

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

mRNA YÜKLÜ İYONİZE EDİLEBİLEN KATYONİK LİPİTLER İLE
OLUŞTURULAN LİPOZOMAL NANOYAPILARIN DPD YÖNTEMİ İLE
SİMÜLASYONU

BUKET YOLDAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: PROF. DR. GÖKHAN KAÇAR

EDİRNE-2024

Buket YOLDAŞ'ın hazırladığı “**mRNA Yüklü İyonize Edilebilen Katyonik Lipitler ile Oluşturulan Lipozomal Nanoyapıların DPD Yöntemi ile Simülasyonu**” başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir **Yüksek lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Gökhan KAÇAR

.....

Doç. Dr. Nergiz Cengiz

.....

Dr. Öğr. Üyesi Güzin TUNCA ALPARSLAN

.....

Tez Savunma Tarihi: 18/07/2024

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Gökhan KAÇAR

Tez Danışmanı

.....

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

.....

Prof. Dr. Muharrem Tolga SAKALLI

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T. Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

18 / 07 / 2024

Buket YOLDAŞ

İmza

Yüksek Lisans Tezi

mRNA Yüklü İyonize Edilebilen Katyonik Lipitler ile Oluşturulan Lipozomal Nanoyapıların DPD Yöntemi ile Simülasyonu

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

mRNA, protein sentezinde DNA'dan genetik mesajı alıp ribozoma protein sentezi için taşıyan bir biyomoleküldür. Hücreye, sahip olmadığı bir genin proteinini sentezletmek için dışarıdan mRNA aktarımı yapılabilir. Günümüzde biyoteknolojinin gelişmesi ile hassas yapılı mRNA'nın hücre içine iletilmesi önemli bir araştırma konusu olmuştur. mRNA, protein sentez kodlarını taşıyan biyomolekül olması nedeniyle genetik tedavilerde ve aşı geliştirmede büyük potansiyele sahiptir, ancak hassas yapısı doğrudan hücreye iletilmesini zorlaştırır. Bu sorunun üstesinden gelmek için nanoteknoloji umut vaat etmektedir. Nanoyapılar mRNA'nın hücre içine taşınmasında yüksek potansiyele sahiptir. Birçok malzeme ile oluşturulabilen nanoyapılar biyouyumlu olmaları, biyoyararlanımı arttırmaları gibi pek çok avantaja sahiptir. Lipitler hücre zarında da bulunan biyomoleküller olduklarından lipit nanoyapılar mRNA'nın güvenli ve etkili taşınması için umut verici taşıyıcı sistemlerdendir. Biyogüvenli, sirkülasyon süresi uzun ve modifiye edilebilir özelliklere sahip lipit nanoyapılar, gen ve ilaç taşıyıcı sistemler olarak dikkat çekmektedir. Özellikle, iyonize edilebilir katyonik lipitler, pH'a duyarlı olmaları, negatif yüklü nükleik asitleri pozitif yükleri ile stabilize edebilmeleri, hücre zarına entegrasyonları ve immün sistemden kaçabilme yetenekleri sayesinde, lipozomlar arasında daha güvenli ve etkili adaylar olarak gösterilebilirler. Moleküler Dinamik (MD) simülasyonları, moleküller arası ve molekül içi etkileşimleri bilgisayar teknolojileri ile inceleyen bir alandır. Deneysel verilerle uyumlu sonuçlar elde edilebilen MD simülasyonları araştırmacılara maliyet, zaman tasarrufunun yanı sıra moleküler düzeyi daha iyi anlamayı sağlar. Biyolojik sistemler gibi karmaşık sistemlerin simülasyonunda

kullanılan Dağıtıcı Parçacık Dinamiği (DPD) yöntemi, yüksek zaman ölçeklerinde ve büyük sistemlerde verimli simülasyonlar gerçekleştirebilir, bu da iyonize edilebilir katyonik lipitler ve hassas yapılı mRNA arasındaki etkileşimleri incelemek için idealdir. Bu çalışma, mRNA-ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan iyonize edilebilir katyonik lipitlerin davranışlarını anlamak, moleküller arası ve molekül içi etkileşimi detaylıca incelemek için DPD yöntemi ile simülasyonlar yapmayı amaçlanmıştır. Sonuç olarak, mRNA'nın hücre içine taşınmasında iyonize edilebilir katyonik lipitlerle oluşturulan nanoyapıların DPD yöntemiyle incelenmesi, bu alandaki bilgi birikime katkı sunmayı ve mRNA taşıma sistemlerinin geliştirilmesinde yeni ve etkili stratejilerin belirlenmesine yardımcı olmayı hedeflemektedir. Bu tezde, iyonize edilebilir katyonik lipitlerle oluşturulan nanoyapının mRNA taşıma mekanizmasını ve moleküller arası etkileşimlerini detaylıca incelemek amacıyla Dağıtıcı Parçacık Dinamiği (DPD) yöntemi kullanılacaktır.

Yıl : 2024

Sayfa Sayısı : 52

Anahtar Kelimeler : Nanoteknoloji, nanolipozom, ilaç taşıyıcı sistemler, moleküler simülasyonlar, DPD, mRNA, iyonize edilebilir katyonik lipit, DOTMA, DOTAP

Master's Thesis

Simulation of Liposomal Nanostructures Formed with Ionizable Cationic Lipids Loaded with mRNA Using the DPD Method

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

mRNA is a biomolecule that receives the genetic message from DNA and carries it to the ribosome for protein synthesis. External mRNA can be transferred to the cell to synthesize the protein of a gene it does not possess. With the development of biotechnology, delivering precisely structured mRNA into the cell has become an important research topic. Since mRNA carries protein synthesis codes, it holds great potential in genetic therapies and vaccine development, but its sensitive structure makes direct delivery to the cell challenging. Nanotechnology shows promise in overcoming this problem, as nanostructures have high potential for transporting mRNA into the cell. These nanostructures, which can be formed from various materials, offer advantages such as biocompatibility and increased bioavailability. Lipid nanostructures are particularly promising carrier systems for the safe and effective transport of mRNA, given that lipids are biomolecules also found in the cell membrane. Lipid nanostructures with biosafety, long circulation time, and modifiable properties attract attention as gene and drug carrier systems. Ionizable cationic lipids, in particular, are seen as safer and more effective candidates among liposomes due to their pH sensitivity, ability to stabilize negatively charged nucleic acids with their positive charges, integration into the cell membrane, and ability to escape the immune system.

Molecular Dynamics (MD) simulations study intermolecular and intramolecular interactions using computer technologies. MD simulations can produce results compatible with experimental data, providing researchers with cost and time savings and

a better understanding of molecular-level interactions. Dissipative Particle Dynamics (DPD), used for simulating complex biological systems, can perform efficient simulations on high time scales and in large systems, making it ideal for studying interactions between ionizable cationic lipids and precisely structured mRNA. This study aims to perform simulations using the DPD method to understand the behavior of ionizable cationic lipids used in mRNA-drug carrier systems and to examine intermolecular and intramolecular interactions in detail. By using the DPD method to examine nanostructures formed with ionizable cationic lipids in the transport of mRNA into the cell, this study aims to contribute to the knowledge in this field and help determine new and effective strategies in developing mRNA transport systems. In this thesis, the Dissipative Particle Dynamics method will be used to examine in detail the mRNA transport mechanism and the intermolecular interactions of the nanostructure formed with ionizable cationic lipids.

Year : 2024

Number of Pages : 52

Keywords : Nanotechnology, nanoliposome, drug delivery systems, molecular simulations, mRNA, ionizable cationic lipids, DOTMA, DOTAP

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Gökhan KAÇAR'a teşekkür ederim. Desteklerini ve sevgilerini her zaman hissettiğim aileme, ilkokul öğretmenim Sevgi UYANIK'a verdikleri emekler için minnettarım ve teşekkür ederim. Bu alışma TÜBİTAK 221Z263 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir. Simülasyonların bir bölümünün gerçekleştirilmesinde TÜBİTAK ULAKBİM TRUBA kaynakları kullanılmıştır.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	5
GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	5
2.2. Lipit İlaç Taşıyıcı Sistemler	6
2.3. mRNA	9
2.4. Moleküler Dinamik Simülasyonu	11
2.5. Kaba Taneli Moleküler Dinamik Simülasyonları ve DPD	12
BÖLÜM 3	16
MATERYAL VE SİMÜLASYON DETAYLARI	16
3.1. Materyal	16
3.2. Materyallerin Kaba Taneleme Modelleri	17
3.3. DPD Simülasyon Detayları ve Parametreleri.....	18

BÖLÜM 4	23
BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1. Kritik Misel Konsantrasyonu Belirlenmesi.....	23
4.2. mRNA Yüklenmesi.....	27
4.3. Misel Çap Analizi	29
4.4. Göreceli Şekil Anizotropisi Analizi	29
4.5. Yoğunluk Profili Analizi.....	30
BÖLÜM 5	33
SONUÇLAR.....	33
KAYNAKLAR.....	36
ÖZGEÇMİŞ	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Farklı malzeme ile oluşturulan farklı yapılardaki ilaç taşıyıcı sistemlerin gösterimi. (Veerapandian ve ark. (2023)).	2
Şekil 2.1. İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan materyallerin boyutlarını göstermektedir (https://bilsenbesergil.blogspot.com/p/nanopartikül-nanoparticle.html).	5
Şekil 2.2. Lipozomların yapısı gösterilmektedir. (Rooijen (1998)).	7
Şekil 2.3. mRNA taşınması için kullanılan iyonize edilebilir lipid örnekleridir. (Guevara M. L., Persano F. & Persano S. (2020). <i>Frontiers in Chemistry</i> .)	8
Şekil 2.4. Ökaryotik bir hücrede protein sentezi gösterilmektedir. (Nature Education https://www.nature.com/scitable/topicpage/gene-expression-14121669/)	10
Şekil 2.5. mRNA taşınmasında kullanılan sistemler ve tedavi edilebilecek hastalıklar gösterilmektedir (Fang, Chen (2022)).	11
Şekil 2.6. DPD tekniği ile simülasyon yürütmenin aşamaları	13
Şekil 3.1. (a) İyonize katyonik lipid DOTAP, (b) iyonize katyonik lipid DOTMA, (c) AUGUUU dizilimli mRNA'yı ve (d) su moleküllerinin kimyasal yapısını temsil etmektedir.	17
Şekil 3.2. Tez kapsamında çalışılan moleküllerin kaba taneleri gösterilmiştir. (a) DOTAP, (b) DOTMA iyonize katyonik lipidlerini, (c) mRNA (AUGUUU) ve (d) su molekülünün kaba tanelenmesini göstermektedir.	18
Şekil 4.1. DOTMA iyonize edilmiş katyonik lipidinin kritik misel konsantrasyonu belirlenmesi için yürütülen simülasyon sonuçlarıdır. (a) %0,5, (b) %2,5, (c) %4,5, (d) %5,0, (e) %6,5, (f) %7,5, (g) %8,5, (h) %10 DOTMA konsantrasyonunu göstermektedir.	26

Şekil 4.2. DOTMA ve mRNA'nın belirtilen etkileşim parametreleri ve simülasyon koşullarında elde edilen simülasyon sonuçları.....	27
Şekil 4.3. DOTMA ve mRNA'nın Q ve N ₃ boncukları arasındaki etkileşim parametresinin 80 <i>kBT</i> olduğu simülasyon sonucunu göstermektedir.....	28
Şekil 4.4. DOTAP iyozine katyonik lipidi ve mRNA simülasyon sonuçları.....	28
Şekil 4.5 DOTMA-mRNA simülasyonunda DOTMA lipidin yoğunluk profili.....	30
Şekil 4.6. DOTMA-mRNA simülasyonunda mRNA'nın yoğunluk profilidir.	31
Şekil 4.7. DOTAP-mRNA simülasyonunda DOTAP lipidinin yoğunluk profilidir.....	31
Şekil 4.8 DOTAP-mRNA simülasyonunda mRNA'nın yoğunluk profilidir.....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan iyonize edilmiş katyonik lipit DOTAP ve DOTMA'nın kaba tanelerinin çözünürlük parametreleridir. N ₁ -N ₂ boncukları DOTAP, N ₃ ise DOTMA iyonize katyonik lipidin linker grubunu temsil etmektedir. Diğer tüm boncuklar her iki iyonize katyonik lipitte de aynı kimyasal grupları temsil etmektedir.	19
Çizelge 3.2. Tez kapsamında çalışılan mRNA (AUGUUU) molekülünün kaba tanelerinin çözünürlük parametreleridir.	19
Çizelge 3.3. DOTAP iyonize katyonik lipidi ile mRNA'nın etkileşim parametreleri gösterilmektedir.	20
Çizelge 3.4. DOTMA iyonize katyonik lipidi ile mRNA'nın etkileşim parametreleri gösterilmektedir.	20
Çizelge 3.5. DOTAP ve DOTMA molekülleri için MD verilerinden elde edilen bağ uzunlukları.	21
Çizelge 3.6. Lipit boncuklarının molekül içinde birbirleri ile yaptıkları açı değerleri gösterilmektedir.	22
Çizelge 4.1. CMC belirlemesi için kullanılan DOTMA konsantrasyonları ve konsantrasyona denk gelen molekül sayıları gösterilmektedir.	24
Çizelge 4.2 Lipit-mRNA simülasyonları sonucunda elde edilen misellerin çap analizi.	29
Çizelge 4.3 Göreceli Şekil Anizotropisi analiz sonucudur.	30

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

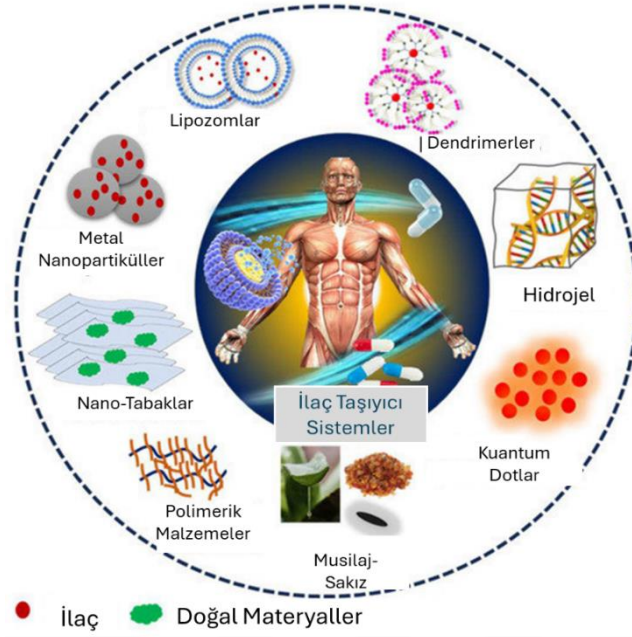
a_{ij} :	i ve j kaba tanelerinin arasındaki DPD etkileşim parametresi
E :	Enerji
F_{ij}^T :	Kaba tane üzerine etkiyen toplam kuvvet
F_{ij}^C :	Kaba tane üzerine etkiyen koruyucu kuvvet
F_{ij}^D :	Kaba tane üzerine etkiyen dağıtıcı kuvvet
F_{ij}^R :	Kaba tane üzerine etkiyen rastgele kuvvet
N :	Boncuk sayısı
P :	Basınç
r_{DPD} :	Kesme uzaklık değeri
T :	Sıcaklık
V :	Hacim
k_B :	Boltzmann sabiti
ρ_i :	i kaba tanesinin boyutsuz olarak yoğunluğu
δ :	Çözünürlük parametresi
χ_{ij} :	Flory-Huggins parametresi
κ^{-1} :	Boyutsuz izotermal sıkıştırılabilirlik
CGMD:	Kaba Taneli Moleküler Dinamik
CMC:	Kritik Misel Konsantrasyonu
DP:	Yoğunluk Profili
MD:	Moleküler Dinamik

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Nanoteknoloji, farmasötik alanında birçok yeni gelişmede önemli bir rol oynamaktadır. Bu yeniliklerden biri de ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesidir. İlaç taşıyıcı sistemler, ilaç moleküllerini içine alarak taşıyan ve koruyan nano boyuttaki yapılardır. İlaç taşıyıcı sistemler, terapötik verimi artırma ve istenmeyen yan etkileri azaltmak amacıyla belirli bölgelere özel ilaç taşınmasını gerçekleştirme ve ilgili bölgede istenilen zamanda ilaç salım gerçekleşmesi amacıyla kullanılır. Ayrıca ilaç taşıyıcı sistemler ilacın sirkülasyon süresini artırarak düşük doz yüksek biyoyararlanım sağlar (R. Singh, J. W. Lillard,2009).

