

OZET

AKTARIM

- 5 Bu buluş, protein aktarım gibi yük moleküllerinin canlı hücrelere aktarım özellikle şunları içeren bir hücreye bir yükün aktarımına yönelik bir iletim molekülü ile ilgilidir: bir yük-bağlayıcı molekül ve/veya bir yük; hücrenin yüzeyinde GAG'a bağlanabilen bir glikozaminoglikan (GAG) bağlayıcı eleman; ve bir protein aktarım alanı. Aktarım yöntemleri, aktarım için yükün üretilmesine veya modifiye edilmesine yönelik yöntemler, aktarıma yönelik
- 10 iletim molekülleri ve aktarım kullanan veya aktarım hücreleri kullanan tedaviye yönelik yöntemler sağlanmaktadır.

İSTEMLER

1. Bir yükün bir hücreye aktarılma yönelik bir iletim molekülü olup, aşağıdakileri içermektedir:

5

(A) bir yük, veya bir yüke bağlanmasın için bir yük-bağlayıcı molekül, ve isteğe bağlı olarak burada yük, yük-bağlayıcı moleküle bağlanmaktadır

(B) aşağıdakileri içeren bir glikozaminoglikan (GAG) bağlayıcı eleman:

10

(i) hücrenin yüzeyinde heparin sülfat glikozaminoglikana (HS-GAG) bağlanabilen bir heparin bağlayıcı alan veya bunun bir fonksiyonel varyantı veya

(ii) bir GAG bağlayıcı antikor veya bunun bir fonksiyonel bağlayıcı fragmenti; ve

(C) bir protein aktarılma alanı

15

2. İstem 1'e göre iletim molekülü olup, burada GAG bağlayıcı eleman, HB-EGF'nin P21'ini; veya bunun tepesi kesik, uzatılmış veya fonksiyonel bir varyantını içermektedir; veya

20

burada GAG bağlayıcı eleman, bir fibroblast büyüme faktörünün bir heparin bağlama alanı veya bunun bir fonksiyonel varyantını içermektedir; veya

burada GAG bağlayıcı eleman, FGF1A, FGF2A, FGF2B, FGF4A, FGF1C, FGF2C, FGF4C, FGF7B veya FGF7C gibi FGF, ATIII, BMP'ler, Wnt'ler, Shh EGF'ler, VEGF veya PDGF gibi antitrombin veya bunların varyantlarını içermektedir; veya

25

burada GAG bağlayıcı eleman, FGF2B, FGF7B veya PDGF'den herhangi birini içermektedir.

3. GAG bağlayıcı antikorun, bir tek-alan antikoru veya bunun bir fonksiyonel bağlayıcı fragmentini içerdiği, İstem 1'e göre iletim molekülü.

30

4. Önceki istemlerden herhangi birine göre iletim molekülü olup, burada protein aktarılma alanı hidrofildir veya amfiliktir; ve/veya burada protein aktarılma alanı hidrofilik amino asit kalıntıları büyük çoğunluğunu içermektedir.

35

5. Protein aktarılma alanı, arjinin ve/veya lizin amino asit kalıntıları büyük çoğunluğunu

içerdiği, önceki istemlerden herhangi birine göre iletim molekülü.

6. İstemler 1 ila 4'ten herhangi birine göre iletim molekülü olup, burada protein aktarılan alanı taşıyan yapıları içeren herhangi bir gruptan seçilmektedir:

5

Penetratin veya Antenapedi PTD RQIKWFQNRRMKWKK (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 37);

TAT YGRKKRRQRRR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 38);

SynB1 RGGRLSYSRRRFSTSTGR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 39);

10

SynB3 RRLSYSRRRF (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 40);

PTD-4 PIRRRKCLRRLK (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 41);

PTD-5 RRQRRTSKLMKR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 42);

FHV Kaplama-(35-49) RRRNRTRRNRVR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 43);

BMV Gag-(7-25) KMTRAQRRAARRNRWTAR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 44);

15

HTLV-II Rex-(4-16) TRRQRTRRRNR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 45);

D-Tat GRKKRRQRRRPPQ (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 46);

R9-Tat GRRRRRRRRRPPQ (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 47);

Transportan GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 48) kimera;

20

MAP KLALKLALKLALALKLA (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 49);

SBP MGLGLHLLVLAALQGAWSQPKKRKRKV (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 50);

FBP GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKRKRKV (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 51);

MPG ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKRKRKV-cya (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 52);

MPG(NLS) ac- GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKRKV-cya (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 53);

25

Pep-1 ac-KETWWETWWTEWSQPKKRKRKV-cya (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 54); ve

Pep-2 ac-KETWFETWFTEWSQPKKRKRKV-cya (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 55); veya

RxN (4<N<17) kimera gibi poliarjininler, KxN (4<N<17) kimera gibi polilizinler, (RAca)6R, (RA-bu)6R, (RG)6R, (RM)6R, (RT)6R. (RS)6R, R10, (RA)6R, R7 ve R8;

30

veya

burada protein aktarılan alanı taşıyan yapıları içeren herhangi bir gruptan seçilmektedir.

7. Önceki istemlerden herhangi birine göre iletim molekülü olup, burada yük, bir peptit, bir protein, bir nükleik asit ve bir nanopartikül içeren herhangi bir gruptan seçilmektedir; ve/veya

35

burada yük, bir terapötik molekül; bir ilaç; bir pro-ilaç; bir enzim veya bir transkripsiyon faktörü gibi bir fonksiyonel protein veya peptit; bir mikrobiyal protein veya peptit; ve bir toksin; veya bunu kodlayan nükleik asidi içeren herhangi bir gruptan seçilmektedir: ve/veya

5 burada yük-bağlayıcı molekül, bir peptit, bir protein, streptavidin, bir nükleik asit-bağlayıcı molekül, bir antikor veya bunun bir fragmenti, bir antikor mimesiği, bir kimyasal bağ molekülü, bir afinite etiketi veya bir afinite etiketli molekülden herhangi birini içermektedir.

10 **8.** Bir hücreye bir yükün *in vitro* aktarılmasına yönelik bir yöntem olup, aşağıdakileri içermektedir:

istemler 1 ila 7'den herhangi birine göre iletim molekülünün sağlanması ve hücrenin iletim molekülü ile temas ettirilmesi.

15

9. İstemler 1 ila 7'den herhangi birine göre iletim molekülünü içeren veya kodlayan bir hücre.

20 **10.** İstemler 1 ila 7'den herhangi birine göre iletim molekülünü kodlayan bir nükleik asit; ve isteğe bağlı olarak burada nükleik asit, iletim molekülünün ifadesine yönelik bir vektördür.

11. Aktarım vasıtasıyla bir yükün bir hücreye *in vitro* şekilde eşlik etmesinin sağlanmasına yönelik İstemler 1 ila 7'den herhangi birine göre iletim molekülünün kullanılması

25

12. Bir hastalığın tedavisinde veya önlenmesinde kullanılmaya yönelik, İstemler 1 ila 7'den herhangi birine göre iletim molekülü veya İstem 9'a göre bir hücre.

30 **13.** İstemler 1 ila 7'ye göre bir iletim molekülü içeren bir bileşimin uygulanması içeren, bir hücre kültüründe sellüler fonksiyonun modifiye edilmesine yönelik bir yöntem.

14. İstemler 1 ila 7'den herhangi birine göre bir veya daha fazla iletim molekülünün bir pluripotent olmayan hücreye aktarılması ile bir pluripotent kök hücrenin *in vitro* indüklenmesine yönelik bir yöntem.

35

15. İstemler 1 ila 7'den herhangi birine göre iletim molekülünü içeren veya İstem 9'a göre bir hücreyi içeren bir farmasötik bileşim ve farmasötik olarak kabul edilebilir eksipiyan.

16. Yükün, hücre görüntülenmesinde kullanıma yönelik bir nanopartikül içerdiği, İstemler 1
5 ila 7'den herhangi birine göre iletim molekülü.

TARİFNAME

AKTARIM

- 5 Bu buluş, protein aktarım gibi kargo moleküllerinin canlı hücrelere aktarım ile, özellikle aktarım yöntemleri, aktarım için yükün üretilmesine veya modifiye edilmesine yönelik yöntemler, aktarıma yönelik iletim molekülleri ve aktarım kullanan veya aktarılan hücreleri kullanan tedaviye yönelik yöntemler ile ilgilidir.
- 10 İnsan genomunun ve belirli bir transkriptom için tam aletler ile araştırma, artı klinik translasyon için terapötik hedeflerin akıllı seçimine olanak sağlama için proteomun fonksiyonel olarak açılmasına odaklanmaktadır {Zografos, 2013 #86}. Protein etkileşimi ve bunun fonksiyonu nasıl modifiye ettiği, ayrıca hedef seçimini karmaşıklaştıracak ve protein fonksiyonelliğinin normal ve hastalıklı modellerde belirlenmesi ve doğrulanması
- 15 gerekecektir {Natrajan, 2013 #89}. Gen-yukarı regülasyonuna veya nakavta aracılığı eden DNA transgenezi ve küçük-müdahaleci/antisens oligonükleotitler gibi DNA ve RNA-bazlı yaklaşımlar çok değerli aletlerdir {Yamaguchi, 2009 #87}. Ancak bu yaklaşımlar, genetik modifikasyon yüzünden klinik olarak alaki olmayabilmektedir veya transkript ve protein düzeyleri arasındaki korelasyonun bulunmaması yüzünden protein aktivitesine net bir şekilde
- 20 karşı gelmeyebilmektedir {Peng, 2011 #88}. DNA yapılarından veya RNA moleküllerinden ziyade proteinlerin doğrudan iletimi, çeşitli avantajlara sahiptir; en belirgin olan aktif ajan, intrasellüler düzenek ile bunu üretmek için bir sisteme dayanmaktan ziyade doğrudan uygulanmasıdır {Gump, 2007 #39}.
- 25 Hücrelerde protein fonksiyonunun değiştirilmesi, uygulamada, bir lentiviral vektör gibi bir vektör yapılabildiği oluşturulan DNA'ya sahip genetik olarak dönüştürücü hücrelere tarihsel olarak standarttır. Bu, hücrelerin istenilen ekstra genleri kapsayan ekzojen genetik malzemeyi ve ayrıca hücrelerin modifikasyonu ve ekzojen gen yapılı ifadesi için gerekli olan vektör DNA'sini taşıdığı anlamına gelmektedir. Bu heterolog DNA, örneğin insan hücre
- 30 terapötiklerinde genetik kalite ile ilgili meselelere potansiyel olarak neden olabilmektedir. Bir örnek olarak indüklenen pluripotent kök hücrelerinin (iPS hücreleri) üretimi, retroviral veya lentiviral vektörler kullanılarak yeniden programlama ile ilişkili spesifik genlerin genetik aktarım ile gerçekleştirilebilmektedir. Ancak bu teknolojinin terapötik kullanıma yönelik bir engel, potansiyel olarak tümörjenik olan insersiyonel mutajenik lezyonların üretimidir. Gen
- 35 iletiminin tam olarak değiştirilmesine yönelik muhtemel bir strateji protein aktarımıdır.

Diğer potansiyel protein aktarımları terapileri,örneğin kas rahatsızlıklarının tedavisi için insan yetişkin kök hücrelerinin (hASC'ler) miyojenik farklılaşmasını kapsayabilmektedir.

- 5 Buluşun amacı DNA yapılarını kullanılmadan bypass edebilmektir ve DNA yapılarına yönelik gereksinim olmadan doğrudan protein ile hücrelerin aktarımını sağlayabilmektedir.

DNA yapılarını kullanılmadan protein ile hücrelerin aktarımını bililmektedir ve proteinler, peptitler, oligonükleotitler ve nanopartiküller gibi büyük molekül yüklerinin geniş bir çeşitlilikte hücrelere aktarımını kolaylaştırdığı bilinen artan sayıda potansiyel iletim molekülleri bulunmaktadır {El-Andaloussi, 2005 #36}. Katyonik peptit protein aktarım alanı (PTD)-aracılı ekstrasellüler aktarım, terapötik makromoleküllerinin iletimi için önemli potansiyele sahip bir hücre giriş yaklaşımını temsil etmektedir. İnsan immünyetmezliği virüsü (HIV-1) TAT protein temel alanı RKKRRQRRR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 20 ve daha uzun varyantları) ve poli-Arjinin (örneğin 8R; RRRRRRRR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 19)) veya Lizin gibi diğer PTD'ler {El-Andaloussi, 2005 #36}, *in vivo* kültür ve prelinik modellerde geniş çeşitlilikte biyoaktif yüklerin hücrelere iletilmesi için kullanılmaktadır {El-Andaloussi, 2005 #36; Goun, 2006 #38; Meade, 2007 #37}. PTD'lerin peptit, nükleik asit ve büyük molekül yüklerinin etkili iletimi birçok grup tarafından gösterilmiştir ve birkaç klinik deney PTD-aracılı iletim kullanılarak günümüzde devam etmektedir. PTD-alemi ile ilgili birçok mekanistik çalışma, yine kötü bir şekilde belirlenmiş tam mekanizması ile gerçekleştirilmiştir {Fischer, 2005 #41; Gump, 2007 #39; Nakase, 2008 #40; Heitz, 2009 #42; Gump, 2010 #2}.

PTD ile birleştirilmiş yüklerin, hücre membranı boyunca yerinin değiştirildiği ve bunların ekstrasellüler konsantrasyon iletim verimliliğini belirtmektedir. Son zamanlardaki çalışmalar, PTD-aracılı protein iletiminin, lipit yığılmasıyla ilişkili makropinositoz gibi endositotik yollar aracılığıyla edildiği gösterilmektedir {Gump, 2010 #2}. Makropinositoz protein ile internalizasyon sonrasında yükler, makropinositoların içerisinde barındırılmaktadır ve sitosolün içerisinde serbest değildir; böylelikle doğru lokalizasyonu ve aktiviteyi kazanmaktadır Makropinositotik ve vesiküller, diğer türlere kıyasla sızınmayan endozomlar olarak düşünülmektedir ve asidifikasyon yüzünden membran bütünlüğünü ilerlemeli olarak kaybetmektedir. Bu, PTD ile etiketli proteinlerin herhangi bir kaçışını bu özellikler yüzünden muhtemel olduğu anlamına gelmektedir {Norbury, 1995 #21; Meier, 2002 #20}. Önemli bir şekilde makropinositotik vesiküller, bunların içeriklerini bozmak için lizozomlara birleşmemektedir {Conner, 2003 #22}. Ancak iletim, translokasyonu tahrik etmek için ekstrasellüler olarak aşırı miktarda

protein gerektirmektedir. Ayrıca endozomal muhafazadan kaçınılması ve biyolojik olarak fonksiyonel olması için etkili bir miktarda iletilmesi gerekmektedir. Ultrason, endozom-bozan peptitler veya endozomal yollara karşı klorokuin gibi kimyasal işlemleri içeren bu vesiküllerden yükün serbest bırakılmasını sağlamak üzere geliştirilmiştir {Gump, 2007 #39}.

