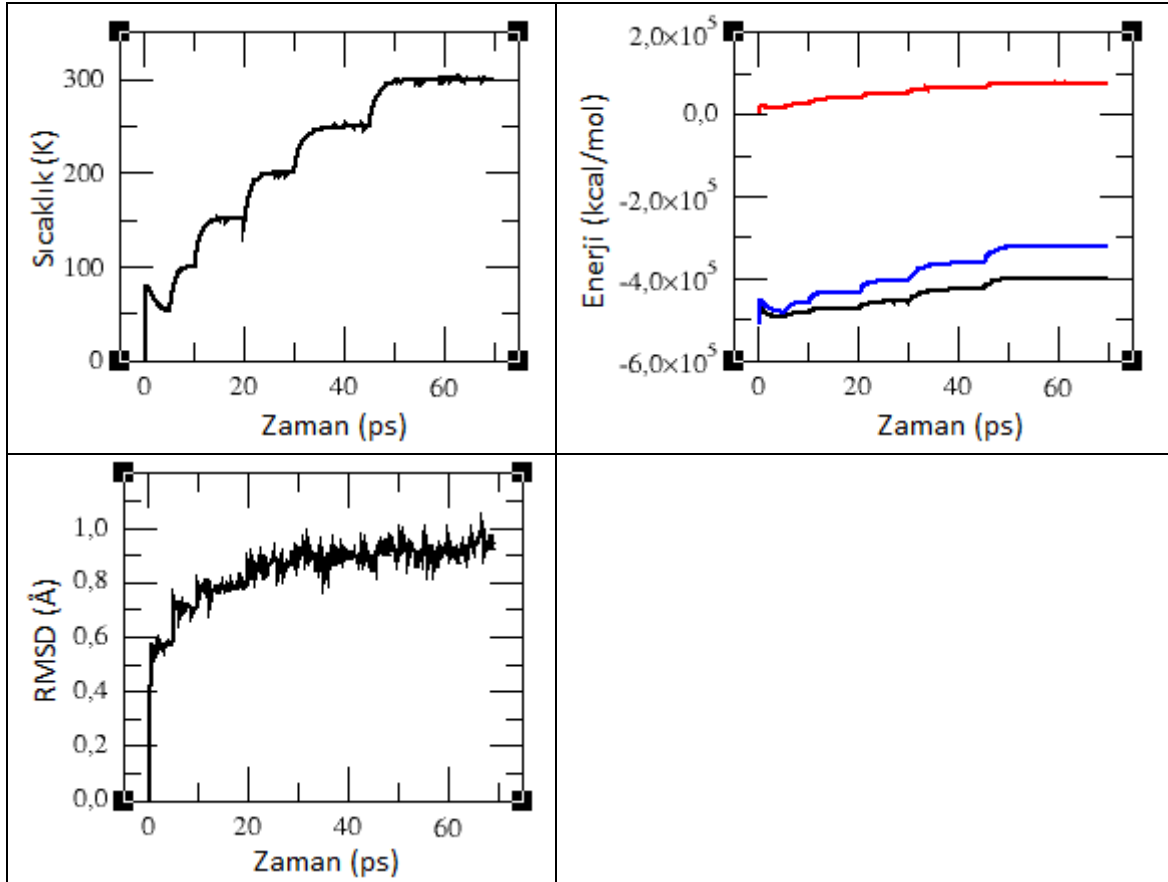
Şekil 4.39’da DNA’nın O1P ve O2P atomları ile PEI’nin protonlanmış amin azot atomları arasındaki radyal dağılım fonksiyonu (RDF) verilmiştir. RDF grafiği, simülasyonun son 10 ns’sinin verileri ile çizilmiştir. Grafiğe göre 2,5-3 Å ve yaklaşık 5 Å değerlerinde iki belirgin pik çıkmıştır. Birinci pik, fosfat oksijenleri ile amin azotları arasında H-bağları kurulacak şekilde amin ve fosfat gruplarının doğrudan temasından kaynaklanan birincil etkileşimlerin sonucudur. İkinci pik ise, su aracılığıyla oluşan H-bağları veya diğer daha az doğrudan temaslarla olan etkileşimlerin yani ikincil etkileşimlerin sonucudur.



Şekil 4. 39 DNA’nın O1P ve O2P atomları ile PEI’nin protonlanmış amin azot atomları arasındaki radyal dağılım fonksiyonu

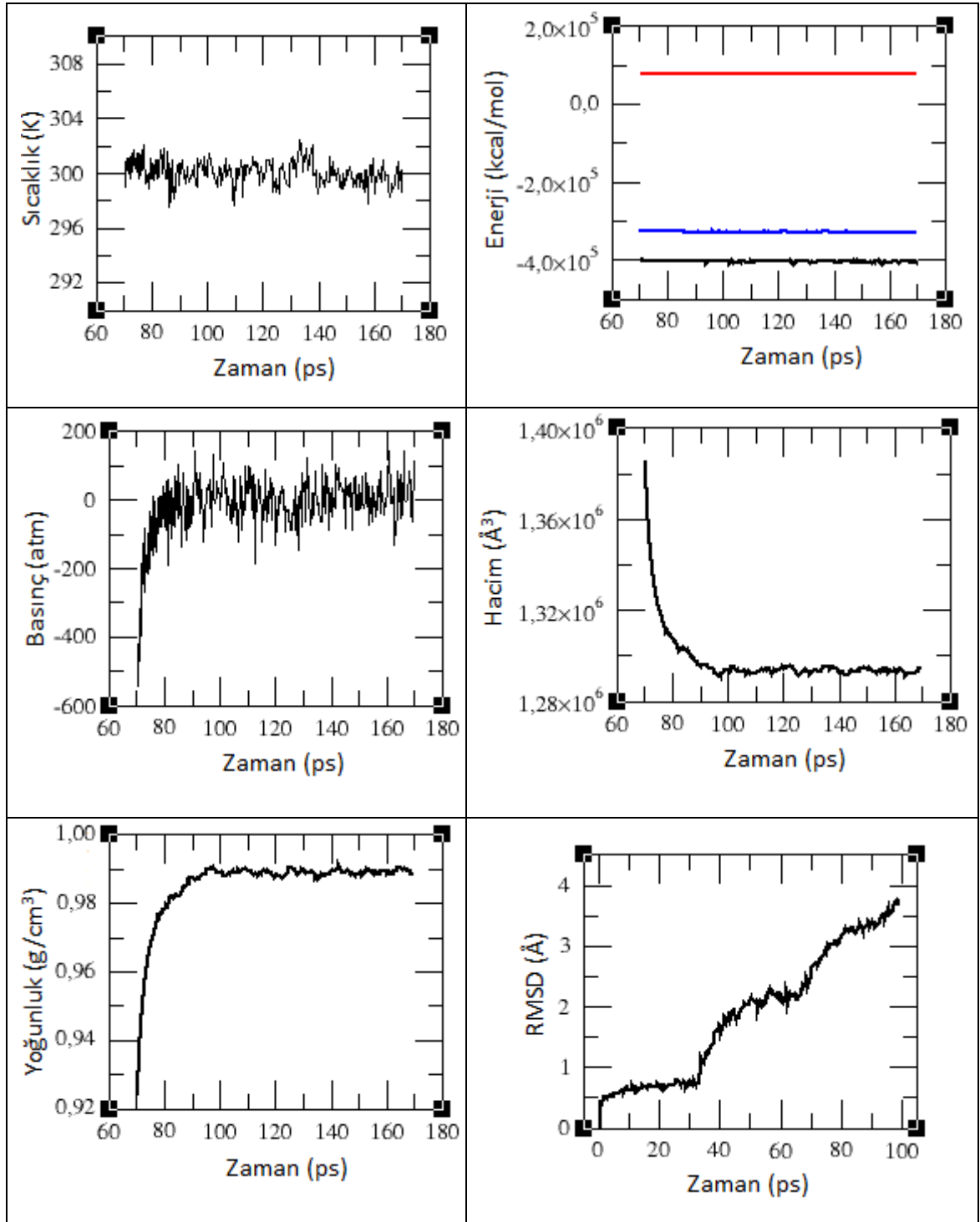
4.12 mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN'nin MD Simülasyonları

Şekil 4.40'da mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN sisteminin ısıtma sürecine ait sıcaklık, enerji ve RMSD grafikleri verilmiştir. Grafiklere göre ısıtma süreci düzgün şekilde gerçekleşmiş ve sistem 300 K'e ulaşmıştır.



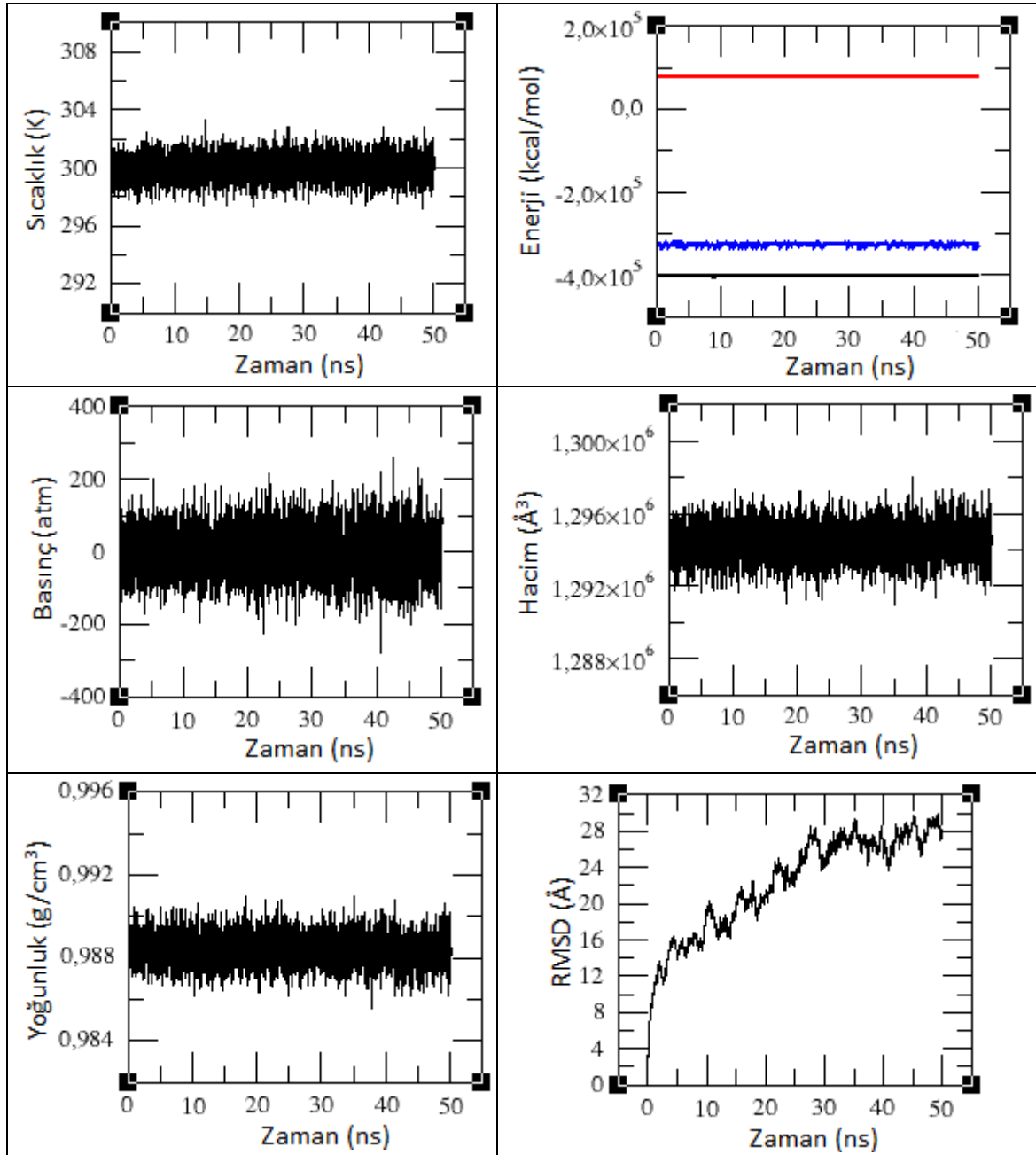
Şekil 4. 40 mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN sisteminin ısıtma sürecine ait sıcaklık; potansiyel (–), kinetik (–) ve toplam (–) enerjiler ile RMSD grafikleri

Şekil 4.41'de dengelenme sürecine ait sıcaklık, enerji, basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri verilmiştir. Sıcaklık ve enerji grafikleri dengede gözükmemektedir. Basınç, hacim ve yoğunluk değerleri de 20 ps içinde dengelenmektedir. RMSD grafiği, kısıtlamaların kademeli olarak kaldırılmasına bağlı olarak bir miktar artış göstermiştir. Bu grafiklere göre sistemin sıcaklık, enerji, basınç, hacim ve yoğunluk değerlerinin dengeye ulaştığı görülmektedir.



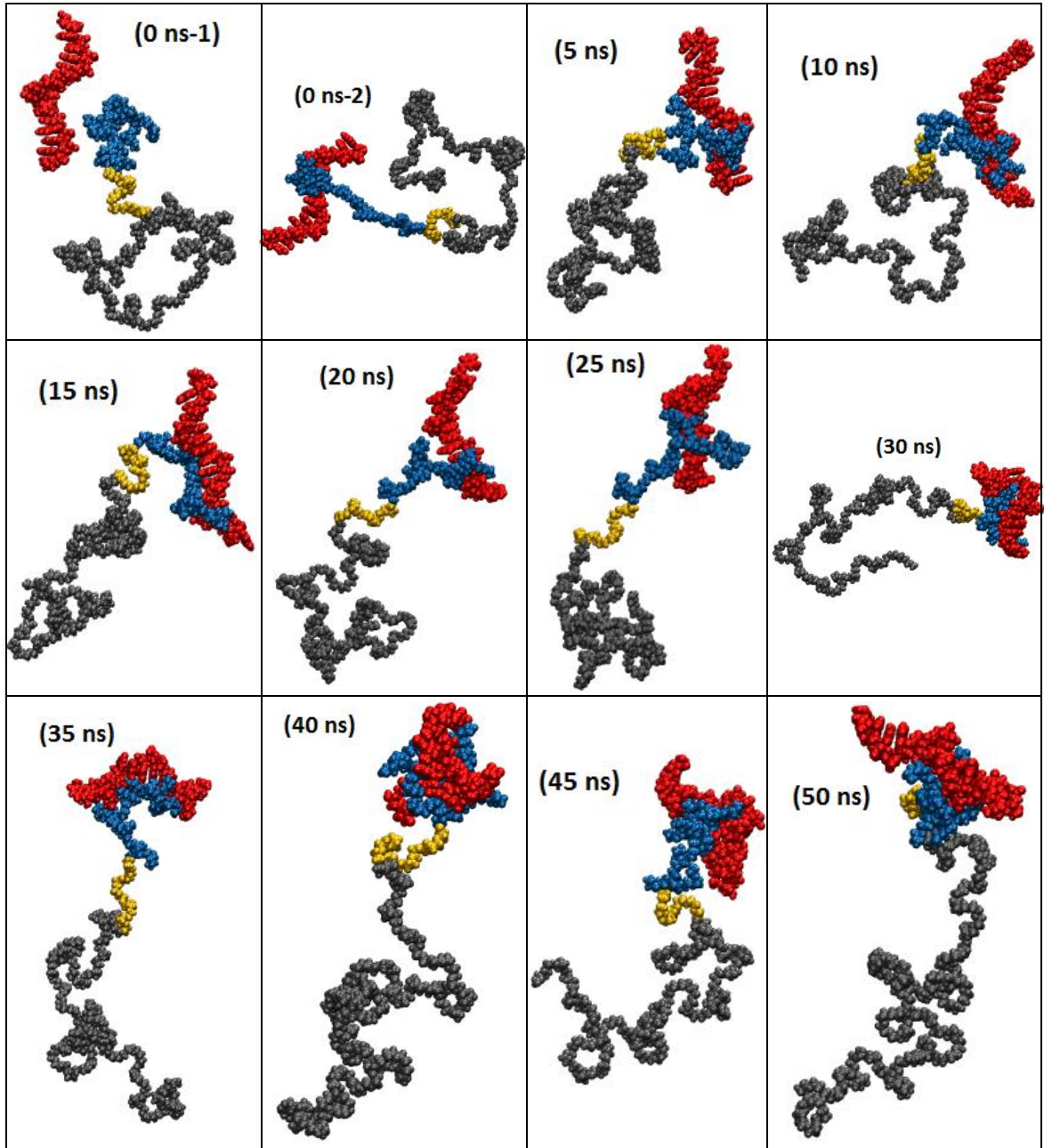
Şekil 4. 41 mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN sisteminin dengelenme sürecine ait sıcaklık; potansiyel (–), kinetik (–) ve toplam (–) enerjiler ile basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri

Şekil 4.42’de üretim simülasyonlarına ait sıcaklık, enerji, basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri verilmiştir. Sıcaklık, enerji, basınç, hacim ve yoğunluk değerleri tüm simülasyon boyunca belirli ortalamalarda sabit kalmıştır. RMSD grafiği ilk birkaç ns içinde hızla artarken daha sonra artış oranı giderek azalmıştır ve yaklaşık 30 ns’den sonra dengelenmeye başlamıştır. Bu grafiklere göre simülasyonun düzgün şekilde gerçekleştiği anlaşılmaktadır.



Şekil 4. 42 mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN sisteminin üretim simülasyonlarına ait sıcaklık; potansiyel (–), kinetik (–) ve toplam (–) enerjiler ile basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri

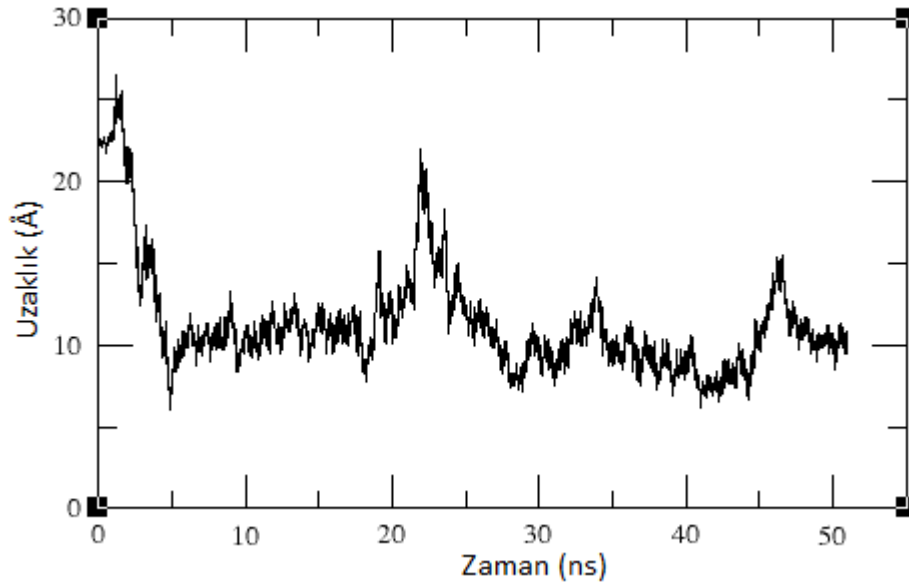
Üretim simülasyonlarının sonuçlarına göre, $t=0$ anında belli uzaklıkta ayrı ayrı duran mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI polimeri ile ODN molekülü simülasyon başladıktan sonra yaklaşmış ve hemen kompleks oluşturmuştur. Şekil 4.43’de simülasyona ait 5 ns aralıklarla alınmış anlık görüntüler verilmiştir. Tüm simülasyon boyunca ODN ve PEI atomları birbirlerine yakın dururken PEG zinciri ODN’nin uzağında kalmış ve su ortamı içinde konformasyonunda rastgele ve sürekli değişimler meydana gelmiştir. Bir ucu PEI’ye diğer ucu PEG’e bağlı olan PCL kısmı ise, bir yandan PEI tarafından ODN’ye yaklaştırılmaya çalışılırken diğer yandan PEG tarafından uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. PEG zincirinin rastgele hareketinin PCL aracılığıyla PEI’ye etki etmesi, PEI’nin ODN ile oluşturduğu kompleks yapısını etkilemekte ve PEI’nin bu ucunun ODN’ye tam sarılması engellenebilmektedir.