İlaç taşıyıcı sistemler lipid tabanlı yapılardan metal nanoparçacıklara, polimerik sistemlerden biyolojik moleküllere kadar geniş bir yelpazede malzemeler ile oluşturulabilmektedir. Lipidler hücre zarında da bulunan biyolojik moleküllerdir. İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanıldıklarında bu özelliklerinden dolayı toksik etki yapmaz ve biyoyumlu özelliklerinden dolayı biyolojik olarak parçalanabilirler. Lipidler taşıdıkları moleküllerin stabilizasyonunu sağlayıp vücut içi sirkülasyonunu artırırlar (A. Yurdakul, R. ATAV, 2007).



Şekil 1.1. Farklı malzeme ile oluşturulan farklı yapılarıdaki ilaç taşıyıcı sistemlerin gösterimi. (Veerapandian ve ark. (2023)).

Mesajcı RNA (mRNA) DNA'dan transkripsiyon ile sentezlenen ve ribozoma translasyon işlemi için protein sentez kodlarını taşıyan biyomoleküldür. DNA'da bulunmayan bir genetik kod proteine çevrilemez ve bu yüzden hücreye sahip olmadığı bir genin ürününü sentezletmek istendiğinde mRNA dışarıdan verilebilir. Hassas yapıda olan mRNA'nın hücre içine iletimi günümüzde nanoyapılar ile gerçekleştirilmektedir. Gen ve ilaç taşıyıcı sistemler olarak biyogüvenli, sirkülasyon süresi uzun, modifiye edilebilir lipid nanoyapılar en öne çıkan adaylardır (Matsumoto ve ark. 2008).

İyonize olabilen katyonik lipidler pH duyarlıdır. Ortama göre protonlanabilir veya iyonlaşabilirler. İyonize olabilen katyonik lipidlerin hücreye girişleri ve taşıdıkları yükü serbest bırakmaları diğer lipid nanotaşıyıcılarla karşılaştırıldığında daha fazladır. Bu özellikleri, pH duyarlı protonlaşma veya iyonize olma yeteneklerinden kaynaklanır ve transfeksiyon (hücrelere gen aktarımı) yeteneklerini olumlu etkiler (Y. Zhao, L. Huang, 2016). İyonlaşabilir olmaları negatif yüklü nükleik asitleri taşıdıklarında molekülün stabilitesini artırır. Literatürde yayımlanan çalışmalarda iyonize olabilen katyonik lipidlerin mRNA ile etkileşimi, yapının mekanik ve kimyasal-karakteristik özelliklerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir (Settanni, Brill, Haas & Schmid, 2021).

İyonize olabilen katyonik lipidlerin misel oluşum mekanizmaları ve mRNA ile etkileşimini anlamak için alternatif yaklaşımlardan moleküler simülasyon uygulamaları öne çıkmaktadır. Moleküler dinamik simülasyonları molekül içi ve moleküller arası etkileşimleri incelemek için önemli bir yöntemdir. Moleküler dinamik simülasyonlarından kaba taneli (coarse-grained) yöntem sistemdeki molekülleri belirli atom gruplarına ayırılıp ve atomistik detayın kaybolduğu düşük çözünürlüklü simülasyonların gerçekleştirilmesidir. Kaba taneli yöntem büyük sistemlerin simülasyonlarında araştırmacılara zaman ve bilgisayar gücü tasarrufu sağlar.

Tez kapsamında iyonize olabilen katyonik lipidler ve mRNA'nın moleküller arası etkileşimleri, misel morfolojisi, mRNA'nın miseldeki konumunu anlamak için simülasyonlar gerçekleştirilecektir. DOTMA (1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium-propane) ve DOTAP (Di-oleoil-3-trimethylammonium propane) iyonize olabilen katyonik lipidlerinin mRNA ile simülasyonları kaba-taneli bir simülasyon yöntemi olan Dağıtıcı Parçacık Dinamiği (DPD) tekniği kullanılarak yapılacaktır. Mesajcı RNA (mRNA) DNA'dan transkripsiyon ile sentezlenen ve ribozoma translasyon işlemi için protein sentez kodlarını taşıyan biyomoleküldür. DNA'da bulunmayan bir genetik kod proteine çevrilemez ve bu yüzden hücreye sahip olmadığı bir genin ürününü sentezletmek istendiğinde mRNA dışarıdan verilebilir. Hassas yapıda olan mRNA'nın hücre içine iletimi günümüzde nanoyapılar ile gerçekleştirilmektedir. Gen ve ilaç taşıyıcı sistemler olarak biyogüvenli, sirkülasyon süresi uzun, modifiye edilebilir lipid nanoyapılar en öne çıkan adaylardır (Matsumoto ve ark. 2008).

İyonize olabilen katyonik lipidler pH duyarlıdır. Ortama göre protonlanabilir veya iyonlaşabilirler. İyonize olabilen katyonik lipidlerin hücreye girişleri ve taşıdıkları yükü serbest bırakmaları diğer lipid nanotaşıyıcılarla karşılaştırıldığında daha fazladır. Bu özellikleri, pH duyarlı protonlaşma veya iyonize olma yeteneklerinden kaynaklanır ve transfeksiyon (hücrelere gen aktarımı) yeteneklerini olumlu etkiler (Y. Zhao, L. Huang, 2016). İyonlaşabilir olmaları negatif yüklü nükleik asitleri taşıdıklarında molekülün stabilitesini artırır. Literatürde yayımlanan çalışmalarda iyonize olabilen katyonik lipidlerin mRNA ile etkileşimi, yapının mekanik ve kimyasal-karakteristik özelliklerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir (Settanni, Brill, Haas & Schmid, 2021).

İyonize olabilen katyonik lipidlerin misel oluşum mekanizmaları ve mRNA ile etkileşimini anlamak için alternatif yaklaşımlardan moleküler simülasyon uygulamaları öne çıkmaktadır. Moleküler dinamik simülasyonları molekül içi ve moleküller arası etkileşimleri incelemek için önemli bir yöntemdir. Moleküler dinamik simülasyonlarından kaba taneli (coarse-grained) yöntem sistemdeki molekülleri belirli atom gruplarına ayırılıp ve atomistik detayın kaybolduğu düşük çözünürlüklü simülasyonların gerçekleştirilmesidir. Kaba taneli yöntem büyük sistemlerin simülasyonlarında araştırmacılara zaman ve bilgisayar gücü tasarrufu sağlar.

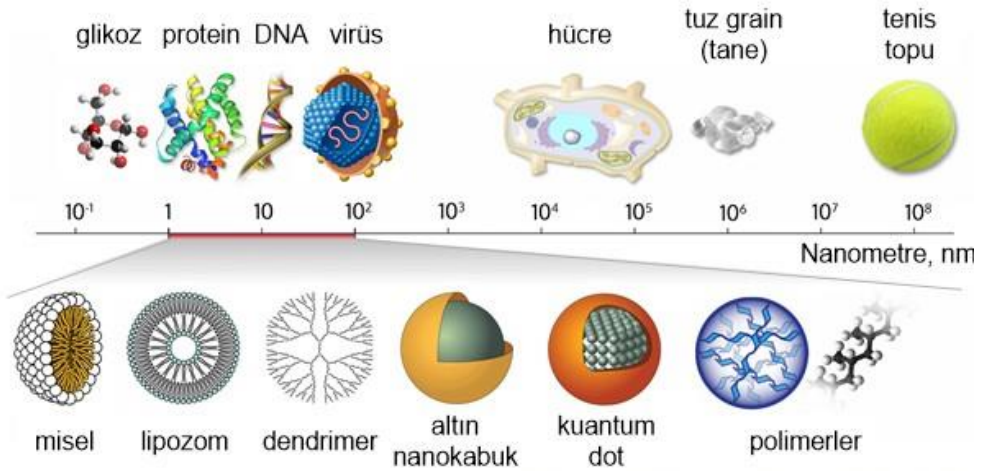
Tez kapsamında iyonize olabilen katyonik lipidler ve mRNA'nın moleküller arası etkileşimleri, misel morfolojisi, mRNA'nın miseldeki konumunu anlamak için simülasyonlar gerçekleştirilecektir. DOTMA (1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium-propane) ve DOTAP (Dioleoil-3-trimethylammonium propane) iyonize olabilen katyonik lipidlerinin mRNA ile simülasyonları kaba-taneli bir simülasyon yöntemi olan Dağıtıcı Parçacık Dinamiği (DPD) tekniği kullanılarak yapılacaktır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. İlaç Taşıyıcı Sistemler

Farmasötik alanında kullanılan geleneksel dozaj formlarının kontrolsüz salınım, stabilite, hedefe yönelik olmama, ağrı ve yan etki gibi dezavantajları vardır (A. Sultana ve ark. 2022). İlaç sektöründe bulunan ilaçların suda zayıf çözünürlük ve geçirgenlik sorunları vardır bu yüzden ilaçların biyoyararlanımı düşmektedir (S. M. Moinuddin ve ark. 2022). Farmasötik alanındaki bu dezavantajlar araştırmacıları yeni arayışlara yönlendirmiştir. Nanoteknoloji, metrenin milyarda biri olan nanometre boyutundaki parçacık bilimi olarak tanımlanır ve 10-100 nm arasındaki parçacıkları kapsar. Nanoteknolojinin farmasötik alanındaki en önemli katkılarından biri olarak, ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi gösterilebilir. İlaç taşıyıcı sistemler nanopartiküller, nano emülsiyonlar, polimerzomlar, nano süspansiyonlar, lipozomlar ve karbon nanotüpler olarak sınıflandırılabilir (Çomoğlu & Sayner, 2016).



Şekil 2.1. İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan materyallerin boyutlarını göstermektedir (<https://bilsenbesergil.blogspot.com/p/nanopartikul-nanoparticle.html>).

İlaç taşıyıcı sistemler, ilaç moleküllerini içine alarak taşıyan ve koruyan nano boyuttaki yapılardır. İlaç taşıyıcı sistemler, terapötik verimi artırma ve istenmeyen yan etkileri azaltmak amacıyla belirli bölgelere özel ilaç taşınmasını gerçekleştirme ve ilgili bölgede istenilen zamanda ilaç salım gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılır. Ayrıca ilaç taşıyıcı sistemler ilacın sirkülasyon süresini artırarak düşük doz yüksek biyoyararlanım sağlar (R. Singh, J. W. Lillard, 2009). İlaç taşıyıcı sistemlerin amacı, aktif ilaç moleküllerinin hedeflenen bölgede uzun süre birikmesini sağlayarak biyoyararlanımı artırmak ve seçici etki gösterip yan etkileri azaltmaktır (D. Liu ve ark. 2016).

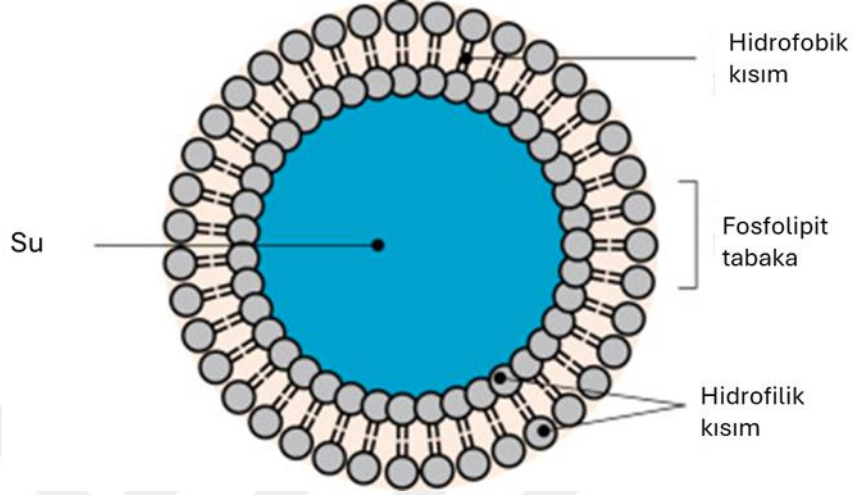
2018 yılında Patra ve arkadaşlarının yayınladıkları makaleye göre piyasada FDA tarafından onay almış ve ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanıldığı 51 ilaç vardı. Bu ilaçlar kemoterapötik, antimikrobiyal maddelere ve tıbbi uygulama, psikolojik, otoimmün hastalıklara etki etmektedir (J.K. Patra ve ark. 2018). FDA (Food and Drug Administration) yayınladığı listede 2024 yılı itibari ile sayının arttığı görülmektedir. FDA tarafından da onaylanan ve liposomal ilaç taşıyıcı sistem ile hedeflenen tümör dokusunda birikmesini sağlayarak Doksorubisinin yan etkileri azaltan DOXIL®. Bir diğer örnek olarak doğum kontrolü için hormonu kontrollü ve sürekli salınan polimer implant olan Nexplanon® gösterilebilir.