5 Endozomal-bozucuların birlikte iletimi, bu peptitler yükler ile doğrudan iletilebildiğinden dolayı çekicidir {Wadia, 2004 #25}, ancak bu prosesin verimliliği, yine proteinin büyük çoğunluğunu sitosolden uzakta tutmaktadır {Skehel, 2001 #34; Han, 2001 #35}. Bundan dolayı yeterli miktarlarda protein ile hücreyi doğrudan aktarabilme, örneğin hücreler üzerinde fizyolojik veya metabolik ifade etkilerine sahip olabilme, burası için pratik bir seçenek olmamıştır

10

Mevcut buluşun bir amacı hücre üzerinde fizyolojik veya metabolik etkilerin sağlanmasıyla yönelik olarak yükün aktarımına dair geliştirilmiş bir yöntem sağlamaktır

Buluşun bir birinci yönünde burada açılan istem 1'e göre bir yükün bir hücreye aktarımına yönelik bir iletim molekülü sağlanmaktadır

15

Avantajlı bir şekilde mevcut buluşun iletim molekülünün sağlanmasıyla bir yükün hücrelere, örneğin kök hücrelere aktarım verimliliğini arttırabilmektedir. Bazı örneklerde herhangi bir mevcut bilinen sisteme kıyasla iletim miktarındaki bir >100-kat gelişim gösterilmiştir. HS-GAG bağlayıcı eleman (P21) gibi GAG bağlayıcı eleman (bir büyüme faktöründen), bir protein aktarım alanı örneğin 8mer arjinin peptit ve bir yük ile birlikte, büyük miktarlarda yükün mememli hücreleri gibi hücrelere alınabilmesi büyük ölçüde kolaylaştırılmaktadır Hücreler yalnızca iletim molekülünü (makropinositoz ile) almamaktadır ancak aynı zamanda iletim moleküllerinin, sellüler matrisin içinden geçtiği ve çekirdeklere iletildiği gösterilmiştir. Bu prosedür, proteinlerin DNA-bazlı iletiminden daha etkilidir ve yük, aktivitenin istendiği (çekirdekler dahil) alana iletilmektedir. Hücre spesifik yanlılar ayrıca gerçekleştirilebilir.

20

25

Bu teknoloji, yalnızca tranjenik deneylere kullanılmasıyla sınırlı değildir, ancak aynı zamanda iPSC'lerin (indüklenmiş pluripotent kök hücreleri) terapötik kullanıma yönelik aşamalı ayarlanmasıyla sınırlı değildir bir değiştirme adımı sağlamaktadır burada iPSC'lerin artı DNA yapıları ile modifiye edilmesi gerekmektedir.

30

Avantajlı bir şekilde bir yük-bağlama molekülünün sağlanmasıyla hücre membranı boyunca çeşitli aralıklarla yüklere tutturmak ve bunları taşımak için işlevselleştirilen bir molekül sağlamaktadır

35

Buradaki buluş molekül iletim sistemi, GET (GAG-bağlayıcı geliştirilmiş aktarıcı) veya Heparan-sülfat geliştirilmiş aktarıcı alan (HETD)-aracı iletim olarak atılabilir bulunulabilmektedir. Bu terimler birbirinin yerine kullanılabilir.

- 5 GAG bağlayıcı eleman, hücrenin yüzeyinde HS-GAG'a bağlanabilen bir heparan sülfat glikozaminoglikan (HS-GAG) olabilmektedir, bu da hücrenin yüzeyinde HS-GAG'a bağlanabilmektedir.

10 Heparan sülfat glikozaminoglikan (HS-GAG), iki veya üç HS zincirinin, hücre yüzeyine veya ekstrasellüler matris proteinlerine yakın bir şekilde tutturulduğu bir proteoglikandaki HS'nin, bir dizi protein ligandına bağlandığı ve gelişimsel proses, anjiyogenez, kan koagülasyonu ve tümör metastaz dahil olmak üzere geniş çeşitlilikte biyolojik aktiviteyi regüle ettiği formdur. Heparan sülfat, karbohidratları glikozaminoglikan familyasından bir üyesidir ve yapı bakımından heparan ile yakından ilişkilidir. Her ikisi de değişken bir şekilde sülfatlanmış

15 yineleyen disakkarit biriminden oluşmaktadır. Heparan sülfat içerisinde en yaygın disakkarit birimi, toplam disakkarit birimlerinin en fazla yaklaşık %50'sini oluşturan N-asetilglükosamina (GlcNAc) bağlanan bir glükuronik asitten (GlcA) oluşmaktadır.

GAG bağlayıcı eleman, GAG için spesifik afiniteye sahip olabilmektedir. HS-GAG bağlayıcı

20 eleman, HS-GAG için spesifik afiniteye sahip olabilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, bir heparin bağlayıcı alan (HBD) veya bunun bir varyantını içerebilmektedir. Heparin bağlayıcı alan varyantı tepesi kesilmiş bir heparin bağlayıcı alanı veya uzatılmış bir heparin bağlayıcı alanı içerebilmektedir. GAG bağlayıcı eleman, spesifik olarak veya tercihen GAG'a bağlanan herhangi bir protein, peptit veya molekülü içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman,

25 spesifik olarak veya tercihen HS-GAG'a bağlanan herhangi bir protein, peptit veya molekülü içerebilmektedir.

HS-GAG bağlayıcı eleman, Heparin-Bağlayıcı EGF-benzeri Büyüme Faktörünün (HB-EGF) heparin bağlayıcı alanını en azından bir kısmını içerebilmektedir. Heparin bağlayıcı alanı HB-EGF'nin P21'ini içerebilmektedir. Heparin bağlayıcı alanı P21'in bir tepesi kesik, uzatılmış

30 veya fonksiyonel varyantını içerebilmektedir.

HS-GAG bağlayıcı eleman, bir fibroblast büyüme faktörünün bir heparin bağlayıcı alanı (HBD) veya bir fonksiyonel kısmını veya bunun bir varyantını içerebilmektedir.

35 HS-GAG bağlayıcı elemanı, FGF, ATIII gibi antitrombin, VEGF, BMP'ler, Wnt'ler, Shh EGF'ler

ve PDGF; veya bunların kombinasyonları içeren grubun herhangi birinden seçilebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, FGF2, FGF7 veya PDGF'den herhangi birini içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, herhangi bir FGF proteininin heparan bağlayıcı sülfat alanlarından bir veya daha fazlasını (örneğin alanlar A, B veya C) içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, FGF4 içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman; FGF1 HBD A (heparan sülfat bağlayıcı alan A (FGF1'in birinci HBD alanı)), FGF2 HBD A (heparan sülfat bağlayıcı alan A), FGF4 HBD A (heparan sülfat bağlayıcı alan A), FGF1 HBD C (heparan sülfat bağlayıcı alan C), FGF2 HBD B (heparan sülfat bağlayıcı alan B), FGF2 HBD C (heparan sülfat bağlayıcı alan C), FGF4 HBD C (heparan sülfat bağlayıcı alan C), FGF7 HBD B (heparan sülfat bağlayıcı alan B), FGF7 HBD C (heparan sülfat bağlayıcı alan C), antitrombin, örneğin ATIII, VEGF veya PDGF veya bunların varyantları içerebilmektedir.

HS-GAG bağlayıcı eleman, Hepatosit Büyüme Faktörü, İnterlökin, morfojenler, HS-GAG bağlayıcı enzimler, Wnt/Kanalsız Endostatin, viral protein, örneğin ayak ve ağız hastalığı virüs proteini, anneksin V, lipoprotein lipaz; veya HS-GAG bağlayıcı fragmentlerini içeren grubun herhangi birinden seçilebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, spesifik olarak HS-GAG'a bağlanabilen herhangi bir protein, peptit veya molekülü içerebilmektedir.

Bir "varyant" ile, teknikte uzman bir kişi tarafından, bilinen, raporlanan, açılan veya talep edilen sekansın farklı birkaç sekansını bulunabildiği ancak yine de varyantın HS-GAG'a bağlandığı bir fonksiyonel varyantı kapsadığı anlaşılacaktır. Koruyucu amino asit ikameleri, ayrıca "varyant" anlamında dahilinde tasarlanmaktadır.

HS-GAG bağlayıcı eleman, amino asit sekansı KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK (P21) SEKANS KİMLİK NUMARASI 1) içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1'e yönelik en az %80 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1'e yönelik en az %90 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1'e yönelik en az %95 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1'e yönelik en az %98 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1'e yönelik en az %99 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir.

HS-GAG bağlayıcı eleman, amino asit sekansı G R P R E S G K K R K R K R L K P T (PDGF, SEKANS KİMLİK NUMARASI 3) içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK

NUMARASI: 3'e yönelik en az %80 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 3'e yönelik en az %90 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 3'e yönelik en az %95 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 3'e yönelik en az %98 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 3'e yönelik en az %99 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir.

HS-GAG bağlayıcı eleman, amino asit sekansı Y A S A K W T H N G G E M F V A L N Q ((FGF7, HBD B) SEKANS KİMLİK NUMARASI 5) içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5'e yönelik en az %80 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5'e yönelik en az %90 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5'e yönelik en az %95 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5'e yönelik en az %98 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5'e yönelik en az %99 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir.

HS-GAG bağlayıcı eleman, amino asit sekansı Y R S R K Y T S W Y V A L K R (FGF2 HBD B SEKANS KİMLİK NUMARASI 7) içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7'ye yönelik en az %80 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7'ye yönelik en az %90 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7'ye yönelik en az %95 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7'ye yönelik en az %98 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7'ye yönelik en az %99 kimliğe sahip bir sekans içerebilmektedir.

Sekans kimliği, standart BLAST hizalama parametreleri ile belirlenebilmektedir (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ tarafından sağlanmaktadır).

GAG bağlayıcı eleman, bir GAG bağlayıcı antikor, veya bunun bir varyantı veya fragmentini içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, bir HS-GAG bağlayıcı antikor, veya bunun bir varyantı veya fragmentini içerebilmektedir. Antikor fragmenti, bir antikor değişken alan, bir scFv, bir diakor, bir FAb, bir Dab, bir F(ab)'2, bir ağır hafif zincir dimeri veya bir tek zincir

yapılabilmektedir. Antikor varyantları CDR'leri, bir antikor mimiteik ve bir DARPin içeren bir protein iskelesini içerebilmektedir.

5 GAG veya HS-GAG bağlayıcı eleman, bir nanokor (hafif zincirlerden yoksun olan ve doğal olarak Kamelidada oluşan ağır zincir antikorlardan elde edilen tek-alan antijen-bağlayıcı fragmentler) içerebilmektedir.

Tek-alan antikoru, bir CDR1, CDR2 ve CDR3 içeren bir V_HH fragmenti içerebilmektedir, burada

10

CDR1, GFTVSSNE (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 21) veya GFAFSSYA (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 22)'nin amino asit sekansı içerebilmektedir veya bu sekanstan oluşabilmektedir;

15

CDR2, ISGGST (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 23) veya IGTGGDT (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 24)'ün amino asit sekansı içerebilmektedir veya bu sekanstan oluşabilmektedir; ve

CDR3, GRRLKD (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 25) veya SLRMNGWRAHQ (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 26)'nin amino asit sekansı içerebilmektedir veya bu sekanstan oluşabilmektedir.

20

Tek-alan antikoru, bir CDR1, CDR2 ve CDR3 içeren bir V_HH fragmenti içerebilmektedir, burada

25

CDR1, GFTVSSNE (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 21)'nin amino asit sekansı içerebilmektedir veya bu sekanstan oluşabilmektedir;

CDR2, ISGGST (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 23)'ün amino asit sekansı içerebilmektedir veya bu sekanstan oluşabilmektedir; ve

CDR3, GRRLKD (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 25)'in amino asit sekansı içerebilmektedir veya bu sekanstan oluşabilmektedir.

30

Alternatif olarak CDR3; GMRPRL (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 27), HAPLRNTRTNT (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 28), GSRSSR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 29), GRTVGRN (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 30), GKVLPN (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 31), SGRKGRMR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 32), SLRMNGWRAHQ (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 26) veya RRYALDY (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 33) amino asit sekansı içerebilmektedir.

35

Tek-alan antikoru, bir CDR1, CDR2 ve CDR3 içeren bir V_HH fragmenti içerebilmektedir, burada

5 CDR1, GFAFSSYA (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 22)'nin amino asit sekansı içerebilmektedir veya bu sekanstan oluşabilmektedir;
CDR2, IGTGGDT (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 24)'ün amino asit sekansı içerebilmektedir veya bu sekanstan oluşabilmektedir; ve
CDR3, SLRMNGWRAHQ (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 26)'nin amino asit sekansı
10 içerebilmektedir veya bu sekanstan oluşabilmektedir.

Alternatif olarak CDR3; LKQQGIS (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 34), AMTQKKPRKLSL (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 35), HAPLRNTRTNT (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 28), GMRPRL (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 27), RRYALDY (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 33) veya
15 SGRKYFRARDMN (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 36) amino asit sekansı içerebilmektedir.

HS-GAG bağlayıcı eleman, anti-HS scFv antikorlar AO4B08, AO4B05, AO4F12, RB4CB9, RB4CD12, RB4EA12 veya RB4EG12 (Jenniskens ve ark (2000. The Journal of Neuroscience, 20(11):4099-4111) ve Smits, ve ark (2006. METHODS IN ENZYMOLOGY, CİLT 416, ss. 61-87
20 dokümanlarında açıkladığı üzere); veya bunların fragmentlerini içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, AO4B08 içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, AO4B08, AO4B05, AO4F12, RB4CB9, RB4CD12, RB4EA12 veya RB4EG12'nin CDR1, CDR2 ve CDR3'ünü içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, AO4B08'in CDR1, CDR2 ve CDR3'ünü içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, HS3A8, LKIV69, EW3D10, EW4G2, NS4F5,
25 RB4EA12, HS4E4 veya HS4C3'ü içerebilmektedir (Wijnhoven ve ark (2008) Glycoconj J 25:177-185) ve Smits, ve ark (2006. METHODS IN ENZYMOLOGY, CİLT 416, ss. 61-87 dokümanlarında açıkladığı üzere). HS-GAG bağlayıcı eleman, HS4E4 veya HS4C3 içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, HS3A8, LKIV69, EW3D10, EW4G2, NS4F5, RB4EA12, HS4E4 veya HS4C3'ün CDR1, CDR2 ve CDR3'ünü içerebilmektedir. HS-GAG
30 bağlayıcı eleman, HS4E4 veya HS4C3'ün CDR1, CDR2 ve CDR3'ünü içerebilmektedir.

HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 15 veya 17'yi (AO4B08) içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11 veya 13'ü (HS4C3) içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman; bir antikör veya antikör fragmenti, ağır zincir ve/veya hafif zincir içerebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman; bir antikör veya antikör

fragmenti, HCDR1, HCDR2 ve HCDR3 zincirlerini içeren ağır zincir ve/veya LCDR1, LCDR2 ve LCDR3 zincirlerini içeren hafif zincir içerebilmektedir.

5 Protein aktarım alanı hidrofilik veya amfiliktir. Protein aktarım alanı hidrofilik amino asit kalıntıları büyük çoğunluğunu içerebilmektedir. Protein aktarım alanı arginin ve/veya lizin amino asit kalıntıları büyük çoğunluğunu içerebilmektedir. Protein aktarım alanı yinelenmiş bir amino asit sekans motifine sahip bir periyodik sekans içerebilmektedir. Protein aktarım alanı penetratin HIV türevli TAT gibi TAT, MAP veya transportan, pVec veya pep-1 içerebilmektedir.

10

Kalıpların "büyük çoğunluğu"na atıfta bulunulduğunda teknikte uzman kişiler tarafından kalıpların %50'sinden daha fazlasını kapsadığı anlaşılabilmektedir. Büyük çoğunluk kalıpların %55, %60, %70, %80, %90 veya %95'i olabilmektedir.