Şekil 4. 43 mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN sistemine ait 5 ns aralıklarla alınmış anlık görüntüler; ODN (●), PEI (●), PCL (●), PEG (●)

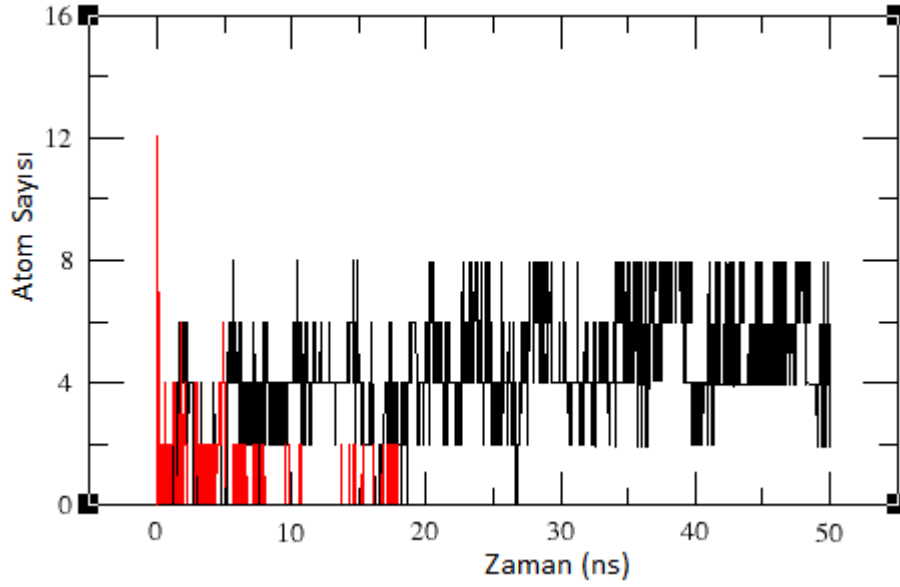
Şekil 4.44'te PEI ve ODN moleküllerinin kütle merkezleri arasındaki uzaklığın zamanla değişimi görülmektedir. $t=0$ anında kütle merkezleri arasında yaklaşık 22-23 Å mesafe bulunurken, simülasyon başladıktan sonra moleküllerin birbirlerine yaklaşmaları sonucu 5 ns içinde bu mesafe 10 Å civarına düşmüştür. Bu durum, polimer ve DNA'nın çok kısa bir süre içinde bağlandığını göstermektedir. Kütle merkezleri arasındaki uzaklık 20-25 ns belirgin bir pik yapmış olup bunun sebebi bu zaman zarfında kompleks

yapısındaki değişimlerdir. Şekil 4.43’de 20. ns’ye ait anlık grafikte PEI’nin ODN’nin ucuna kaydığı sonraki anlık görüntülerde ise tekrar ortadan bağlandığı görülmektedir.



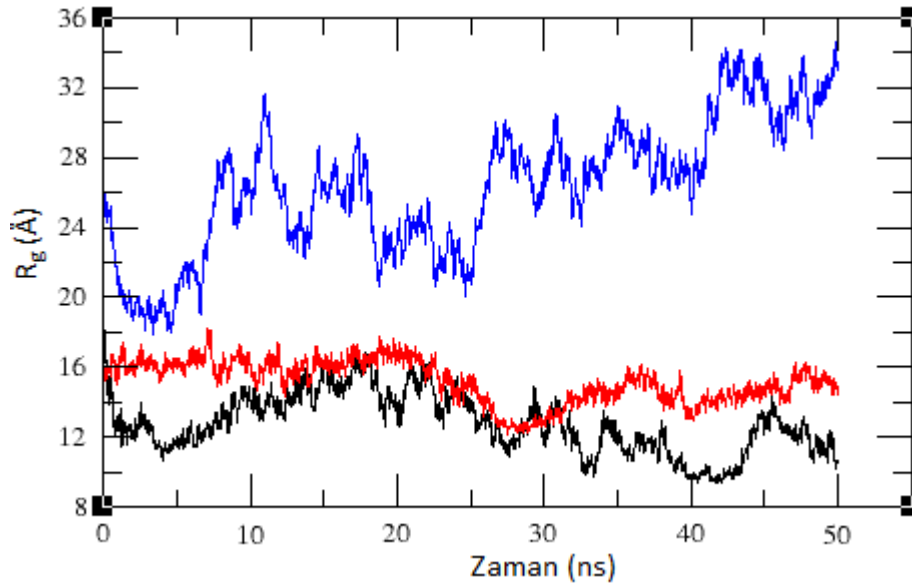
Şekil 4. 44 PEI ve ODN moleküllerinin kütle merkezleri arasındaki uzaklığın zamanla değişimi

Şekil 4.45'te birbirlerine 5.4 Å'den yakın olan atomların sayıları verilmiştir. Şekildeki kırmızı çizgiler ODN'nin fosfor atomlarıyla Na^+ iyonları için, siyah çizgiler ise ODN'nin fosfor atomlarıyla PEI'nin protonlanmış amin azot atomları için çizilmiştir. Grafiğe göre başlangıçta fosfor atomlarının etrafında Na^+ iyonları bulunurken, simülasyon sırasında bu iyonlar uzaklaşmış ve protonlanmış amin azotları yaklaşmıştır. Bu durum, kompleks oluşumunun ODN etrafından Na^+ iyonlarının salınması ve protonlanmış azot atomlarının çekilmesi ile oluştuğunu göstermektedir.



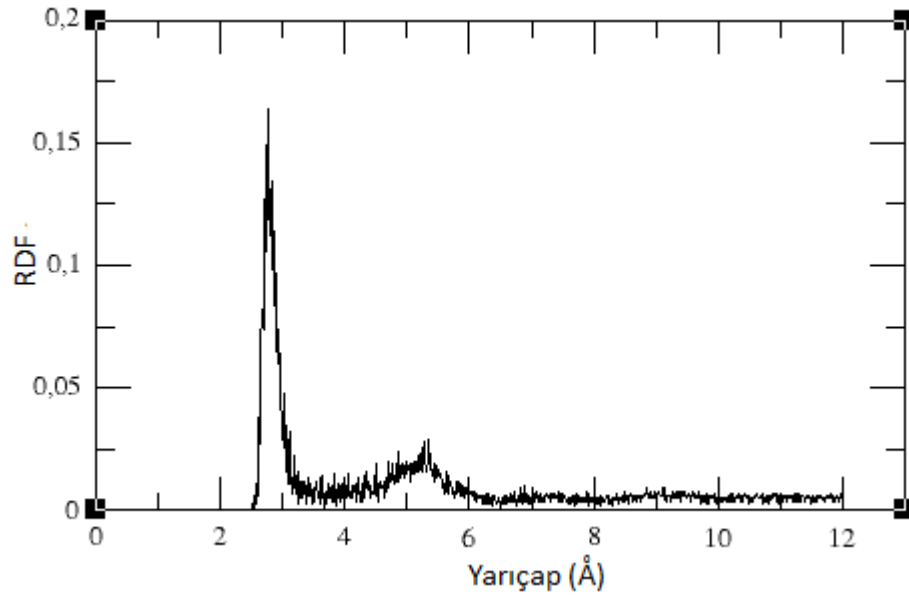
Şekil 4. 45 ODN'nin fosfor atomlarına 5.4 Å'den yakın bulunan protonlanmış amin azot atomlarının (–) ve Na⁺ iyonlarının (–) sayılarının zamanla değişimi

Şekil 4.46'da PEI, DNA ve PEG moleküllerinin ayrı ayrı R_g jirasyon yarıçaplarının zamanla değişimi verilmiştir. PEI ve DNA'nın yarıçapları zamanla bir miktar azalmaktayken PEG'in yarıçapında büyük dalgalanmalar ve artış görülmektedir.



Şekil 4. 46 PEI (–), DNA (–) ve PEG (–) için jirasyon yarıçap değerlerinin zamanla değişimi

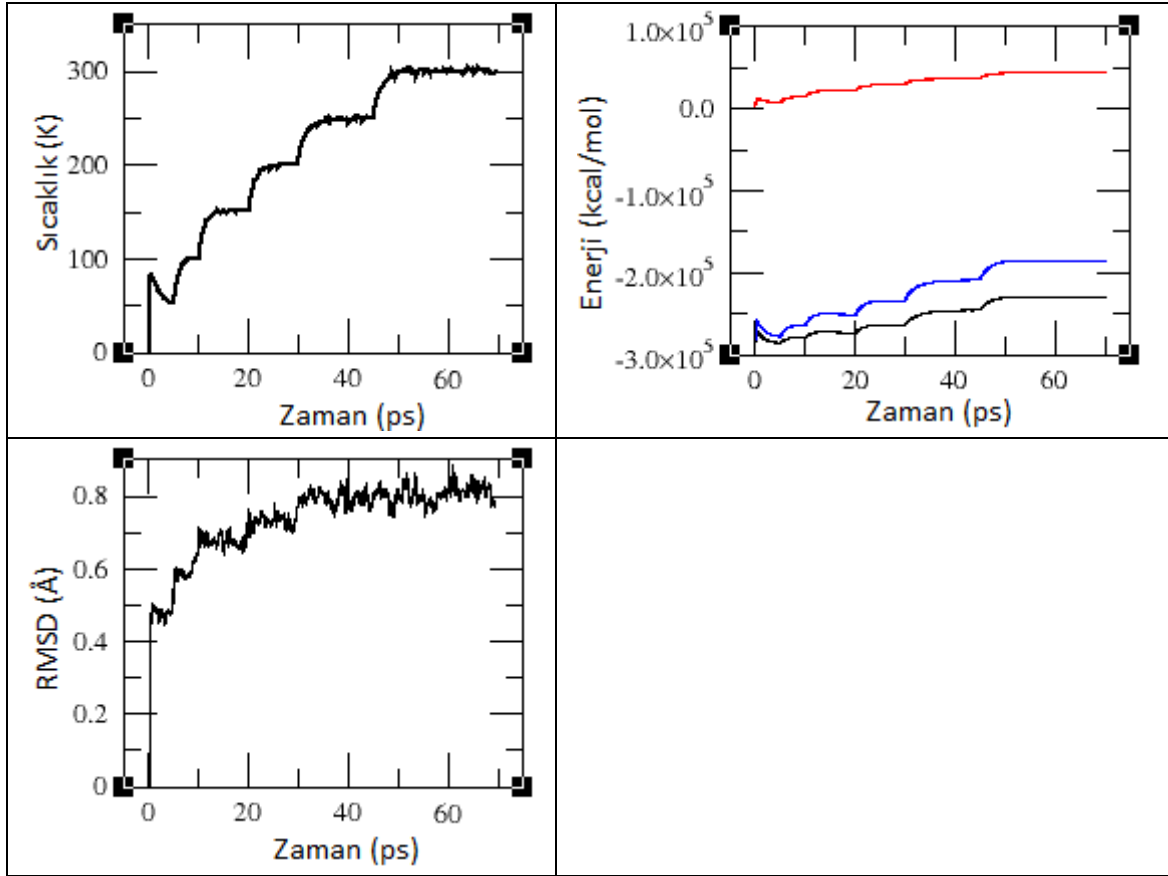
Şekil 4.47’de DNA’nın O1P ve O2P atomları ile PEI’nin protonlanmış amin azot atomları arasındaki radyal dağılım fonksiyonu (RDF) verilmiştir. RDF grafiği, simülasyonun son 10 ns’sinin verileri ile çizilmiştir. Grafiğe göre 2,5-3 Å ve yaklaşık 5 Å değerlerinde iki belirgin pik çıkmıştır. Birinci pik, fosfat oksijenleri ile amin azotları arasında H-bağları kurulacak şekilde amin ve fosfat gruplarının doğrudan temasından kaynaklanan birincil etkileşimlerin sonucudur. İkinci pik ise, su aracılığıyla oluşan H-bağları veya diğer daha az doğrudan temaslarla olan etkileşimlerin yani ikincil etkileşimlerin sonucudur.



Şekil 4. 47 DNA’nın O1P ve O2P atomları ile PEI’nin protonlanmış amin azot atomları arasındaki radyal dağılım fonksiyonu

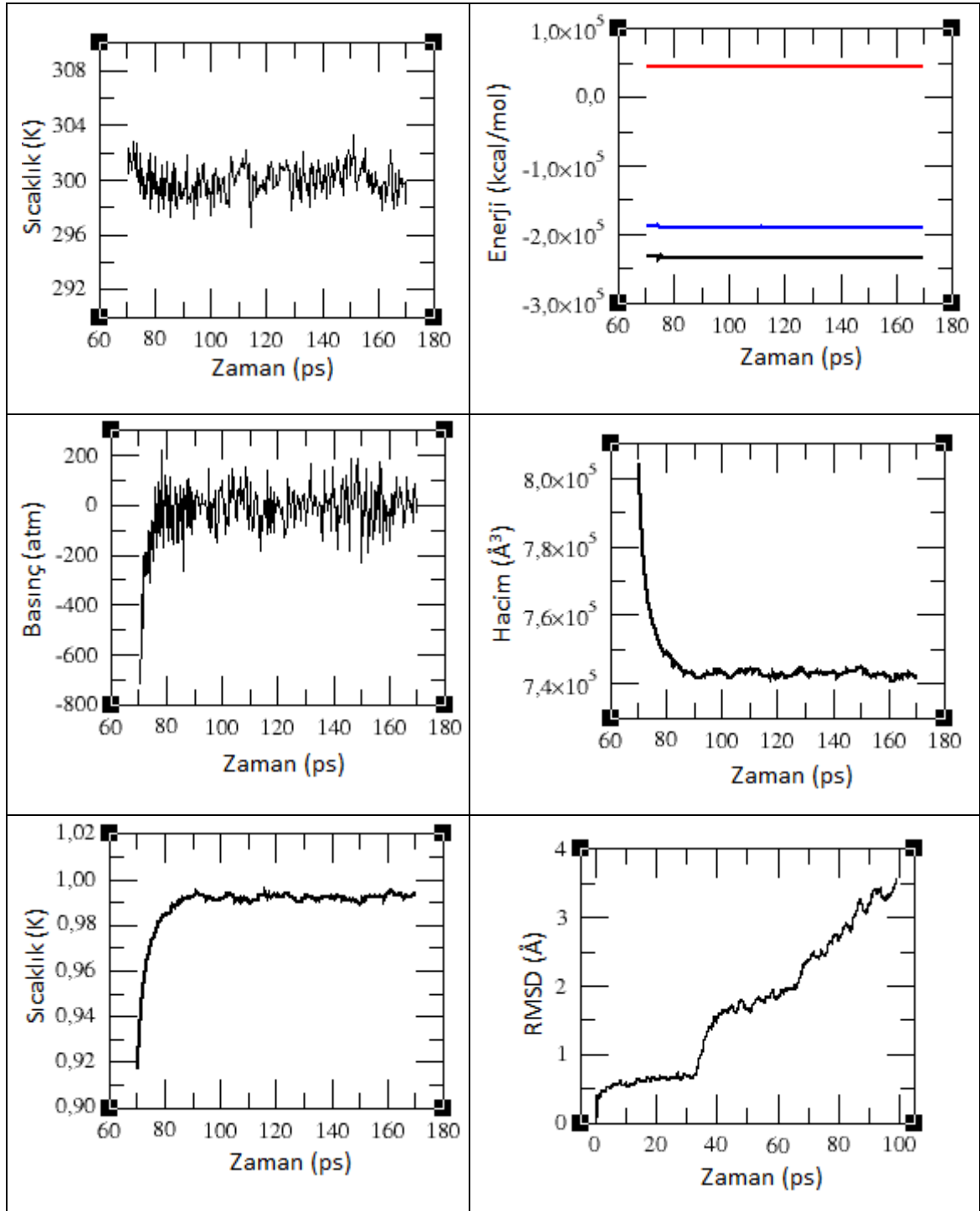
4.13 mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN'nin MD Simülasyonları

Şekil 4.48'de mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN sisteminin ısıtma sürecine ait sıcaklık, enerji ve RMSD grafikleri verilmiştir. Grafiklere göre ısıtma süreci düzgün şekilde gerçekleşmiş ve sistem 300 K'e ulaşmıştır.