Lipit moleküller hücre zarında ve metabolizmasında önemli roller üstlenir bu yüzden lipit ilaç taşıyıcı sistemler yüksek biyoyararlanım, düşük yan etki ile sonuçlanan başarılar vaat etmektedir.

2.2. Lipit İlaç Taşıyıcı Sistemler

Lipitler, karbon, hidrojen ve oksijen atomlarından oluşan organik moleküllerdir. Lipitler yağ asitleri, trigliseridler, fosfolipidler, steroidler ve glikolipidler gibi çeşitli sınıflara ayrılırlar. Enerji depolama, hücre zarlarının yapısını oluşturma, organları koruma, sinyal iletimi ve vitamin taşıma gibi önemli işlevlere sahiptirler (Guo R, Chen Y ve ark. 2020). Lipit sınıfındaki bazı moleküller amfifilik özellik gösterir (van Meer, G. ve ark. 2008). Amfifilik moleküller, hidrofilik ve hidrofobik kısımları sayesinde su içinde miselleşme davranışı gösterir. Su içerisinde hidrofilik kısımları suya yönelirken hidrofobik kısımları ise sudan kaçma eğilimi gösterir (AlSawaftah NM. Ve ark., 2022). Hidrofobik kısımların sudan kaçma isteği ile moleküller birleşme eğilimi gösterir. Bu davranış ile suya temas eden yüzeyleri azaltılmış olur. Bu davranışla, moleküllerin

hidrofilik kısımları dışta, hidrofobik kısımları ise içte birleşmiş olur. Oluşan bu yapıya ise misel denir.

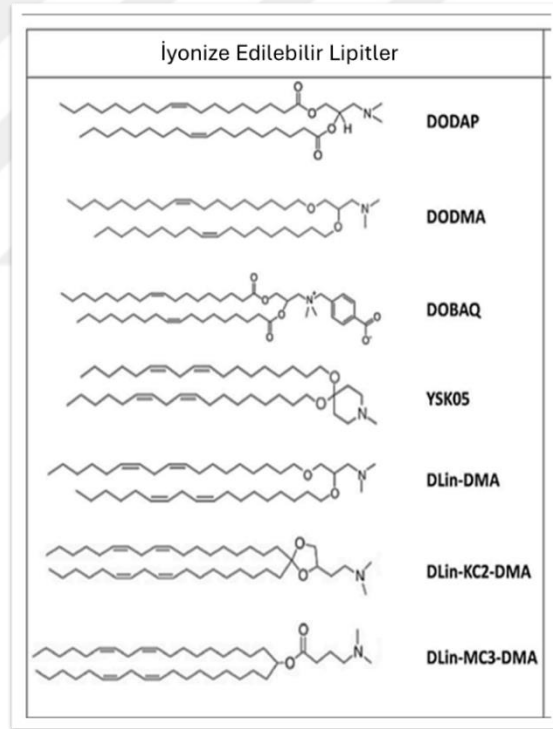


Şekil 2.2. Lipozomların yapısı gösterilmektedir. (Rooijen (1998)).

Amfifilik lipidlerin bu özelliğinden yararlanarak ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Lipitlerden oluşturulan ilaç taşıyıcı yapılara lipozom denir. Lipit nano taşıyıcıların ortalama çapı 50 ila 200 nanometre arasındadır (Chan, Du, Dong & Cheng, 2021). Lipozomlar nükleik asitler başta olmak üzere taşıdıkları molekülün kapsüllemesi, korunması ve hücre içine iletimi için tasarlanırlar. Lipozomlar hücre zarı yapısının da lipid ağırlıklı olmasından dolayı yüksek transfeksiyon sağlar. İmmün sistemden kaçabilecek moleküllerin eklenmesiyle daha düşük dozda daha fazla biyoyararlanım sağlarlar (Hou, Zaks, Langer & Dong, 2021). Lipit sınıfından son yıllarda pandemi aşılarda da kullanılan ve genetik materyalin stabilitesini diğer lipidlere göre daha iyi sağlayan, bu özelliğinden dolayı transfeksiyon yeteneğini de arttıran iyonize edilebilir lipidler dikkat çekmektedir.

İyonize edilebilir lipidler ilaç taşıma ve gen tedavisinde kullanılan lipid türlerindedir. İyonize edilebilir lipidler pH'a duyarlı gruplar içerir ve buldukları ortama göre artı ya da eksi yük ile yüklenebilirler. pH'a duyarlı bu özelliklerinden dolayı hücre zarını geçmeleri daha kolaylaşır ve transfeksiyon yetenekleri yükselir. Vücut içine girdiklerinde kan pH'ına uygun olarak nötr davranırlar bu özellikleri sayesinde hem immün sistemden kaçabilir hem de biyolojik olarak güvenli ve uyumlu olurlar (Kulkarni ve ark., 2019). İyonize lipid taşıyıcılar, genellikle endositoz yoluyla hücre içine girer ve

pH değışiklikleri ile taşıdıkları yükü serbest bırakırlar (Sun & Lu, 2023). İyonize edilebilir lipidler anyonik ve katyonik olmak üzere sınıflandırılabilir. İyonize edilebilir anyonik lipidler, genellikle karboksilik asit, fosfat veya sülfat grupları gibi asidik fonksiyonel gruplar içerir. Bu gruplar, pH'a bağılı olarak protonlanma ve deprotonlanma yoluyla negatif yük kazanabilirler. İyonize anyonik lipidler, hücre membranının yapısal bütünlüğünü korumaktan, hücre içi ve hücreler arası sinyal iletimine kadar geniş bir yelpazede görev alırlar (Vorobyov & Allen, 2011). Katyonik lipidler, pozitif yüklü amin gruplarını veya dördüncül amonyum gruplarını içeren baş gruplara sahiptir. Bu pozitif yük sayesinde nükleik asitler ve negatif yüklü biyomoleküllerle elektrostatik etkileşimler kurarlar (Sahin, Karikó, Türeci, 2014). Hücre zarları genel olarak negatif yüklü fosfolipitlerden oluştuğu için katyonik lipidler kolaylıkla etkileşerek zarla kaynaşır ve taşıdıkları moleküllerin hücre içine geçmesini sağlar.



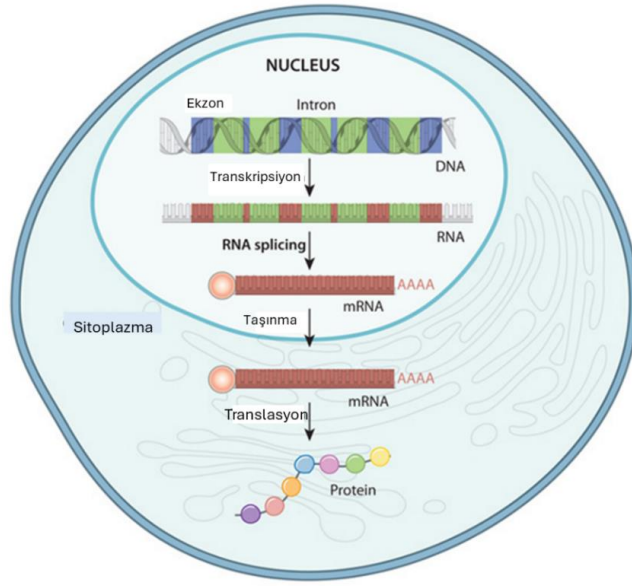
Şekil 2.3. mRNA taşınması için kullanılan iyonize edilebilir lipid örnekleridir. (Guevara M. L., Persano F. & Persano S. (2020). *Frontiers in Chemistry*.)

2020 mart ayından itibaren küresel çapta etki eden korona virüse karşı üretilen aşılarda iyonize edilebilir katyonik lipidler kullanılmıştır. Pandemi aşılı bir yıldan kısa sürede yüksek başarı ile üretilmiştir. İyonize edilebilir katyonik lipidlerin kullanıldığı taşıyıcı sistemlere mRNA yüklenmiştir. mRNA hücre içerisinde patojenin proteinini

sentezleterek immün sistemin tanınmasını sağlar. Aşı teknolojisinde mRNA güçlü bağışıklık yanıtı oluşturması ve hastaya ölü ya da canlı patojen verilmesini ortadan kaldırdığından tercih edilmektedir. mRNA taşınması aşı teknolojisinde umut vaat etmektedir.

2.3. mRNA

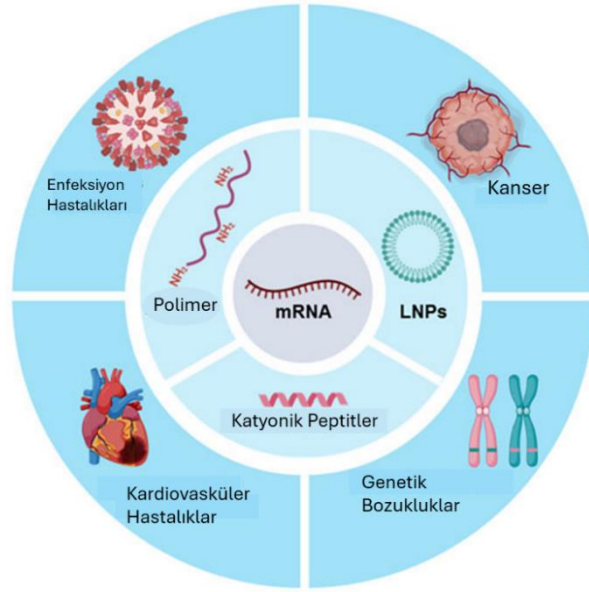
Hücre sürekliliği olan bir organizasyona sahiptir. Hücrenin yaşamsal faaliyetleri için aynı anda birden çok protein sentezlenir. Hücrede sentezlenen protein yapıcı-onarıcı, düzenleyici görevlere sahiptir. İşleyişi sağlayan sinyal moleküller, hormonlar, enzimler protein yapılıdır. mRNA protein sentezi için gerekli genetik kodu taşır. DNA'dan enzimler proteini kodlayan genleri okur. DNA'dan gen okunması ile mRNA sentezlenir. Bu süreç transkripsiyon denir. Okuma sonucunda pre-mRNA adı verilen ekzon (kodlama yapan genler) ve intron (kodlama yapmayan genler) içeren molekül sentezlenir. Bu molekülün 5' ucunda cap, 3' ucunda ise poli-A kuyruğu bulunmaktadır. 5' cap ve 3' poli-A kuyruğu molekülün stabilitesini sağlamanın yanı sıra sitoplazmada enzim yıkımından da korur ve translasyon işlemi için tanınmasını sağlar. Çekirdekte gerçekleşen bu olay pre-mRNA'nın splicing denilen enzimlerle kodlama yapmayan intron bölgelerin kesilip atılmasıyla devam etmektedir. İntron bölgelerinin çıkarılmasıyla olgun mRNA elde edilir. Olgun mRNA okunması ve protein sentezlenmesi için ribozoma ulaşmak üzere sitoplazmaya gider. Ribozomun mRNA'yı okuması ve protein sentezlenmesi sürecine translasyon denmektedir. Ökaryotik hücrelerde transkripsiyon çekirdekte gerçekleşir ve translasyon ise sitoplazmadadır. Prokaryotik hücrelerde ise tüm süreç sitoplazmada gerçekleşir. Olgun mRNA sitoplazmaya geçer. Ribozom ekzon bölgelerini içeren olgun-mRNA'yı tanır ve bu moleküle bağlanarak proteini sentezler böylece hayati fonksiyonlar için önemli olan polipeptitler sentezlenir. Polipeptitler post-translasyonel modifikasyonlar ile fonksiyonel hale gelir.



Şekil 2.4. Ökaryotik bir hücrede protein sentezi gösterilmektedir. (Nature Education <https://www.nature.com/scitable/topicpage/gene-expression-14121669/>)

DNA’da bulunmayan bir genin ürünü olan protein sentezlenemez. Hücreye iki yöntem ile orijinal DNA’da olmayan bir genin ürünü sentez ettirilebilir. Hücreye gen ekleme, modern biyoteknolojik yöntemlerle mümkündür fakat eklenen genin çekirdeğe ulaşması gerekir. Bu yöntem ile DNA’da mutasyon oluşturma ihtimali vardır. Bir diğer yöntem ise DNA ile etkileşime girilmeden ribozoma genetik kodu gönderebileceğimiz mRNA iletimidir. Bu yöntem ile istenilen proteinin kodlanmasını sağlayacak mRNA hücre içerisine sokulur. Hücreye mRNA transferi DNA’ya gen eklenmesine göre daha güvenilir bir yöntemdir çünkü mRNA sitoplazmada işlem görür ve DNA ile etkileşimde bulunmaz (Sahin, Karikó, Türeci, 2014). mRNA'nın sitoplazmada hızlı bir şekilde işlenmesi, protein sentezinde çabuk ve etkili bir yanıt sağlar. Bu hızlı işlem, in vivo dağıtımda yüksek verimlilik sunarak terapötik etkilerin çabuk ortaya çıkmasını sağlar.

mRNA’lar hassas yapıdadırlar bu yüzden hücreye taşınması sırasında nükleazlar ve kararsız yapılarından dolayı yıkılırlar. Transfeksiyon yeteneğini arttırmak için mRNA’lar taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyar (Pardi, Hogan, Porter & Weissman, 2018). İyonize edilebilir katyonik lipid taşıyıcılar ile taşınmaları stabilite sorunlarını çözmektedir. İyonize edilebilir katyonik lipidlerin mRNA ile etkileşimi tam olarak bilinmemektedir. mRNA'nın misel morfolojisine etkisi ve bu yapının mekanik ve kimyasal özelliklerinin taşımaya etkisi tam olarak bilinmemektedir (Settanni, Brill, Haas & Schmid, 2021).



Şekil 2.5. mRNA taşınmasında kullanılan sistemler ve tedavi edilebilecek hastalıklar gösterilmektedir (Fang, Chen (2022)).

Moleküler dinamik simülasyonları (MD) moleküller arası ve molekül içi etkileşimleri Newton hareket yasalarını kullanarak modellendiği tekniktir. Deneysel yöntemlerle elde edilemeyen atom ve molekül bazındaki detayları bilgisayar teknolojileri ile incelemeye ve anlamaya yöneliktir. Hassas yapılı mRNA'nın taşınmasında etkili olan iyonize edilebilir katyonik lipidlerin MD yöntemleri ile incelenmesiyle oluşturdukları misellerin morfolojileri, taşıma kapasiteleri, kritik misel oluşum konsantrasyonları (CMC), nükleik asidin misel içerisindeki konumu, mRNA ve lipid molekülleri arasındaki etkileşimlerin yanı sıra lipit-lipit ve mRNA-mRNA molekülleri arasındaki etkileşimlerde incelenebilir. Simülasyonlar ile iyonize edilebilir katyonik lipid davranışları tanımlanabilir. Bu çalışmaların ışığında terapötik etkisi olan hassas yapılı mRNA'nın taşınması için gereken bilgiler deneysel çalışmalara kazandırılabilir.