15 Protein aktarım alanı aşağıdakileri içeren grubun herhangi birinden seçilebilmektedir:

Penetratin veya Antenapedi PTD RQIKWFQNRMMKWKK (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 37);

TAT YGRKKRRQRRR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 38);

20 SynB1 RGGRLSYSRRRFSTSTGR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 39);

SynB3 RRLSYSRRRF (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 40);

PTD-4 PIRRRKLRRLK (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 41);

PTD-5 RRQRRTSKLMKR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 42);

FHV Kaplama-(35-49) RRRNRTRNRNRVR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 43);

25 BMV Gag-(7-25) KMTRAQRRAAARNRWTAR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 44);

HTLV-II Rex-(4-16) TRRQRTRRRARNR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 45);

D-Tat GRKKRRQRRPPQ (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 46);

R9-Tat GRRRRRRRRPPQ (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 47);

Transportan GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 48)

30 kimera;

MAP KLALKLALKLALALKLA (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 49);

SBP MGLGLHLLVLAALQGAWSPKPKKRKV (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 50);

FBP GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKPKKRKV (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 51);

MPG ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKPKKRKV-cya (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 52);

35 MPG(?NLS) ac- GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV-cya (SEKANS KİMLİK NUMARASI:

53);

Pep-1 ac-KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-cya (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 54); ve

Pep-2 ac-KETWFETWFTEWSQPKKKRKV-cya (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 55).

- 5 Protein aktarımları alan R_xN ($4 < N < 17$) kimera gibi poliarjininler, K_xN ($4 < N < 17$) kimera gibi polilizinler, (RAca)6R, (RAbu)6R, (RG)6R, (RM)6R, (RT)6R içerebilmektedir. (RS)6R, R10, (RA)6R, R7, veya R8.

Protein aktarımları alan poliarjinin veya polilizin içerebilmektedir. Protein aktarımları alan arjinin veya lizin yineleme sekansları içerebilmektedir. Protein aktarımları alan ardışık arjinin kalıntıları gibi arjinin kalıntıları içerebilmektedir. Protein aktarımları esasen arjinin kalıntılarından oluşabilmektedir. Protein aktarımları 4-20 arjinin kalıntıları gibi arjinin yinelemelerini içerebilmektedir. Protein aktarımları 8 arjinin kalıntısı içerebilmektedir. Protein aktarımları yaklaşık 6 ve yaklaşık 12 arasında arjinin kalıntısı içerebilmektedir. Protein aktarımları yaklaşık 7 ve yaklaşık 9 arasında arjinin kalıntısı içerebilmektedir.

Protein aktarımları yaklaşık 4 ve yaklaşık 12 arasında amino asit kalıntısı içerebilmektedir. Protein aktarımları yaklaşık 6 ve yaklaşık 12 arasında amino asit kalıntısı içerebilmektedir. Protein aktarımları yaklaşık 7 ve yaklaşık 9 arasında amino asit kalıntısı içerebilmektedir. Protein aktarımları yaklaşık 4 amino asit kalıntısı içerebilmektedir. Protein aktarımları yaklaşık 6 amino asit kalıntısı içerebilmektedir.

Protein aktarımları ardışık lizin kalıntıları gibi lizin kalıntıları içerebilmektedir. Protein aktarımları esasen lizin kalıntılarından oluşabilmektedir. Protein aktarımları 4-20 lizin kalıntıları gibi lizin yinelemelerini içerebilmektedir. Protein aktarımları 8 lizin kalıntısı içerebilmektedir. Protein aktarımları yaklaşık 4 ve yaklaşık 12 arasında lizin kalıntısı içerebilmektedir. Protein aktarımları yaklaşık 6 ve yaklaşık 12 arasında lizin kalıntısı içerebilmektedir. Protein aktarımları yaklaşık 7 ve yaklaşık 9 arasında lizin kalıntısı içerebilmektedir.

Protein aktarımları ardışık Q ve R kalıntıları gibi QR yineleme kalıntıları içerebilmektedir. Protein aktarımları esasen Q ve R kalıntılarından oluşabilmektedir. Protein aktarımları 4-20 QR yineleme kalıntıları gibi QR yinelemelerini içerebilmektedir. Protein aktarımları 8 QR yineleme kalıntısı içerebilmektedir. Protein aktarımları yaklaşık 6 ve yaklaşık 12 arasında QR yineleme kalıntısı içerebilmektedir. Protein aktarımları yaklaşık 7 ve yaklaşık 9 arasında

QR yineleme kalıtı içerebilmektedir.

Yük, moleküler bir yük olabilmektedir. Yük, bir protein içerebilmektedir. Yük, bir peptit içerebilmektedir. Yük küçük olmayan bir molekül içerebilmektedir. Yük, bir nanopartikül veya polimer nanopartikül gibi bir nanopartikül içerebilmektedir. Nanopartikül, bir metal çubuk gibi bir çubuk olabilmektedir. Nanopartikül gözenekli olabilmektedir. Yük, bir nano-yapı içerebilmektedir. Yük, bir süpermanyetik demir oksit nanopartikülü (SPION) içerebilmektedir. Yük bir nükleik asit vektörü gibi nükleik asit olabilmektedir. Yük, oligonükleotit içerebilmektedir. Yük, siRNA, modifiye mesajcıRNA'lar (mRNA'lar), mikro RNA'lar, DNA, PNA, LNA veya bunların yapılarından herhangi birini içerebilmektedir.

Yük, fizyolojik olarak veya metabolik olarak ilgili bir protein içerebilmektedir. Yük, bir intrasellüler protein içerebilmektedir. Yük, bir sinyal yolunda kapsanan protein olan bir sinyal proteini içerebilmektedir. Yük, bir hücrenin ifade regülasyonu veya metabolizması ile kapsanan bir protein içerebilmektedir. Yük, hücre bölünmesi ile kapsanan bir protein içerebilmektedir. Yük, kök hücre farklılaşması gibi hücre farklılaşması ile kapsanan bir protein içerebilmektedir. Yük, pluripotent kök hücrelerinin indüksiyonu için gerekli bir protein içerebilmektedir. Yük, kardiyak hücre farklılaşması ile kapsanan bir protein içerebilmektedir. Yük, bir protein işaretçisi gibi bir işaretçi içerebilmektedir. Yük, bakteriyel veya bakteriyel olarak elde edilen bir protein içerebilmektedir. Yük, bir memeli veya memeli türevli protein içerebilmektedir. Yük, herhangi bir peptit, polipeptit veya protein olabilmektedir. Yük, araştırma, teşhis veya terapötik molekülleri içerebilmektedir. Yük, sinyal üretiminin bir elemanı olan bir transkripsiyon modülatörünü içerebilmektedir. Yük; bir enzim veya bunun bir substratı bir proteaz, bir enzim aktivite modülatörü, bir pertürbimer ve peptit aptamer, bir antikor, protein-protein etkileşiminin bir modülatörü, bir büyüme faktörü veya bir farklılaşma faktörü içerebilmektedir.

Yük, bir ön-protein olabilmektedir. Örneğin eksizyon alanları hücreye girmesi üzerine veya sonrasında klevajı olacak şekilde düzenlenen iletim molekülünde sağlanabilmektedir. Yük, hücre içerisinde bir post-translasyonel olarak modifiye edilmiş olacak şekilde düzenlenen bir protein olabilmektedir. Yük, hücre içerisinde bir kere fonksiyonel olarak düzenlenebilmektedir. Örneğin yük, hücreye aktarıldıktan sonra kadar fonksiyonel olmayabilmektedir.

Yük, herhangi bir intrasellüler molekülü içerebilmektedir. Yük, bir intrasellüler fonksiyonel (etki modu), intrasellüler reseptöre, intrasellülere liganda veya intrasellüler substrata sahip

herhangi bir protein veya molekülü içerebilmektedir. Yük, bir hücreye doğal olarak/normal olarak içselleştirilen bir protein veya molekülü içerebilmektedir. Yük, bir hücre yüzeyi reseptörü gibi hücre yüzeyinde iletim veya gösterim için amaçlanan bir protein içerebilmektedir. Yük, bir terapötik molekül; bir ilaç; bir pro-ilâç; bir fonksiyonel protein veya peptit, örneğin bir enzim veya bir transkripsiyon faktörü; bir mikrobiyal protein veya peptit; ve bir toksin; veya bunu kodlayan nükleik asidi içeren grubun herhangi birinden seçilebilmektedir.

Yük, NANOG, NEO, MYOD, Cre, GATA4, TBX5, BAF60c ve NKX2.5 içeren grubun herhangi birinden seçilebilmektedir. Yük, RFP içerebilmektedir. Yük, Cre içerebilmektedir. Yük, bir kardiyak gen regülatör ağı bir üyesini içerebilmektedir. Yük, GATA4 içerebilmektedir. Yük, TBX5 içerebilmektedir. Yük, NKX2.5 içerebilmektedir. Yük, BAF60c içerebilmektedir. Yük, Oct-3/4 (Pou5f1), Sox2, Lin28, Klf4, Nanog, Glis1 veya c-Myc; veya bunların kombinasyonları içerebilmektedir.

Yük; toksin, hormon transkripsiyon faktörleri, örneğin jun, fos, maks, mad, serum yanıt faktörü (SRF), AP-1, AP2, mib, MyoD, miyogenin, ETS-kutusu içeren proteinler, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF4, C/EBP, SP1, CCAAT-kutu bağlayıcı proteinler, interferon düzenleme faktörü (IRF-1), Wilms tümör proteini, ETS-bağlayıcı protein, STAT, GATA-kutusu bağlayıcı proteinler, örneğin GATA-3, transkripsiyon faktörü, örneğin HIF1a ve RUNT, kanatlı heliks proteinler, karbamoil sintaz I, ornitin transkarbamilaz, arginosüksinat sentaz, argino süksinat liyaz, arginaz fümariasetat hidrolaz, fenilalanin hidroksilaz, alfa-1 antitripsin, glikoz-6-fosfataz, porfobilinogen deaminaz, faktör VIII, faktör IX, sistasyon beta-sintaz, dallanmış zincir ketoasit dekarboksilaz, izovaleril-coA dehidrojenaz, propionil CoA karboksilaz, metil malonil CoA mutaz, glutaril CoA dehidrojenaz, beta-glükosidaz, piruvat karboksilat, hepatik fosforilaz, fosforilaz kinaz, glisin dekarboksilaz, H-proteini, T-proteini, bir sistik fibroz transmembran regülatörü (CFTR) sekans bir distrofin cDNA sekansı Oct-3/4 (Pou5f1), Sox2, c-Myc, Klf4, RPE65 Nanog ve SoxB1; veya bunların fragmentleri ve/Veya bunların kombinasyonları içeren grubun herhangi birinden seçilebilmektedir.

Yük, protein-protein kompleksler, protein-mRNA, protein-kodlama olmayan RNA, protein-lipit ve protein-küçük molekül kompleksleri gibi kolavent olmayarak bağlı kompleksleri içerebilmektedir. Bu tür komplekslerin örnekleri, RISC'ler veya splisozomlar olmaktadır

35

Yük, en az 1KDa molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. Yük, en az 5KDa molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. Yük, en az 10KDa molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. Yük, en az 20KDa molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. Yük, en az 400KDa molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. Yük, en az 300KDa molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. Yük, yaklaşık 0.5KDa ve yaklaşık 400KDa arasında bir molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. Yük, yaklaşık 1KDa ve yaklaşık 400KDa arasında bir molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. Yük, yaklaşık 0.5KDa ve yaklaşık 200KDa arasında bir molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. Yük, yaklaşık 1KDa ve yaklaşık 200KDa arasında bir molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. Yük, yaklaşık 2KDa ve yaklaşık 300KDa arasında bir molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. Yük, yaklaşık 20KDa ve yaklaşık 300KDa arasında bir molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. Yük, yaklaşık 20KDa ve yaklaşık 100KDa arasında bir molekül ağırlığına sahip olabilmektedir.

Yükün amino asitleri içerdiği durumlarda yük, uzunluk bakımından yaklaşık 20 veya yaklaşık 30,000 arasında amino asit olabilmektedir. Yük, uzunluk bakımından yaklaşık 20 veya yaklaşık 10,000 arasında amino asit olabilmektedir. Yük, uzunluk bakımından yaklaşık 20 veya yaklaşık 5,000 arasında amino asit olabilmektedir. Yük, uzunluk bakımından yaklaşık 20 veya yaklaşık 1000 arasında amino asit olabilmektedir. Yük, uzunluk bakımından en azından yaklaşık 20 amino asit olabilmektedir. Yük, uzunluk bakımından en azından yaklaşık 100 amino asit olabilmektedir.

Yük, iyonik veya kovalent bağlanma vasıtasıyla gibi yük-bağlayıcı moleküle bağlanabilmektedir. Yük, iyonik veya kovalent bağlanma vasıtasıyla gibi protein aktarılan alan ve/veya GAG bağlayıcı elemana bağlanabilmektedir.

Yük, yük bağlayıcı moleküle bağlanması için bir eleman içerebilmektedir. Yük, biyotin veya alternatif olarak streptavidin içerebilmektedir. Yük, biyotinlenmiş olabilmektedir. Yük, yük bağlayıcı molekülde bir tamamlayıcı afinite etiketine bağlanabilen bir afinite etiketi içerebilmektedir.

Bir yapılandırılmada yük, yük-bağlayıcı moleküle bağlanmaktadır. Yük, iletim molekülünün imalat sırasında, imalat sonrasında, kullanılmı öncesinde veya kullanılmı sırasında yük-bağlayıcı moleküle bağlanabilmektedir.

Yük-bağlayıcı molekül, yük molekülü için bir taşıyıcı olabilmektedir. Bir tek yük-bağlayıcı molekül bağlanabilmektedir ve çoklu yük moleküllerini taşıyabilmektedir. Yük-bağlayıcı

molekül, bir hücreye içselleştirme öncesinde yükü koruyabilmektedir. Yük-bağlayıcı molekül, bir biyotinlenmiş yük üzerinde biyotine bağlanabilmektedir. Yük-bağlayıcı molekül, nükleik-asit bazı yüke bağlanabilmektedir. Yük-bağlayıcı molekül, peptit-bazı yüke bağlanabilmektedir. Yük-bağlayıcı molekül, bir antikor yüke veya bunun fragmentine veya benzerine bağlanabilmektedir. Yük-bağlayıcı molekül, bir metal veya polimer nanopartikül gibi bir nanopartikül yüke bağlanabilmektedir. Yük-bağlayıcı molekül, fonksiyonel olarak bir hücrede etkinsiz olabilmektedir ancak bir aktif yükü taşıyabilmektedir veya buna bağlanabilmektedir. Yük-bağlayıcı molekül, bir kimyasal bağ molekülü içerebilmektedir. Yük-bağlayıcı molekül, bir afinite etiketi içerebilmektedir. Yük-bağlayıcı molekül, bir peptit veya protein içerebilmektedir. Yük-bağlayıcı molekül, bir mSA2 (monomerik streptavidin 2) içerebilmektedir. Yük-bağlayıcı molekül, LK15 gibi bir nükleik asitle etkileşen peptit içerebilmektedir. Yük-bağlayıcı molekül, IgG bağlayıcı protein gibi bir antikor bağlayıcı molekül içerebilmektedir. IgG bağlayıcı protein, protein SpAB'yi bağlayan S. aureus IgG içerebilmektedir. Teknikte uzman kişi, moleküllerin herhangi bir uygun çiftinin veya grubunun, aralarında yeterli bağlamaya veya afiniteye sahip olduğu sağlanan yük veya yük-bağlayıcı molekül için kullanılabilmektedir.

Yük ve yük-bağlayıcı molekül arasındaki bağ veya etkileşim, örneğin intrasellüler çevrede tersinir veya bozunur olabilmektedir.