Şekil 4. 48 mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN sisteminin ısıtma sürecine ait sıcaklık; potansiyel (–), kinetik (–) ve toplam (–) enerjiler ile RMSD grafikleri

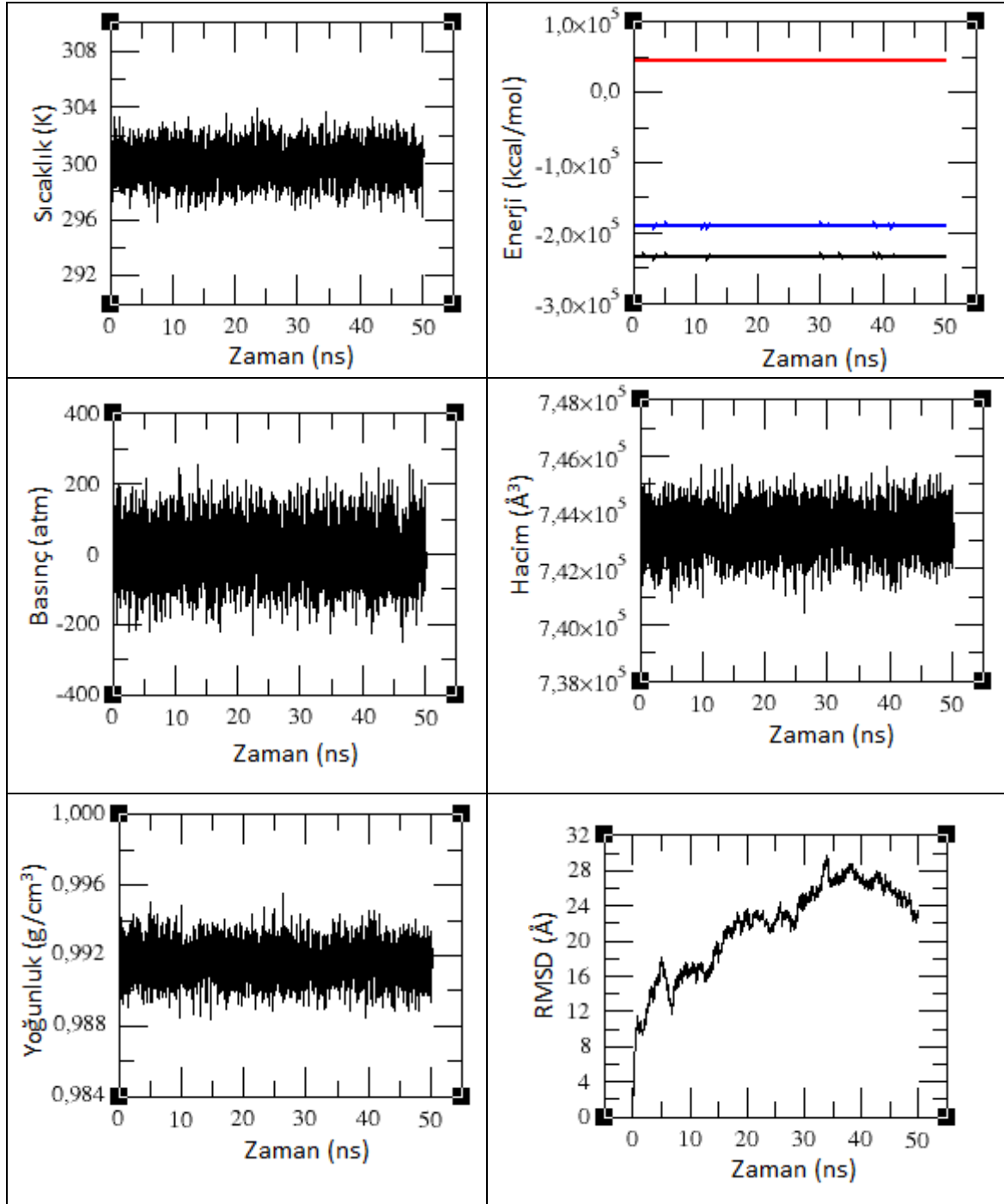
Şekil 4.49'da dengelenme sürecine ait sıcaklık, enerji, basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri verilmiştir. Sıcaklık ve enerji grafikleri dengede gözükmemektedir. Basınç, hacim ve yoğunluk değerleri de 20 ps içinde dengelenmektedir. RMSD grafiği, kısıtlamaların kademeli olarak kaldırılmasına bağlı olarak bir miktar artış göstermiştir. Bu grafiklere göre sistemin sıcaklık, enerji, basınç, hacim ve yoğunluk değerlerinin dengeye ulaştığı görülmektedir.



Şekil 4. 49 mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN sisteminin dengelenme sürecine ait sıcaklık; potansiyel (–), kinetik (–) ve toplam (–) enerjiler ile basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri

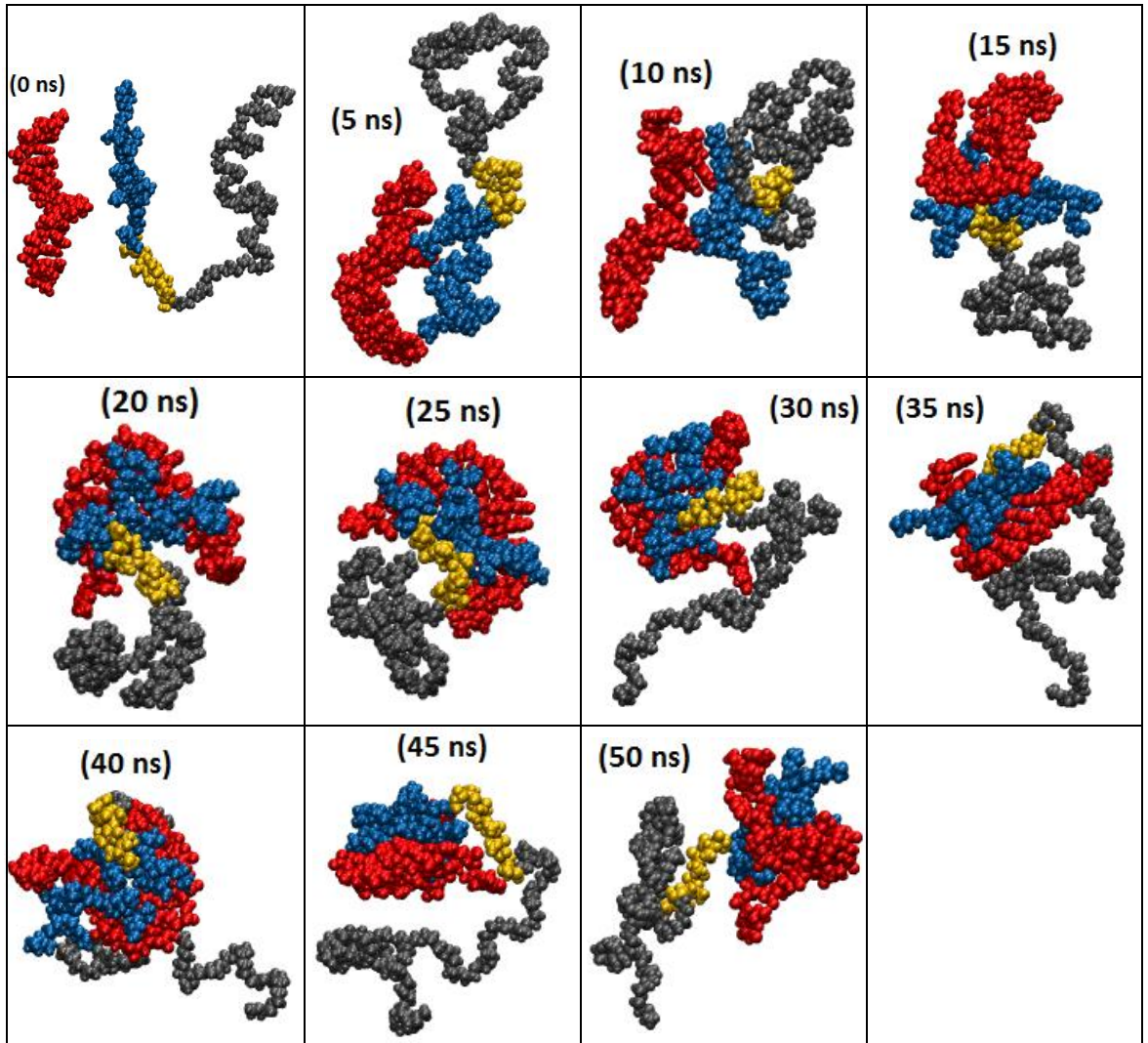
Şekil 4.50’de üretim simülasyonlarına ait sıcaklık, enerji, basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri verilmiştir. Sıcaklık, enerji, basınç, hacim ve yoğunluk değerleri tüm simülasyon boyunca belirli ortalamalarda sabit kalmıştır. RMSD değeri yaklaşık 40 ns’ye kadar artmış daha sonraysa bir miktar azalmış olup yaklaşık bu sürelerdeki RMSD

değerleri denge durumuna karşılık gelmektedir. Bu grafiklere göre simülasyonun düzgün şekilde gerçekleştiği anlaşılmaktadır.



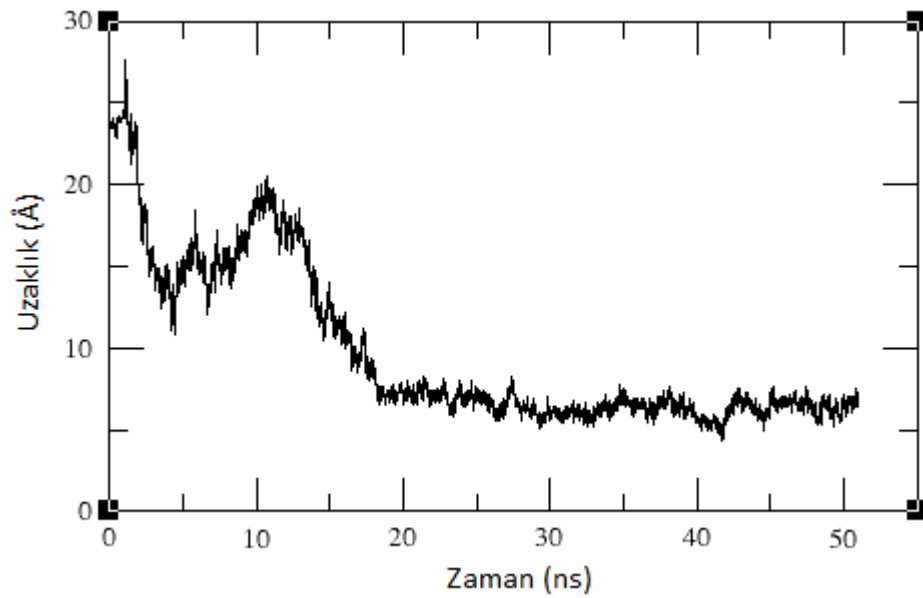
Şekil 4. 50 mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN sisteminin üretim simülasyonlarına ait sıcaklık; potansiyel (–), kinetik (–) ve toplam (–) enerjiler ile basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri

Üretim simülasyonlarının sonuçlarına göre, $t=0$ anında belli uzaklıkta ayrı ayrı duran mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI polimeri ile ODN molekülü simülasyon başladıktan sonra yaklaşmış ve hemen kompleks oluşturmuştur. Şekil 4.51’de simülasyona ait 5 ns aralıklarla alınmış anlık görüntüler verilmiştir. Tüm simülasyon boyunca ODN ve PEI atomları birbirlerine yakın dururken PEG zinciri ODN’nin uzağında kalmış ve su ortamı içinde konformasyonunda rastgele ve sürekli değişimler meydana gelmiştir. Bir ucu PEI’ye diğer ucu PEG’e bağlı olan PCL kısmı ise, bir yandan PEI tarafından ODN’ye yaklaştırılmaya çalışılırken diğer yandan PEG tarafından uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. PEG zincirinin rastgele hareketinin PCL aracılığıyla PEI’ye etki etmesi, PEI’nin ODN ile oluşturduğu kompleks yapısını etkilemekte ve PEI’nin bu ucunun ODN’ye tam sarılması engellenebilmektedir.



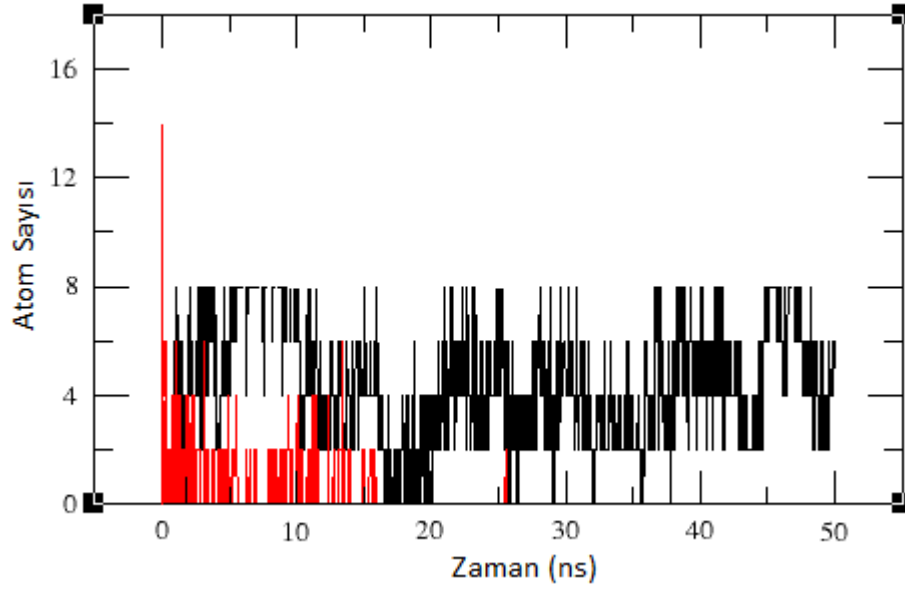
Şekil 4. 51 mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN sistemine ait 5 ns aralıklarla alınmış anlık görüntüler; ODN (●), PEI (●), PCL (●), PEG (●)

Şekil 4.52’de PEI ve ODN moleküllerinin kütle merkezleri arasındaki uzaklığın zamanla değişimi görülmektedir. $t=0$ anında kütle merkezleri arasında yaklaşık 24 Å mesafe bulunurken, simülasyon başladıktan sonra moleküllerin birbirlerine yaklaşmaları sonucu 5 ns içinde bu mesafe 15 Å’ün altına düşmüştür. Ancak daha sonra 10 ns’ye kadar mesafe artmış, 10 ns’den sonra tekrar azalarak 10 Å’ün altına düşmüş ve yaklaşık 20 ns’den sonra bu mesafe korunmuştur. İlk 20 ns’deki değişimler hem kompleks oluşumu sırasındaki PEI-ODN yaklaşmasından hem de PCL ve PEG’in etkisiyle bu kompleks yapısının bir miktar değişmesinden kaynaklanmaktadır.



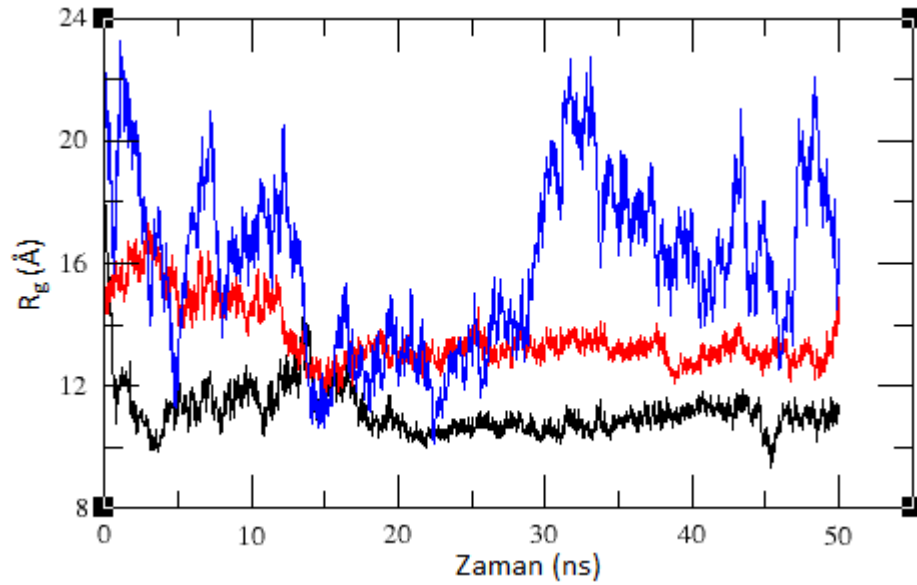
Şekil 4. 52 PEI ve ODN moleküllerinin kütle merkezleri arasındaki uzaklığın zamanla değişimi

Şekil 4.52’de birbirlerine 5.4 Å’den yakın olan atomların sayıları verilmiştir. Şekildeki kırmızı çizgiler ODN’nin fosfor atomlarıyla Na^+ iyonları için, siyah çizgiler ise ODN’nin fosfor atomlarıyla PEI’nin protonlanmış amin azot atomları için çizilmiştir. Grafiğe göre başlangıçta fosfor atomlarının etrafında Na^+ iyonları bulunurken, simülasyon sırasında bu iyonlar uzaklaşmış ve protonlanmış amin azotları yaklaşmıştır. Bu durum, kompleks oluşumunun ODN etrafından Na^+ iyonlarının salınması ve protonlanmış azot atomlarının çekilmesi ile oluştuğunu göstermektedir.



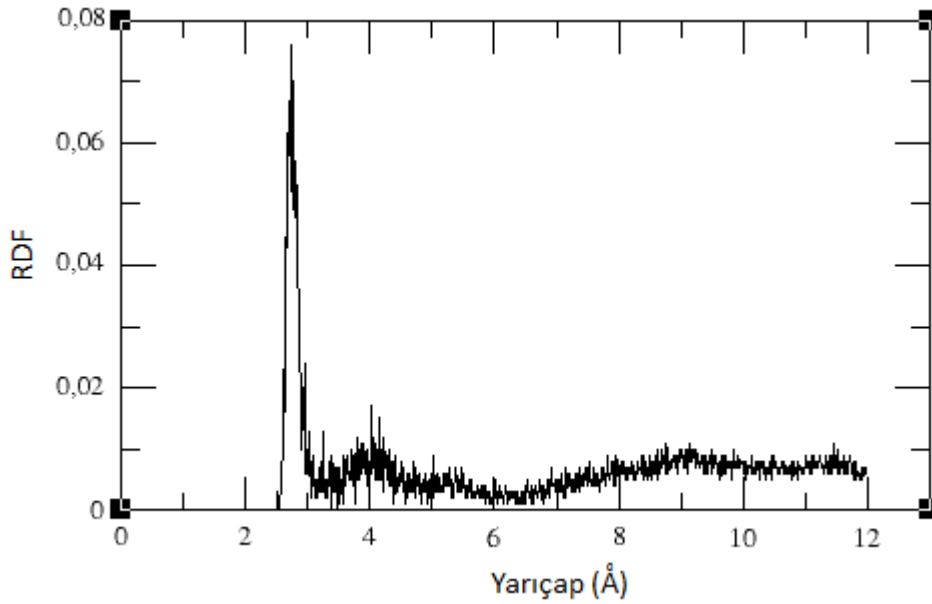
Şekil 4. 53 ODN'nin fosfor atomlarına 5.4 Å'den yakın bulunan protonlanmış amin azot atomlarının (-) ve Na⁺ iyonlarının (-) sayılarının zamanla değişimi

Şekil 4.54'de PEI, DNA ve PEG moleküllerinin ayrı ayrı R_g jirasyon yarıçaplarının zamanla değişimi verilmiştir. PEI ve DNA'nın yarıçapları zamanla azalmakta ve başlangıçta yaklaşık 16 Å olan yarıçap değerleri zamanla azalmıştır. Buna karşılık PEG zincirine ait yarıçap değerinde büyük dalgalanmalar olmuştur.