2.4. Moleküler Dinamik Simülasyonu

Moleküler Dinamik (MD) simülasyonları Newton mekaniğini kullanarak atom ve moleküllerin fiziksel hareketlerini modeller. Matematiksel formüller ile hesaplanan etkileşim parametreleri atom ve moleküllerin davranışlarını tanımlar. Belirli süreler ile gerçekleştirilen simülasyonlar sonucu sistemde moleküller arası ve molekül içi davranışlar, hız, konum, enerji gibi özellikler hakkında bilgi edinilir.

İlk kez 1949 yılında Metropolis ve arkadaşları tarafından tanıtılan MD (Metropolis, Ulam, 1949), birçok alanda atom-atom, molekül-molekül ve molekül-atom davranışlarını anlamak için kullanılır. MD biyoloji alanında protein katlanması ve ligand bağlanması, enzimatik reaksiyonlar (Warshel, Levitt, 1976), membran dinamiği ve nükleik asitlerin davranışları gibi süreçlerin analizine olanak tanır. MD ayrıca, biyomoleküllerin birbiri ile olan etkileşimleri, iyon kanal fonksiyonları, antijen-antikor etkileşimleri ve hücre sinyalleşmesinin incelenmesinde de kullanılır.

Araştırmacıya zaman ve para tasarrufunun yanı sıra deneyselde gözlemlenemeyen atomistic detayları sunan MD yöntemi, Klasik moleküler dinamik (MD), Kaba taneli (Coarse-grained) Moleküler Dinamik (CGMD), Kuantum Mekanik simülasyonları (QMD) olmak üzere üç farklı teknik olarak incelenebilir (Salo-Ahen ve ark., 2021). Klasik moleküler dinamik (MD) simülasyonları, sistemi Newton yasalarına göre modeller ve geniş ölçekli biyolojik süreçlerin anlaşılmasında kullanılır. Kuantum mekanik simülasyonları, atom ve moleküllerin kuantum yasalarına göre davranışlarını inceleyerek detaylı analizlerini sağlar fakat yüksek hesaplama gücü gerektirir. Kaba taneli moleküler dinamik simülasyonları ise atomistik ayrıntıları azaltarak büyük biyomoleküler sistemlerin dinamiklerini hızla inceler (Brooks ve ark., 2021).

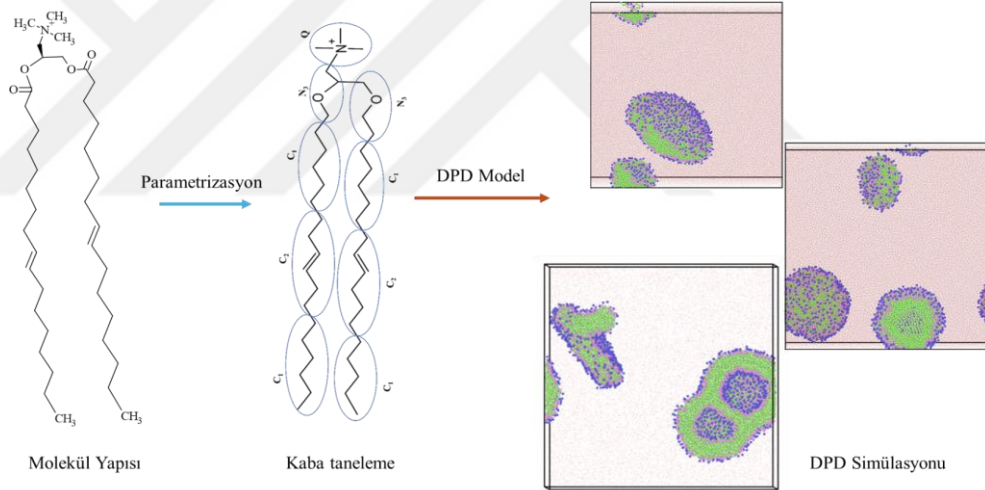
Hassas mRNA'nın taşınmasında miselin morfolojisi, misel oluşum konsantrasyonu, lipidlerin çözücü içerisindeki davranışları önemlidir. Kaba taneli yöntem ile azaltılan atomistik ayrıntılar moleküller arası etkileşimi de azaltır. İlaç ve mRNA taşıyıcı sistemler gibi kompleks sistemlerin kendi-kendine kurulum süreçleri incelenebilir.

2.5. Kaba Taneli Moleküler Dinamik Simülasyonları ve DPD

Kaba Taneli Moleküler Dinamik (CGMD) simülasyonları, biyomoleküler sistemlerin daha uzun süre ve daha büyük ölçekler de incelenmesine olanak tanıyan yöntemdir. Kaba taneli yöntem ile sistemdeki moleküller belirli atom gruplarına ayrılır. Her bir atom grubuna boncuk (bead) denir. Boncuklar molekülün kimyasal yapısına uygun olacak şekilde ve gruplar arası ağır atom sayısına dikkat edilerek belirlenir. Kaba taneli yöntemde etkileşim parametreleri hesaplanırken gruplar dikkate alınmıştır. Kaba taneli yöntem ile her bir atomun konum ve hareketini ayrı ayrı incelenmez, bir araya gelen atom gruplarını tek bir birim olarak ele alır. Atomları gruplandırarak atomik

ayrıntılarının bir kısmını ortadan kaldırılır, böylece sistemin toplam serbestlik derecesi azaltılmış olur ve simülasyonlar hızlandırılır. Kaba Taneli Moleküler Dinamik modelleri, özellikle biyolojik süreçlerin makroskobik özelliklerini anlamaya yardımcı olurken, deneysel tekniklerle elde edilemeyen detaylı yapısal ve dinamik bilgileri sağlar.

Araştırmacıların daha kompleks sistemleri daha uzun sürelerde bir çözücü içerisinde simüle edebildikleri Dağıtıcı Parçacık Dinamiği (Dissipative Particle Dynamics) tekniği ise büyük ve karmaşık sistemlerin sıvı bir ortamda mezoskopik ölçekte modellenmesine olanak sunan bir moleküler dinamik simülasyon tekniğidir. DPD tekniği ile moleküller atom gruplarına ayrılır ve her grup bir boncuk olarak temsil edilir. Bunlara DPD boncuğu denir. DPD boncukları daha az detay yükü ile uzun süreli büyük sistem simülasyonları yapmayı mümkün kılar. Teknik ile simülasyon sonucunda moleküllerin ortam şartlarındaki davranışları, moleküller arası etkileşimler ve molekül içi etkileşimler incelenebilir.



Şekil 2.6. DPD tekniği ile simülasyon yürütmenin aşamaları

DPD sisteminde, bir taneciğe etki eden kuvvet, koruyucu (\mathbf{F}_{ij}^C), dağıtıcı (\mathbf{F}_{ij}^D) ve rastgele (\mathbf{F}_{ij}^R) kuvvetlerin toplamı olarak hesaplanır. Koruyucu kuvvet, son yapının sorumluluğunu taşırken, dağıtıcı ve rastgele kuvvetler bir termostat gibi davranarak sistemin sıcaklığını kontrol eder. Taneciklerin etkileşim parametreleri, Flory-Huggins parametreleri (χ_{ij}) DPD etkileşimlerine uyarlanarak hesaplanır. Elde edilen etkileşim parametreleri, belirlenen taneciklerin birbirleriyle olan çekici ve itici etkileşimlerini tanımlamamıza olanak tanır. Çapraz etkileşimler için itici parametre, Flory-Huggins

etkileşim parametresi a_{ij} kullanılarak hesaplanır. DPD boncuğu üzerine etkiyen kuvvet Denklem 2.1 ile gösterilir:

$$\frac{dr_i}{dt} = v_i, \quad m \frac{dv_i}{dt} = \mathbf{f}_i \quad (2.1)$$

$$\mathbf{f}_i = \sum_{i \neq j} (\mathbf{F}_{ij}^C + \mathbf{F}_{ij}^D + \mathbf{F}_{ij}^R + \mathbf{F}_{ij}^H)$$

Denklem 2.1’de Newton’un hareket yasalarından başlayarak bir DPD boncuğu üzerine etki eden kuvvetler gösterilmiştir. DPD boncuğu üzerine etkiyen korunumlu, rastgele ve dağıtıcı kuvvetleri Denklem 2.2’de gösterilir:

$$\mathbf{F}_{ij}^C = \begin{cases} a_{ij} \left(1 - \frac{r_{ij}}{R_c}\right) \hat{\mathbf{r}}_{ij} & r_{ij} < R_c \\ 0 & r_{ij} \geq R_c \end{cases}$$

$$\mathbf{F}_{ij}^D = -\gamma \omega^D(r_{ij}) (\hat{\mathbf{r}}_{ij} \mathbf{v}_{ij}) \hat{\mathbf{r}}_{ij} \quad (2.2)$$

$$\mathbf{F}_{ij}^R = \sigma \omega^R(r_{ij}) \theta_{ij} \hat{\mathbf{r}}_{ij}$$

$$\mathbf{F}_{ij}^H = \sum C_S(r_{ij} - r_{ij,0})$$

Denklem 2.2’de a_{ij} farklı iki boncuğun birbirlerine uyguladıkları itici kuvveti tanımlamaktadır. Farklı boncuklar arası itici etkileşimin gücü $\mathbf{r}_{ij} = \mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j$, $r_{ij} = |\mathbf{r}_{ij}|$ ve $\hat{\mathbf{r}}_{ij} = \mathbf{r}_{ij}/|\mathbf{r}_{ij}|$. Dağıtıcı ve rastgele kuvvetler için $\mathbf{v}_{ij} = \mathbf{v}_i - \mathbf{v}_j$. $\omega^D(r_{ij}) = [\omega^R(r_{ij})]^2$ ve $\omega^R(r_{ij}) = 1 - r_{ij}/R_c$ arasındaki ilişki r_{ij} parçacık arasındaki mesafeye bağlı olan ve kesim mesafesi R_c ’de sıfır olan ağırlık fonksiyonlarını tanımlar. $\sigma^2 = 2\gamma k_B T$, k_B Boltzmann sabiti, T sıcaklık, θ_{ij} Gauss istatistiklerine sahip rastgele dalgalanan bir değişkendir. Groot and Warren çalışmalarında $\gamma=4.5$ olarak almaktadır. Harmonik kuvvet $\mathbf{F}_{ij}^H = \sum C_S(r_{ij} - r_{ij,0})$, C_S bağlı boncuklar arasındaki yay sabiti ve $r_{ij,0}$ denge bağ uzunluğudur. Boncukların etkileşim parametreleri Flory- Huggins parametrelerinin DPD etkileşimlerine uyarlanması ile edilir (Groot & Warren, 1997).

$$a_{ii} = \frac{\kappa^{-1} - 1}{2\rho 0.101} \quad (2.3)$$

Denklem 2.3, Klasik DPD yönteminde benzer boncukların kendi aralarındaki itici etkileşim parametrelerini hesaplamak için kullanılmaktadır. κ^{-1} suyun sıkıştırılabilirliğidir. Boncuk içerisindeki ağır atom sayısı ile κ^{-1} çarpılır. ρ ise sistemdeki boncuk yoğunluğudur.

$$a_{ij} = \frac{a_{ii} + a_{jj}}{2} + 3.5\chi_{ij} \quad (2.4)$$

$$\chi_{ij} = \bar{V}(\delta_i - \delta_j)^2 / k_B T \quad (2.5)$$

i ve j boncuklarının çözünürlük parametreleri δ_i ve δ_j , \bar{V} ise i ve j boncuklarının hacimlerinin ortalamasıdır. Denklem 2.4 elde edilen etkileşim parametreleri belirlenen boncukların birbirleri ile çekici ve itici etkileşimlerini tanımlar. DPD tekniği ile yapılan çalışmalar iyonize olabilen katyonik lipid davranışları tanımlayabilir. Bu çalışmaların ışığında terapötik etkisi olan hassas yapılı mRNA'nın taşınması için gereken bilgiler deneysel çalışmalara kazandırılabilir.

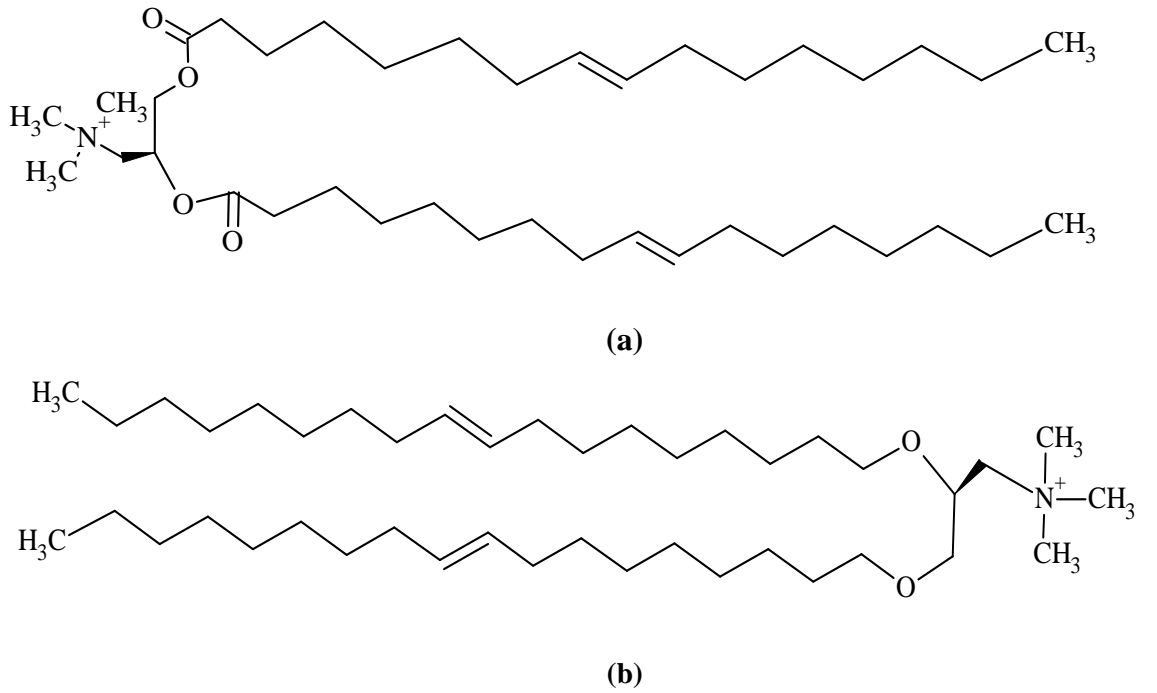
Bu yüzden DPD yöntemi kullanarak iyonize olabilen katyonik lipidlerden DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonyum-propan) ve DOTMA (1,2-di-O-oktadesenil-3-trimetilamonyum-propan) incelenecektir. İyonize lipid ile oluşturulmuş nanoyapının moleküler seviyedeki etkileşimlerini inceleyerek deneysel çalışmalarda dikkat edilmesi gereken hususlar, daha iyi kapsülleme ve taşıma için lipid üzerinde yapılabilecek değişiklikler bağlar arasındaki etkileşim ile hazırlanma ve saklama koşullarının optimizasyonu veya deney sırasında karşılaşılan sorunların nedenlerine kaynak olması; dolayısıyla deneysel çalışmalara yol göstermesi hedeflenmektedir.