GAG bağlayıcı eleman ve protein aktarılan alandan doğrudan kimyasal konjugasyon ile veya bir bağ molekülü vasıtasıyla yüke ve/veya yük-bağlayıcı moleküle bağlanabilmektedir. GAG bağlayıcı eleman ve protein aktarılan alandan doğrudan kimyasal konjugasyon ile veya bir bağ molekülü vasıtasıyla yüke bağlanabilmektedir. GAG bağlayıcı eleman ve protein aktarılan alandan doğrudan kimyasal konjugasyon ile veya bir bağ molekülü vasıtasıyla yük-bağlayıcı moleküle bağlanabilmektedir. GAG bağlayıcı eleman, protein aktarılan alan ve yük, bir tek füzyon molekülü olabilmektedir (örneğin bir tek peptit molekülü olarak kodlanabilmektedir ve transkript edilebilmektedir). GAG bağlayıcı eleman, protein aktarılan alan ve yük-bağlayıcı molekül, bir tek füzyon molekülü olabilmektedir (örneğin bir tek peptit molekülü olarak kodlanabilmektedir ve transkript edilebilmektedir). Protein aktarılan alan ve GAG bağlayıcı eleman, yük-bağlayıcı molekülün ve/veya yükün yanında olabilmektedir.

İletim molekülü, uzunluk bakımından yaklaşık 10 veya yaklaşık 30,000 arasında amino asit olabilmektedir. İletim molekülü, uzunluk bakımından yaklaşık 20 veya yaklaşık 30,000 arasında amino asit olabilmektedir. İletim molekülü, uzunluk bakımından yaklaşık 30 veya

yaklaşık 30,000 arasında amino asit olabilmektedir. İletim molekülü, uzunluk bakımından yaklaşık 40 veya yaklaşık 30,000 arasında amino asit olabilmektedir. İletim molekülü, uzunluk bakımından yaklaşık 10 veya yaklaşık 10,000 arasında amino asit olabilmektedir. İletim molekülü, uzunluk bakımından yaklaşık 20 veya yaklaşık 10,000 arasında amino asit olabilmektedir. İletim molekülü, uzunluk bakımından yaklaşık 40 veya yaklaşık 10,000 arasında amino asit olabilmektedir. İletim molekülü, uzunluk bakımından yaklaşık 10 veya yaklaşık 3,000 arasında amino asit olabilmektedir. İletim molekülü, uzunluk bakımından yaklaşık 20 veya yaklaşık 3,000 arasında amino asit olabilmektedir. İletim molekülü, uzunluk bakımından yaklaşık 40 veya yaklaşık 3,000 arasında amino asit olabilmektedir. İletim molekülü, uzunluk bakımından yaklaşık 10 veya yaklaşık 1000 arasında amino asit olabilmektedir. İletim molekülü, uzunluk bakımından yaklaşık 20 veya yaklaşık 1000 arasında amino asit olabilmektedir. İletim molekülü, uzunluk bakımından yaklaşık 40 veya yaklaşık 1000 arasında amino asit olabilmektedir. İletim molekülü, uzunluk bakımından yaklaşık 40 veya yaklaşık 500 arasında amino asit olabilmektedir. İletim molekülü, uzunluk bakımından yaklaşık 10 veya yaklaşık 500 arasında amino asit olabilmektedir. İletim molekülü, uzunluk bakımından yaklaşık 20 veya yaklaşık 500 arasında amino asit olabilmektedir. İletim molekülü, uzunluk bakımından yaklaşık 100 veya yaklaşık 3,000 arasında amino asit olabilmektedir. İletim molekülü, uzunluk bakımından en azından yaklaşık 100 amino asit olabilmektedir.

20

İletim molekülü bir tek füzyon molekülü olabilmektedir. Yük, HS-GAG bağlayıcı eleman ve protein aktarıcı alanı birlikte birleştirilebilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman ve protein aktarıcı alanı yükün yanında olabilmektedir. Yük, HS-GAG bağlayıcı eleman ve protein aktarıcı alanı bir veya daha fazla bağ molekülü ile birlikte bağlanabilmektedir.

25

İletim molekülü, en az 1KDa molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. İletim molekülü, en az 5KDa molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. İletim molekülü, en az 10KDa molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. İletim molekülü, en az 20KDa molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. İletim molekülü, 400KDa veya daha az molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. İletim molekülü, 300KDa veya daha az molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. İletim molekülü, yaklaşık 0.5KDa ve yaklaşık 400KDa arasında bir molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. İletim molekülü, yaklaşık 1KDa ve yaklaşık 400KDa arasında bir molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. İletim molekülü, yaklaşık 0.5KDa ve yaklaşık 200KDa arasında bir molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. İletim molekülü, yaklaşık 1KDa ve yaklaşık 200KDa arasında bir molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. İletim molekülü, yaklaşık 2KDa ve yaklaşık

35

300KDa arasında bir molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. İletim molekülü, yaklaşık 20KDa ve yaklaşık 300KDa arasında bir molekül ağırlığına sahip olabilmektedir. İletim molekülü, yaklaşık 20KDa ve yaklaşık 100KDa arasında bir molekül ağırlığına sahip olabilmektedir.

- 5 Hücre bir insan hücresi gibi bir memeli hücresi olabilmektedir. Hücre kanserli bir hücre olabilmektedir. Hücre bir kök hücre olabilmektedir. Hücre bir mutant hücre olabilmektedir. Hücre, bir hücre popülasyonunu içerebilmektedir. Hücre popülasyonu, karışık hücre türlerinde bir popülasyon olabilmektedir. Hücre bir mezenkimal kök hücre olabilmektedir. Hücre bir embriyonik kök hücre olabilmektedir. Hücre bir pluripotent kök hücre olabilmektedir. Hücre fonksiyonel restorasyon gerektiren bir hücre olabilmektedir. Hücre bir kardiyak kök hücre olabilmektedir. Hücre, NIH3t3, CGR8 ve HUES7 içeren grubun herhangi birinden seçilebilmektedir.

İletim molekülü, iletim molekülünün lokasyonunu tanımlanması ve/veya izlenmesine yönelik bir işaretçi içerebilmektedir. İşaretçi, bir floresan işaretçi veya bir radyoizotop içerebilmektedir. İşaretçi, mRFP1 (monomerik kırmızı floresan protein) içerebilmektedir. İşaretçi, pH-duyarlı mNektarin gibi mNektarin içerebilmektedir. mNektarin, 6.9'luk bir pKa'ya sahip olduğundan dolayı memeli hücrelerdeki fizyolojik pH değişikliklerini ölçmek için uygundur. İşaretçi, avGFP'nin bir kırmızı floresan protein (RFP) homologunu içerebilmektedir. İşaretçi, tetramerik Diskozoma RFP'den elde edilen Mmeyve serisi RFP'lerinden seçilen bir floresan protein içerebilmektedir. İşaretçi, mMandalina, mPortakal, mKiraz, mÇilek, sarıFP Sitrin, mElma ve EtiketRFP-T'den herhangi birini içerebilmektedir. İşaretçi pH-duyarlı olabilmektedir. İşaretçi, iletim molekülünün hücreye veya dokuya iletimini onaylamak üzere kullanılabilir. İşaretçi, hücre-türü spesifik olabilmektedir, örneğin işaretçi, yalnızca spesifik hücre türlerinde aktiveleştirilebilmektedir veya floresan yayayabilmektedir.

İletim molekülü, lokasyonun sadeleştirilmesi, izolasyonu, tespiti ve/veya belirlenmesinde yardımcı olacak bir etiket içerebilmektedir. Etiket bir afinite etiket olabilmektedir. Etiket bir peptid olabilmektedir. Etiket bir BAYRAK-etiketi / BAYRAK oktapeptidi olabilmektedir.

İletim molekülü, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10'u içeren bir nükleotit sekansı ile kodlanabilmektedir.

Aşağıdaki adları içeren aktarımlar için bir iletim molekülünün üretilmesine yönelik bir yöntem açıklanmaktadır.

(i) hücrenin yüzeyinden GAG'a bağlanabilen bir GAG bağlayıcı eleman; ve bir protein aktarılan alan ile bir yükün birleştirilmesi; veya

- 5 (ii) bir GAG bağlayıcı eleman ve bir protein aktarılan alanı kodlayan nükleik asit ile bir yükü kodlayan nükleik asidin bir araya getirilmesi; ve nükleik asitten iletim molekülünü ifade edilmesi; veya
- (iii) hücrenin yüzeyinden GAG'a bağlanabilen bir GAG bağlayıcı eleman; ve

bir protein aktarılan alan ile bir yükün in vitro sentezlenmesi.

10

GAG bağlayıcı eleman ve protein aktarılan alanı kodlayan nükleik asit DNA olabilmektedir. İn vitro sentez, peptidin sınırlı veya katı fazda gerçekleştirilebilir. GAG bağlayıcı eleman, bir HS-GAG bağlayıcı eleman olabilmektedir.

- 15 Buluşun başka bir yönüne göre, burada istem 8'e göre bir hücreye bir yükün aktarılmasını yönelik bir yöntem sağlanmaktadır

Aktarılan en az yaklaşık 1 saniye sürebilmektedir. Aktarılan en az yaklaşık 1 dakika sürebilmektedir. Aktarılan en az yaklaşık 2 dakika sürebilmektedir. Aktarılan en az yaklaşık 10 dakika sürebilmektedir. Aktarılan en az yaklaşık 30 dakika sürebilmektedir. Aktarılan en az yaklaşık 1 saat sürebilmektedir. Aktarılan, 8 saat veya daha az gibi 12 saat sürebilmektedir. Aktarılan yaklaşık 6 saat veya daha az sürebilmektedir. Aktarılan yaklaşık 1 saat veya 6 saat arasında sürebilmektedir. Aktarılan yaklaşık 1 saatten daha az sürebilmektedir. Aktarılan yaklaşık 30 dakikadan daha az sürebilmektedir. Aktarılan yaklaşık 10 dakikadan daha az sürebilmektedir. Aktarılan yaklaşık 1 dakikadan daha az sürebilmektedir.

25

Buluşun yöntemi ile veya buluşun iletim molekülü ile aktarılan veya indüklenmiş bir hücre açılanmaktadır

- 30 Mevcut buluşun başka bir yönüne göre, burada istem 9'a göre bir hücre sağlanmaktadır

Hücre indüklenmiş bir pluripotent kök hücre olabilmektedir.

- 35 Mevcut buluşun başka bir yönüne göre, burada istem 10'a göre bir nükleik asit sağlanmaktadır

Nükleik asit DNA olabilmektedir. Nükleik asi bir vektör olabilmektedir.

Aşağıdakileri içeren aktarımları için bir proteinin ifadesine yönelik bir vektör açılanmaktadır

5

bir HS-GAG bağlayıcı eleman gibi bir GAG bağlayıcı elemanı kodlayan bir sekans; ve protein aktarımları alanını kodlayan bir sekans.

Vektör, bir molekülü kodlayan bir nükleik asit sekansı içerebilmektedir. Vektör, OriP gibi bir bakteriyel replikasyon elemanı içerebilmektedir. Vektör, bir çoklu klonlama/kopyalama bölgesi içerebilmektedir. Vektör, güçlü bir promotör içerebilmektedir. Vektör, bir antibiyotik direnç işaretçisi gibi bir işaretçi içerebilmektedir.

Ayrıca şunları içeren bir hücre açılanmaktadır burada açılan nükleik asit; veya burada açılan bir vektör.

Aşağıdakileri içeren aktarımları için bir iletim molekülünün üretimine yönelik bir proses açılanmaktadır

20 burada açılan hücreden iletim molekülünün ifade edilmesi; ve iletim molekülünün büyük ölçüde veya kısmen izole edilmesi veya saflaştırılması

İletim molekülünün izolasyonu veya saflaştırılması hücre(ler)den veya hücre süpernatandan olabilmektedir. İletim molekülünün izolasyonu veya saflaştırılması konakçı hücre proteininden (HCP) olabilmektedir. Teknikte uzman kişi, herhangi bir standart saflaştırma yöntemi ile iletim molekülünü izole edebilmektedir veya saflaştırabilmektedir.

İletim molekülü, bir memeli, böcek, maya veya bakteriyel hücre gibi bir hücrede üretilebilmektedir. İletim molekülü, bir memeli hücrede üretilebilmektedir. Hücre HeLa, CHO veya HEK293T olabilmektedir.

Bir hücrede yükün aktarımlarının geliştirilmesi için bir yükün modifiye edilmesine yönelik bir yöntem açılanmakta olup, yüke bağlanan HS-GAG bağlayıcı elemanı ve bir protein aktarımları alanını sağlanması içermektedir.

35

5 HS-GAG bağlayıcı eleman, protein aktarılan alan ve yük, bir tek füzyon molekülü olarak protein ifadesi tarafından sağlanabilmektedir. HS-GAG bağlayıcı eleman, protein aktarılan alan ve yük, kimyasal olarak bunların bağlanmasıyla sağlanabilmektedir. Kimyasal bağ, kovalent bağ olabilmektedir HS-GAG bağlayıcı eleman, protein aktarılan alan ve yük, örneğin SNAP-etiket, Halo etiketi Promega) veya CLIP-etiket teknolojileri (New England Biolabs) kullanılarak bunların birleştirilmesiyle sağlanabilmektedir.

Mevcut buluşun başka bir yönüne göre, burada istem 11'e göre kullanılmı sağlanmaktadır

10 Ayrıca, buluşa göre bir iletim molekülünü içeren bir bileşimin uygulanması içeren bir hastalığın tedavisine veya önlenmesine yönelik bir yöntem açıklanmaktadır

Ayrıca, buluşa göre bir hücrenin uygulanması içeren bir hastalığın tedavisine veya önlenmesine yönelik bir yöntem açıklanmaktadır

15

Mevcut buluşun başka bir yönüne göre, bir hastalığın tedavisinde veya önlenmesinde kullanılmaya yönelik buluşa göre bir iletim molekülü sağlanmaktadır

20 Hastalık, bir veya daha fazla hücrede bir protein eksikliği ile karakterize edilen herhangi bir hastalık olabilmektedir. Hastalık, bir klap rahatsızlığı gibi bir kardiyak durumu içerebilmektedir. Hastalık, farklı kök hücrelerin uygulanması ile tedavi edilebilir veya önlenebilir olan bir hastalık içerebilmektedir. Hastalık, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin uygulanması ile tedavi edilebilir veya önlenebilir olan bir hastalık içerebilmektedir. Hastalık, protein indüksiyonu ile tedavi edilebilir veya önlenebilir olan bir hastalık içerebilmektedir.

25 Tedavi, kalp dokusunun rejenerasyonunu veya kalp dokusu fonksiyonunun restorasyonunu içerebilmektedir. Hastalık kanser veya kas distropisini içerebilmektedir.

İletim molekülü, (a) düz kas hücre proliferasyonu ve/veya migrasyonunun inhibe edilmesi; (b) düz kas gevşemesinin teşvik edilmesi; (c) kalp kasında kasılma hızının artması; (d) kalp kası gevşeme hızının artması; (e) yara iyileşmesinin teşvik edilmesi; (f) yara izi oluşumunun azaltılması; (g) fokal yapışmaların bozulması; (h) aktin polimerizasyonunun regüle edilmesi; veya (i) intimal hiperplazi, stenoz, restenoz, ateroskleroz, düz kas hücre tümörleri, düz kas spazmı anjina, Prinzmetal'in anjinası (koroner vasospazm), iskemi, felç, bradikardiya, hipertansiyon, pulmoner (akciğer) hipertansiyonu, astım (bronkospazm), hamilelik toksemisi, pre-term doğum, pre-eklampsi/eklampsi, Raynaud hastalığı veya olayı hemolitik-üremi,

30

35

oklüzif olmayan mesenterik iskemi, anal fisür, akalasi, impotens, kadonda cinsel heyecan bozukluğu (FSAD), migren, düz kas spazmı ile ilişkiliskemik kas yaralanması, vaskülopati, örneğin transplant vaskülopati, bradiaritmi, bradikardiya, konjestif kal yetmezliği, sersemletilmiş miyokardiyum, pulmoner hipertansiyon, musküler distropi, kanelopati ve diastolik disfonksiyondan bir veya daha fazlasının tedavi edilmesi, önlenmesi veya inhibe edilmesine yönelik kullanılabilmektedir.