Şekil 4. 54 PEI (-), DNA (-) ve PEG (-) için jirasyon yarıçap değerlerinin zamanla değişimi

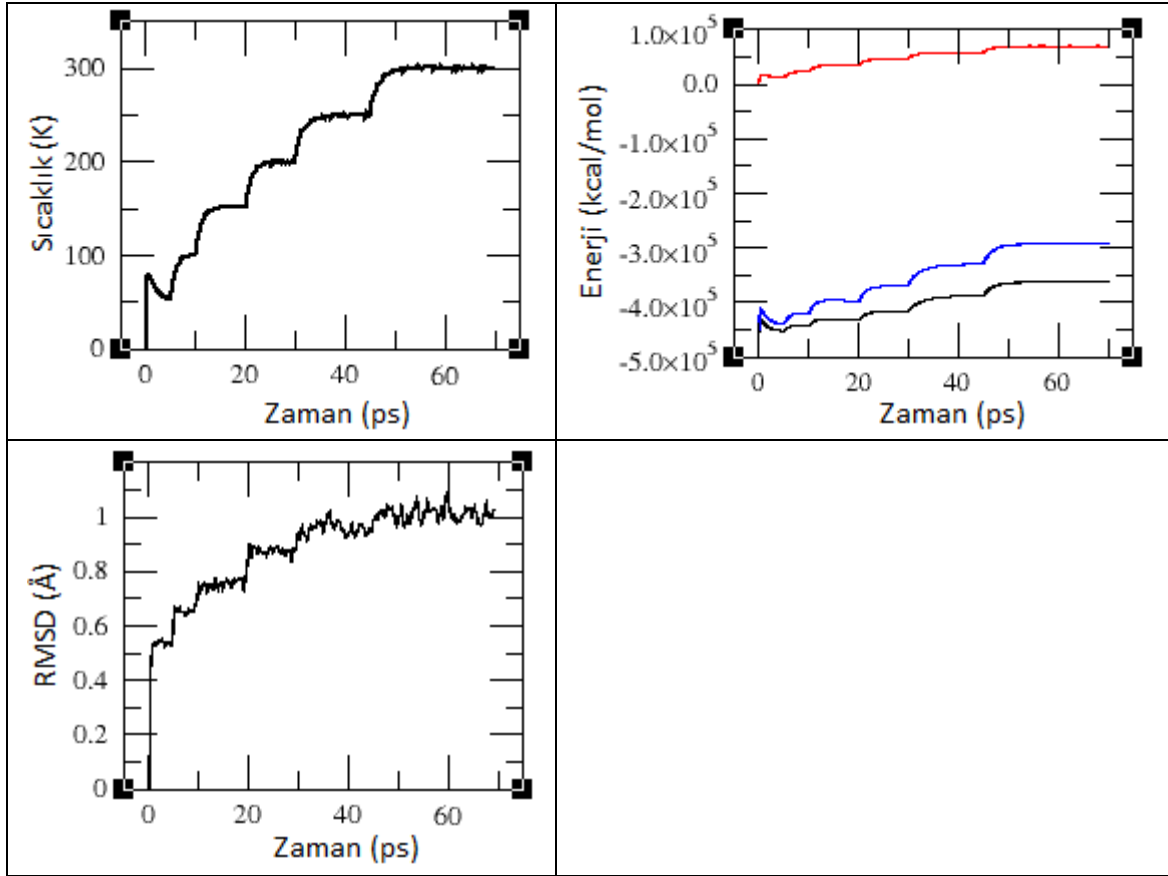
Şekil 4.55’de DNA’nın O1P ve O2P atomları ile PEI’nin protonlanmış amin azot atomları arasındaki radyal dağılım fonksiyonu (RDF) verilmiştir. RDF grafiği, simülasyonun son 10 ns’sinin verileri ile çizilmiştir. Grafiğe göre 2,5-3 Å ve yaklaşık 4 Å değerlerinde iki belirgin pik çıkmıştır. Birinci pik, fosfat oksijenleri ile amin azotları arasında H-bağları kurulacak şekilde amin ve fosfat gruplarının doğrudan temasından kaynaklanan birincil etkileşimlerin sonucudur. İkinci pik ise, su aracılığıyla oluşan H-bağları veya diğer daha az doğrudan temaslarla olan etkileşimlerin yani ikincil etkileşimlerin sonucudur.



Şekil 4. 55 DNA’nın O1P ve O2P atomları ile PEI’nin protonlanmış amin azot atomları arasındaki radyal dağılım fonksiyonu

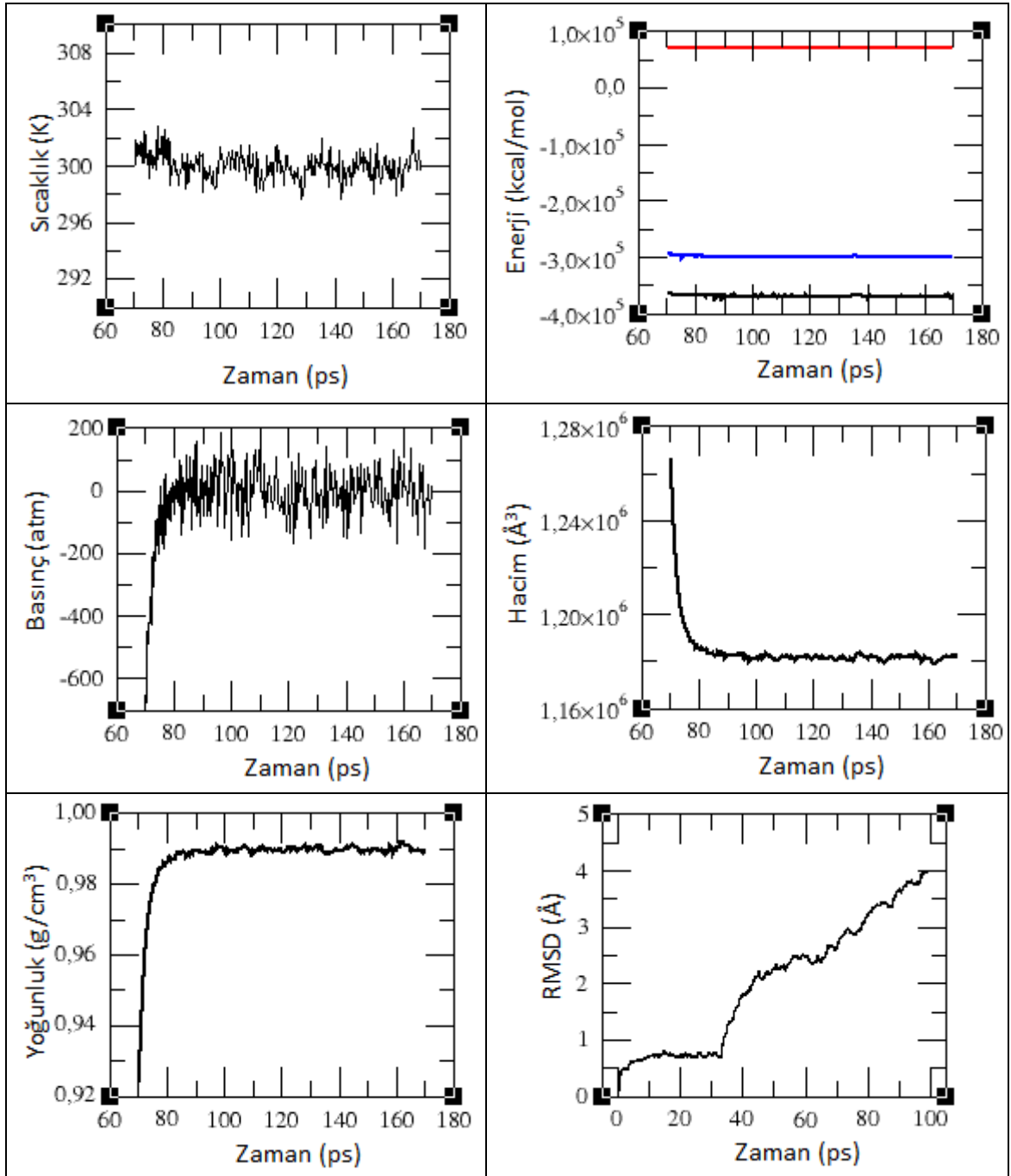
4.14 mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN'nin MD Simölasyonları

Şekil 4.56'da mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN sisteminin ısıtma sürecine ait sıcaklık, enerji ve RMSD grafikleri verilmiştir. Grafiklere göre ısıtma süreci düzgün şekilde gerçekleşmiş ve sistem 300 K'e ulaşmıştır.



Şekil 4. 56 mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN sisteminin ısıtma sürecine ait sıcaklık; potansiyel (–), kinetik (–) ve toplam (–) enerjiler ile RMSD grafikleri

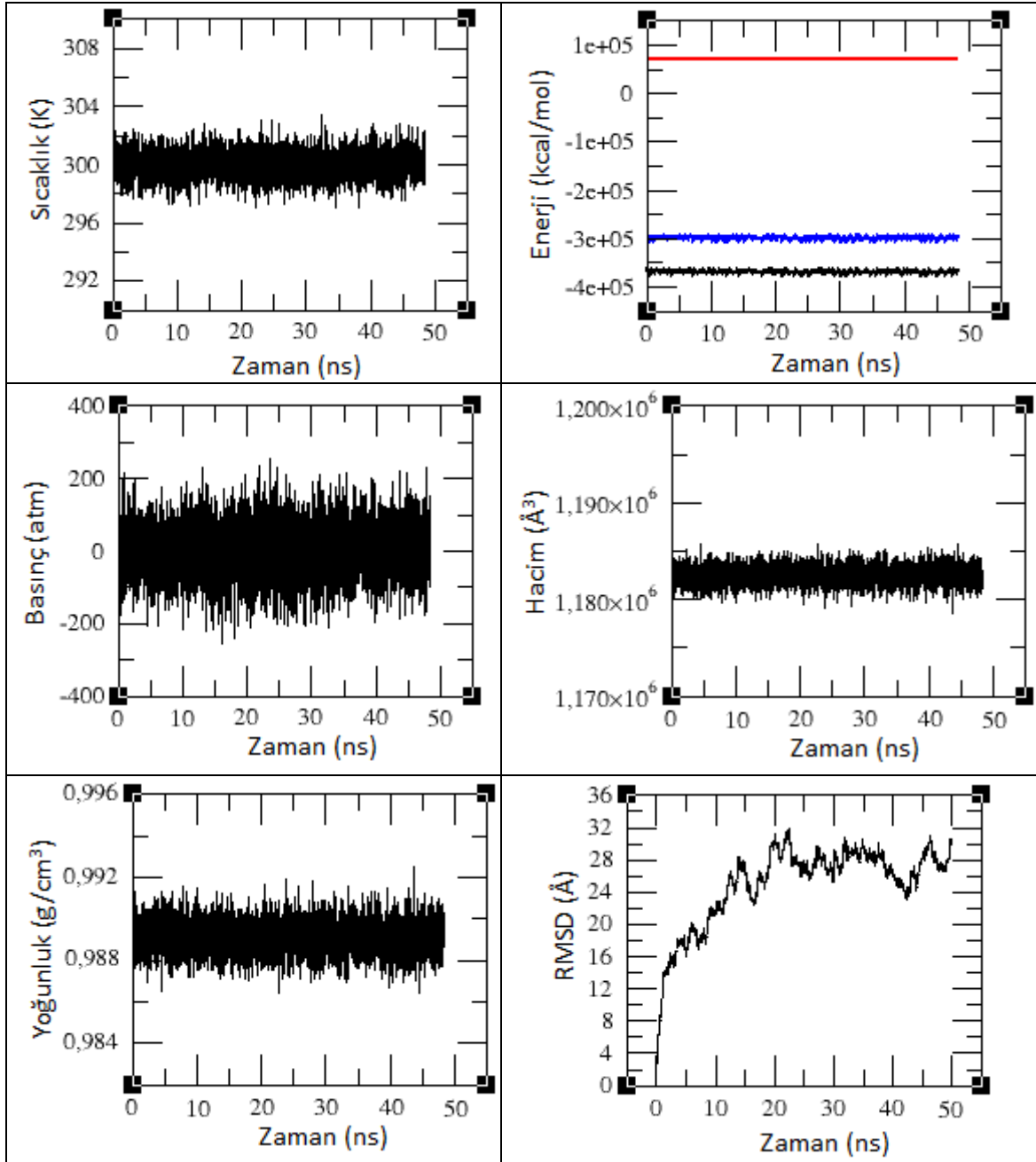
Şekil 4.57'de dengelenme sürecine ait sıcaklık, enerji, basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri verilmiştir. Sıcaklık ve enerji grafikleri dengede gözükmektedir. Basınç, hacim ve yoğunluk değerleri de 20 ps içinde dengelenmektedir. RMSD grafiğı, kısıtlamaların kademeli olarak kaldırılmasına bağılı olarak bir miktar artış göstermiştir. Bu grafiklere göre sistemin sıcaklık, enerji, basınç, hacim ve yoğunluk değerlerinin dengeye ulaştığı görölmektedir.



Şekil 4. 57 mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN sisteminin dengelenme sürecine ait sıcaklık; potansiyel (–), kinetik (–) ve toplam (–) enerjiler ile basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri

Şekil 4.57’de üretim simülasyonlarına ait sıcaklık, enerji, basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri verilmiştir. Sıcaklık, enerji, basınç, hacim ve yoğunluk değerleri tüm simülasyon boyunca belirli ortalamalarda sabit kalmıştır. RMSD değeri ilk birkaç ns’de hızla artmış, daha sonra artış miktarı azalarak yaklaşık 20 ns’den sonra dengeye

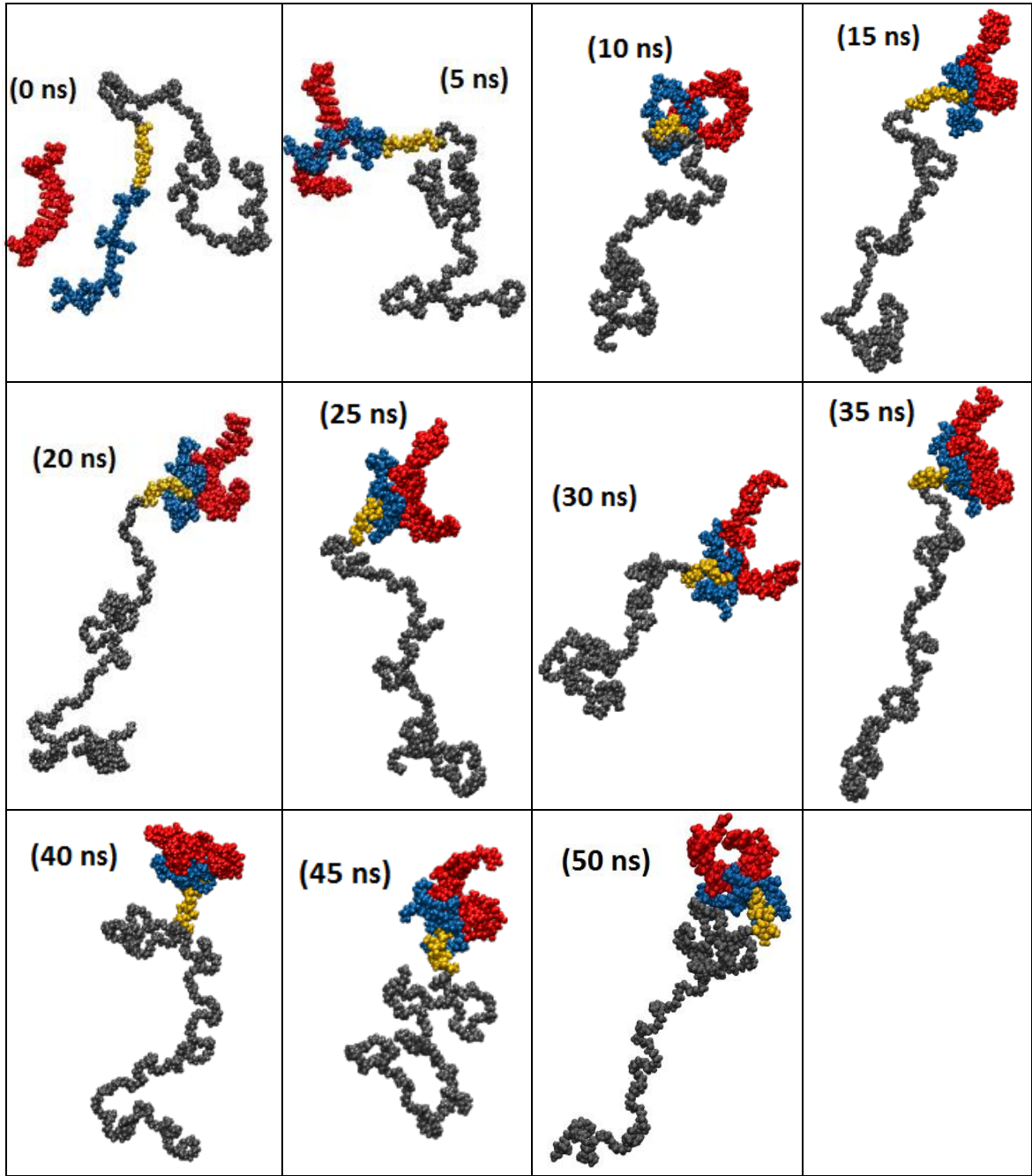
yaklaşılmıştır. Bu grafiklere göre simülasyonun düzgün şekilde gerçekleştiği anlaşılmaktadır.



Şekil 4. 58 mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN sisteminin üretim simülasyonlarına ait sıcaklık; potansiyel (–), kinetik (–) ve toplam (–) enerjiler ile basınç, hacim, yoğunluk ve RMSD grafikleri

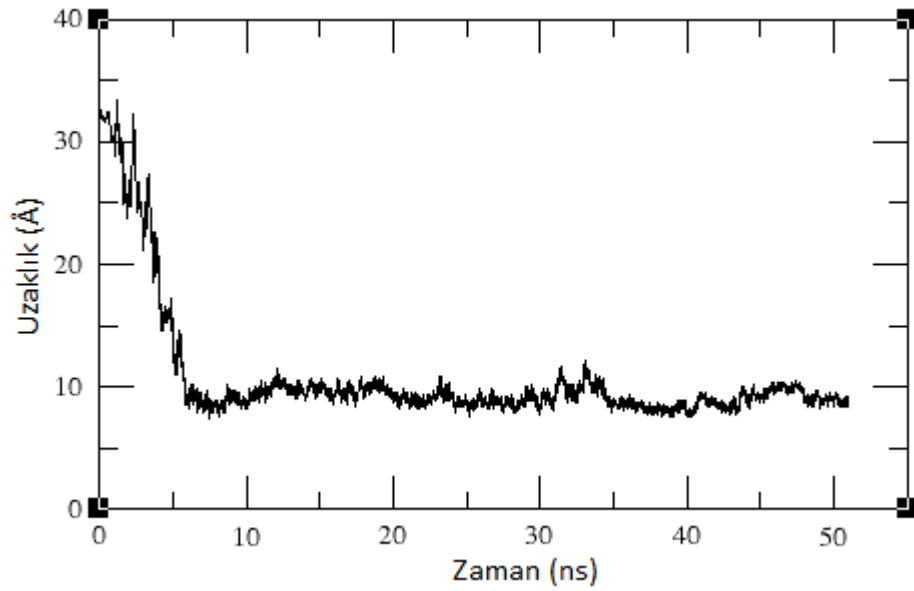
Üretim simülasyonlarının sonuçlarına göre, $t=0$ anında belli uzaklıkta ayrı ayrı duran mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI polimeri ile ODN molekülü simülasyon başladıktan sonra yaklaşmış ve hemen kompleks oluşturmuştur. Şekil 4.59’da simülasyona ait 5 ns aralıklarla alınmış anlık görüntüler verilmiştir. Tüm simülasyon boyunca ODN ve PEI

atomları birbirlerine yakın dururken PEG zinciri ODN'nin uzağında kalmış ve su ortamı içinde konformasyonunda rastgele ve sürekli değişimler meydana gelmiştir. Bir ucu PEI'ye diğer ucu PEG'e bağlı olan PCL kısmı ise, bir yandan PEI tarafından ODN'ye yaklaştırılmaya çalışılırken diğer yandan PEG tarafından uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. PEG zincirinin rastgele hareketinin PCL aracılığıyla PEI'ye etki etmesi, PEI'nin ODN ile oluşturduğu kompleks yapısını etkilemekte ve PEI'nin bu ucunun ODN'ye tam sarılması engellenebilmektedir.