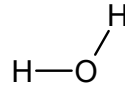
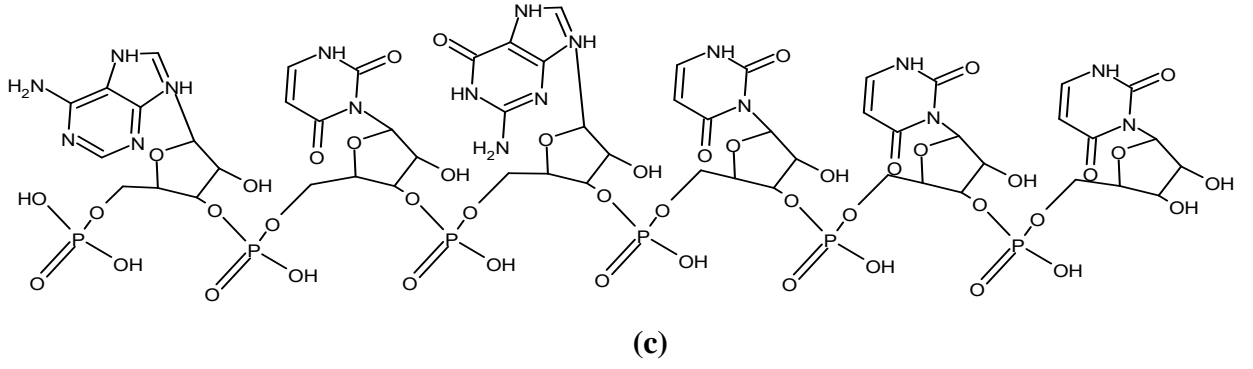
BÖLÜM 3

MATERYAL VE SİMÜLASYON DETAYLARI

3.1. Materyal

Lipozom oluştururken iyonize edilebilir katyonik lipitler 1,2-dioleiloksi-3-dimetilaminopropan (DODMA) ve 1,2-dioleil-3-dimetilamonyum-propan (DODAP) moleküllerinin, iyonize edilmiş halleri DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonyum-propan) ve DOTMA (1,2-di-O-oktadesenil-3-trimetilamonyum-propan) kullanılmıştır. mRNA ise 6 nükleotitlik AUGUUU olarak belirlenmiştir. Sistemin çözücüsü olarak su belirlenmiştir. Çalışmalarda kullanılan iyonize katyonik lipitler, mRNA ve suyun kimyasal yapıları Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

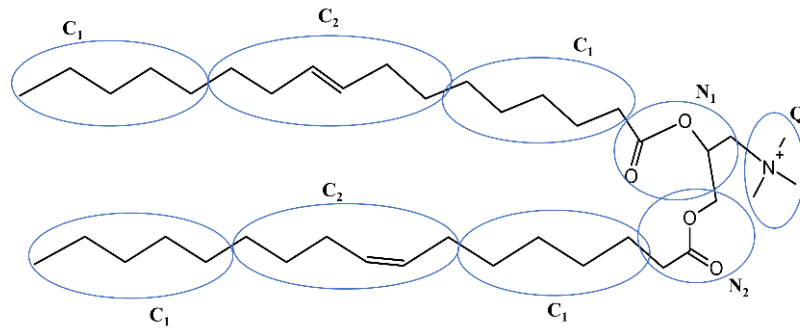


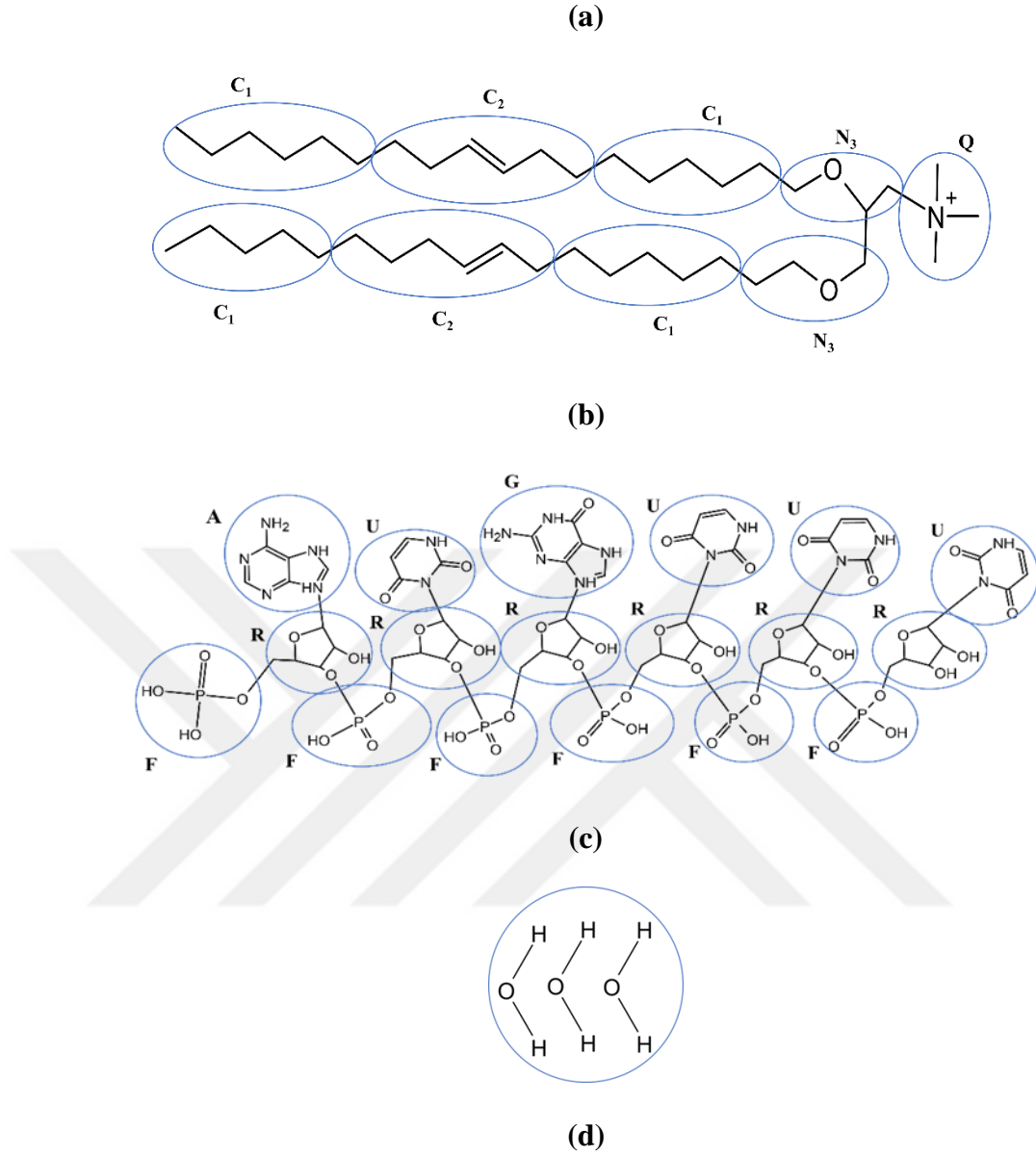


Şekil 3.1. (a) İyonize katyonik lipid DOTAP, (b) iyonize katyonik lipid DOTMA, (c) AUGUUU dizilimli mRNA'yı ve (d) su moleküllerinin kimyasal yapısını temsil etmektedir.

3.2. Kaba Tane Modelleri

Kaba taneleme yöntemi materyallerin belirli atom gruplarına ayrılmasıdır. Kaba-taneli modeller, moleküllerin hidrofilik ve hidrofobik gruplarına, ağır atom sayılarına, atomlar arası çift bağlara dikkat edilerek yapılmıştır. Tez kapsamında kullanılan materyaller Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Kaba tanelenme modelleri ise Şekil 3.2'de gösterilmektedir. Kaba taneleme yapılırken halkalı yapıların aynı grupta olmasına dikkat edilmiştir. DOTMA ve DOTAP hidrofilik (polar) bir baş grubu, iki linker grubu ve hidrofobik (apolar) altı kuyruk grubu olacak şekilde kaba-taneli modelleri oluşturulmuştur. İyonize katyonik lipidler 9, mRNA 18 kaba tane boncuğu olacak şekilde atom gruplarına ayrılmıştır. Su ise bir boncuk içerisinde 3 su molekülü olacak şekilde kaba tanelenmiştir.





Şekil 3.2. Tez kapsamında çalışılan moleküllerin kaba taneleri gösterilmiştir. (a) DOTAP, (b) DOTMA iyonize katyonik lipidlerini, (c) mRNA (AUGUUU) ve (d) su molekülünün kaba tanelenmesini göstermektedir.

3.3. DPD Simülasyon Detayları ve Parametreleri

Groot ve Warren (Groot & Warren, 1997), DPD model parametrelerini Flory-Huggins çözüm teorisi (Flory, 1941; Huggins, 1941) ile ilişkilendirerek, DPD simülasyonlarının deneysel sonuçlara uygun termodinamik davranışlar sergilemesini sağladılar. Bu tez çalışmasında Groot ve Warren tarafından ortaya konan ve yaygın olarak kullanılan klasik DPD yaklaşımı uygulanmıştır ve simülasyonlar gerçekleştirilmiştir. Hesaplamalar için Denklem 4 kullanılmış ve a_{ii} aynı kaba-taneler arasında $78 k_B T$ olarak

alınmıştır. Chi (χ_{ij}) parametresi farklı kaba tanelerin birbirlerine olan kimyasal afinitelerini niceliksel olarak karakterize etmektedir. Chi parametresi Denklem 5 kullanılarak hesaplanmıştır. Çözünürlük parametreleri literatürdeki deneysel çalışmalardan ve MD çalışmalarından elde edilebilmektedir. Literatürde çözünürlük parametreleri mevcut olmayan kaba-taneli modellerimizin çözünürlük parametrelerini proje kapsamında gerçekleştirdiğimiz MD çalışmaları ile hesaplanmıştır. Hesaplamalar Kohezif Enerji Yoğunluğu (CED) ile aşağıdaki denklemler kullanılarak hesaplanmıştır;

$$\delta = (CED)^{1/2}, \delta = \left(\frac{\Delta E_{coh}}{V_i}\right)^{1/2}, E_{coh} = \sum_{i=1}^n U_i - U_{condense} \quad (3.1)$$

Denklemde U_i molekülün izole haldeki ortalama potansiyel enerjisi, $U_{condense}$ molekülün yığın haldeki potansiyel enerjisidir. Sistemlerimizde kullanılan iyonize lipitlerin boncuklarının δ çözünürlük parametreleri Çizelge 3.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan iyonize edilmiş katyonik lipit DOTAP ve DOTMA’nın kaba tanelerinin çözünürlük parametreleridir. N₁-N₂ boncukları DOTAP, N₃ ise DOTMA iyonize katyonik lipidinin linker grubunu temsil etmektedir. Diğer tüm boncuklar her iki iyonize katyonik lipitte de aynı kimyasal grupları temsil etmektedir.

δ	Q	N ₁	N ₂	N ₃	C ₁	C ₂	W
	59,11	88,11	60,05	60,09	72,15	84,16	54,05

Tez çalışması kapsamında kaba tanelenen mRNA’nın ise etkileşim parametreleri Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Tez kapsamında çalışılan mRNA (AUGUUU) molekülünün kaba tanelerinin çözünürlük parametreleridir.

δ	R	F	A	G	U
	59,11	88,11	60,05	60,09	72,15

Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de belirtilen çözünürlük parametreleri kullanılarak kaba tanelerin etkileşim parametreleri hesaplanmıştır. Tez kapsamında kullanılan iyonize

katyonik lipidler ve mRNA'nın etkileşim parametreleri Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. DOTAP iyonize katyonik lipidi ile mRNA'nın etkileşim parametreleri gösterilmektedir.

a_{ij}	W	Q	N ₁	N ₂	C ₁	C ₂	R	F	A	G	U
W	78,00	78,11	142,42	129,89	161,35	155,87	151,42	102,92	89,92	92,65	87,06
Q		78,00	147,73	134,67	167,38	161,70	157,08	106,27	92,26	95,24	89,12
N ₁			78,00	78,68	79,22	78,64	78,29	87,21	98,92	95,63	103,16
N ₂				78,00	81,71	80,63	79,86	82,89	92,07	89,40	95,59
C ₁					78,00	78,09	78,31	95,12	110,23	106,11	115,45
C ₂						78,00	78,07	92,69	106,86	102,97	111,81
R							78,00	90,79	104,17	100,48	108,90
F								78,00	80,37	79,36	81,93
A									78,00	78,14	78,20
G										78,00	78,67
U											78,00

Çizelge 3.4. DOTMA iyonize katyonik lipidi ile mRNA'nın etkileşim parametreleri gösterilmektedir.

a_{ij}	W	Q	N ₃	C ₁	C ₂	R	F	A	G	U
W	78,00	78,10	145,89	161,26	155,79	151,34	102,90	89,91	92,63	87,05
Q		78,00	151,34	167,28	161,61	156,99	106,23	92,25	95,22	89,10
N ₃			78,00	78,78	78,34	78,10	88,56	100,94	97,49	105,37
C ₁				78,00	78,09	78,31	95,10	110,20	106,08	115,41
C ₂					78,00	78,07	92,67	106,83	102,94	111,77
R						78,00	90,77	104,15	100,45	108,86
F							78,00	80,37	79,36	81,93
A								78,00	78,14	78,20
G									78,00	78,67
U										78,00

Tüm simülasyonlar için kutu boyutu $50 r_{DPD}^3$ ve yoğunluk $\rho = 3$ olarak ayarlanmıştır. Sistemdeki toplam boncuk sayısı 375.000'dir. mRNA ve iyonize katyonik lipidlerin simülasyonlarında, DOTAP ve DOTMA'nın boncuk konsantrasyonu %4,5'tir.

mRNA ise simülasyonlarda 5 adet ve toplam 90 boncuk olarak konulmuştur. mRNA sistemde %0,024 boncuk yüzdesine denk gelmektedir. Sistemde geri kalan boncuklar su olarak konulmuştur. Suyun sistemdeki konsantrasyonu %95,48'tir. Simülasyonlardaki zaman adımı $t=0.02$ ile başlanıp $t=0.05$ adım ile dengelenip veriler son $3,5 \times 10^6$ adımda elde edilmiş ve analizler gerçekleştirilmiştir. Simülasyon sıcaklık değeri 298 K olarak alınmıştır. Simülasyonlar NVE (sabit parçacık sayısı N, sabit hacim V, sabit enerji E) koşullarında gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamındaki DPD simülasyonlarında LAMMPS (Plimpton,1995) simülasyon paketi kullanılmıştır. Simülasyonların başlangıç yapıları için MAPS programı (Materials and Processes Platform, Versiyon 4.3, Scienomics SARL, Paris, Fransa) kullanılmıştır. Simülasyonların görüntülenmesinde OVITO (A. Stukowski, 2010, OVITO– the Open Visualization Tool Modelling Simul. Mater. Sci. Eng. 015012 <https://www.ovito.org/>) programı kullanılmıştır.