Mevcut buluşun başka bir yönüne göre, burada istem 13'e göre bir sellüler fonksiyonun modifiye edilmesine yönelik bir yöntem sağlanmaktadır

10

Hücre kültürü *in vitro* olabilmektedir.

Burada açıklanan bir iletim molekülünün bir kök hücre sine aktarımı ile bir hücrenin farklılaşmasını indüklenmesine yönelik bir yöntem açıklanmaktadır

15

Kök hücre bir kardiyak kök hücre içerebilmektedir. İletim molekülü GATA4 veya TBX5 içerebilmektedir.

Mevcut buluşun başka bir yönüne göre, burada istem 14'e göre bir pluripotent kök hücre sinin indüklenmesine yönelik bir yöntem sağlanmaktadır İletim molekülü, Oct-3/4 (Pou5f1), Sox2, Lin28, Klf4, Nanog, Glis1 veya c-Myc; veya bunların kombinasyonları içerebilmektedir.

20

Ayrıca, burada açıklanan bir birinci iletim molekülünün bir kardiyak kök hücre sine aktarımı ve burada açıklanan bir ikinci iletim molekülünün kardiyak kök hücre sine aktarımı ile kardiyak farklılaşmasını indüklenmesine yönelik bir yöntem açıklanmaktadır burada birinci iletim molekülü, GATA4 içermektedir ve ikinci iletim molekülü TBX5 içermektedir.

25

Bir kök hücre nin kardiyak farklılaşmasını indüklenmesine yönelik yöntem, GATA4, TBX5, NKX2.5 ve BAF60c içeren grubun herhangi birinden seçilen bir yükü içeren bir veya daha fazla füzyon proteininin aktarımı içermektedir. Bir kök hücre nin kardiyak farklılaşmasını indüklenmesine yönelik yöntem, kardiyak gen regülatör ağı bir proteinini içeren bir veya daha fazla füzyon proteininin aktarımı içermektedir. Kardiyak kök hücre ye aktarım eş zamanlı veya sıralılabilmektedir.

30

35

Mevcut buluşun başka bir yönüne göre, burada istem 15'e göre bir farmasötik bileşim sağlanmaktadır.

5 İletim molekülü, mikropinositik vesiküllerden iletim molekülünün serbest bırakılmasını teşvik edilmesine yönelik bir vesikül serbest bırakma ajanının mevcudiyetinde aktarılabilir veya bunla birlikte uygulanabilmektedir. Vesikül serbest bırakma ajanı klorokuin içerebilir. Klorokuin konsantrasyonu, yaklaşık 1µM ve yaklaşık 100µM arasında olabilmektedir.

10 Mevcut buluşun başka bir yönüne göre, mevcut buluşa göre bir iletim molekülü sağlanmaktadır burada yük, burada açılan istem 16'ya göre hücre görüntülenmesinde kullanıma yönelik bir nanopartikül içermektedir.

Nanopartikül metal veya polimer içerebilir. Nanopartikül, bir çubuk olabilmektedir.

15

Ayrıca, buluşa göre bir iletim molekülünün bir hücreye iletimini içeren gen terapisine yönelik bir yöntem açılmaktadır burada yük, nükleik asit içermektedir.

Avantajlı bir şekilde aktarılır, gerçek zamanda izlenmektedir veya izlenebilir.

20

İletim molekülü, spesifik hücre türlerini hedefleyecek (başka bir deyişle yükü iletecek) şekilde düzenlenebilir. Uygun bir GAG bağlayıcı eleman, hücre yüzeyinden karşılaşılan GAG türüne sahip bir spesifik hücre popülasyonunu hedefleyecek şekilde seçilebilir.

25 Teknikte uzman kişi, buluşun bir yapılandırılması veya yönünün isteğe bağlı özelliklerinin, uygun görüldüğü takdirde buluşun diğer yapılandırmalarına ve yönlerine uygulanabilir olabileceğini anlayacaktır.

Buluşun yapılandırmaları burada yalnızca örnek olarak ekli şekillere atıfta bulunularak daha ayrıntılı bir şekilde açıklanacaktır.

30

Şekil 1 Pluripotent Hücrelerde Verimsiz Protein İletimi. **(a)** Protein iletiminin verimliliğini belirlemek için oluşturulan proteinlerin şeması mR, temel aktarıcı temsil eden kötü bir şekilde aktaran kontrol proteini olarak mFRP'dir. mR-8R aktarıcı kolaylaştırılmak için sekiz Arjinin kalıntıları (8R) bir C-terminali füzyonuna sahip mRFP'dir. **(b)** mR-8R etkili bir

35

şekilde NIH3t3 hücrelerine aktarmaktadır. Standart ortam koşullarında on iki saat boyunca mR veya mR-8R (100µg/ml) ile tedavi edilen NIH3t3 hücrelerinin floresan mikroskopi görüntüleri. Ölçek çubuğu, 100µm. **(c)** mR-8R insan ve fare embriyonik kök hücrelerine (sırasıyla HUES7 ve CGR-8), insan tarafından indüklenmiş pluripotent kök hücreleri (IPS2) ve fare kardiyomiyosit hücre hattına (HL1) verimsiz bir şekilde aktarmaktadır. Hücre tipi spesifik ortam koşullarında on iki saat boyunca mR-8R (100µg/ml) ile tedavi edilen çoklu hücre hatları floresan mikroskopi görüntüleri. Ölçek çubuğu, 100µm. **(d)** Farklı dozajlarda mR-8R (0, 1, 5, 10, 20, 50 ve 100µg/ml) ile tedavi edilen çoklu hücre hatları yirmi dört saat boyunca akış sitometri analizleri. **(e)** Yirmi dört saat boyunca 100µg/ml dozun akış sitometri analizleri. Grafikler, ilgili floresan birimleri (R.F.U) göstermektedir. Hata çubukları s.d. göstermektedir.

Şekil 2 P21, PTD-aracıyla aktarım geliştirmektedir. **(a)** Hücrelere protein iletiminin verimliliğini geliştiren alanlar tarafından oluşturulan proteinlerin şeması mR ve mR-8R Şekil 1'de açıklanmaktadır. P21-mR, heparin-bağlayıcı EGF'nin (HB-EGF) P21 alanına bir N-terminal füzyonuna sahip mRFP'dir. P21-mR-8R, P21'in N-terminal füzyonuna ve 8R'nin C-terminal füzyonuna sahip mRFP'dir. **(b)** P21'in mR-8R'ye füzyonu, NIH3t3 hücrelerine aktarım önemli ölçüde geliştirmektedir. Standart ortam koşullarında on iki saat boyunca proteinler (20µg/ml) ile tedavi edilen NIH3t3 hücrelerinin floresan mikroskopi görüntüleri. Ölçek çubuğu, 100µm. **(c)** P21-mR-8R insan ve fare embriyonik kök hücrelerine (sırasıyla HUES7 ve CGR-8), insan tarafından indüklenmiş pluripotent kök hücreleri (IPS2) ve fare kardiyomiyosit hücre hattına (HL1) verimli bir şekilde aktarmaktadır. mR-8R'nin akış sitometri analizleri, on iki saat boyunca proteinler mR-8R (20µg/ml) ile tedavi edilen hücre hatları verimsiz bir şekilde aktarmıştır. **(d)** P21-mR-8R başlangıçta hücre membranları ile güçlü bir şekilde etkileşime girmektedir ve kademeli olarak perinükleer olarak aktarmaktadır. Ya 1 saat boyunca P21-mR-8R (20µg/ml) ile tedavi edilen NIH3t3 hücrelerinin floresan (üst) ve konfokal lazer tarama mikroskopi (alt) görüntüleri, 1 saatlik yıkama ve bir ilave 5 saatlik inkübasyon (serumsuz ortamda) veya 6 saatlik işlem. Hücreler, serumsuz ortamda 1 saat boyunca önceden inkübe edilmiştir, serumsuz ortamda istenilen süre boyunca aktarımıştır. Ölçek çubukları 50µm (üst) ve 10µm (alt). **(e)** P21 ve 8R tarafından aracılı edilen aktarım geliştirilmesi, Tripsin proteolizis tarafından etkilenmektedir. 1 saat boyunca proteinler (20µg/ml) ile tedavi edilen ve ilave 5 saat boyunca Tripsin ile 10dk ön-sindiririlmemiş veya olmadan inkübasyon (serumsuz ortamda) yapılan veya proteolitik olmayan hücre çözülme çözeltisi (CDS) ile tedavi yapılan NIH3t3 hücrelerinin akış sitometri analizleri.

Hücreler, serumsuz ortamda 1 saat boyunca önceden inkübe edilmiştir, Tripsin ile tedavi edilmiştir ve 1 saat boyunca serumsuz ortamda aktarılmıştır. **(f)** P21-barındıran proteinlerin hücre yüzey etkileşimi, Tritonx100 işlemi ile bozulmaktadır. 1 saat boyunca proteinler (20µg/ml) ile tedavi edilen ve ilave 5 saat boyunca Tripsin ile PBS veya PBS barındıran hacim cinsinden %0.1 Tritonx100 (Tx100) ile 10dk ön-tedavi olarak veya olmadan inkübasyon (serumsuz ortamda) yapılan NIH3t3 hücrelerinin akış sitometri analizleri. Hücreler, serumsuz ortamda 1 saat boyunca önceden inkübe edilmiştir, PBS veya Tx100'e sahip PBS ile tedavi edilmiştir ve 1 saat boyunca serumsuz ortamda aktarılmıştır. Hata çubuklar s.d. göstermektedir.

10

Şekil 3 P21 Heparine ve hücre yüzeyine (HS-GAG) doğrudan bağlanmaktadır. **(a)** Aktarım sırasında ortamda çözünür Heparin, hücre membran etkileşimini inhibe etmektedir ve P21-barındıran proteinlerin aktarımını inhibe etmektedir. 0 veya 50 µg/ml Heparin barındıran serumsuz ortamda 6 saat boyunca P21-mR-8R (20µg/ml) ile tedavi edilen CGR-8 hücrelerinin floresan mikroskopi görüntüleri. Ölçek çubuğu, 100µm. **(b)** Akış sitometrisi, serumsuz ortamda bir dizi GAG (50µg/ml) ile veya bu olmadan 6 saat boyunca P21-mR-8R (20µg/ml) ile tedavi edilen NIH3t3 hücrelerini analiz etmektedir. CS, Kondroitin sülfattır. Hücreler, serumsuz ortamda 1 saat boyunca önceden inkübe edilmiştir ve GAG'lar ile veya bunlar olmadan serumsuz ortamda 6 saat boyunca aktarılmıştır. **(c-d)** Heparinin yalnızca sekiz dozu, 8R aktivitesini inhibe etmektedir, oysa P21 aktivitesi **(c)** NIH3t3 hücreleri ve **(d)** CGR-8 hücrelerindeki Heparine bağlı olarak dozu engellenmektedir. **(e)** ve **(f)** Hücre yüzeyi Heparan sülfat, verimli P21-aracılığı protein iletimi için gereklidir. FCS barındıran Heparan sülfatlar Heparin, P21 aracılığı aktarımını inhibe etmektedir ancak ayrıca hücre yüzeyi GAG'ları değiştirmektedir ve Heparan sülfat bakımından eksik hücrelerde P21-aktarımları aracılığı etmektedir. %0 veya 20 FCS barındıran serumsuz ortamda 6 saat boyunca P21-mR-8R (20µg/ml) ile tedavi edilen CGR-8 hücrelerinin ve *EXT1*^{-/-} mESC'nin floresan mikroskopi görüntüleri. Ölçek çubuğu, 100 µm. Hata çubuklar s.d. göstermektedir.

15

20

25

30

35

Şekil 4 Cre Rekombinazın GET / HETD-aracılığı nükleer iletimi. **(a)** Cre aktivitesini hücrelerde belirtmek için oluşturulan yapılar şeması /oxP alanları tarafından yandan kuşatılan bir transkripsiyonel DURDURMA bölgesinin cre-aracılığı eksizyonu, eGFP'nin temel ifadesini indüklemektedir. Pr, promotör; βGal, β-galaktosidaz; Neo, Neomisin fosfotransferaz. NIH3t3 LSL-eGFP hücre hattı NIH3t3 hücrelerinin transfeksiyonu ve seçimi ile oluşturulmuştur. **(b)** Tedavi görmemiş NIH3t3 LSP-eGFP hücrelerinde veya

SIN Cre lentivirüs ile aktarılan hücrelerin eGFP ifadesi. Sol taraf, floresan mikroskopisini göstermektedir ve sağ taraf eGFP ifadesinin akış sitometri histogramını göstermektedir. Ölçek çubuğu, 50µm. **(c)** NIH3t3 LSL-eGFP hücrelerinde Cre aktivitesinin test aktarılan şeması Hücreler, 1 saat boyunca Cre proteinleri ile aktarılan analizlerden 2 gün önce yılanmış ve kültürlenmiştir. **(d-e)** P21-mR-Cre-8R verimli bir şekilde aktarılmakta ve DNA'yı birleştirmektedir. **(d)** Floresan mikroskopisi, bir dizi dozajda Cre-ile aktarılan NIH3t3 LSL-eGFP'yi görüntülemektedir. Ölçek çubuğu, 50µm. **(e)** Bir dizi dozajda (0, 1, 10, 100 ve 500µg/ml) mR-Cre, mR-Cre-8R ve P21-mR-Cre-8R ile 1 saat boyunca aktarılan ve yılanmış ve 2 gün boyunca kültürlenmiş NIH3t3 LSL-eGFP hücrelerinin akış sitometri analizleri. Grafik, %rekombinasyonu (başka bir deyişle toplam hücre popülasyonundan eGFP+ve'nin %'si). Hata çubukları s.d. göstermektedir.

Şekil 5 NEO'nun GET / HETD-araçlaması fare embriyonik fibroblastlarda antibiyotik-direnci kolaylaştırılmaktadır **(a)** Fare embriyonik fibroblast (MEF) hücrelerinde aktarılan NEO'nun (Neomisin Fosfotransferaz) antibiyotik-direnç aktivitesi testinin şeması MEF hücreleri (300,000), günlük taze ortamla beslenerek 3 gün boyunca hacim cinsinden %10 FCS ve P21-mR-NEO-8R (0, 10 veya 100µg/ml) barındıran DMEM'de kültürlenmiştir. Sonrasında bir ilave 3 gün boyunca günlük taze ortam ile beslenerek G-418 eklenmiştir. **(b-e)** P21-mR-NEO-8R, antibiyotik-direnç vererek MEF ve NIH3t3 hücrelerini G-418 seçiminden kurtarmaktadır **(b-c)** P21-mR-NEO-8R, G-418 seçimi altında MEF'lerin canlı kültürlerini sürdürmektedir. **(b)** SIN NEO ile tamamlandığında (NEO'yu aşırı ifade etmek için) veya P21-mR-NEO-8R ile aktarıldığında ve G-418 (0, 75, 150 veya 300µg/ml) ile seçildiğinde MEF hücre sayıları **(c)** 150µg/ml dozunda G-418 için MEF hücre sayıları Hata çubukları s.d. göstermektedir. **(d-e)** P21-mR-NEO-8R, G-418 seçilmiş MEF ve NIH3t3 hücrelerinde canlılığı teşvik etmektedir. **(d)** Tripan Mavi boya kullanılarak canlı MEF hücrelerinin yüzdesinin miktar tayini. **(e)** CANLI/ÖLÜ boyama kullanılarak canlı bakımdan değerlendirilen 150µg/ml G-418 ile seçilmiş NIH3t3 hücrelerini floresan mikroskopisi. Ölçek çubuğu, 100 µm. Hata çubukları s.d. göstermektedir.