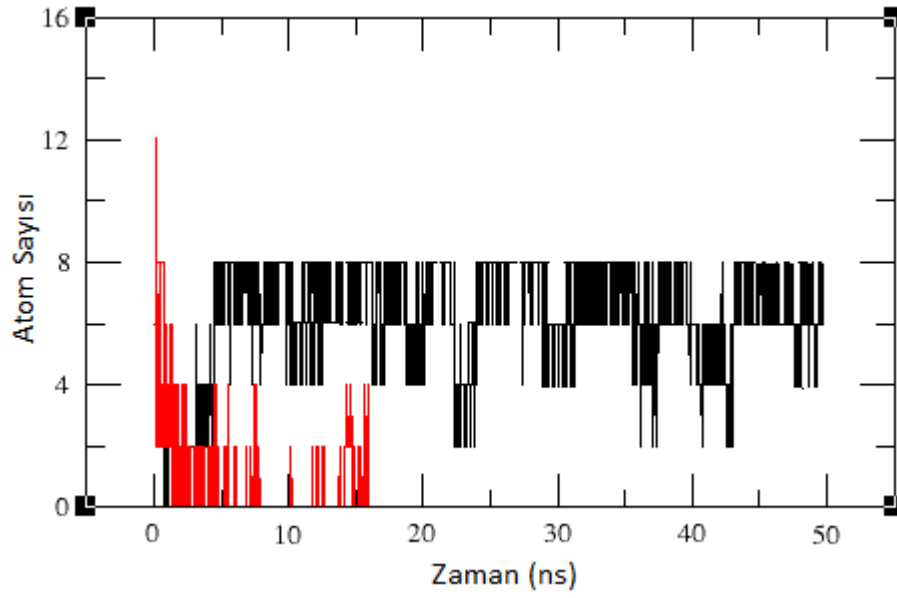
Şekil 4. 59 mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN sistemine ait 5 ns aralıklarla alınmış anlık görüntüler; ODN (●), PEI (●), PCL (●), PEG (●)

Şekil 4.60'da PEI ve ODN moleküllerinin kütle merkezleri arasındaki uzaklığın zamanla değişimi görülmektedir. $t=0$ anında kütle merkezleri arasında yaklaşık 32 Å mesafe bulunurken, simülasyon başladıktan sonra moleküllerin birbirlerine yaklaşmaları sonucu 5-6 ns içinde bu mesafe 10 Å'ün altına düşmüş ve daha sonra bu mesafe simülasyon boyunca korunmuştur.



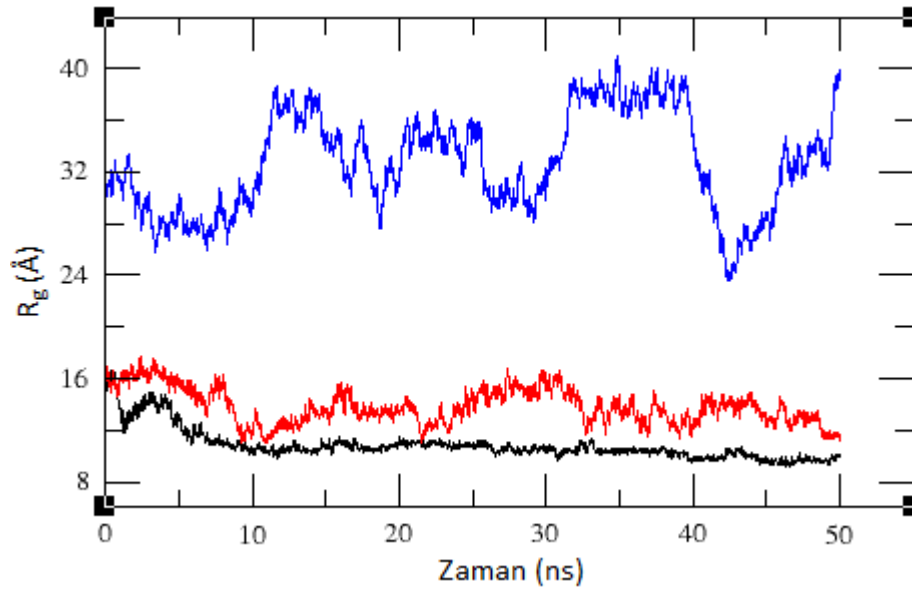
Şekil 4. 60 PEI ve ODN moleküllerinin kütle merkezleri arasındaki uzaklığın zamanla değişimi

Şekil 4.61’de birbirlerine 5.4 Å’dan yakın olan atomların sayıları verilmiştir. Şekildeki kırmızı çizgiler ODN’nin fosfor atomlarıyla Na^+ iyonları için, siyah çizgiler ise ODN’nin fosfor atomlarıyla PEI’nin protonlanmış amin azot atomları için çizilmiştir. Grafiğe göre başlangıçta fosfor atomlarının etrafında Na^+ iyonları bulunurken, simülasyon sırasında bu iyonlar uzaklaşmış ve protonlanmış amin azotları yaklaşmıştır. Bu durum, kompleks oluşumunun ODN etrafından Na^+ iyonlarının salınması ve protonlanmış azot atomlarının çekilmesi ile oluştuğunu göstermektedir.



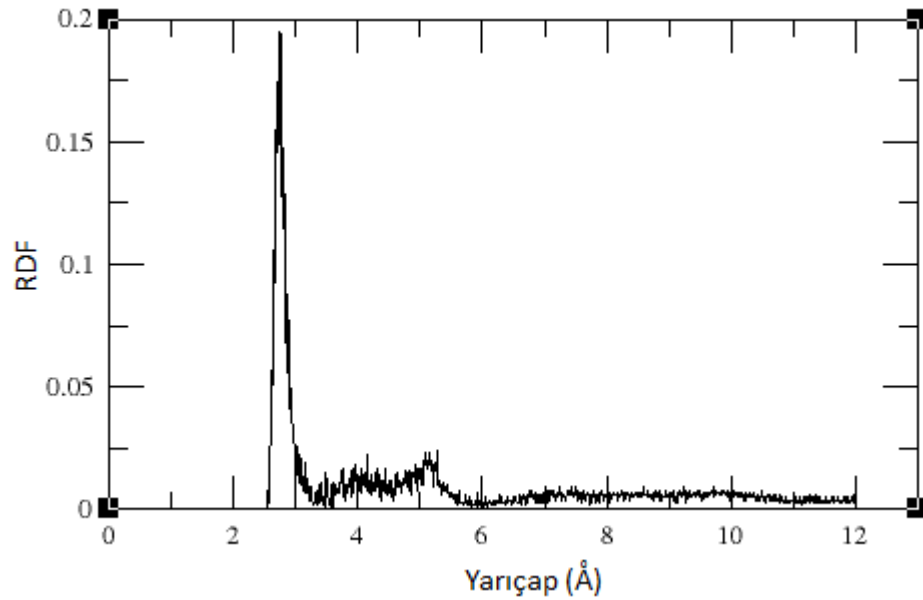
Şekil 4. 61 DNA'nın fosfor atomlarına 5.4 Å'den yakın bulunan protonlanmış amin gruplarının (-) ve Na⁺ iyonlarının (-) sayılarının zamanla değişimi

Şekil 4.61'de PEI, DNA ve PEG moleküllerinin ayrı ayrı R_g jirasyon yarıçaplarının zamanla değişimi verilmiştir. Başlangıçta yaklaşık 16 Å olan PEI ve DNA'nın yarıçapları zamanla azalmıştır. PEG zincirinde ise büyük dalgalanmalar olmuştur.



Şekil 4. 62 PEI (-), DNA (-) ve PEG (-) için jirasyon yarıçap değerlerinin zamanla değişimi

Şekil 4.63’de DNA’nın O1P ve O2P atomları ile PEI’nin protonlanmış amin azot atomları arasındaki radyal dağılım fonksiyonu (RDF) verilmiştir. RDF grafiği, simülasyonun son 10 ns’sinin verileri ile çizilmiştir. Grafiğe göre 2,5-3 Å ve yaklaşık 4 Å değerlerinde iki belirgin pik çıkmıştır. Birinci pik, fosfat oksijenleri ile amin azotları arasında H-bağları kurulacak şekilde amin ve fosfat gruplarının doğrudan temasından kaynaklanan birincil etkileşimlerin sonucudur. İkinci pik ise, su aracılığıyla oluşan H-bağları veya diğer daha az doğrudan temaslarla olan etkileşimlerin yani ikincil etkileşimlerin sonucudur.



Şekil 4. 63 DNA’nın O1P ve O2P atomları ile PEI’nin protonlanmış amin azot atomları arasındaki radyal dağılım fonksiyonu

4.15 Bağlanma Enerjileri

MD sonuçları üzerine MM/PBSA (moleküler mekanik Poisson-Boltzmann yüzey alanı) yöntemi uygulanarak bağlanma enerjileri bulunmuştur. Bağlanma enerjilerinin hesabında son 5 ns’ye ait yörünge bilgileri kullanılmıştır. Çizelge 4.14 ve 4.15’te polimer/ODN sistemlerine ait bağlanma enerjilerine katkı yapan terimler verilmiştir.

Çizelge 4. 14 mPEG-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN sistemleri için bağlanma enerjisine katkı yapan terimler (tüm enerjiler kcal/mol birimindedir)

	mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN			mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN		
	Kompleks	DNA	Polikasyon	Kompleks	DNA	Polikasyon
$\Delta E_{\text{bağ}}$	259,82	125,22	134,60	345,36	125,09	220,27
$\Delta E_{\text{açı}}$	801,36	274,94	526,43	1038,56	281,18	757,38
$\Delta E_{\text{dihedral}}$	699,08	328,78	370,30	822,26	326,47	494,70
ΔE_{VDW}	-364,03	-257,65	-68,42	-384,32	-228,31	-113,38
$\Delta E_{\text{elektrostatik}}$	-1655,30	1275,83	-604,46	-3781,92	1158,36	-2514,87
$\Delta E_{1-4 \text{ VDW}}$	258,18	125,82	132,31	320,24	127,91	192,33
$\Delta E_{1-4 \text{ elektrostatik}}$	62,26	-1530,87	1593,13	4513,91	-1532,41	6046,32
$\Delta G_{\text{elektrostatik}}$	-2526,96	-3155,73	-1697,60	-2748,91	-3061,53	-2120,56
$\Delta G_{\text{hidrofobik}}$	50,64	16,68	38,16	78,77	19,08	65,77
ΔG_{vakum}	61,33	342,06	2083,89	2873,00	258,28	5082,77
$\Delta G_{\text{çözünme}}$	-2476,31	-3139,05	-1659,44	-2670,14	-3042,46	-2054,79
ΔG_{toplam}	-2414,99	-2796,99	424,44	202,85	-2784,18	3027,98

Çizelge 4. 15 mPEG-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN sistemleri için bağlanma enerjisine katkı yapan terimler (tüm enerjiler kcal/mol birimindedir)

	mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN			mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN		
	Kompleks	DNA	Polikasyon	Kompleks	DNA	Polikasyon
$\Delta E_{\text{bağ}}$	271,01	121,42	149,59	373,41	125,82	247,59
$\Delta E_{\text{açı}}$	848,64	276,57	572,07	1088,93	273,60	815,33
$\Delta E_{\text{dihedral}}$	715,93	323,05	392,88	893,44	333,03	560,40
ΔE_{VDW}	-356,89	-226,46	-77,40	-416,77	-219,75	-164,59
$\Delta E_{\text{elektrostatik}}$	-3410,14	1205,62	-1863,31	-5147,21	1237,80	-3519,38
$\Delta E_{1-4 \text{ VDW}}$	267,89	127,76	140,13	329,74	123,74	206,00
$\Delta E_{1-4 \text{ elektrostatik}}$	2421,68	-1519,46	3941,14	5825,70	-1521,51	7347,20
$\Delta G_{\text{elektrostatik}}$	-2254,55	-3126,96	-1873,08	-2625,93	-3156,35	-2303,99
$\Delta G_{\text{hidrofobik}}$	54,08	18,77	42,58	78,31	19,41	63,24
ΔG_{vakum}	758,12	308,50	3255,11	2947,22	352,74	5492,56
$\Delta G_{\text{çözünme}}$	-2200,47	-3108,19	-1830,49	-2547,61	-3136,93	-2240,75
ΔG_{toplam}	-1442,35	-2799,69	1424,61	399,61	-2784,19	3251,81

MM/PBSA hesaplamalarına göre bulunan bağlanma enerjileri Çizelge 4.16'da verilmiştir. PLL içeren polimer/ODN sistemlerinde bağlanma enerjilerinin daha negatif oluşu yani daha yüksek bağlanma gösterdiği görülmektedir. Bulunan bu bağlanma enerjileri literatürle uyumludur. Örneğin Elder vd. tarafından lineer ve çeşitli aşı polilizin polimerlerinin DNA ile etkileşimleri incelenmiş ve bağlanma enerjileri polimer yapısına bağlı olarak yaklaşık 20-150 kcal/mol arasında bulunmuştur [131]. Bu çalışmada, bağlanma enerjisinin polimer omurgasındaki hidroforb kısımların uzunluğundan etkilendiği ve hidroforb kısımların sterik engel oluşturarak bağlanma enerjilerini azalttığı bulunmuştur. Tez çalışmasında incelenen triblok kopolimerlerdeki PCL ve PLL kısımları hidroforbik olup ayrıca PCL PLL'ye göre daha uzun olduğundan daha hidroforbiktir. Bunun sonucunda PCL içeren polimer/ODN sistemlerinin bağlanma enerjileri de daha düşük çıkmıştır. Bunun dışında PCL ve PLL içeren triblok kopolimerlerin bağlanma enerjileri PEG uzunluğuna göre kıyaslandığında, hem PEG zincirinin uzamasıyla bağlanma enerjisinin azaldığı görülmektedir. Bu durum, uzun PEG zincirinin çözelti içindeki hareketlerinin PEI'yi etkileyerek bağlanmayı zorlaştırmasından veya sterik engel oluşturmamasından kaynaklanmış olabilir.

Çizelge 4. 16 Polimer/ODN sistemleri için bağlanma enerjileri

	ΔG (kcal/mol)	$\pm$ Sapma Değeri (kcal/mol)
mPEG2000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN	-42,44	5,207
mPEG5000- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -PEI/ODN	-40,95	7,022
mPEG2000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN	-67,27	8,206
mPEG5000- <i>b</i> -PLL- <i>b</i> -PEI/ODN	-53,53	7,813

SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında, gen terapide taşıyıcı olarak kullanım potansiyeline sahip mPEG-*b*-PCL-*b*-PEI ve mPEG-*b*-PLL-*b*-PEI triblok kopolimerlerinin, tek zincirli insan *c-myc* antisens oligonükleotidleri ile kompleks oluşumları incelenmiştir. Deneysel çalışmalarda 20 mM PBS (pH 7,0) ortamında monodispers ve kararlı kompleksler oluştuğu görülmüştür. Kompleks oluşumları N/P oranına bağlı olarak değişmektedir ve buna göre komplekslerin boyutu ve etkin kompleksleşme N/P oranına göre ayarlanabilmektedir.

N/P oranı 20'den 100'e artarken boyut değerleri (hidrodinamik çaplar) mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN komplekslerinde 164 nm'den 217 nm'ye, mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN komplekslerinde 82 nm'den 105 nm'ye ve mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN komplekslerinde 241 nm'den 547 nm'ye çıkmıştır. Bu sonuçlara göre incelenen tüm triblok kopolimerleri çok yüksek ODN molekülü taşıma kapasitesine sahiptir. Ancak N/P oranı arttıkça oluşan kompleksin kararlılığı azalmakta, daha çok agregasyona gidilebilmekte bu nedenle boyut yüksek çıkmaktadır. Bu nedenle yüksek N/P oranlarında boyutun 500 nm'nin üzerine çıkmasıyla hücre içine girişte zorlanma olabileceği sonucuna varılabilir.

Boyut ölçümlerine bakıldığında genel olarak PLL içeren triblok kopolimerlerin, PCL içeren triblok kopolimerlere kıyasla ODN ile daha büyük boyutlu kompleksler oluşturduğu görülmektedir. Bu durumun, PLL'ye kıyasla daha fazla hidrofob alkil içeren PCL'li polimerler ile kompleks oluşumunun biraz daha zor olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Burada, laktat içeren polimerler ile oluşan komplekste, kaprolakton

içerenler ile kıyaslandığında daha fazla molekül olduğu da söylenebilir ki bu durum bağlanma sayıları ile de gösterilmiştir.

PCL veya PLL içeren triblok kopolimerlerin PEG uzunluğuna göre kendi içlerinde değerlendirilmesinde ise genel olarak PEG zincir uzunluğu arttığında kompleks boyutunun azaldığı görülmektedir. Kompleks oluşumları ODN ile polimerlerin PEI kısımları arasındaki bağlanmalarla meydana geldiğinden, PEG zincirlerinin uzunluğu arttıkça PEI kısımlarının ODN ile yaklaşması sterik olarak engelleniyor olmalıdır. Bunun sonucu olarak da bir araya gelecek molekül sayıları da azalmaktadır.