Bağ uzunluğu ve sertliği tüm DOTAP ve DOTMA molekülleri için MD verilerinden elde edilip tüm simülasyonlarda aynı değerler kullanılmıştır. Tüm simülasyonlar mRNA kaba taneleri arasındaki bağ uzunluğu ise $0,50 r_{DPD}$, bağ sertliği ise $50 k_B T$ ve boncuklar arasındaki açısı da 90° olarak belirlenmiştir. Simülasyonlarda kullanılan boncuklar arası açı değerleri ise Çizelge 3.6'da verilmiştir. N_1-N_2 boncukları için kullanılan bağ sertliği,bağ uzunluğu ve boncuklar arasındaki açı değerleri N_3-N_3 boncukları içinde kullanılmıştır. DOTAP ve DOTMA için kullanılan bağ uzunluğu ve bağ sertliği Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. DOTAP ve DOTMA molekülleri için MD verilerinden elde edilen bağ uzunlukları.

Bağ türü	Q-N ₁	N ₁ -N ₂	N ₃ -N ₃	N1-C1	N2-C1	C1-C2
Bağ uzunluğu [r_{DPD}]	0,52	0,46	0,61	0,61	0,61	0,70
Bağ sertliği [$k_B T$]	50	50	50	50	50	50

Çizelge 3.6. Lipit boncuklarının molekül içinde birbirleri ile yaptıkları açı değerleri gösterilmektedir.

AÇI TİPİ	Q-N ₁ - N ₂	Q-N ₁ - C ₁	N ₁ -N ₂ - C ₁	N ₁ -C ₁ - C ₂	N ₂ -N ₁ - C ₁	N ₂ -C ₁ - C ₂	C ₁ -C ₂ - C ₁
AÇI DEĞERİ	100	180	100	180	80	180	180

BÖLÜM 4

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kritik Misel Konsantrasyonu Belirlenmesi

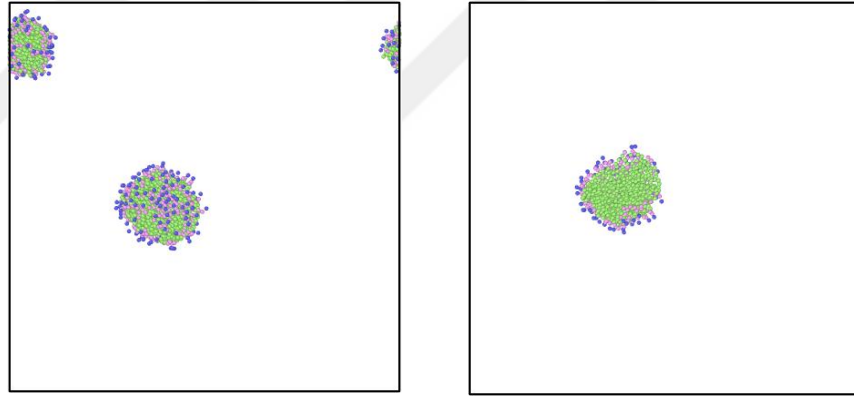
Amfifilik moleküller su içerisinde miselleşme eğilimi gösterirler. Moleküllerin birleşme ve misel oluşturabilmeleri için belirli bir konsantrasyonda olmaları gerekir. Bu konsantrasyona Kritik Misel Konsantrasyonu (CMC) denir. Düşük CMC'ye sahip lipozomlarda daha az lipit molekülü kullanılır ve bu da hem maliyet hem de daha düşük sitotoksitite vaat eder. Düşük CMC'ye sahip lipozomların stabiliteleri de daha uzun sürer çünkü CMC yükseldikçe artan molekül sayısı stabilite de kararsızlık oluşturabilir.

Bu tez kapsamında DOTMA ve DOTAP iyonize edilmiş katyonik lipidlerinin önce CMC oranı belirlenmiştir. Her iki lipidin özellikleri ve etkileşim parametreleri benzer olduğundan (bkz. Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4) DOTMA ile yapılan çalışmaların sonucu DOTAP içinde geçerli sayılmıştır. DOTMA iyonize edilmiş katyonik lipidinin farklı konsantrasyonlarda simülasyonları yapılmıştır. Simülasyonların gerçekleştiği konsantrasyonlar ve konsantrasyonun denk geldiği DOTMA molekül sayısı Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

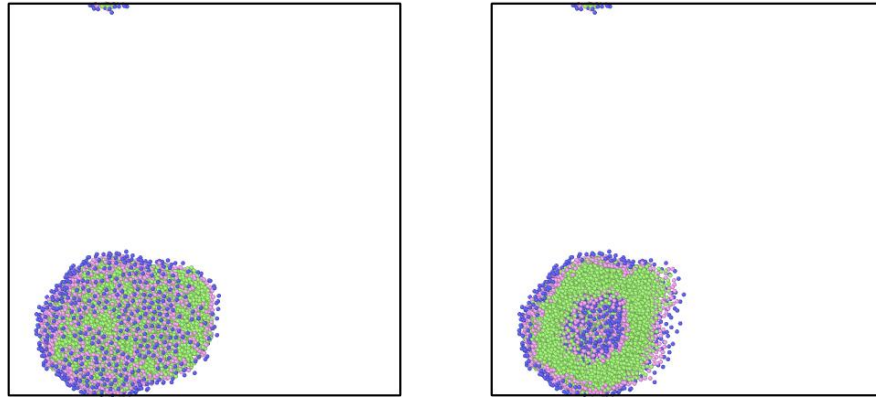
Çizelge 4.1. CMC belirlenmesi için kullanılan DOTMA konsantrasyonları ve konsantrasyona denk gelen molekül sayıları gösterilmektedir.

Konsantrasyon	Molekül Sayısı
%0,5	208
%2,5	1042
%4,5	1875
%5,0	2083
%6,5	2708
%7,5	3125
%8,5	3542
%10,0	4167

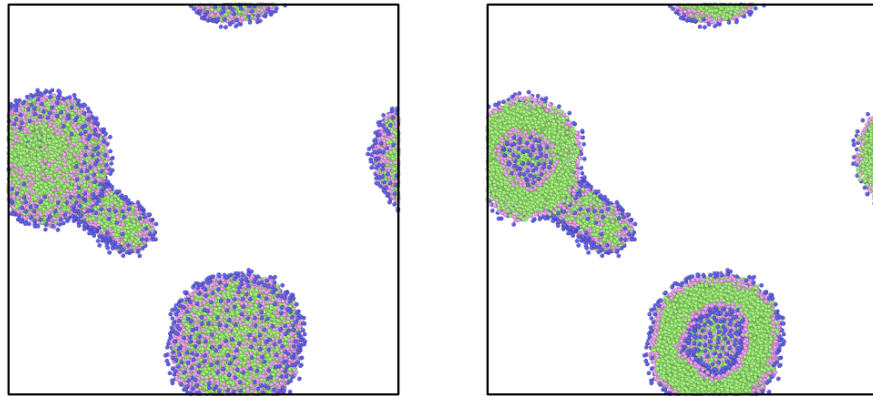
Çizelge 4.1’de belirtilen konsantrasyonlarla yürütülen simülasyon sonuçları sırasıyla Şekil 4.1’de çizelge sırasına uygun şekilde gösterilmiştir. Her şekilde görüntü netliği için su boncukları silinmiştir. Simülasyondaki Q boncuğu mor, N3 boncukları pembe, C1, C2 boncukları ise yeşil renk ile gösterilmiştir. İkinci şekil oluşan simülasyon sonucunda oluşan misellerin orta kısmını göstermektedir.



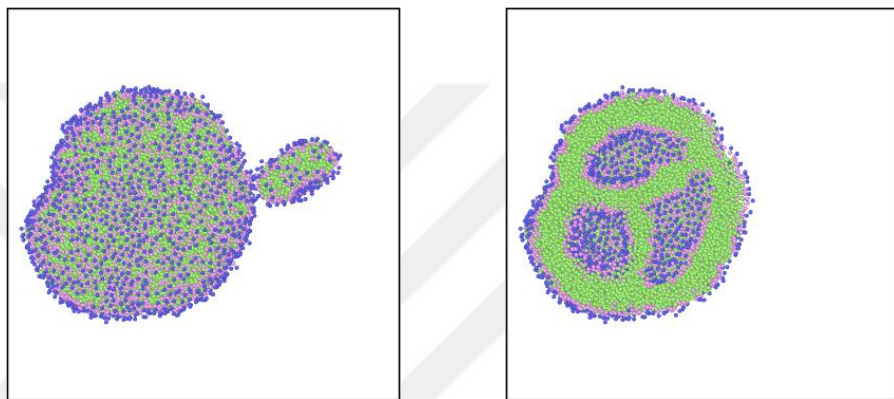
(a) %0,5 DOTMA



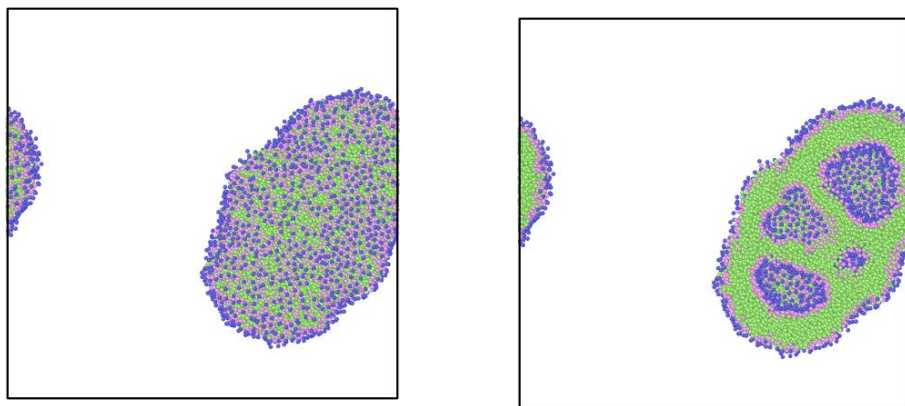
(b) %2,5 DOTMA



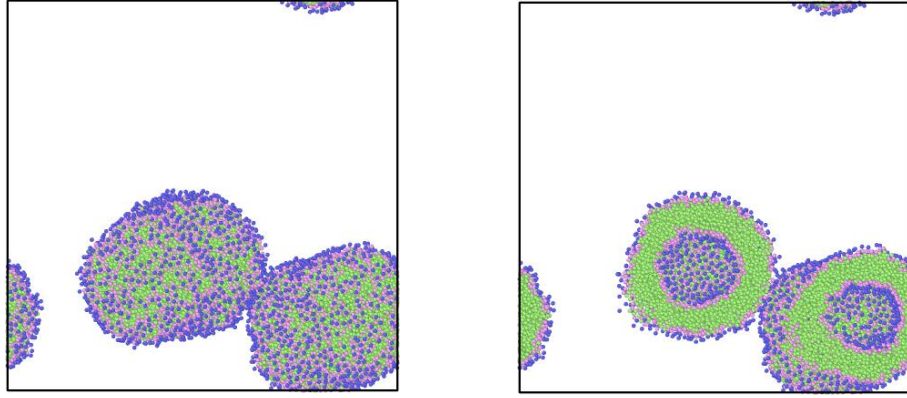
(c) %4,5 DOTMA



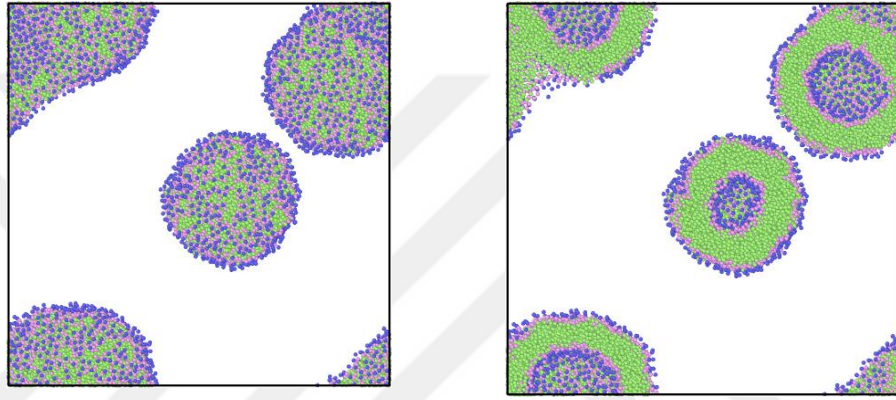
(d) %5,0 DOTMA



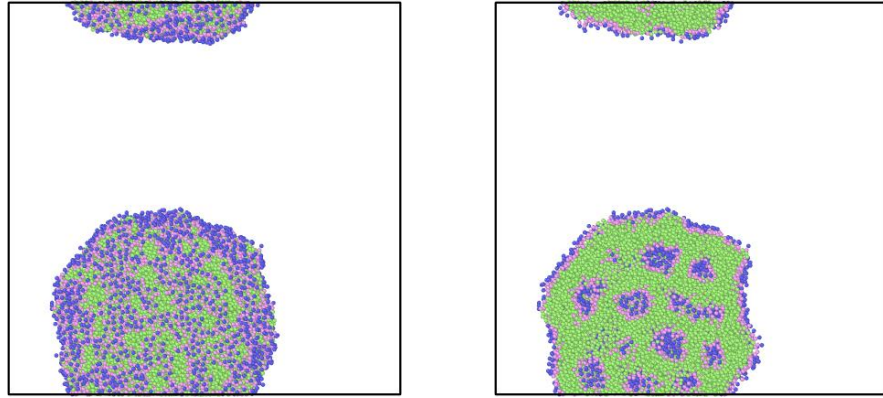
(e) %6,5 DOTMA



(f) %7,5 DOTMA



(g) %8,5 DOTMA



(h) %10,0 DOTMA

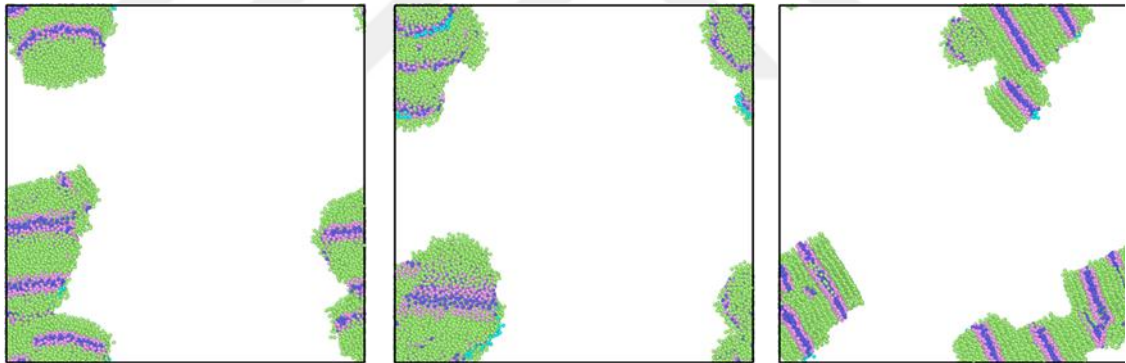
Şekil 4.1. DOTMA iyonize edilmiş katyonik lipidinin kritik misel konsantrasyonu belirlenmesi için yürütülen simülasyon sonuçlarıdır. (a) %0,5, (b) %2,5, (c) %4,5, (d) %5,0, (e) %6,5, (f) %7,5, (g) %8,5, (h) %10 DOTMA konsantrasyonunu göstermektedir.