Şekil 6 NANOG'un GET / HETD-araçlaması fare Embriyonik Kök hücrelerinin kendi kendine yenilenmesini teşvik etmektedir. **(a)** CGR-8 hücrelerinde aktarılan NANOG'un test aktivitesinin şeması Hücreler, üç ardışık gün boyunca (1 geçiş, 1:3 ayrık) P21-mR-NANOG-8R proteinleri ile (0, 1, 10 ve 50µg/ml) ile 1:3 aktarılan ve P21-mR-NANOG-8R ile ancak LIF olmadan (-LIF) büyüme ortamına plakalanmış Hücreler, -LIF ortamında

barındıran P21-mR-NANOG-8R ile günlük beslenmiştir ve 2 geçiş için her 3 günde 1:3 geçirilmiştir (toplamda 3 geçiş -LIF) **(b)** P21-mR-NANOG-8R, bağılı bir şekilde LIF bulunmayan mESC'lerin kendi kendine yenilenmesini kurtarmaktadır P21-mR-NANOG-8R ile tedavi edilmiş ve LIF'den vazgeçildiği CGR-8 hücrelerinin alkali fosfataz (AP) boyaması AP aktivitesi ve koloni morfolojisi, LIF'de veya LIF olmadan kültürlenmiş CGR-8 hücrelerinde muhafaza edilmektedir ancak SIN NANOG ile ilave edilmektedir (NANOG'u aşırı ifade etmek için) veya P21-mR-NANOG-8R ile aktarılmaktadır Ölçek çubuğu, 100 µm. **(c)** P21-mR-NANOG-8R, bağılı bir şekilde LIF dozu bulundurmayan mESC'lerin proliferasyonunu sürdürmektedir. LIF olmadan kültürlenmiş CGR-8 hücrelerinin sayısına yüzdesine karşı geçitte LIF (% -LIF/+LIF) ile kültürlenmiş olanların yüzdesi. LIF-bulunmayan CGR-8 kültürlerinin proliferasyonu, SIN NANOG ile ilave edildiğinde (NANOG'u aşırı ifade etmek için) veya P21-mR-NANOG-8R ile aktarıldığında teşvik edilmektedir. Hata çubukları s.d. göstermektedir. **(d)** LIF-bulunmayan kültürlerde NANOG-bağılı kurtarıcı, daha epiblast-benzeri bir gen ifade profilini üretmektedir. Niceliksel PCR (QPCR) kullanılarak LIF-bulunmayan CGR-8 kültürlerinin ilgili gen ifade analizleri. SIN NANOG ile ilave edilmiş (NANOG'u aşırı ifade etmek için) veya P21-mR-NANOG-8R ile aktarılan kültürler, *Fgf5* ifadesini arttırmış ve *Rex1* ifadesini azaltmış ve *Oct4* ifadesini sürdürmektedir. Hata çubukları s.e. göstermektedir.

Şekil 7 MYOD'un GET / HETD-aracılığı iletimi, İnsan Embriyonik Kök hücrelerinin Miyojenik farklılaşmasını teşvik etmektedir. **(a)** HUES7 hücrelerinde aktarılan MYOD'un farklılaşma aktivitesi testinin şeması HUES7 hücreleri, jelatinlenmiş plastiğe plakalanmış ve hacim cinsinden %10 FCS barındıran DMEM'de kültürlenmiştir. Hücreler, hacim cinsinden %10 FCS ve P21-mR-MYOD-8R (0, 1, 5, 10 veya 50µg/ml) barındıran DMEM ile 7 gün boyunca günlük beslenmiştir. Ortam, sonrasında hacim cinsinden %2 At serumu (HS), İnsan rekombinant İnsülini ve P21-mR-MYOD-8R barındıran DMEM'ye değiştirilmiştir ve 3 gün boyunca günlük beslenmiştir. **(b-f)** P21-mR-MYOD-8R, HUES7 hücrelerinin miyojenik farklılaşmasını çok çekirdeklenmiş Miyotüplere tahrik etmektedir. **(b)** SIN MYOD ile ilave edilen (MYOD'u aşırı ifade etmek için) veya P21-mR-MYOD-8R ile aktarılan miyojenik rejim altında kültürlenmiş HUES7 hücrelerinin ışık mikroskopisi. Uzatılmış kaynaşmış Miyotüpler ve tek miyositler, SIN-MYOD veya yüksek dozlarda P21-mR-MYOD-8R ile üretilmektedir. Ölçek çubuğu, 100 µm. **(c)** İnsan embriyonik kök hücrelerinin MYOD-bağılı miyojenik farklılaşmasını Niceliksel PCR (QPCR) kullanılarak HUES7 kültürlerinin ilgili gen ifade analizleri. SIN MYOD ile ilave edilen (MYOD'u aşırı ifade etmek için) veya P21-mR-MYOD-8R ile aktarılan kültürler,

endojen *MYOD* ifadesini ve iskelet kas-spesifik *ACTA1* ifadesini arttırmıştır. Hata çubukları s.e. göstermektedir. **(d-e)** P21-mR-MYOD-8R farklılaşmış hücreler çok çekirdeklenmektedir. **(d)** PI boyası kullanılarak hücre başına ortalama çekirdek sayısının miktar tayini. Hata çubukları s.d. göstermektedir. **(e)** P21-mR-MYOD-8R (50µg/ml) ile farklılaştırılan ve çekirdek boya DAPI ile boyanan HUES7 hücrelerinin floresan mikroskopi görüntüleri. Ölçek çubuğu, 50µm. **(f)** P21-mR-MYOD-8R farklılaşmış hücreler, MYOGENIN pozitifdir. İmmünofloresan-etiketleme kullanılarak MYOGENIN pozitif hücrelerin yüzdesinin miktar tayini. Hata çubukları s.d. göstermektedir.

Şekil 8 PTD-proteinleri, Pluripotent hücrelerine bağlanmaktadır ancak kötü bir şekilde aktarmaktadır. Hücreler ile inkübasyon sonrasında kalan floresan proteini belirlemek için ortamın florometrisi. mR-8R, serumsuz ortamda 20µg/ml'ye seyreltilmiştir ve 1 saat **(a)** veya 12 saat **(b)** boyunca 6 kuyucuk plakasında konflüent NIH3t3, MEF, CGR-8, HUES7 veya IPS2 ile 1 ml/kuyucuk inkübe edilmiştir. Floresan ön-inkübasyon, birimlerin ve çıkarılan ortamın temel serumsuz ortamının %100'ü olarak tahsis edilmiştir. Hata çubukları s.d. göstermektedir.

Şekil 9 P21, doğrudan Heparine bağlanmaktadır. Heparin-sefaroz boncukları ile inkübasyon sonrasında kalan floresan proteinini belirlemek için florometri. Rekombinant proteinler, serumsuz ortamda (20µg/ml) seyreltilmiştir ve 50µl Heparin-sefaroz ile dönerek 1 saat boyunca 37°C'de 1ml/tüp inkübe edilmiştir. Floresan ön-inkübasyon, birimlerin ve çıkarılan ortamın temel serumsuz ortamının %100'ü olarak tahsis edilmiştir. Hata çubukları s.d. göstermektedir.

Şekil 10 Alan konum protein varyantlarının GET / HETD-aracılığı ile. **(a)** Hücrelere protein iletiminde alan konumunun etkisini test etmek için oluşturulan proteinlerin şematiği. **(b)** Herhangi bir yönelimde P21 ve 8R ile mR'nin füzyonu aktarım büyük ölçüde geliştirmektedir. On iki saat boyunca protein varyantları (20µg/ml) ile inkübe edilen NIH3t3 ve HUES7 hücrelerinin akış sitometri analizleri. Hata çubukları s.d. göstermektedir.

Şekil 11 PTD protein varyantlarının GET / HETD-aracılığı ile. **(a)** Hücrelere protein iletiminde P21'in diğer PTD'ler üzerindeki artan etkisini test etmek için oluşturulan proteinlerin şematiği. 8R is RRRRRRRR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 19), TAT, HIV-1 TAT protein RKKRRQRRR (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 20) olmaktadır. 8K, KKKKKKKK

olmaktadır 8RQ, RQRQRQRQ olmaktadır **(b)** P21 ve herhangi bir PTD'nin mR'ye füzyonu, aktarım ciddi derecede artmaktadır On iki saat boyunca protein varyantları (20µg/ml) ile inkübe edilen NIH3t3 ve HUES7 hücrelerinin akış sitometri analizleri. Hata çubukları s.d. göstermektedir.

5

Şekil 12 PTD-aracılı iletim, serbest Heparin ve Kondroitin sülfat ile inhibe edilmektedir. serumsuz ortamda bir dizi GAG (50µg/ml) ile veya bu olmadan 6 saat boyunca mR-8R (20µg/ml) ile tedavi edilen NIH3t3 hücrelerinin akış sitometri analizleri. CS, Kondroitin sülfat Hücreler, serumsuz ortamda 1 saat boyunca önceden inkübe edilmiştir ve serumsuz ortamda GAG'lar ile veya bunlar olmadan 6 saat boyunca aktarım Hata çubukları s.d. göstermektedir.

10

Şekil 13 GET / HETD-Protein iletimi, GAG-barındır FCS, Heparinaz tedavisi ve rekabetçi çözünebilir Heparin tarafından inhibe edilmektedir. **(a-b)** Heparinaz ile önceden tedavi edilmiş aktarım hücrelerinin akış sitometrisi. **(a)** NIH3t3 hücreleri, farklı miktarlarda Heparinaz III (0, 0.01, 0.1 veya 1 U/ml) ile 1 saat boyunca serumsuz ortamda önceden inkübe edilmiştir ve 12 saat boyunca mR veya P21-mR-8R (serumsuz ortamda 20µg/ml) barındır Heparinaz III ile aktarım **(b)** NIH3t3 hücreleri, farklı miktarlarda Heparinaz III ile 1 saat boyunca serumsuz ortamda önceden inkübe edilmiştir ve Heparinaz III ve farklı miktarlarda FCS (hacim cinsinden %0, 1 veya 10) barındır P21-mR-8R (20µg/ml) ile 12 saat boyunca aktarım **(c)** NIH3T3 hücreleri farklı konsantrasyonlarda FCS veya P21-bağlayıcı malzeme için tüketilmiş FCS'de aktarım NIH3t3 hücrelerinin akış sitometrisi. NIH3t3 hücreleri, 1 saat boyunca serumsuz ortamda önceden inkübe edilmiştir ve farklı miktarlarda FCS (hacim cinsinden 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 veya 20) barındır P21-mR-8R (20µg/ml) ile 6 saat boyunca aktarım **(d)** Çözünür Heparinin eklenmesi ile %10 FCS veya %10 P21 bağlayıcı tüketilmiş FCS'de aktarım NIH3t3 hücrelerinin akış sitometrisi. NIH3t3 hücreleri, 1 saat boyunca serumsuz ortamda önceden inkübe edilmiştir ve FCS'nin bir türünü ve farklı miktarlarda çözünür Heparini (0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5 veya 50 µg/ml) barındır P21-mR-8R (20µg/ml) ile 6 saat boyunca aktarım Hata çubukları s.d. göstermektedir.

15

20

25

30

Şekil 14 GET /HETD-aracılı iletim, HS-GAG sentez inhibitör Sodyum Klorat tarafından inhibe edilmektedir. Akış sitometrisi, serumsuz ortamda Sodyum Klorat (SC, 20mM) ile veya bu olmadan 6 saat boyunca P21-mR-8R (20µg/ml) ile tedavi edilen NIH3t3 hücrelerini analiz etmektedir. Hücreler, serumsuz ortamda 1 saat boyunca SC ile veya bu

35

olmadan önceden inkübe edilmiştir ve serumsuz ortamda 6 saat boyunca SC ile veya bu olmadan aktarılan Hata çubuklar s.d. göstermektedir.

Şekil 15 GET / HETD'leri transjenik sistemlere kıyasla daha yüksek intrasellüler düzeylerde yük iletimini gerçekleştirebilmektedir. **(a)** Farklı dozlarda mR-8R veya P21-mR-8R (serumsuz ortamda 0, 10, 20, 50, 100 veya 200µg/ml) ile 6 saat boyunca aktarılan NIH3t3 hücrelerinden üretilen ekstraktlara kıyasla NIH3t3 mR'den (SIN mR ile aktarılan transjenik NIH3t3 hücreler) üretilen çözünür ekstraktların florometrisi **(b)** Farklı dozlarda mR-8R veya P21-mR-8R (serumsuz ortamda 0, 10, 20, 50, 100 veya 200µg/ml) ile 6 saat boyunca aktarılan NIH3t3 hücrelerinden üretilenlere kıyasla NIH3t3 mR'nin (SIN mR ile aktarılan transjenik NIH3t3 hücreleri) akış sitometrisi. Floresan, tedavi görmemiş NIH3t3 hücrelerine normalleştirilmektedir. Hata çubuklar s.d. göstermektedir.

Şekil 16 GET / HETD-etiketli proteinler, verimli aktarımla ile kültür ortamından hızlı bir şekilde tüketilmektedir. **(a-b)** Hücreler ile inkübasyon sonrasında kalan floresan proteinini belirlemek için ortamın florometrisi. Rekombinant proteinler, serumsuz ortamda 20µg/ml'ye seyreltilmiştir ve 12 saat boyunca 6 kuyucuk plakasında konflüent NIH3t3 ile 1 ml/kuyucuk inkübe edilmiştir. Floresan ön-inkübasyon, birimlerin ve çıkarılan ortamın temel serumsuz ortamın %100'ü olarak tahsis edilmiştir. **(a)** 12 saat içinde kültür ortamından rekombinant proteinlerin HUES7-aracılı depleksiyonu. **(b)** 12 saat içinde kültür ortamından rekombinant proteinlerin NIH3t3-aracılı depleksiyonu **(c)** Farklı zamanlar için rekombinant proteinler (20µg/ml) NIH3t3 hücrelerin inkübe edilmesiyle T1/2 depleksiyonu hesaplanmıştır. Çubuk tablo, açılan sistemde başlangıç konsantrasyonunu yarıya indirmek için rekombinant proteinin tüketilmesi için gerekli süreyi (saat) göstermektedir. Hata çubuklar s.d. göstermektedir.

Şekil 17 HERD-aracılı Cre Rekombinaz çekirdek aktivitesi, vesikül kaçışı ile teşvik edilmektedir ancak makropinositoz veya kolesterol depleksiyonun inhibitörleri ile baskılanmaktadır. NIH3t3: LSL-eGFP hücreleri, serumsuz ortamda (ilaçlar ile veya olmadan) önceden inkübe edilmiştir, serumsuz ortamda (ilaçlar ile veya olmadan) 1 saat boyunca Cre proteinleri (mR-Cre: 100µg/ml veya P21-mR-8R: 10µg/ml) ile aktarılan ve analizlerin öncesinden 12 saat boyunca tam büyüme ortamında (ilaçlar ile veya olmadan) ve bir ilave 36 saat boyunca tam büyüme ortamında kültürlenmiştir. **(a)** Metil-β-siklodekstrin (kolesterolü tüketmek üzere kullanılmaktadır), Cre aktarımları ve

rekombinasyonu inhibe etmektedir. (Methyl-(β -siklodekstrin dozlar 0, 1 2 ve 5 mM olmuştur). **(b)** Nistatin (kolesterolü ayrık tutan bir ilaç), Cre aktarımları ve rekombinasyonu inhibe etmektedir. (Nistatin dozlar 0, 10, 20 ve 50 μ g/ml olmuştur). **(c)** Amilorit (makropinositoz için gerekli Na^+/H^+ değişiminin spesifik bir inhibitörü), Cre aktarımları ve rekombinasyonu inhibe etmektedir. (Amilorit dozlar 0, 1, 5 veya 10mM olmuştur). **(d)** Sitokalsin D (bir F-aktin uzama inhibitörü) Cre aktarımları ve rekombinasyonu inhibe etmektedir. (Sitokalsin D dozlar 0, 1, 5 ve 10 μ M olmuştur) **(e)** Klorokuin, endozomal vesiküllerden Cre serbest bırakılmasını teşvik etmektedir ve rekombinasyonu arttırmaktadır (Klorokuin dozlar 0, 10 ve 100 μ M olmuştur). **(f)** Milimetre miktar başına pikofram, geliştirilmiş cesikül kağıdı ile rekombinasyonu indüklemek için gereklidir. Aktarımları P21-mR-Cre-8R'nin dozu, sonrasında Klorokuin mevcudiyetinde 1 saatlik inkübasyon ile on kat seyreltide (0-100 μ g/ml) değiştirilmiştir. Tüm veriler, maksimal rekombinasyonun %'si olarak gösterilmektedir. Hata çubukları s.d. göstermektedir.