Yapılan model hesaplamalarında en düşük bağlanma sayıları mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI polimerinde görülmüştür. Bu polimerin ODN ile oluşturduğu kompleks yapılarında mertebe olarak yaklaşık 10^3 tane polimer zinciri yaklaşık 10^2 tane ODN molekülü ile bağlanmıştır. En düşük bağlanma sayısının mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI triblok kopolimerinde görülmesinin sebebi, bu polimerin hem PLL'ye kıyasla daha hidrofobik olan PCL içermesi hem de 5000 Da'luk uzun PEG zinciri içermesidir. Komplekslerdeki bağlanmış polimer ve ODN sayıları, mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN sisteminde sırasıyla 10^4 ve 10^3 mertebesinde, mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN sisteminde sırasıyla 10^7 ve 10^4 mertebesinde, mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN sisteminde ise sırasıyla 10^4 ve 10^3 mertebesinde. Bu sonuçlara göre de incelenen tüm triblok kopolimerlerin çok yüksek ODN molekülü taşıma kapasitesine sahip olduğu anlaşılmaktadır. Daha yüksek taşıma kapasitesi için polimerin omurgasında hidrofob kısımların minimum ve ayrıca PEG zincir uzunluğunun daha kısa tutulması gerektiği bulunmuştur. Ancak PEG zinciri suda çözünürlüğü arttırma ve kanda dolaşım süresini arttırma gibi başka avantajlar sağladığından, polimer yapıları oluşturulurken tüm etkenler göz önüne alınıp maksimum verimi sağlayacak polimerlerin tasarlanmasına ihtiyaç vardır.

Boyut ölçümlerinden yapılan hesaplamalarla komplekslerin yaklaşık molekül ağırlıkları bulunmuştur. Molekül ağırlıkları, PCL içeren triblok kopolimerlerin ODN komplekslerinde mertebe olarak yaklaşık 10^7 - 10^8 Da, PLL içeren triblok kopolimerlerin ODN komplekslerinde ise mertebe olarak yaklaşık 10^8 - 10^{10} Da olarak bulunmuştur. Molekül ağırlıkları, boyut değerlerinde olduğu gibi N/P oranı arttıkça büyümektedir. Hesaplanan bu molekül ağırlıkları, boyut ölçümlerinden dolayı olarak bulunmuştur.

Sedimentasyon denge tekniğinde ise molekül ağırlıkları doğrudan ölçülebilmektedir. Bu amaçla analitik ultrasantrifüj cihazı ile farklı N/P oranlarında hazırlanan polimer ve polimer/ODN kompleks çözeltileri analiz edilmiştir. Analizler önce 16000 rpm’de denenmiştir ancak çok büyük yapılardaki kompleks molekülleri santrifüj alanı altında hemen çöktüğünden bu hızda molekül ağırlığı hesaplanamamıştır. N/P=1 oranı için mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI/ODN ve mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI/ODN kompleks çözeltilerinin 3000 rpm’de analizleri yapılabilmiş ve buna göre bu kompleks yapıların molekül ağırlıklarının merteye olarak sırasıyla 10^7 ve 10^8 Da olduğu bulunmuştur. AUC sonuçları boyut ölçümlerinden hesaplanan molekül ağırlıklarını doğrulamaktadır ve incelenen triblok kopolimerleri ODN ile büyük kompleks yapıları oluşturmaktadır.

Deneysel çalışmaların ardından kompleks oluşumları moleküler dinamik simülasyonları ile atom seviyesinde incelenmiştir. Atomistik MD simülasyonları nükleik asit ve protein simülasyonları için özelleştirilmiş Amber programı ile gerçekleştirilmiştir. *C-myc* ODN molekülü Amber içinde oluşturulmuştur. Triblok kopolimeri ise GAMESS kuantum mekanik programında bulunan kısmi yükleri kullanılarak yine Amber’de oluşturulmuştur. Simülasyonlarda bir triblok kopolimer zinciri ile bir ODN molekülü periyodik kutu içinde aralarında belli bir uzaklık olacak şekilde yan yana bırakılmış ve sistem belirgin olarak su molekülleri ile çözündürülmüştür. Ayrıca tüm sistemin toplam yükünün nötr olması için kutuya net yükü sıfır yapacak şekilde zıt yüklü monovalent iyonlar yerleştirilmiştir. Harmonik kısıtlama altında minimizasyon, ısıtma ve dengelenme süreçlerinden sonra serbest bırakılan sistemlerin 50 ns’lik MD simülasyonları gerçekleştirilmiştir.

Simülasyonların anlık görüntüleri incelendiğinde, tüm sistemlerde yaklaşık 5-10 ns içinde kompleks oluşumları olduğu ve kompleks oluşumlarının ODN ile triblok kopolimerlerin PEI kısımları arasında olduğu görülmüştür. PEG zincirleri su ortamı içinde rastgele hareket etmekte ve konformasyonları sürekli değişmektedir. PEG zincirinin bu hareketi PCL veya PLL aracılığıyla PEI’yi etkilemekte ve buna bağlı olarak kompleks yapısında da bir miktar değişimler oluşmaktadır.

PEI ve ODN moleküllerinin kütle merkezleri arasındaki uzaklıkların zamanla değişimleri incelendiğinde, tüm sistemlerde kütle merkezleri arasındaki uzaklıklar yaklaşık 7-10 Å

olacak şekilde kompleksler oluştuğu bulunmuştur. ODN'nin fosfor atomları etrafındaki Na^+ iyonlarının ve PEI'lerdeki protonlanmış amin azot atomlarının sayılarının zamanla değişimleri incelendiğinde, tđm sistemlerde kompleks oluşumlarının Na^+ iyonlarının ODN etrafından salınması ve protonlanmış amin azot atomlarının ODN'nin fosfor atomlarına yaklaşmasıyla geręekleřtięi bulunmuştur. Bu incelemede Na^+ iyonlarının salınması yaklaşık ilk 15 ns içinde geręekleřmiřtir.

PEI ve ODN molekđllerinin jirasyon yarıçapları hesaplanmıştır. Buna gđre kompleks oluşumlarıyla beraber hem PEI'nin hem de ODN'nin boyutları bir miktar kđđlmüřtđr. Bu durum, kompleks oluşumuyla ODN'nin bir miktar da kompaktlaştığını gđstermektedir.

PEI'de bulunan protonlanmış amin azot atomlarının ODN'nin fosfat gruplarında bulunan O1P ve O2P atomlarının etrafında bulunma olasılıklarını veren radyal dağılım fonksiyonları (RDF) izilmiştir. Buna gđre RDF dağılımlarında genel olarak yaklaşık 2,5-3 Å 'de ve 4-5 Å'de iki ayrı belirgin pik bulunmuştur. Bunlardan kđđk olanı, ODN'nin fosfat gruplarındaki oksijen atomları ile PEI'nin protonlanmış amin gruplarındaki hidrojen atomları arasında H-bağları kurulduğunu gđstermektedir. Bđyđk pik ise ikincil etkileşimlerden kaynaklanmıştır.

Atomistik MD simđlasyonlarından elde edilen yđrđngelerin đzerine MM/PBSA hesaplamaları yapılarak polimer/ODN komplekslerinin bağlanma enerjileri bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara gđre, PLL içeren triblok kopolimerleri PCL içerenlere kıyasla ODN ile daha iyi bağlanmaktadır. Bunun sebebi, PCL'nin PLL'ye kıyasla daha hidrofobik olması ve PCL'nin kompleks oluşumunu daha çok engellemesidir. Bu durum deneylerde de gđrđlmüř ve PLL içeren triblok kopolimerlerin PCL içerenlere kıyasla daha bđyđk boyutlu kompleks yapıları oluşturduğu bulunmuştu. Yine PCL ve PLL içeren polimerler PEG uzunluğuna gđre kendi içinde kıyaslandığında, daha uzun PEG zinciri içeren polimerlerin daha dđřđk bağlanma enerjisine sahip olduğu gđrđlmüřtđr. Bu durum, PEG zincirinin çözelti içindeki hareketliliğinin kompleks yapısını etkileyerek kompleks oluşumunu zorlaştırması ya da sterik engellemeden kaynaklanmış olmalıdır. Modellemeden elde edilen bu sonuç deneysel verilerle de uyumludur, nitekim deneysel olarak da PCL ve PLL içeren polimerler PEG uzunluğuna gđre kendi

içinde kıyaslandığında, daha uzun PEG zincirine sahip olan polimerlerin oluşturduğu komplekslerin daha kısa PEG zincirli polimerlere göre daha küçük boyutlu kompleks oluşturduğu bulunmuştur. Ayrıca hesaplanan bağlanma enerjileri literatürle kıyaslandığında, incelenen triblok kopolimerlerin gen terapisinde polimerik vektör olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Genel olarak modelleme sonuçları deneysel sonuçlarla uyumludur. Hem modelleme hem de deneysel incelemelere göre mPEG-*b*-PCL-*b*-PEI ve mPEG-*b*-PLL-*b*-PEI triblok kopolimerleri *c-myc* ODN molekülleri ile kolayca kompleks oluşturmaktadır. Deneysel çalışmalar çözelti içinde kararlı ve monodispers yapıda büyük boyutlu ve büyük molekül ağırlıklı kompleksler oluştuğunu göstermektedir. Modelleme çalışmalarında, moleküllerin büyük olmasından ve simülasyonların çok uzun sürmesinden dolayı sadece bir polimer zinciri ile bir ODN molekülü arasındaki etkileşimler incelenebilmiştir. Modelleme çalışmaları, sistemde birden fazla ODN ve/veya polimer molekülü olacak şekilde geliştirilebilir. Böylelikle deneysel koşullara daha yakın sistemlerin modellenmesi yapılabilir. Modelleme çalışmalarının yapılması iki nedenden dolayı çok önemli ve gereklidir. Bunlardan birincisi, modelleme ile kompleks oluşumları atom seviyesinde incelenebilmektedir. İkincisi ise bağlanma enerjileri gibi deneysel olarak bulunması zor olan özellikler modelleme ile bulunabilmektedir.

Hem deneysel hem de modelleme çalışmaları, kopolimer sistemlerinin omurgalarındaki hidrofobik zincirlerin durumuna göre daha sistematik olarak incelenebilir. Ayrıca PEI'nin farklı molekül ağırlıkları ve dallanma durumuna göre de oluşturulan farklı kopolimerlerin sistematik incelemeleri ile gen terapisine yönelik daha uygun polimerik taşıyıcıların bulunması sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Mulligan, R.C., (1993). "The Basic Science of Gene Therapy", Science, 260: 926-932.
- [2] Langner, M., (2000). "The Intracellular Fate of Non-Viral DNA Carriers", Cell. Mol. Biol. Lett, 5: 295-313.
- [3] Pişkin, E. Dincer, S. ve Türk, M., (2004). "Gene Delivery: Intelligent But Just at the Beginning", Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 15: 1181-1202.
- [4] Pouton, C.W. Lucas, P. Thomas, B.J. Uduehi, A.N. Milroy, D.A. ve Moss, S.H., (1998). "Polycation-DNA Complexes for Gene Delivery: A Comparison of the Biopharmaceutical Properties of Cationic Polypeptides and Cationic Lipids", Journal of Controlled Release, 53: 289-299.
- [5] Eldred, S.E. Pancost, M.R. Otte, K.M. Rozema, D. Stahl, S.S. ve Gellman, S.H., (2005). "Effects of Side Chain Configuration and Backbone Spacing on the Gene Delivery Properties of Lysine-Derived Cationic Polymers", Bioconjugate Chemistry, 16: 694-699.
- [6] Mintzer, M.A. ve Simanek, E.E., (2009). "Nonviral Vectors for Gene Delivery", Chem Rev, 109: 259-302.
- [7] Crooke, S.T., (2000). "Potential Roles of Antisense Technology in Cancer Chemotherapy", Oncogene, 19: 6651.
- [8] Skoblov, M.Y., (2009). "Prospects of Antisense Therapy Technologies", Molecular Biology, 43: 917-929.
- [9] Kenneth, N.S. ve White, R.J., (2009). "Regulation by c-Myc of ncRNA Expression", Current opinion in genetics & development, 19: 38-43.
- [10] Saçak, M., (2010). Polimer Kimyası, Ankara: Gazi Kitabevi.
- [11] Lehninger, A. Nelson, D.L. ve Cox, M.M., (2008). Lehninger Principles of Biochemistry: W. H. Freeman.
- [12] Morawetz, H. ve Hughes Jr, W.L., (1952). "The Interaction of Proteins with Synthetic Polyelectrolytes. I. Complexing of Bovine Serum Albumin", The Journal of Physical Chemistry, 56: 64-69.

- [13] Xia, J. ve Dubin, P.L., (1994). Protein-Polyelectrolyte Complexes, ed. Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology. Springer, 247-271.
- [14] Cooper, C.L. Dubin, P.L. Kayitmazer, A.B. ve Turksen, S., (2005). "Polyelectrolyte-Protein Complexes", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10: 52-78.
- [15] Zezin, A. Rogacheva, V. Skobeleva, V. ve Kabanov, V., (2002). "Controlled Uptake and Release of Proteins by Polyelectrolyte Gels", *Polymers for Advanced Technologies*, 13: 919-925.
- [16] Drogoz, A. David, L. Rochas, C. Domard, A. ve Delair, T., (2007). "Polyelectrolyte Complexes from Polysaccharides: Formation and Stoichiometry Monitoring", *Langmuir*, 23, 10950-10958.
- [17] Boddohi, S. Moore, N. Johnson, P.A. ve Kipper, M.J., (2009). "Polysaccharide-Based Polyelectrolyte Complex Nanoparticles from Chitosan, Heparin, and Hyaluronan", *Biomacromolecules*, 10: 1402-1409.
- [18] Bouyer, E. Mekhloufi, G. Rosilio, V. Grossiord, J.L. ve Agnely, F., (2012). "Proteins, Polysaccharides, and Their Complexes Used as Stabilizers for Emulsions: Alternatives to Synthetic Surfactants in the Pharmaceutical Field?", *International Journal of Pharmaceutics*, 436: 359-378.
- [19] Schmitt, C. Sanchez, C. Desobry-Banon, S. ve Hardy, J., (1998). "Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes: A Review", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38: 689-753.
- [20] Troutier, A.L. Delair, T. Pichot, C. ve Ladaviere, C., (2005). "Physicochemical and Interfacial Investigation of Lipid/Polymer Particle Assemblies", *Langmuir*, 21: 1305-1313.
- [21] Orwick, M.C. Judge, P.J. Procek, J. Lindholm, L. Graziadei, A. Engel, A. Grobner, G. ve Watts, A., (2012). "Detergent-Free Formation and Physicochemical Characterization of Nanosized Lipid-Polymer Complexes: Lipodisq", *Angewandte Chemie-International Edition*, 51: 4653-4657.
- [22] May, S. ve Ben-Shaul, A., (2004). "Modeling of Cationic Lipid-DNA Complexes", *Current Medicinal Chemistry*, 11: 151-167.
- [23] Tarahovsky, Y., (2009). "Cell Transfection by DNA-Lipid Complexes-Lipoplexes", *Biochemistry-Moscow*, 74: 1293-1304.
- [24] Dias, R.S. ve Lindman, B., (2008). *DNA Interactions with Polymers and Surfactants*, New Jersey: Wiley-Interscience.
- [25] DeRouchey, J. Netz, R.R. ve Radler, J.O., (2005). "Structural Investigations of DNA-Polycation Complexes", *European Physical Journal E*, 16: 17-28.
- [26] Kabanov, V. ve Zezin, A., (1984). "A New Class of Complex Water-Soluble Polyelectrolytes", *Die Makromolekulare Chemie*, 6: 259-276.

- [27] Kabanov, A.V. ve Kabanov, V.A., (1998). "Interpolyelectrolyte and Block Ionomer Complexes for Gene Delivery: Physicochemical Aspects", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 30: 49-60.
- [28] Kabanov, A.V. ve Kabanov, V.A., (1995). "DNA Complexes with Polycations for the Delivery of Genetic Material into Cells", *Bioconjugate Chemistry*, 6: 7-20.
- [29] Hartig, S.M. Greene, R.R. Dikov, M.M. Prokop, A. ve Davidson, J.M., (2007). "Multifunctional Nanoparticulate Polyelectrolyte Complexes", *Pharmaceutical Research*, 24: 2353-2369.
- [30] Dragan, S. Cristea, M. Luca, C. ve Simionescu, B., (1996). "Polyelectrolyte Complexes. I. Synthesis and Characterization of Some Insoluble Polyanion-Polycation Complexes", *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 34: 3485-3494.
- [31] Kabanov, A.V. Astafyeva, I.V. Chikindas, M.L. Rosenblat, G.F. Kiselev, V.I. Severin, E.S. ve Kabanov, V.A., (1991). "DNA Interpolyelectrolyte Complexes as a Tool for Efficient Cell-Transformation", *Biopolymers*, 31: 1437-1443.
- [32] Yaroslavov, A.A. Sukhishvili, S.A. Obolsky, O.L. Yaroslavova, E.G. Kabanov, A.V. ve Kabanov, V.A., (1996). "DNA Affinity to Biological Membranes Is Enhanced due to Complexation with Hydrophobized Polycation", *Febs Letters*, 384: 177-180.
- [33] Clark, D.J. ve Kimura, T., (1990). "Electrostatic Mechanism of Chromatin Folding", *Journal of Molecular Biology*, 211: 883-896.
- [34] Minagawa, K. Matsuzawa, Y. Yoshikawa, K. Matsumoto, M. ve Doi, M., (1991). "Direct Observation of the Biphasic Conformational Change of DNA Induced by Cationic Polymers", *Febs Letters*, 295: 67-69.
- [35] Wagner, E. Cotten, M. Foisner, R. ve Birnstiel, M.L., (1991). "Transferrin Polycation DNA Complexes - The Effect of Polycations on the Structure of the Complex and DNA Delivery to Cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 4255-4259.
- [36] Pyshkina, O.A. Sergeev, V.G. Zezin, A.B. ve Kabanov, V.A., (1996). "Macromolecular DNA Can Be Dissolved in Low Polarity Organic Solvents by Its Complexation with Cationic Surfactants", *Dokl. Chem.*, 348: 138-140.
- [37] Kabanov, A.V. Astafieva, I.V. Maksimova, I.V. Lukanidin, E.M. Georgiev, G.P. ve Kabanov, V.A., (1993). "Efficient Transformation of Mammalian-Cells Using DNA Interpolyelectrolyte Complexes with Carbon-Chain Polycations", *Bioconjugate Chemistry*, 4: 448-454.
- [38] Feughelman, M. Langridge, R. Seeds, W. Stokes, A. Wilson, H. Hooper, C. Wilkins, M. Barclay, R. ve Hamilton, L., (1955). "Molecular Structure of Deoxyribose Nucleic Acid and Nucleoprotein".
- [39] Laemmli, U., (1975). "Characterization of DNA Condensates Induced by Poly (ethylene oxide) and Polylysine", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72: 4288-4292.