Yapılan simülasyonlar sonucunda içi su dolu vezikül oluşumu en düşük %2,5 konsantrasyonda görülmüştür. %2,5 konsantrasyondaki miselin morfolojisinin küresel

olammasından dolayı %4,5 konsantrasyonda oluşan misel seçilmiştir. İçi su dolu vezikül olması, küresel morfolojide olması seçim kriteri olmuştur. %4,5 konsantrasyonda DOTAP ve DOTMA iyonize katyonik lipitleri mRNA ile simüle edilmiştir.

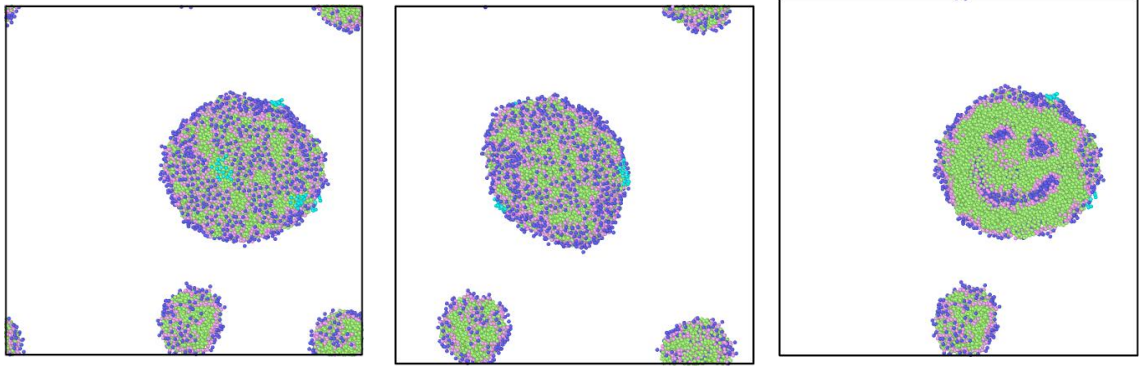
4.2. mRNA Yüklenmesi

DOTMA ile yapılan CMC belirleme simülasyonları sonucu %4,5 konsantrasyona karar verildi. Simülasyon kutusu içerisine iyonize katyonik lipitler ve mRNA rastgele olarak atıldı. Başlık 3.3'te belirtildiği gibi simülasyon detay ve etkileşim parametreleri uygulandı. DOTMA iyonize katyonik lipidi ve mRNA kutu içerisine rastgele atılmıştır. Şekil 4.2'da gösterilen sonuçlarda belirtilen koşullarda misel elde edilememiştir. Simülasyon sonucu lamel yapı gözlenmiştir. Lipitler ve mRNA ile yapılan simülasyon sonuçlarında mRNA boncukları açık mavi, DOTMA Q boncuğu mor, N3 boncuğu pembe, C1-C2 boncukları ise yeşil ile temsil edilmiştir. Görüntülerin netliği için su boncukları silinmiştir. Her şeklin son görseli ise simülasyon sonunda oluşan miselin ortasını göstermektedir.



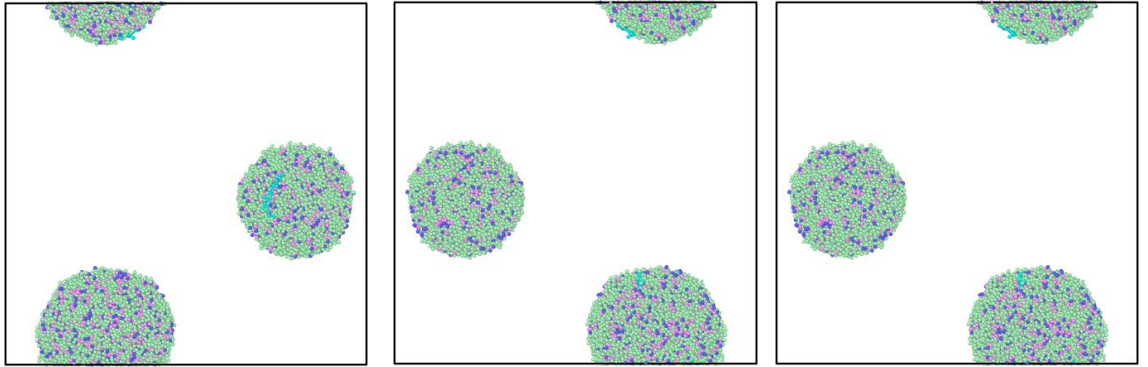
Şekil 4.2. DOTMA ve mRNA'nın belirtilen etkileşim parametreleri ve simülasyon koşullarında elde edilen simülasyon sonuçları.

Elde edilen bu sonuç ışığında Q ve N3 boncukları arasındaki yüksek itici etkileşimin misel oluşumuna engel olduğu düşünülerek bu boncuklar arasındaki a_{ij} değeri $80 k_B T$ olarak belirlenmiştir (Kaçar 2024). DOTMA ve mRNA yeniden bu koşulda simüle edilmiştir. Şekil 4.3'te gösterildiği gibi etkileşim parametresindeki bu düzenleme ile içi su dolu birden fazla küçük vezikülün olduğu misel elde edilmiştir. Tez çalışması kapsamında DOTMA-mRNA için bu sistem analiz edilmiştir.



Şekil 4.3. DOTMA ve mRNA'nın Q ve N₃ boncukları arasındaki etkileşim parametresinin $80 k_B T$ olduğu simülasyon sonucunu göstermektedir.

Elde edilen bu sonuçlara bakılarak tez çalışması kapsamında çalışılan DOTAP iyonize edilmiş katyonik lipidi ve mRNA'nın simülasyonlarında da Q ve N₁, N₂ boncukları arasındaki a_{ij} değeri $80 k_B T$ olarak belirlenmiştir. Yürütülen simülasyon sonuçları Şekil 4.4'te gösterilmiştir ve şekilde mRNA boncuklarını açık mavi, DOTAP'ın Q boncuğu mor, N₁-N₂ boncukları pembe, C₁-C₂ boncukları ise yeşil renk ile gösterilmiştir. Görüntü netliği için su molekülleri silinmiştir. Görüntüler kutunun farklı açılardan alınmıştır. Son görüntü misellerin ortasını göstermektedir.



Şekil 4.4. DOTAP iyozone katyonik lipidi ve mRNA simülasyon sonuçları.

DOTAP ve mRNA kutu içerisine rastgele atılmış ve simülasyon sonucunda 2 misel elde edilmiştir. Misellerin ortasında veziküller bir boşluk bulunmamıştır. mRNA hidrofilik bir moleküldür ve miselin dış katmanında gözlenmiştir. Lipit molekülünün boncukları arasında homojen bir dağılım görülmemiştir. Tez çalışması kapsamında yürütülen simülasyonların aksine bu simülasyonda hidrofilik lipit boncukları iç kısımda hidrofobik boncuklar ise miselin dış kabuğunda gözlenmiştir.

4.3. Misel Çap Analizi

Yapılan simülasyonlar sonucu elde edilen misellere çap analizi yapılmıştır. Analiz için bu tez kapsamında kod yazılmıştır. Kutu içerisinde oluşan her miselin kod ile önce kutu içindeki koordinatları belirlenmiş ardından miselin çapı hesaplanmıştır. Kod miselin dışındaki birbirinden en uzak aynı tip atomlarının koordinatlarını belirler ve hesaplamalarda Öklid mesafesi (Euclidean distance) formülü kullanır.

$$d = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2} \quad (4.1)$$

Denklem 4.1'de x_1, y_1, z_1 ilk atomun, x_2, y_2, z_2 ise ikinci atomun koordinatlarını belirtmektedir. DOTAP ve DOTMA iyonize katyonik lipitlerinin ve mRNA'nın simülasyonu sonucu oluşan misellerin her birinin çapı ayrı ayrı hesaplanmış ve Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 Lipit-mRNA simülasyonları sonucunda elde edilen misellerin çap analizi

ÇAP	DOTAP ₁	DOTAP ₂	DOTMA
$[r_{DPD}]$	18,89	15,93	19,92
[Å]	125,62	105,93	132,47

4.4. Göreceli Şekil Anizotropisi Analizi

Çalışma kapsamında elde edilen mRNA yüklü misellerin şekil morfolojisi incelenmiştir. Göreceli Şekil Anizotropisi (Relative Shape Anisotropy) ile bir miselin farklı yönlere göre değişen boyutları arasındaki orantı hesaplanır. Bu yöntem ile çalışma kapsamında oluşan misellerin küresel yapıları analiz edilmiştir.

$$\kappa = \frac{\sqrt{(a_x - a_y)^2 + (a_y - a_z)^2 + (a_x - a_z)^2}}{a_x + a_y + a_z} \quad (4.2)$$

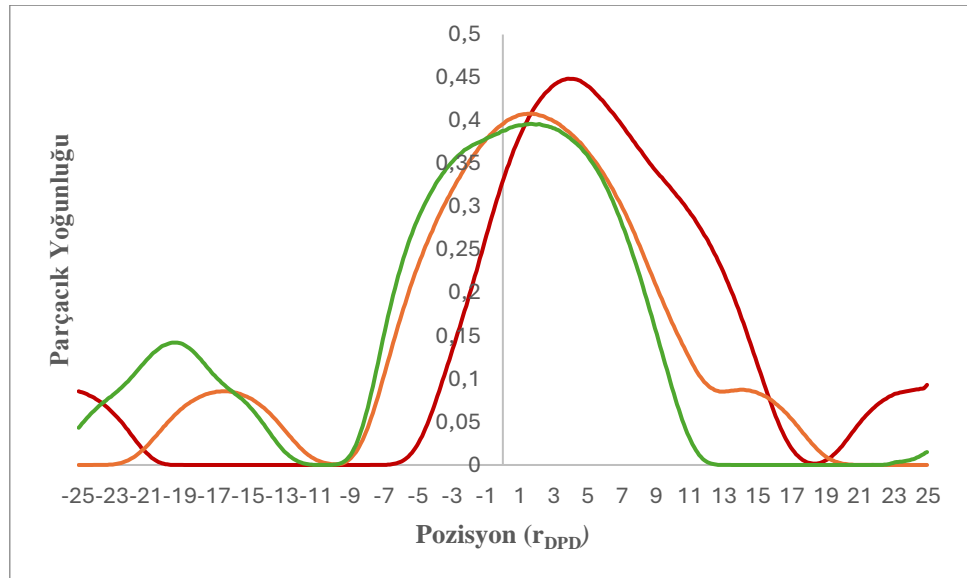
κ , Göreceli Şekil Anizotropisi sembolüdür. κ , 0 ile 1 arasında değişmektedir. $\kappa=0$ sınırları, tüm noktaların küresel simetriye sahip olduğu bir durumu ifade ederken, $\kappa=1$ değerine yaklaştıkça küresel morfolojiden uzaklaşıp lineer yapıya yaklaştığı durumu belirtir. Tez çalışması kapsamında yazılan kod ile elde edilen mRNA yüklü misellerin κ değerleri hesaplanmıştır. Yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 Göreceli Şekil Anizotropisi analiz sonucudur.

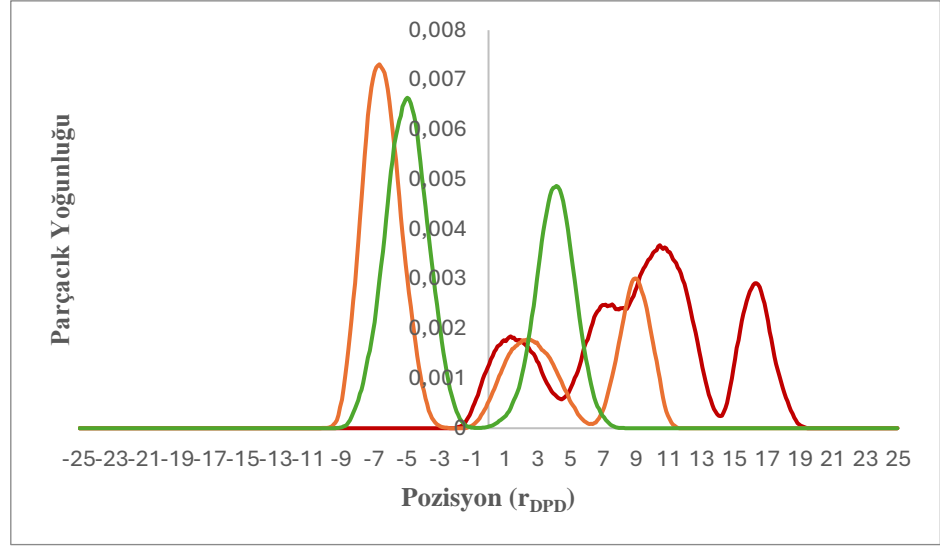
κ	DOTAP ₁	DOTAP ₂	DOTMA
	0,01104	0,07843	0,05088

4.5. Yoğunluk Profili Analizi

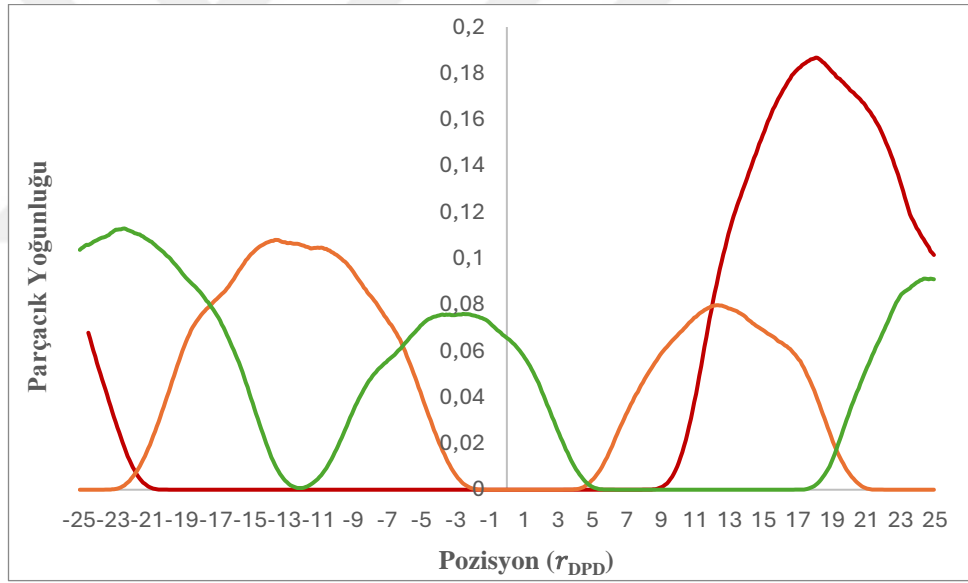
Yoğunluk profili, sistemdeki parçacıkların belirli bir eksen boyunca nasıl değiştiğini gösteren analizdir. Boncukların yoğunluk dağılımı ve konumları hakkında bilgi edinmemizi sağlar. Yoğunluk profil analizi ile miselin morfolojisi, yapı içerisinde boncukların nasıl dağıldığını, mRNA'nın konumunun değerlendirilmesini sağlar. Analiz sonuçlarında kırmızı renk x eksenini, turuncu renk y eksenini, yeşil renk ise z eksenini temsil etmektedir.