15

Şekil 18 GET / HETD-aracıyla aktarımları, genel sellüler makropinositozu arttırmaktadır 70kDa FITC-Dekstran ile inkübe edilen ve rekombinant proteinler ile aktarılan hücrelerin akış sitometrisi. NIH3t3 hücreleri, 1 saat boyunca serumsuz ortamda önceden inkübe edilmiştir ve 70kDa FITC-Dekstran (nötral) barındıran mR, P21-mR, mR-8R veya P21-mR-8R (serumsuz ortamda 20 μ g/ml) ile 1 saat boyunca aktarımları Hata çubukları s.d. göstermektedir.

20

Şekil 19 Protein olmayan Yüklerin GET'si. **(a)** Biotinlenmiş yüklerin monomerik streptavidin (mSA2) kullanılarak GET'si. **(i)** Biotinlenmiş yükleri bağlamak ve aktarmak üzere tasarlanan mSA2 proteinlerinin şematiği. P21-8R, bir etkileşime girmeyen kontrol olarak, mSA2, bir aktarımları olmayan kontrol ve P21-mSA2-8R test proteini olarak kullanılmaktadır **(ii)** Aktiviteyi test etmek üzere kullanılan bir FITC-konjüge ikincil (2°) antikora (Tavşan anti-fare; Rb α Mu) bağlanan bir biyotinlenmiş birincil (1°) antikorun (Keçi anti-tavşan; GtaRb) antikor (Ab) komplekslerinin şematiği. **(iii)** Ab komplekslerinin GET-iletimi, floresan mikroskopi ile görünür olmuştur (ölçek çubuğu, 50 μ m). P21-mSA2-8R'nin (10 μ g/ml, taban görüntüsü) birlikte inkübasyonu ile Ab kompleksleri, hücrelere verimli bir şekilde iletilmiştir **(iv)** $1^\circ/2^\circ$ Ab komplekslerinin (1 μ g/ml), doğrudan inkübasyon ile veya yalnızca mSA2 ile birlikte inkübe edildiğinde NIH3t3 hücrelerine kötü bir şekilde alınıyor gösteren akış sitometrisi. **(b)** LK15 petidi kullanılarak tasarlanan nükleik asitlerin GET'si **(i)** Nükleik asitlere bağlanmak ve bunları aktarmak üzere

25

30

35

tasarlanan LK15 proteinlerinin şematığı. **(ii)** GET-LK15 kullanılarak insan mezokimal kök hücrelerinin (iHMSC'ler) transfeksiyonu. Başlangıçta plazmit (p)DNA (transfeksiyonda GFP'yi ifade etmek için SIN GFP) için LK15 peptitlerinin bağlanma kapasitesini, modifiye sentetik mesajcıRNA (modRNA) (Miltenyi Biotech; transfeksiyonda GFP'yi ifade etmek için) ve küçük inhibitör (si)RNA'lar (iletimi tespit etmek için FAM florofor ile etiketli) değerlendirdik. Oranlar optimize edildikten sonra P21-LK15-8R ve pDNA (10µg), modRNA (10µg) veya siRNA (1µg) ile iHMSC'leri transfekte ettik ve floresan mikroskopi (ölçek çubuğu, 100µm) ile transfeksiyonu görselleştirdik. **(iii)** Bir ticari standart olarak lipofektamine (LIPO)2000 kılıfı ile akış sitometrisi ile iHMSC'lerin GET-LK15 transfeksiyonunun miktar tayini (siRNA için %transfeksiyon verimliliği veya ilgili floresan). Hata çubukları s.d. göstermektedir **(c)** Manyetik Nanopartiküllerin GET'si. **(i)** Sentezlenmiş P21-8R ve test manyetik nanopartiküllerin (MNP'ler) şematığı. 250nm Nanomag-D dekstran kabuğu/demir oksit cevheri MNP'leri test etik ve P21-8R peptidini yüzey COOH gruplarına konjüge ettik. **(ii)** MNP'ler, serumsuz ortamda (SFM; sol panel) en etkili bir şekilde NIH3t3 hücrelerine alınmaktadır Standart ortam koşullar (%10 FCS) veya SFM'de on iki saat boyunca MNP'ler (50µg/ml) ile tedavi edilen koyu laciverte demir ile doyurulmuş NIH3t3 hücrelerinin akış mikroskopi görüntüleri. P21-8R'nin MNP'lere konjügasyonu, hem %10 FCS hem de SFM koşullarında büyük ölçüde selüller alınmaktadır (dairesel görüntü, tüm kuyucuktur, ölçek çubuğu 100µm).

Şekil 20 İntrasellüler ve ekstrasellüler membrana-bağlı HALO proteinlerinin ligand oto-etiketlenmesi. **(a)** HALO (intraselelüler) ve LAMP2b-HALO (ekstrasellelüler membran-bağlı) transjenik SIN lentivirüs yapılarının şematığı. LAMP2b-HALO'da ifade edilmiş protein, hücre membranından ekstrasellelüler tarafından bağlanan ve sunulan sinyal peptidi (SIG) tarafından hücre membranına lokalize edilmektedir **(b)** İntrasellelüler HALO proteini için transjenik olan NIH3t3 hücreleri (NIH3t3-HALO), yalnızca hücre geçirimli ligandlar tarafından etkili bir şekilde etiketlenmektedir (HALO^{ETİKET} Oregon Green). Membran-bağlı ekstrasellelüler HALO protein (NIH3t3-LAMP2b) için transjenik olan NIH3t3 hücreleri, hem hücre geçirimli hem de hücre geçirimsiz ligandlar (HALO^{ETİKVE} arkexafluor⁴⁸⁸) tarafından etkili bir şekilde etiketlenmektedir. Veri, 15 dakika boyunca ligandda (1µM) inkübe edilen, 3 ortam ile yıkanan ve bağlanmamış ligandları çözmek için bir 15 dakikalık inkübasyona maruz kalan NIH3t3 hücre-hatları akış sitometrisini göstermektedir. Hata çubukları s.d. göstermektedir. Bu, HALO proteinlerinin intraya karşı ekstrasellelüler lokalizasyonunu değerlendirmeye yönelik bir tahlil sağlamaktadır

Şekil 21 GET-HALO proteinlerinin ligand etiketlenmesi, hücre bağlanması ve aktarımını göstermektedir. **(a)** (şekil 1’de mRFP için açıklandığı gibi) oluşturulan HALO proteinlerinin şematiği. **(b)** P21-HALO-8R ve P21-HALO etkili bir şekilde NIH3t3’e bağlanmaktadır ancak bir 1 saatlik inkübasyon ile büyük ölçüde içselleşmemektedir. **(c)** Bağlı P21-HALO-8R, ilave inkübasyon (1sa-5sa) ile NIH3t3 hücrelerine etkili bir şekilde aktarmaktadır. Bağlı P21-HALO, hücrelere etkili bir şekilde girmemektedir ve ilave inkübasyon için hücre membranına bağlı kalmaktadır. Veri, 1 saatlik proteinler (20 µg/ml) ile tedavi gören, sonrasında doğrudan ligand etiketlemesi (1sa) veya ilave 5 saatlik inkübasyon (1sa-5sa) gören NIH3t3 hücrelerinin akış sitometrisini göstermektedir. Hata çubukları s.d. göstermektedir.

Şekil 22 GET-mNektarin (mNekt) proteinlerinin pH-duyarlı hücre bağlanması ve aktarımını göstermektedir. **(a)** (şekil 1’de mRFP için açıklandığı gibi) oluşturulan HALO proteinlerinin şematiği. **(b-c)** GET-mNekt veya GET-mR proteinleri (20µg/ml), 1 sa boyunca NIH3t3 hücrelerine aktarılır (membran bağlama aktivitesini göstermek için), sonrasında protein (1sa-5sa) (aktarım aktivitesini göstermek için) veya 6sa (kesintisiz iletimi göstermek için) olmadan bir ilave 5 sa inkübasyonun takip ettiği 1sa inkübasyon gelmiştir. Akış sitometri, mNekt ve mR GET-proteinlerinin yoğunlukları karşılaştırmak üzere kullanılır. Aktaran mNekt proteinlerinin (mR versiyonlarından farklı olarak) floresan sinyali, endozomal asidifikasyona ve protein yayılımına yeni içselleştirme sonrasında hızlı bir şekilde kaybolmaktadır. Hata çubukları s.d. göstermektedir. **(d-f)** GET-mNekt proteinleri (20µg/ml), aynı rejimler için NIH3t3 hücrelerine aktarılır ancak sitometri öncesinde pH7.5 veya pH5.5’te DMEM’de uygulanır. Membran lokalize mNekt protein floresansı pH5.5 ile ortadan kaldırılmaktadır ancak 1sa’da inkübasyonları P21-mNekt-8R’yi hücrelerin dışında bıraktığını gösteren pH7.5’te muhafaza edilmektedir, membranlara bağlanmamaktadır ve pH-aracılı ayrılardan korunmamaktadır. 1sa-5sa inkübasyonları P21-mNekt-8R lokalizasyonunun değiştirildiğini ve proteinin içselleştirilmesini ve hücre membranı tarafından korunmasını gösteren pH-aracılı ayrılardan korunduğunu göstermektedir. Hata çubukları s.d. göstermektedir.

Şekil 23 GET proteini, başarılı bir yeniden aktarıma olanak sağlamak üzere intrasellüler olarak iletilmelidir **(a)** NIH3t3 hücrelerinde GET proteinlerinin yeniden aktarımına dair etkinin test şeması. Hücreler, 1 saat boyunca taze ortamda önceden inkübe edilmiştir ve P21-mR-8R (20µg/ml) ile 1 saat boyunca aktarılır. Sonrasında hücreler ya floresan

5 bakımdan analiz edilmiştir ya da bir ilave 1 saat boyunca P21-mR-8R (20µg/ml) ile yeniden aktarılmıştır. Bu yeniden aktarım, ya ortada (0sa) ya da akış sitometrisi tarafından floresan analizlerinden önce yeniden aktarım arasında bir 1-6 saatlik inkübasyona sahiptir. Orta yeniden inkübasyon inhibe edilmektedir, oysa aktarımlar arasındaki >1 saatlik inkübasyon, GET proteininin en etkili yeniden aktarımla olanak sağlamaktadır. Hata çubukları s.d. göstermektedir. * p<0.05.

10 **Şekil 24** NEO'nun yalnızca CPP aktarımla kıyasla GET. **(a)** mR-NEO-8R (yalnızca CPP proteini) ve P21-mR-NEO-8R'nin (GET protein) şematiği. **(b)** P21-mR-NEO-8R, G-418 seçimi kapsamından MEF'lerin canlı kültürlerini korumaktadır oysa mR-NEO-8R kötü kurtarma aktivitesine sahiptir. P21-mR-NEO-8R aktivitesi, SIN NEO (NEO'yu aşırı ifade etmek için) ile genetik olarak tamamlanmış hücreler ile karşılaştırılabilir. Veri, G-418'in 150µg/ml dozu için MEF hücre sayılarını göstermektedir. Hata çubukları s.d. göstermektedir.

15 **Şekil 25** NANOG'un yalnızca CP aktarımla kıyasla GET. **(a)** mR-NANOG-8R (yalnızca CPP proteini) ve P21-mR-NANOG-8R'nin (GET protein) şematiği. **(b)** P21-mR-NANOG-8R, bağlı bir şekilde LIF dozunu buldurmeyen mESC'lerin proliferasyonunu sürdürmektedir, oysa mR-NANOG-8R kötü kendi kendini yenileme aktivitesine sahiptir. Veri, LIF olmadan 20 kültürlenmiş CGR-8 hücrelerinin sayısının yüzdesine karşı geçitte LIF (% -LIF/+LIF) ile kültürlenmiş olanların yüzdesini göstermektedir. LIF-bulunmayan CGR-8 kültürlerinin proliferasyonu, SIN NANOG ile ilave edildiğinde (NANOG'u aşırı ifade etmek için) veya P21-mR-NANOG-8R ile aktarıldığında ancak mR-NANOG-8R ile kötü bir şekilde atarldığında teşvik edilmektedir. Hata çubukları s.d. göstermektedir.

25 **Şekil 26** MYOD'un yalnızca CPP aktarımla kıyasla GET. **(a)** mR-MYOD-8R (yalnızca CPP protein) ve P21-mR-MYOD-8R'nin (GET protein) şematiği. **(b)** P21-mR-MYOD-8R, HUES7 hücrelerinin miyojenik farklılaşmasını MYOGENIN pozitif çok çekirdeklenmiş Miyotülere tahrik etmektedir, oysa mR-MYOD-8R kötü miyojenik aktiviteye sahiptir. P21-mR-MYOD-8R aktivitesi, SIN MYOD (MYOD'u aşırı ifade etmek için) ile genetik olarak tamamlanmış 30 hücreler ile karşılaştırılabilir. Veri, immünoetiketleme kullanılarak MYOGENIN pozitif hücrelerin yüzdesinin miktar tayinini göstermektedir. Hata çubukları s.d. göstermektedir.

35 **Şekil 27** GET-mSA2 tarafından aktarılan bir doku-ekstrakte pro-apoptotik proteinin iletimi. **(a)** mSA2'ye sahip sıçir kalbi sito-krom-C (Cyt-C) ve biyotinlenmiş Cyt-C (BIO-

Cyt-C) ve Cyt-C komplekslerinin şematığı. **(b)** NIH3t3'lerin apoptozunu indüklemek için Klorokuin (100 μ M) mevcudiyetinde GET-mSA2 proteinleri ile Cyt-C (bir etkileşime girmeyen kontrol olarak) veya BIO-Cyt-C (10 μ g/ml) birlikte inkübasyonu. Bir 12 saatlik inkübasyon sonrasında tripna mavi ile değerlendirildiği üzere hücre canlılığı yalnızca tamamen etkileşime giren ve aktaran kompleks (Klorokuin ile) aracılığıyla kaybolmuş. Hata çubuklar s.d. göstermektedir **(c)** Klorokuin mevcudiyetinde P21-mSA2-8R ile aktarılan BIO-Cyt-C, ışık mikroskopisi tarafından gösterilen hücre canlılığına tam kayba neden olmuştur. (ölçek çubuğu, 50 μ m).