- [40] Gosule, L.C. ve Schellman, J.A., (1976). "Compact Form of DNA Induced by Spermidine".
- [41] Hays, M.E. Jewell, C.M. Lynn, D.M. ve Abbott, N.L., (2007). "Reversible Condensation of DNA Using a Redox-Active Surfactant", *Langmuir*, 23: 5609-5614.
- [42] Tiera, M.J. Shi, Q. Winnik, F.M. ve Fernandes, J.C., (2011). "Polycation-Based Gene Therapy: Current Knowledge and New Perspectives", *Current Gene Therapy*, 11: 288-306.
- [43] Tiera, M.J. Winnik, F.M. ve Fernandes, J.C., (2006). "Synthetic and Natural Polycations for Gene Therapy: State of the Art and New Perspectives", *Current Gene Therapy*, 6: 59-71.
- [44] Schaffert, D. ve Wagner, E., (2008). "Gene Therapy Progress and Prospects: Synthetic Polymer-Based Systems", *Gene Therapy*, 15: 1131-1138.
- [45] Pack, D.W. Hoffman, A.S. Pun, S. ve Stayton, P.S., (2005). "Design and Development of Polymers for Gene Delivery", *Nature Reviews Drug Discovery*, 4: 581-593.
- [46] Gebhart, C.L. ve Kabanov, A.V., (2001). "Evaluation of Polyplexes as Gene Transfer Agents", *Journal of Controlled Release*, 73: 401-416.
- [47] O'Rorke, S. Keeney, M. ve Pandit, A., (2010). "Non-Viral Polyplexes: Scaffold Mediated Delivery for Gene Therapy", *Progress in Polymer Science*, 35: 441-458.
- [48] Giacca, M., (2010). *Gene Therapy*: Springer.
- [49] Cavazzana-Calvo, M. Hacein-Bey, S. de Saint Basile, G. Gross, F. Yvon, E. Nussbaum, P. Selz, F. Hue, C. Certain, S. ve Casanova, J.-L., (2000). "Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease", *Science*, 288: 669-672.
- [50] Boyd, A., (2005). "Gene and Stem Cell Therapy".
- [51] Kaplitt, M.G. Feigin, A. Tang, C. Fitzsimons, H.L. Mattis, P. Lawlor, P.A. Bland, R.J. Young, D. Strybing, K. ve Eidelberg, D., (2007). "Safety and Tolerability of Gene Therapy with an Adeno-Associated Virus (AAV) Borne GAD Gene for Parkinson's Disease: An Open Label, Phase I Trial", *The Lancet*, 369: 2097-2105.
- [52] Yang, Z. Wang, H. Zhao, J. Peng, Y. Wang, J. Guinn, B. ve Huang, L., (2007). "Recent Developments in the Use of Adenoviruses and Immunotoxins in Cancer Gene Therapy", *Cancer gene therapy*, 14: 599-615.
- [53] Niven, R. Pearlman, R. Wedeking, T. Mackeigan, J. Noker, P. Simpson-Herren, L. ve Smith, J.G., (1998). "Biodistribution of Radiolabeled Lipid-DNA Complexes and DNA in Mice", *Journal of pharmaceutical sciences*, 87: 1292-1299.
- [54] Anderson, W.F., (1998). "Human Gene Therapy", *Nature*, 392: 25-30.

- [55] Jeong, J.H. Kim, S.W. ve Park, T.G., (2007). "Molecular Design of Functional Polymers for Gene Therapy", *Progress in Polymer Science*, 32: 1239-1274.
- [56] Verma, I.M. ve Somia, N., (1997). "Gene Therapy-Promises, Problems and Prospects", *Nature*, 389: 239-242.
- [57] Behr, J.P., (1993). "Synthetic Gene-Transfer Vectors", *Accounts of chemical research*, 26: 274-278.
- [58] Niidome, T. ve Huang, L., (2002). "Gene Therapy Progress and Prospects: Nonviral Vectors", *Gene Therapy*, 9: 1647-1652.
- [59] Branski, L. Pereira, C. Herndon, D. ve Jeschke, M., (2006). "Gene Therapy in Wound Healing: Present Status and Future Directions", *Gene Therapy*, 14: 1-10.
- [60] Houk, B.E. Martin, R. Hochhaus, G. ve Hughes, J.A., (2001). "Pharmacokinetics of Plasmid DNA in the Rat", *Pharmaceutical Research*, 18: 67-74.
- [61] Tang, M. ve Szoka, F., (1997). "The Influence of Polymer Structure on the Interactions of Cationic Polymers with DNA and Morphology of the Resulting Complexes", *Gene Therapy*, 4: 823.
- [62] De Smedt, S.C. Demeester, J. ve Hennink, W.E., (2000). "Cationic Polymer Based Gene Delivery Systems", *Pharmaceutical Research*, 17: 113-126.
- [63] Toncheva, V. Wolfert, M.A. Dash, P.R. Oupicky, D. Ulbrich, K. Seymour, L.W. ve Schacht, E.H., (1998). "Novel Vectors for Gene Delivery Formed by Self-Assembly of DNA with Poly (L-Lysine) Grafted with Hydrophilic Polymers", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1380: 354-368.
- [64] Brus, C. Petersen, H. Aigner, A. Czubayko, F. ve Kissel, T., (2004). "Efficiency of Polyethylenimines and Polyethylenimine-Graft-Poly (Ethylene Glycol) Block Copolymers to Protect Oligonucleotides Against Enzymatic Degradation", *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 57: 427-430.
- [65] Lee, M. ve Kim, S.W., (2005). "Polyethylene Glycol-Conjugated Copolymers for Plasmid DNA Delivery", *Pharmaceutical Research*, 22: 1-10.
- [66] Sagara, K. ve Kim, S.W., (2002). "A New Synthesis of Galactose-Poly (Ethylene Glycol)-Polyethylenimine for Gene Delivery to Hepatocytes", *Journal of Controlled Release*, 79: 271-281.
- [67] Lee, H. Jeong, J.H. ve Park, T.G., (2002). "PEG Grafted Polylysine with Fusogenic Peptide for Gene Delivery: High Transfection Efficiency with Low Cytotoxicity", *Journal of Controlled Release*, 79: 283-291.
- [68] Katayose, S. ve Kataoka, K., (1997). "Water-Soluble Polyion Complex Associates of DNA and Poly (Ethylene Glycol)-Poly (L-Lysine) Block Copolymer", *Bioconjugate Chemistry*, 8: 702-707.
- [69] Kataoka, K. Togawa, H. Harada, A. Yasugi, K. Matsumoto, T. ve Katayose, S., (1996). "Spontaneous Formation of Polyion Complex Micelles with Narrow Distribution from Antisense Oligonucleotide and Cationic Block Copolymer in Physiological Saline", *Macromolecules*, 29: 8556-8557.

- [70] Jain, R.K., (1998). "The Next Frontier of Molecular Medicine: Delivery of Therapeutics", *Nature medicine*, 4: 655-657.
- [71] Jain, R.K., (1998). "Delivery of Molecular and Cellular Medicine to Solid Tumors", *Journal of Controlled Release*, 53: 49-67.
- [72] Ruponen, M. Honkakoski, P. Rönkkö, S. Pelkonen, J. Tammi, M. ve Urtti, A., (2003). "Extracellular and Intracellular Barriers in Non-Viral Gene Delivery", *Journal of Controlled Release*, 93: 213-217.
- [73] Boussif, O. Lezoualc'h, F. Zanta, M.A. Mergny, M.D. Scherman, D. Demeneix, B. ve Behr, J.-P., (1995). "A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in Vivo: Polyethylenimine", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 7297-7301.
- [74] Cho, Y.W. Kim, J.D. ve Park, K., (2003). "Polycation Gene Delivery Systems: Escape From Endosomes to Cytosol", *Journal of pharmacy and pharmacology*, 55: 721-734.
- [75] Schaffer, D.V. Fidelman, N.A. Dan, N. ve Lauffenburger, D.A., (2000). "Vector Unpacking as a Potential Barrier for Receptor-Mediated Polyplex Gene Delivery", *Biotechnology and bioengineering*, 67: 598-606.
- [76] Godbey, W. Wu, K.K. ve Mikos, A.G., (1999). "Tracking the Intracellular Path of Poly(ethylenimine)/DNA Complexes for Gene Delivery", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 5177-5181.
- [77] Godbey, W. Barry, M.A. Saggau, P. Wu, K.K. ve Mikos, A.G., (2000). "Poly(ethylenimine)-Mediated Transfection: A New Paradigm for Gene Delivery", *Journal of biomedical materials research*, 51: 321-328.
- [78] 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 Carrier", *Journal of Controlled Release*, 54: 39-48.
- [79] Putnam, D. Gentry, C.A. Pack, D.W. ve Langer, R., (2001). "Polymer-Based Gene Delivery with Low Cytotoxicity by a Unique Balance of Side-Chain Termini", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 1200-1205.
- [80] 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*, 13: 510-517.
- [81] van de Wetering, P. Moret, E.E. Schuurmans-Nieuwenbroek, N.M. van Steenbergen, M.J. ve Hennink, W.E., (1999). "Structure-Activity Relationships of Water-Soluble Cationic Methacrylate/Methacrylamide Polymers for Nonviral Gene Delivery", *Bioconjugate Chemistry*, 10: 589-597.
- [82] Lim, Y.-b. Choi, Y.H. ve Park, J.-s., (1999). "A Self-Destroying Polycationic Polymer: Biodegradable Poly (4-Hydroxy-L-Proline Ester)", *Journal of the American Chemical Society*, 121: 5633-5639.

- [83] Akinc, A. Lynn, D.M. Anderson, D.G. ve Langer, R., (2003). "Parallel Synthesis and Biophysical Characterization of a Degradable Polymer Library for Gene Delivery", *Journal of the American Chemical Society*, 125: 5316-5323.
- [84] Wang, J. Mao, H.-Q. ve Leong, K.W., (2001). "A Novel Biodegradable Gene Carrier Based on Polyphosphoester", *Journal of the American Chemical Society*, 123: 9480.
- [85] Neu, M. Fischer, D. ve Kissel, T., (2005). "Recent Advances in Rational Gene Transfer Vector Design Based on Poly(ethylene imine) and its Derivatives", *The journal of gene medicine*, 7: 992-1009.
- [86] Behr, J.P., (1997). "The Proton Sponge: A Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit", *Chimia*, 51: 34-36.
- [87] Godbey, W. Wu, K.K. ve Mikos, A.G., (1999). "Size Matters: Molecular Weight Affects the Efficiency of Poly(ethyleneimine) as a Gene Delivery Vehicle", *Journal of biomedical materials research*, 45: 268-275.
- [88] Fischer, D. Li, Y. Ahlemeyer, B. Krieglstein, J. ve Kissel, T., (2003). "In Vitro Cytotoxicity Testing of Polycations: Influence of Polymer Structure on Cell Viability And Hemolysis", *Biomaterials*, 24: 1121-1131.
- [89] 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*, 16: 1273-1279.
- [90] Dunlap, D.D. Maggi, A. Soria, M.R. ve Monaco, L., (1997). "Nanoscopic Structure of DNA Condensed for Gene Delivery", *Nucleic acids research*, 25: 3095-3101.
- [91] Reschel, T. Koňák, Č.r. Oupický, D. Seymour, L.W. ve Ulbrich, K., (2002). "Physical Properties and In Vitro Transfection Efficiency of Gene Delivery Vectors Based on Complexes of DNA with Synthetic Polycations", *Journal of Controlled Release*, 81: 201-217.
- [92] Petersen, H. Fechner, P.M. Martin, A.L. Kunath, K. Stolnik, S. Roberts, C.J. Fischer, D. Davies, M.C. ve Kissel, T., (2002). "Polyethylenimine-Graft-Poly(ethylene glycol) Copolymers: Influence of Copolymer Block Structure on DNA Complexation and Biological Activities as Gene Delivery System", *Bioconjugate Chemistry*, 13: 845-854.
- [93] Merdan, T. Kunath, K. Petersen, H. Bakowsky, U. Voigt, K.H. Kopecek, J. ve Kissel, T., (2005). "PEGylation of Poly(ethylene imine) Affects Stability of Complexes with Plasmid DNA Under In Vivo Conditions in A Dose-Dependent Manner After Intravenous Injection into Mice", *Bioconjugate Chemistry*, 16: 785-792.
- [94] Thomas, M. ve Klibanov, A.M., (2002). "Enhancing Polyethylenimine's Delivery of Plasmid DNA into Mammalian Cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 14640-14645.

- [95] Wang, D.-a. Narang, A.S. Kotb, M. Gaber, A.O. Miller, D.D. Kim, S.W. ve Mahato, R.I., (2002). "Novel Branched Poly(ethylenimine)-Cholesterol Water-Soluble Lipopolymers for Gene Delivery", *Biomacromolecules*, 3: 1197-1207.
- [96] Han, S.-o. Mahato, R.I. ve Kim, S.W., (2001). "Water-Soluble Lipopolymer for Gene Delivery", *Bioconjugate Chemistry*, 12: 337-345.
- [97] Pun, S.H. Bellocq, N.C. Liu, A. Jensen, G. Machemer, T. Quijano, E. Schluep, T. Wen, S. Engler, H. ve Heidel, J., (2004). "Cyclodextrin-Modified Polyethylenimine Polymers for Gene Delivery", *Bioconjugate Chemistry*, 15: 831-840.
- [98] Godbey, W. Wu, K.K. ve Mikos, A.G., (2001). "Poly(ethylenimine)-Mediated Gene Delivery Affects Endothelial Cell Function and Viability", *Biomaterials*, 22: 471-480.
- [99] Ahn, C.-H. Chae, S.Y. Bae, Y.H. ve Kim, S.W., (2002). "Biodegradable Poly(ethylenimine) for Plasmid DNA Delivery", *Journal of Controlled Release*, 80: 273-282.
- [100] Shuai, X. Merdan, T. Unger, F. ve Kissel, T., (2005). "Supramolecular Gene Delivery Vectors Showing Enhanced Transgene Expression and Good Biocompatibility", *Bioconjugate Chemistry*, 16: 322-329.
- [101] Petersen, H. Merdan, T. Kunath, K. Fischer, D. ve Kissel, T., (2002). "Poly(ethylenimine-co-L-lactamide-co-succinamide): A Biodegradable Polyethylenimine Derivative with an Advantageous pH-Dependent Hydrolytic Degradation for Gene Delivery", *Bioconjugate Chemistry*, 13: 812-821.
- [102] Ahmed, F. ve Discher, D.E., (2004). "Self-Forming Polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL: Hydrolysis-Triggered Controlled Release Vesicles", *Journal of Controlled Release*, 96: 37-53.
- [103] Ahmed, F. Pakunlu, R.I. Srinivas, G. Brannan, A. Bates, F. Klein, M.L. Minko, T. ve Discher, D.E., (2006). "Shrinkage of a Rapidly Growing Tumor by Drug-Loaded Polymersomes: pH-Triggered Release Through Copolymer Degradation", *Molecular pharmaceuticals*, 3: 340-350.
- [104] Shi, Y. Hutchinson, H.G. Hall, D.J. ve Zalewski, A., (1993). "Down-Regulation of c-Myc Expression by Antisense Oligonucleotides Inhibits Proliferation of Human Smooth-Muscle Cells", *Circulation*, 88: 1190-1195.
- [105] Hussain, H. Tan, B. Mya, K. Liu, Y. He, C. ve Davis, T.P., (2010). "Synthesis, Micelle Formation, and Bulk Properties of Poly(ethylene glycol)-b-poly(pentafluorostyrene)-g-polyhedral Oligomeric Silsesquioxane Amphiphilic Hybrid Copolymers", *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 48: 152-163.
- [106] Robinson, L.A. Smith, L.J. Fontaine, M.P. Kay, H.D. Mountjoy, C.P. ve Pirruccello, S.J., (1995). "C-Myc Antisense Oligodeoxyribonucleotides Inhibit Proliferation of Non-Small Cell Lung Cancer", *The Annals of thoracic surgery*, 60: 1583-1591.

- [107] Kanamaru, T. Takagi, T. Takakura, Y. ve Hashida, M., (1998). "Biological Effects and Cellular Uptake of C-Myc Antisense Oligonucleotides and Their Cationic Liposome Complexes", *Journal of drug targeting*, 5: 235-245.
- [108] Dinçer, S. Oskay, E. Piskin, A. Zeybek, N. ve Pişkin, E., (2010). "Growth Inhibition of SK-MEL-30 Human Melanoma Cells by Antisense C-Myc Oligonucleotides Delivered by Poly(N-Isopropylacrylamide)/Poly (Ethyleneimine) Copolymer", *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 4: 284-290.
- [109] Dinçer, S. Türk, M. Karagöz, A. ve Uzunalan, G., (2011). "Potential C-Myc Antisense Oligonucleotide Carriers: PCL/PEG/PEI and PLL/PEG/PEI", *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 39: 143-154.
- [110] Slita, A.V. Kasyanenko, N.A. Nazarova, O.V. Gavrilo, I. Eropkina, E.M. Sirotkin, A.K. Smirnova, T.D. Kiselev, O.I. ve Panarin, E.F., (2007). "DNA-Polycation Complexes - Effect of Polycation Structure on Physico-Chemical and Biological Properties", *Journal of Biotechnology*, 127: 679-693.
- [111] Sarkar, S. Lee, L.K. Hart, S.L. Hailes, H.C. Levy, S.M. Tabor, A. ve Shamlou, P.A., (2005). "The Fractal Structure of Polycation-DNA Complexes", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 41: 127-136.
- [112] Lee, L.K. Mount, C.N. ve Shamlou, P.A., (2001). "Characterisation of the Physical Stability of Colloidal Polycation-DNA Complexes for Gene Therapy and DNA Vaccines", *Chemical Engineering Science*, 56: 3163-3172.
- [113] Slinkin, M.A. ve Shevelev, A.Y., (2001). "Ternary Interpolyelectrolyte Complexes DNA-Polycation-Polyanion: A New Approach to Optimization of Mixtures for Transfection of Eukaryotic Cells", *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 27: 256-263.
- [114] Iacomino, G. Picariello, G. ve D'Agostino, L., (2012). "DNA And Nuclear Aggregates of Polyamines", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*.
- [115] Dalgakıran, E., (2006). *Poliakrilik Asidin Bovine Serum Albumin İle Etkileşiminin Dinamik Ve Elektroforetik Işık Saçılması Yöntemleriyle Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi.
- [116] Koppel, D.E., (1972). "Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants", *The Journal of chemical physics*, 57: 4814.
- [117] Provencher, S.W., (1982). "A Constrained Regularization Method for Inverting Data Represented by Linear Algebraic or Integral Equations", *Computer Physics Communications*, 27: 213-227.
- [118] Cole, J. ve Hansen, J., (1999). "Analytical Ultracentrifugation as a Contemporary Biomolecular Research Tool", *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 10: 163.