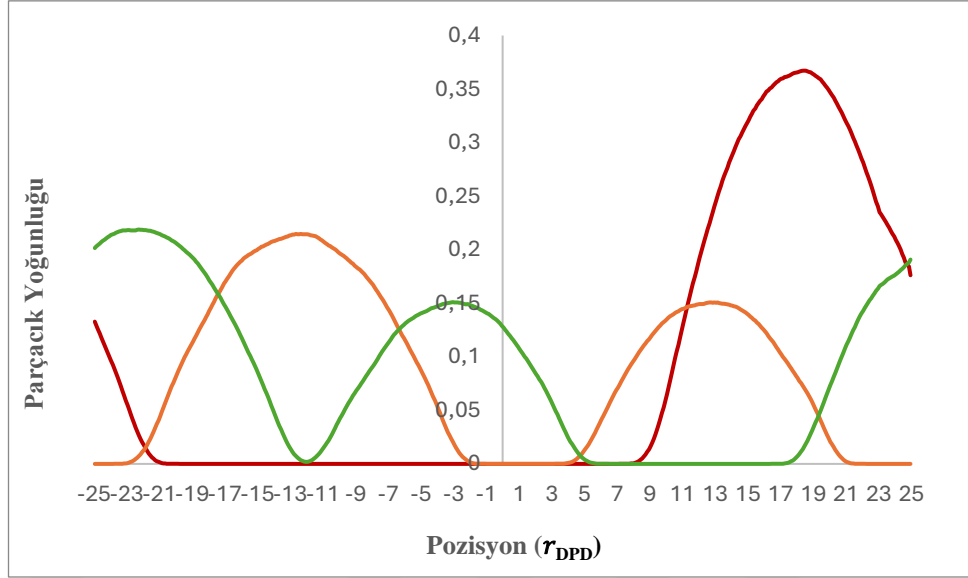
Şekil 4.5 DOTMA-mRNA simülasyonunda DOTMA lipidin yoğunluk profili



Şekil 4.6. DOTMA-mRNA simülasyonunda mRNA'nın yoğunluk profilidir.



Şekil 4.7. DOTAP-mRNA simülasyonunda DOTAP lipidin yoğunluk profilidir.



Şekil 4.8 DOTAP-mRNA simülasyonunda mRNA'nın yoğunluk profilidir.

Yoğunluk profili sonuçlarına baktıldığında simülasyon sonuç görüntüleri ile uyuşmaktadır. DOTMA'nın sonuç görüntülerinde oluşan miselin eliptik bir görüntü oluşturduğu gözlemlenmiştir. Yoğunluk profili sonucu ve görüntüsü uyuşmakta ve x eksenini yönünde daha yoğun parçacık olduğu analizle de kanıtlanmıştır. DOTAP'ın yoğunluk profili sonucunun yapılan diğer analiz sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür.

BÖLÜM 5

SONUÇLAR

Tez kapsamında çalışılan DOTAP ve DOTMA iyonize edilmiş katyonik lipidlerin Kritik Misel Konsantrasyonu (CMC) belirlendi. DOTMA ile yapılan çalışmalar DOTAP içinde geçerli sayılmıştır. Yapılan simülasyonlarda DOTMA kaba tane konsantrasyonu %0,5, %2,5, %4,5, %5,0, %6,5, %7,5, %8,5, %10,0 olarak alınmış ve misel morfolojileri incelenmiştir. %0,5'te lipid molekülleri topaklanmış fakat vezikül oluşumu görülmemiştir. %2,5 konsantrasyonda ise oluşan miselin vezikül boyutu küçüktür. %4,5 konsantrasyonda oluşan lipozomun iç çekirdek büyüklüğü ve morfolojisi %2,5 DOTMA konsantrasyon sonucundan daha iyi olduğuna karar verilmiş ve bu konsantrasyonda mRNA yükleme simülasyonları yapılmıştır. DOTMA'nın diğer konsantrasyonlarında da lipozom elde edilmiştir fakat küresel misel oluşturması, düşük konsantrasyon olması ve boyutuna göre iç çekirdek büyüklüğünün fazla olmasından dolayı %4,5 konsantrasyonu seçilmiştir.

Çizelge 3.4'te gösterilen etkileşim parametrelerinde yürütülen simülasyonda lipozom oluşmadığı Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Literatür çalışmalarında iyonize katyonik lipidlerin baş ve linker gruplarının zayıf itici etkileşim gösterdiği bilinmektedir. Deneysel verilerle ve literatürle uyumlu olması için çalışma kapsamında Q ve N grubu kaba taneler arasındaki etkileşim Prof. Dr. Gökhan KAÇAR'ın 2024 yılında yayınladığı çalışması referans alınarak yeniden düzenlenmiştir. Bu etkileşim parametresi düzenlenmesinden sonra DOTMA-mRNA simülasyonlarında deneysel verilerle uyumlu olarak lipozom elde edilmiştir.

DOTAP-mRNA simülasyonlarında Q ve N boncukları arası etkileşim $80 k_B T$ olarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan simülasyon sonucu misel oluşumu gözlemlenmiş

ancak vezikül oluşmamıştır. Bu farklılık, DOTMA'nın eter grubu içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir; böylece DOTMA, mRNA ile daha güçlü bir şekilde etkileşime girer.

DOTMA'nın içerdiği eter grubunun DOTAP'ın içerdiği ester grubuna göre daha kararlı bağ oluşturur. Bu kimyasal grup farklılığının DOTMA'nın su ile etkileşimini arttırıp su dolu veziküller oluşturmasında, DOTAP'ın ise sulu veziküller oluşturmamasına sebep olduğu düşünülmektedir. DOTAP'ın mRNA ile simülasyonunda misellerin vezikülsüz olması ve hidrofobik boncukların miselin dış kısmında bulunması, DOTAP'ın daha hidrofobik yapılı olduğunu gösterebilir. Sonuç olarak, DOTMA ve DOTAP lipidlerinin mRNA ile simülasyonlarındaki farklılıklar, bu lipidlerin moleküler yapılarındaki küçük değişikliklerin, mRNA ile etkileşimlerinde büyük farklar yaratmasından kaynaklanmaktadır.

Tez kapsamında yapılan simülasyonlarda mRNA enkapsülasyonu %100 olarak belirlenmiştir. Simülasyon sonucu elde edilen misellerin morfolojileri, boncuk mesafeleri analiz edilerek sistemler hakkında bilgi edinilmiştir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalar ile DOTAP ve DOTMA iyonize edilmiş katyonik lipidlerinin mRNA taşınmasındaki morfolojileri anlaşılmasına katkı sağlanmıştır. DOTMA'nın fazladan bulunan ester grubunun misel morfolojisi üzerine etkisi gösterilmiştir. DOTAP'ın polar boncukları arasındaki a_{ij} değeri düşürüldüğünde içi su dolu misel morfolojisi oluşmadığı bu farklılığın ester grubundan kaynaklanabileceği gösterilmiştir. Fakat mRNA her iki lipitte de yapının dış katmanında gözlemlenmiş bu yüzden nükleik asit taşınmasında her iki lipid arasında fark bulunmamıştır. İçi su dolu birden fazla vezikül oluşturduğu için DOTMA'nın hidrofilik ilaç taşınmasında, DOTAP'tan daha iyi bir aday olabileceği gösterilmiştir. Amfifilik moleküllerin hidrofilik kısımlarını temsil eden boncukların zayıf itici etkileşim gösterdiğini bu yüzden a_{ij} değerinin yüksek olduğu durumlarda misel oluşmadığını bu çalışma ile gösterilmiştir.

Moleküler Dinamik simülasyon yöntemleri araştırmacılara molekül içi ve moleküller arası etkileşimi anlamının yanı sıra zaman, maliyet, hammadde tasarrufu gibi birçok avantaj sunar. MD teknikleri kullanarak yaptığımız bu çalışmamız ile iyonize katyonik lipidler ile mRNA taşınması çalışacak olan araştırmacılara lipid konsantrasyonu,

misel morfolojisi ve mRNA'nın taşıyıcı sistem içindeki konumu hakkında katkıda bulduk. Elde edilen bu verilerin hem deneysel çalışmalara hem de DPD tekniği ile çalışacak araştırmacılara etkileşim parametrelerini belirlerken önemli katkılar sağlayacağı açıktır.



KAYNAKLAR

- AlSawaftah, N.M., Awad, N.S., Pitt, W.G., Hussein G.A. (2022). pH-Responsive Nanocarriers in Cancer Therapy. *Polymers (Basel)*, 14(5), 936.
- Brooks C. L., Case D. A., Plimpton S., Roux B., Spoel D., Tajkhorshid E. (2021). Classical molecular dynamics. *Journal of Chemical Physics*, 154(10), 100401.
- Chandrakala, V., Aruna, V. & Angajala, G. (2022). Review on metal nanoparticles as nanocarriers: current challenges and perspectives in drug delivery systems. *Emergent Materials*, 5, 1593–1615.
- Fang H., Chen Q. (2022). Applications and challenges of biomaterial mediated mRNA delivery. *Explor Target Antitumor Therapy*, 3, 428-44.
- Guo, R., Chen, Y., Borgard, H., Jijiwa, M., Nasu, M., He, M., Deng, Y. (2020). The Function and Mechanism of Lipid Molecules and Their Roles in The Diagnosis and Prognosis of Breast Cancer. *Molecules*, 25, 4864.
- Kacar, G. (2024). Structural and energetic properties of lecithin liposomes encapsulating coenzyme Q10 from coarse-grained simulations. *Chemical Papers*, 78, 4551–4565.
- Kulkarni, J.A., Witzigmann, D., Leung, J., Tam, Y.Y.C., Cullis, P.R. (2019). On the role of helper lipids in lipid nanoparticle formulations of siRNA. *Nanoscale*, 11(45), 21733-21739.
- LAMMPS documentation. (n.d.). Sürüm 12 Ekim 2022, https://docs.lammps.org/fix_ave_chunk.html
- Liu D., Yang F., Xiong F., Gu N. (2016). The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential. *Theranostics*, 6(9), 1306-23.
- Metropolis, N., & Ulam, S. (1949). The Monte Carlo method. *Journal of the American Statistical Association*, 44(247), 335–341.
- Moinuddin, S., Sajid, I., Arif, H. (2022). Liposomal Drug Delivery System - A Concise Review, *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*, 6, 2581-5423.
- OVITO User Manual 3.7.10 documentation. (n.d.). Sürüm 12, Ekim, 2022, https://www.ovito.org/manual/reference/pipelines/modifiers/voronoi_analysis.html
- Patra, J.K., Das, G., Fraceto, L.F. *et al.* (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 16, 71.
- Sahin, U, Karikó, K, Türeci, Ö. (2014). mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10, 759-80.
- Saló-Ahen, O.M.H., Alanko, I., Bhadane, R., Bonvin, A.M.J.J., Honorato, R.V., Hossain, S., Juffer, A.H., Kbedev, A., Lahtela-Kakkonen, M., Larsen, A.S., et

al. (2021). Molecular Dynamics Simulations in Drug Discovery and Pharmaceutical Development. *Processes*, 9, 71.

Schlich, M., Palomba, R., Costabile, G., Mizrahy, S., Pannuzzo, M., Peer, D., Decuzzi, P. (2021). Cytosolic delivery of nucleic acids: The case of ionizable lipid nanoparticles. *Bioengineering Translational Medicine*, 6(2), 10213.

Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S., and Maiti, P. (2018). Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3 (7).

Singh, R., Lillard, J.W. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, 86 (3), 0014-4800.

Sultana, A., Zare, M., Thomas, V., Kumar, S., Ramakrishna, S. (2022). Nano-based drug delivery systems: Conventional drug delivery routes, recent developments and future prospects. *Medicine in Drug Discovery*, 15, 2590-0986.

Sun, D., Lu, Z.R. (2023). Structure and Function of Cationic and Ionizable Lipids for Nucleic Acid Delivery. *Pharmaceutical Research*, 40, 27–46.

van Meer, G., Voelker, D. & Feigenson, G. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 112–124.

Veerapandian, M., Ramasundaram, S., Jerome, P., Chellasamy, G., Govindaraju, S., Yun, K., Oh, T.H. (2023). Drug Delivery Application of Functional Nanomaterials Synthesized Using Natural Sources. *Journal of Functional Biomaterials*, 14, 426.

Vorobyov, I., Allen, T. W. (2011). On the role of anionic lipids in charged protein interactions with membranes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 6, 0005-2736.

Warshel, A., Levitt, M. (1976). Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, 103, 0022-2836.

ÖZGEÇMİŞ

İlkokul, ortaokul eğitimini Tekirdağ'da tamamlamış ve 2016 yılında Çorlu Mimar Sinan Anadolu Lisesi'nden mezun olmuştur. 2016 yılında Trakya Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümüne başlamış ve 2020 yılında bitirmiştir. Yüksek lisans eğitimine 2021 yılında Trakya Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik anabilim dalında başlamıştır.