- [119] Howlett, G.J. Minton, A.P. ve Rivas, G., (2006). "Analytical Ultracentrifugation for the Study of Protein Association and Assembly", *Current opinion in chemical biology*, 10: 430-436.
- [120] Hansen, J.C. Lebowitz, J. ve Demeler, B., (1994). "Analytical Ultracentrifugation of Complex Macromolecular Systems", *Biochemistry*, 33: 13155-13163.
- [121] Cole, J.L. Lary, J.W. P Moody, T. ve Laue, T.M., (2008). "Analytical Ultracentrifugation: Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium", *Methods in cell biology*, 84: 143-179.
- [122] Lamm, O., (1929). "Die Differentialgleichung Der Ultrazentrifugierung", *Arkiv för matematik, astronomi och fysik*, 21B: 1-4.
- [123] Ralston, G., (1993). *Introduction to Analytical Ultracentrifugation*, Fullerton, California: Beckman Instruments, Inc.
- [124] Beckman Coulter, (2004). *Model XL-A / XL-I Analytical Ultracentrifuge Optima Series Training Guide*, Palo Alto, California: Beckman Instruments, Inc.
- [125] Stevens, M.J., (2001). "Simple Simulations of DNA Condensation", *Biophysical journal*, 80: 130-139.
- [126] Ou, Z. ve Muthukumar, M., (2006). "Entropy and Enthalpy of Polyelectrolyte Complexation: Langevin Dynamics Simulations", *The Journal of chemical physics*, 124: 154902.
- [127] Dias, R. Pais, A. Miguel, M. ve Lindman, B., (2003). "Modeling of DNA Compaction by Polycations", *The Journal of chemical physics*, 119: 8150.
- [128] Hayashi, Y. Ullner, M. ve Linse, P., (2002). "A Monte Carlo Study of Solutions of Oppositely Charged Polyelectrolytes", *The Journal of chemical physics*, 116: 6836.
- [129] Hayashi, Y. Ullner, M. ve Linse, P., (2004). "Oppositely Charged Polyelectrolytes. Complex Formation and Effects of Chain Asymmetry", *The Journal of Physical Chemistry B*, 108: 15266-15277.
- [130] Ziebarth, J. ve Wang, Y., (2009). "Molecular Dynamics Simulations of DNA-Polycation Complex Formation", *Biophysical journal*, 97: 1971-1983.
- [131] Elder, R.M. Emrick, T. ve Jayaraman, A., (2011). "Understanding the Effect of Polylysine Architecture on DNA Binding Using Molecular Dynamics Simulations", *Biomacromolecules*, 12: 3870-3879.
- [132] Sun, C. Tang, T. Uludağ, H. ve Cuervo, J.E., (2011). "Molecular Dynamics Simulations of DNA/PEI Complexes: Effect of PEI Branching and Protonation State", *Biophysical journal*, 100: 2754-2763.
- [133] Schmidt, M.W. Baldridge, K.K. Boatz, J.A. Elbert, S.T. Gordon, M.S. Jensen, J.H. Koseki, S. Matsunaga, N. Nguyen, K.A. ve Su, S., (1993). "General Atomic and Molecular Electronic Structure System", *Journal of computational chemistry*, 14: 1347-1363.

- [134] Szabo, A., (1996). "Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory Author: Attila Szabo, Neil S. Ostlund, Publ".
- [135] Harmandaris, V.A. ve Mavrantzas, V.G., (2004). Molecular Dynamics Simulations of Polymers: CRC Press.
- [136] Frenkel, D. ve Smit, B., (2001). Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications: Academic press.
- [137] Leach, A.R., (2001). Molecular Modelling: Principles and Applications: Pearson College Division.
- [138] Case, D.A. Darden, T.A. T.E. Cheatham, I. Simmerling, C.L. Wang, J. Duke, R.E. Luo, R. Walker, R.C. Zhang, W. Merz, K.M. Roberts, B. Wang, B. Hayik, S. A. Roitberg Seabra, G. Kolossv ry, I. Wong, K.F. Paesani, F. Vanicek, J. Liu, J. Wu, X. Brozell, S.R. Steinbrecher, T. Gohlke, H. Cai, Q. Ye, X. Wang, J. Hsieh, M.-J. Cui, G. Roe, D.R. Mathews, D.H. Seetin, M.G. Sagui, C. Babin, V. Luchko, T. Gusarov, S. Kovalenko, A. ve Kollman, P.A., (2010). "AMBER 11", University of California, San Francisco.
- [139] Amber, (2010). Amber 11 Manual.
- [140] Karagöz, A., (2009). Misel Oluşturabilen, Biyouyumlu, Biyobozunur, Pozitif Y kl  Polimerik Malzemelerin Sentezi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi.
- [141] Armstrong, J.M. ve McKenzie, H.A., (2001). "Apparently Anomalous Sedimentation Behavior in Mixed Solvent Systems with Strong Interactions between Solution Components: Analysis of Nonideal Behavior by Bovine Serum Albumin in 7 M Urea at pH 3.3", Journal of Protein Chemistry, 20: 255-263.
- [142] Hirayama, K. Akashi, S. Furuya, M. ve Fukuhara, K.-i., (1990). "Rapid Confirmation and Revision of the Primary Structure of Bovine Serum Albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS", Biochemical and biophysical research communications, 173: 639-646.

KOPOLİMERLERİN SENTEZİNDE REAKTANT HESABI

Diblok kopolimerlerin sentezine 2,0 mg mPEG alınarak başlanmıştır. Diğer maddelerin miktarları ise mPEG'e göre hesaplanmıştır. ϵ -kaprolakton hesabı, (A.1) denklemine göre yapılmıştır:

$$V_{\epsilon} = \frac{n_{\epsilon} M_{\epsilon} m_P}{n_P M_P \rho_{\epsilon}} \quad (\text{A.1})$$

Burada V , çekilen hacim; n , mol sayısı; M , molekül kütlesi; m , tartılan kütle ve ρ ise yoğunluktur. " ϵ " indisi, ϵ -kaprolaktonu ve " P " indisi de mPEG'i ifade etmektedir. Sentezlerde $n_{\epsilon}/n_P = 4$ 'tür. Ayrıca M_{ϵ} , 114,44 g/mol ve ρ_{ϵ} , 1,03 g/ml'dir. M_P değeri, kullanılan mPEG'e göre 2000 veya 5000 g/mol'dür.

L-laktat hesabı, (A.2) denklemine göre yapılmıştır:

$$m_L = \frac{n_L M_L}{n_P M_P} m_P \quad (\text{A.2})$$

Burada da n , mol sayısı; M , molekül kütlesi ve m , tartılan kütledir. " L " indisi, L-laktatı ve " P " indisi de mPEG'i ifade etmektedir. Sentezlerde $n_L/n_P = 4$ ve M_L , 144,13 g/mol'dür. M_P değeri, yine kullanılan mPEG'e göre 2000 veya 5000 g/mol'dür.

SnOct₂ hesabı, (A.3) denklemine göre yapılmıştır:

$$n_S = [n_{\epsilon/P} + n_P] \cdot \%1,5 \quad (\text{A.3})$$

Burada n_s , SnOct₂'nin; $n_{\epsilon/p}$, ϵ -kaprolakton veya L-laktatın; n_p ise mPEG'in mol sayısıdır. SnOct₂'nin molekül kütlesi 405,12 g/mol ve yoğunluğu 1,251 g/ml'dir.

Mol sayıları, (A.4) denklemine göre hesaplanmıştır:

$$n = \frac{m}{M} = \frac{\rho \cdot V}{M} \quad (\text{A.4})$$

Burada da n , mol sayısı; M , molekül kütlesi; m , tartılan kütle; ρ , yoğunluk ve V ise çekilen hacimdir.

TAMPON ÇÖZELTİLERİNİN HAZIRLANMASI

B-1 Sodyum Borat Tamponu

Sodyum borat tamponu, 0,01 M borik asit (H_3BO_3 , $M_w = 61,83 \text{ g/mol}$) ile sodyum hidroksit (NaOH) arasındaki denge ile oluşur. Bu tampondan 500 ml hazırlamak için, 309 mg H_3BO_3 tartılarak 500 ml'lik balon jojeye konulmuş ve üzerine ultra saf su eklenerek çözündürülmüştür. Daha sonra 1 M'lık NaOH 'tan ekleme yapılarak, pH değeri 8,5 olacak şekilde tampon hazırlanmıştır. Tüm deneysel çalışmalarda, Millipore Milli-Q ve Millipore Synthesis'den alınan tip 1 ultra saf suları kullanılmıştır (özdirenç = $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, 25°C).

B-2 Fosfat Tamponu

Tez içerisinde kısaca PBS olarak yazılan tüm fosfat tamponları, pH'ı 7,0 olan 20 mM PBS'yi ifade etmektedir. Bu PBS'den 100 ml hazırlamak için, 156 mg sodyum fosfat monobazik dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $M_w = 156,01 \text{ g/mol}$) ile 268 mg sodyum fosfat dibazik heptahidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $M_w = 268,07 \text{ g/mol}$) ayrı ayrı tartılarak 100 ml'lik balon jojeye konulmuştur. Üzeri ultra saf suyla 100 ml'ye tamamlanarak çözündürülmüştür. 0,1 M NaOH ile pH 7,0'a ayarlanmıştır. 0,2 μm 'lik rejenere selüloz filtreyle süzölmüştür.

ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

C-1 Oligonükleotid Çözeltileri

Tüm deneylerde, İontek Firması tarafından sentezlenen *c-myc* antisens oligonükleotidleri (ODN) kullanılmıştır. ODN'ler, ependorf tüpleri içinde ve liyofilize toz olarak alınmıştır. Ependorf tüplerinin içindeki ODN kütleleri firma tarafından belirlenmiş olup, buna göre ODN'lerin üzerine gerekli miktarlarda PBS eklenerek ilk olarak konsantrasyonları 100 μ M olan ODN stok çözeltileri hazırlanmıştır. PBS eklendikten sonra çözeltiler 1-2 s vortekslenmiştir. ODN içeren diğer tüm çözeltilerin hazırlanmasında, bu 100 μ M'lık ODN/PBS stok çözeltileri kullanılmıştır. Stok çözeltileri, -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

C-2 Triblok Kopolimer Çözeltileri

mPEG2000-*b*-PCL-*b*-PEI, mPEG5000-*b*-PCL-*b*-PEI, mPEG2000-*b*-PLL-*b*-PEI ve mPEG5000-*b*-PLL-*b*-PEI triblok kopolimerlerinin Zetasizer'da boyut ölçümleri için 2,0 mg/ml konsantrasyonunda ayrı ayrı çözeltileri hazırlanmıştır. Bunun için, liyofilize toz halinde bulunan kopolimerler 10'ar mg olarak tartılmış, üzerlerine 5'er ml PBS eklenmiş ve 2 saat karıştırılmışlardır.

KİSMİ SPESİFİK HACMİN BULUNMASI

Kısmi spesifik hacim ($\bar{v}$), bir solütün sonsuz seyreltik çözeltisine çok küçük miktarda solüt eklendiğinde, çözeltide oluşan hacimsel değişimdir. Diğer bir ifadeyle, birim kütle başına hacimdir ve yoğunluğun tersine karşılık gelmektedir. SI birimi m^3/kg olup pratikte genel olarak cm^3/g kullanılmaktadır. **Görünen kısmi spesifik hacim (ϕ)** ise, solütün belli bir konsantrasyondaki çözeltisine çok küçük miktarda solüt eklendiğinde, çözeltide oluşan hacimsel değişimdir. ϕ değeri, konsantrasyonu bilinen çözeltinin dansimetrede yoğunluğu ölçüldükten sonra (D.1) denklemi kullanılarak hesaplanır:

$$\phi = \frac{1}{\rho_2} \left[1 - \frac{(\rho_2 - \rho_1)}{C} \right] \quad (\text{D.1})$$

$$C = \frac{m}{V} \quad (\text{D.2})$$

Burada ρ_1 , solventin yoğunluğu; ρ_2 , çözeltinin yoğunluğu; C , çözeltinin konsantrasyonu; m , çözeltiyi oluşturmak için solvante eklenen solütün kütlesi; V , çözeltiyi oluşturmak için kullanılan tek başına solventin hacmidir. Buna göre:

$$\bar{v} = \lim_{C \rightarrow \infty} \phi \quad (\text{D.3})$$

olur. Böylelikle, solütün farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanıp her konsantrasyon için ϕ değeri bulunursa, C - ϕ grafiğinin sıfır konsantrasyona uzatılmasıyla $\bar{v}$ bulunmuş olur.

BAĞLANAN MOLEKÜL SAYISI HESABI

Dinamik ışık saçılması ile yapılan boyut analizlerinin sonuçları kullanılarak, polimer/ODN kompleks yapısını oluşturan yani bağlanan molekül sayıları hesaplanmıştır. Bunun için, ortama eklenen bütün polimer ve ODN moleküllerinin birleşerek kompleks oluşturduğu ve kompleks molekül yapılarının özdeş olduğu varsayılmıştır. Hesaplarda ODN'nin ortalama çapı 2,5 nm kabul edilmiştir.

n , çözeltideki toplam polimer molekülü sayısı; m , çözeltideki toplam ODN molekülü sayısı; x , çözeltideki toplam kompleks molekülü sayısı; p , kompleks başına polimer molekülü sayısı ve q , kompleks başına ODN molekülü sayısı olmak üzere,

$$n = x \cdot p \quad (E-1)$$

$$m = x \cdot q \quad (E-2)$$

yazılabilir. Polimer ve ODN hacimlerinin kompleks içinde değişmediği varsayılırsa, kompleks hacmi kompleks içindeki toplam polimer hacmiyle toplam ODN hacminin toplamına eşit olur. Hacmin, çapın küpüyle orantılı olduğu göz önüne alınıp (E-1) ve (E-2) denklemleri de kullanılırsa (E-3) eşitliği elde edilir:

$$q = \frac{d_x^3}{\left(\frac{n}{m}\right) d_p^3 + d_q^3} \quad (E-3)$$

(E-3) denklemiyle kompleks başına düşen oligo sayısı yaklaşık olarak hesaplanmış olur. Bu sayının (n/m) ile çarpılmasıyla, kompleks başına polimer sayısı bulunur. Ayrıca polimer ve ODN molekül ağırlıkları bilindiğinden, bu sayılarla kompleks molekül ağırlığı da hesaplanabilir:

$$M_x = p.M_p + q.M_q \quad (E-4)$$

Burada M_x , M_p ve M_q , sırasıyla kompleks, polimer ve ODN moleküllerinin molekül ağırlıklarını göstermektedir.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Eray DALGAKIRAN
Doğum Tarihi ve Yeri : 11.10.1978 / İstanbul
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : eraydalgakiran@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2006
Lisans	Fizik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2003

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2004-2012	Yıldız Teknik Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

YAYINLARI

Bildiri

1. E. Dalgakiran, S. Dinçer, H. Tatlıpınar; "Experimental Investigation of Overcharging in Proteins by Electrophoretic Mobility Measurement in the Presence of Salt"; 28th International Physics Congress, 6-9 September 2011, Bodrum-Turkey, pp.571.
2. E. Dalgakiran, S. Dincer; "Characterization of PLA-b-mPEG and PLA-b-mPEG-PEI Conjugates by Analytical Ultracentrifuge", 16th International BIOMED 2010, Istanbul, pp.53
3. S. Derman, E. Dalgakiran, Z. Mustafaeva, "Size and Zeta Potential Analysis of Synthetic Peptide-Carrier Protein Conjugates Depend on the Time", 30th European Peptide Symposium (30EPS), Helsinki, Finland, 31 August - 5 September 2008.
4. E. Dalgakiran, Y. Saricay, Z. Mustafaeva; "Investigation of Ability of Poly(acrylic acid) Complexations with Serum Albumins by Light Scattering Techniques", 14th Biomedical Science & Technology Symposium (BIOMED), Mugla, Turkey, May 4-7, 2008.
5. E. Dalgakiran, N. Akkilic, Z. Mustafaeva, M. Mustafaev; "Analytical Ultracentrifuge and Light Scattering Studies of Water-Soluble Protein-Polymer Nanoparticles", 4th European Symposium on Biopolymers, Kusadasi, Turkey, p.87, October 2-4, 2007.
6. S. Acar, B. Mansour, E. Dalgakiran, M. Topuzogullari, N. Akkilic, Y. Budama Battal, Z. Akdeste, M. Mustafaev Akdeste; "Covalent Conjugation of Synthetic Peptide Antigen of Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) to Globular Macromolecules", 4th European Symposium on Biopolymers, Kusadasi, Turkey, p.82, October 2-4, 2007.
7. N. Akkilic, E. Dalgakiran, V. Chegel, Z. Akdeste, "Sedimentation Process and Conformational Structures of Nanoparticles Monitored by SPR and AUC", Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED), Istanbul, Turkey, p.93, August 26-28, 2007.
8. E. Karabulut, Z.O. Ozdemir, Y. Saricay, E. Dalgakiran, Z. Mustafaeva; "Synthesis and Characterization of Biodegradable Poly(1-Azabicyclo[4.2.0]Octane) Polymers and Their Derivatives", Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED), Istanbul, Turkey, August 26-28, 2007.

9. E. Dalgakiran, M. Mustafaev; "The Investigation of Interactions Between Poly(acrylic acid) and Bovine Serum Albumin by Dynamic and Electrophoretic Light Scattering", 8th Austrian Polymer Meeting, Linz, Austria, p.21, September 20-22 2006.

10. M. Karahan, E. Dalgakiran, Z. Mustafaeva, M. Mustafaev; "Investigation of Soluble Ternary Polyacrylic Acid-Cu²⁺-Bovine Serum Albumin Complexes by Dynamic and Electrophoretic Light Scattering", 8th Austrian Polymer Meeting, Linz, Austria, p.29, September 20-22 2006.

11. N. Akkilic, Y. Budama Battal, N.S. Cimen, E. Dalgakiran, M. Topuzogullari, Z. Mustafaeva, M. Mustafaev; "Development of Nanoparticles Based on Polyanion-Protein Complexes", XII. International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED), Izmir, Turkey, September 20-23, 2005.

12. N. Akkilic, A. Arslan, Y. Budama Battal, E. Dalgakiran, L. Karagoz, O. Oztolan, Y. Ozturk, M. Topuzogullari, Z. Mustafaeva, M. Mustafaev; "Covalent Complexes of Enzymes with Dextran and Dextran Sulphate", XII. International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED), Izmir, Turkey, September 20-23, 2005.

13. B. Mansour, E. Dalgakiran, M. Topuzogullari, Y. Budama Battal, Z. Mustafaeva, M. Mustafaev; "Bioconjugation of Peptide Antigens of Foot-and-Mouth Diseases Virus VP1 Protein with Synthetic Polyanions in Hydrated Reverse Micelle Systems", International Workshop on Bioengineering; Problems and Perspectives, Istanbul, Turkey, 214-221, October 20-23, 2004.

14. S. Canim, E. Dalgakiran, A.B. Hazar Yoruc, Z. Mustafaeva, M. Mustafaev, "Polymer-Metal Complexes for Design of Hydroxyapatite-Based Polymer Composites", International Workshop on Bioengineering; Problems and Perspectives, Istanbul, Turkey, 222-228, October 20-23, 2004.