5
10 **Şekil 28** SpA B alanı kullanılarak Antikorların GET'si. **(a)** IgG antikorlarına bağlanmasında ve bunların aktarması için tasarlanan SpAB ve P21-SpAB-8R proteinlerinin şematığı. Bir FITC-konjüge Tavşan anti-fare IgG'nin (Rb IgG-FITC) iletimini test ettik. **(b)** IgG (1 μ g/ml), doğrudan inkübasyon ile veya SpAB (sol panel) ile birlikte inkübe edildiğinde NIH3t3 hücrelerine kötü bir şekilde alınamaktadır P21-SpAB-8R'nin (10 μ g/ml, sağ panel) birlikte inkübasyonu ile IgG, floresan mikroskopi tarafından görünür hücrelere etkili bir şekilde iletilmiştir (ölçek çubuğu, 50 μ m). **(c)** İletilen hücrelerin akış sitometrisi, 2 derecenin üzerinde büyüklüklerde IgG iletiminde bir artışa neden olmuştur. Hata çubuklar s.d. göstermektedir.

20 **Şekil 29** Yüklere P21 ve CPP ilavesi, >iki derece büyüklüğünde iletimi geliştirmektedir. Sırtan aort düz kas hücreleri (rSMC) ve neonatal kardiyomyositler (rCM'ler) dahil hücre hatları (Şekil 1'de açıklanmaktadır), yük proteinlerinin (mR, mR-Cre, mR-NEO, mR-NANOG veya mR-MYOD) mRFP ile birleştirilmiş varyantları ile veya N-terminal olarak birleştirilmiş P21 ve C-terminal olarak birleştirilmiş 8R (CPP) sekansları (GET proteinleri; P21-mR-8R, P21-mR-Cre-8R, P21-mR-NEO-8R, P21-mR-NANOG-8R veya P21-mR-MYOD-8R) ile aktarılmıştır. Aktarımlar, hücre-hattı standart ortamında 24 saat boyunca 20 μ g/ml proteinde olmuştur. Veri, akış sitometrisi ile değerlendirildiği üzere GET sekanslarının (P21 ve 8R) yüklere eklenmesi ile aktarımların kat artışını göstermektedir. Hata çubuklar s.d. göstermektedir.

30 **Şekil 30** Yüksek seviyede veya sabit GET-aktarımları hücre canlılığına etkilememektedir **(a)** Doğrudan aktarım sonrasında (0sa; sol) ya da 24 saatlik post-aktarım sonrasında (24sa; sağ) 0-200 μ g/ml P21-mR-8R protein ile 12 saat boyunca aktarılan NIH3t3'lerin tripna mavi ekslüzyon ile hücre canlılığı değerlendirilmesi. **(b)** Geçiş yaparak aktarım sonrasında hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi ve 0-200 mg/ μ l P21-mR-8R protein

ile 24 saat boyunca aktarılan NIH3T3'lerin hücre sayımları (c) Geçiş yaparak sabit aktarılan sâasında hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi ve 0-200 µg/ml P21-mR-8R protein (her bir geçişte yenilenen protein) ile aktarılan NIH3T3'lerin hücre sayımları Hücreler günlük olarak geçirilmiştir ve 12 kuyucuk başına 100,000 hücrede yeniden plakalanmıştır. Hata çubukları s.d. göstermektedir.

Şekil 31, GET çoklu klinik olarak ilgili hücre türlerinde biyouyumludur. Hücre hatları 24 saat boyunca 20 veya 200 µg/ml'de P21-mR-8R ile aktarılmıştır ve hücre canlılığı için tripan mavi tarafından değerlendirilmiştir (hücre hatları sıçan aort düz kas hücrelerini (rSMC) ve neonetal kardiyomiyositleri (rCMS'ler)) kapsayan Şekil 1'de açıklananlardır. Canlılık test edilen her iki konsantrasyon için tüm hücrelerde yüksek kalmıştır. Hata çubukları s.d. göstermektedir.

ŞEKİL 32 A: Bir dekstran kaplı nanopartikülün şematik diyagramı B: Ayrı ayrı etiketlenen P21mR ve partiküller ve protein ile etiketlenen 50 µg Nanomag-D nanopartiküllerin koyu lacivert boyanması C: Kırmızı floresan protein ile etiketli Nanomag-D partiküllerin floresansı D: Ön ve post etiketleme çözeltilerinin floresansı

ŞEKİL 33 A: 24 saat boyunca 3T3 hücreleri ile inkübe edilen Nanomag partiküllerinin koyu lacivert boyanması B: 24 saatlik inkübasyon sonrasında hücre başına demir miktarı için demir tahlil sonuçları

ŞEKİL 34 A: Değişken süreler boyunca 3T3 hücrelerinde inkübe edilen nanomag-D partiküllerinin koyu lacivert boyanması B: Demir tahlili nicel sonuçları

ŞEKİL 35 A: 50 µg nanopartiküller, 1 µM P218R ve demir tahlili ile analiz edilen çeşitli miktarlarda heparin ile inkübe edilen 3T3 hücreleri. B: dekstran ile inkübe edilen. C: değişken miktarlarda serum ile inkübe edilen. D Fitc-BSA ile inkübasyon sonrasında 3T3 hücrelerinin floresansı

Şekil 36 P21 mRFP 8R peptidi aracılığıyla hücelere mRFP'nin GET-aracılığıyla geliştirilmiş iletimi. On iki saat boyunca FmRFP, P21 mRFP, mRFP 8R ve P21 mRFP 8R peptitleri (20 µg/ml) ile tedavi edilen NIH3T3 hücrelerinin floresan mikroskopi görüntüleri. Görüntüler, ayrıca, bir kontrol gibi herhangi bir peptit ile tedavi edilmemiş hücreleri kapsamaktadır. Ölçek çubuğu, 100 µm.

Şekil 37 12sa boyunca mRFP konjüge peptitler (20ug/ml) ile tedavi edilen NIH3T3, CGR-8 ve HUES7 hücrelerini gösteren grafik. Akış sitometri analizi, hücrelerin floresan (İlgili floresan birimleri (RFU)) miktarını tayin etmek için kullanılmıştır. Hata çubukları s.d. göstermektedir, n=3.

5

Şekil 38 Bir modifiye edilmemiş CPP (mRFP 8R) üzerinden modifiye edilmiş CPP'ler (HS-GAG bağlama alanı mRFP 8R) tarafından hücrelere mRFP'nin aktarımındaki artış gösteren grafik. NIH3T3, CGR-8 ve HUES7 hücreleri, 12sa boyunca mRFP konjüge peptitler (20ug/ml) ile tedavi edilmiştir. Hata çubukları s.d. göstermektedir, n=3.

10

Şekil 39 GET'yi teşvik etmesi için gösterilen modifiye edilmiş peptitler aracılığıyla hücrelere mRFP'nin etkili iletimi. On iki saat boyunca P21 mRFP 8R, FGF2B mRFP 8R, FGF7B mRFP 8R ve PDGF mRFP 8R peptitleri (20µg/ml) ile tedavi edilen NIH3T3, CGR8 ve HUES-7 hücrelerinin floresan mikroskopi görüntüleri. Ölçek çubuğu, 100 µm.

15

Şekil 40 YO-PRO-1 tahlili kullanılarak P21 LK15 8R'nin pSIN GFP'ye (+/-) yük oranının optimizasyonu. Grafik, P21 LK15 8R pSIN GFP'yi bağladığından dolayı floresan %'sinde bir düşüşü göstermektedir. Hata çubukları s.d. göstermektedir, n=3.

20

Şekil 41 6sa boyunca pSIN GFP ile transfeksiyon sonrasında NIH3T3 hücrelerinin GFP ifadesini gösteren akış sitometri noktasal grafiklerinin örnekleri. Transfeksiyon sonrasında hücreler, bir 48sa'lık zaman-noktasında sabitlenmiştir. Akış sitometri analizi, GFP pozitif hücrelerin % miktarını tayin etmek için kullanılmıştır.

25

Şekil 42 P21 LK15 8R peptidi tarafından NIH3T3 hücrelerine pSIN GFP'nin transfeksiyon optimizasyonu. Hücreler, sırasıyla 2:1'lik P21 LK15 8R'nin pSIN GFP'ye optimum (+/-) yük oranıyla tedavi edilmiştir. Optimizasyon, (A) %10 serum transfeksiyon ortamında (B) serumsuz transfeksiyon ortamında değişken transfeksiyon zamanlarında (3, 6 ve 24sa) gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon sonrasında hücreler, bir 48sa'lık zaman-noktasında sabitlenmiştir. Akış sitometri analizi, GFP pozitif hücrelerin % miktarını tayin etmek için kullanılmıştır. Hata çubukları s.d. göstermektedir, n=3.

30

Şekil 43 Serumsuz koşullarda Lipofektamin2000 tarafından NIH3T3 hücrelerine pSIN GFP'nin transfeksiyonunun optimizasyonunu gösteren grafik. Akış sitometri analizi, GFP

35

pozitif hücrelerin % miktarını tayin etmek için kullanılan Hata çubukları s.d. göstermektedir, n=3.

Giriş

5

İnsan pluripotent kök hücreleri (HPSC'ler), pre-implantasyon embriyonun iç hücre kütesinden elde edilen HESC'leri ve somatik hücrelerin epigenetik yeniden programlanması ile HiPSC'leri içermektedir {Robinton, 2012 #30}. Bu hücrelerin tutumunu ve farklılaşmasını kontrol edebilme, rejeneratif ve kişisel tıpta mevcut çabalar etkili ve verimli bir şekilde temelini oluşturmaktadır. Bir transkripsiyon-faktörü tahrikli transjenik yöntem, kardiyak farklılaşmasını tahrik etmesi ve kasılabilir Kardiyomiyositleri oluşturması için HPSC'lerde doğrudan gen-düzenleyici ağları programlanmasına yönelik olarak açılanmıştır {Dixon, #11}. Genom yeniden programlanması {Takahashi, 2007 #82}, kendi kendini yenileme {Chambers, 2003 #70}, farklılaşma {Dixon, #11}, apoptoz {Mohan, 2013 #83}, proliferasyon {Zhao, 2013 #85} veya migrasyon {Deboux, 2013 #84} gibi hücre tutumlarını kontrol etmeye yönelik birçok transgen-tahrikli yöntem açılanmıştır. Bunların hepsi, genellikle etkisiz olan ve ayrıca genom modifikasyonuna yol açabilen viral vektörler veya geçici DNA transfeksiyonu kullanılarak ekzojen gen ifadesini olarak sağlamak üzere DNA'nın entegrasyonunu kapsamaktadır. RNA transfeksiyonu {Warren, 2010 #4} veya PTD-aracı protein iletimi {Zhou, 2009 #72} gibi yaklaşımlar, dolayısıyla kontrollü stoykiometri ile çekici bir alternatiftir ve genom entegrasyonuna dair hiçbir ihtimal bulunmamaktadır {Gump, 2007 #39}. Mevcut teknolojileri değiştirebilecek ve rejeneratif tıbbi uygulamalar için HPSC'lerin edinmesini geliştirmek üzere kullanılabilen pluripotent kök hücrelerine biyoaktif proteinlerin iletimini sağlamak üzere PTD-teknolojisini geliştirmekti.

25

Sonuçlar

P21'in İzolasyonu, HS-GAG etkileşimi vasıtasıyla PTD fonksiyonunu geliştiren bir HBD

30

Bir odak, endozomal kaçış yerine başlangıçta PTD etkileşimini ve yük proteinlerinin lipid-iki katmanlı yapıları geliştirmiştir. Başlangıçta monomerik kırmızı floresan protein (mRFP1), *Escherichia coli*de kolay bir şekilde ifade edilen ve saflaştırılan bir kendi kendini raporlayan yük olarak kullanılmıştır (Şekil 1a). Araştırma, TAT ve 8R PTD'lerin; mESC'lerin, HESC'lerin HiPSC'lerin hücre membranları ile etkileşime girdiğinin (Şekil 8a) ancak çok kötü yük

35

aktarımla sahip olduğunun belirlenmesine yol açmıştır (kontrol üzerinden ~1-3 kat) (Şekil 1 & 8b). Bu, verimli iletimi gösteren (kontrol üzerinden ~5-50-kat, $p < 0.01$) kapsamlı bir şekilde test edilmiş hücre hatları (NIH3T3, C2C12 ve fare embriyonik fibroblastlar) ile karşılaştırılma olmuştur (Şekil 1). Önceki raporlar, farklı derecelerde sağlamlığa sahip pluripotent kök hücrelerinde PTD-etiketli proteinlerin fonksiyonel iletimini göstermiştir {Do Kwon, 2005 #74; Liang, 2013 #73}. Bu çalışmalarda gerçekleştirilen bu başarı çok minimum miktarlarda gerekli etkili protein, başlangıç popülasyonundan ziyade farklılaşmış türelere protein iletimi veya düşük-seviye fonksiyonelliği açığa çıkarmak için çeşitli miktarlarda proteinin kullanımı yüzünden olduğu vurgulanmıştır

10

Yük proteinlerinin bağlanması ve nihai olarak bu hedef hücre türlerine aktarımın geliştirilmesi amaçlanmaktadır. İntegrinler, CD işaretçileri ve GAG'lar dahil mESC, HESC veya HiPSC membranlarından bulunduğu bilinen moleküller ile etkileşime girdiği raporlanan birkaç kısa peptit tanımlanmıştır. Peptitler, N-terminal olarak mRFP1'e birleştirilmiştir, ifade edilmiştir, afinite saflaştırılmış ve üç hücre türü ile inkübe edilmiştir. 12 varyant tanımlanmış P21 olarak adlandırılan hücrelere ve bunların membranlarına mRFP1-floresan (mR) lokalizasyonunu net bir şekilde arttıran olan birini vermiştir (KRKKKGKGLGKKRD-PCLRKYK (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1)) (Şekil 2). Şaşırtıcı bir şekilde bu peptit, endozomal lokalizasyonun göstergesi olan punktat intrasellüler floresan ile kanıtlanmasına göre aktarım aktivitesi göstermiştir (Şekil 2b,c). P21, sitokinlerin EGF familyasına ait olan HB-EGF'den elde edilmiştir. HB-EGF, heparine güçlü bir afinite göstermektedir ve EGF ve TGF- α ile aynı şekilde bağlanmaktadır {Sakuma, 1997 #76}. Hücre yüzeyi HS-GAG ile HB-EGF'nin etkileşimi, EGFR'ye optimal bağlanma için ve vasküler düz kas hücrelerine doğru büyümesini/göçümü kolaylaştırması için gereklidir {Higashiyama, 1993#90}. Sentetik peptitler ve heparin kullanan analizler ile bağlantı olarak rekombinant HB-EGF'nin mutajenezi ve proteaz sindirimi, çözünebilir HB-EGF'nin amino-terminal bölgesinde P21 sekansını, heparine bağlanması bakımından sorumlu olduğu, böylelikle tipik bir HBD olarak düşünüldüğünü açıklamıştır {Thompson, 1994 #77}. Ek olarak P21, ayrıca hücre yüzeyi HS-GAG ile etkileşime girmektedir ancak HB-EGF'deki diğer sekanslar tarafından aracılık edilen EGFR ile girmemektedir. Bundan dolayı hem fare hem de insan pluripotent kök hücrelerine bir floresan raporunun ilişkisini geliştiren kısa bir 21-kalıntı peptit, P21 izole edilmiştir.

35

P21'in Heparin'e doğrudan bağlanması onaylamak için Heparin-sefaroz boncukları kullanılarak bir bağlanma deneyi geliştirilmiştir (Şekil 9). P21-etiketli mR, etiketsiz mR'den farklı olarak Heparin-sefaroz tarafından etkili bir şekilde ayrıştırılmıştır (%96.2 \pm 5.3;

$p < 0.01$). Bu, bağı bir doz şeklinde serbest Heparin ile ortak olarak inkübe edilerek tersine çevrilebilmektedir. Bir HBD'nin izole edilmesi ilginçtir; HS-GAG'lar, uzun zamandır PTD-aracı aktarın prosesi için önemli olarak düşünülmüştür. Ancak aktarımda HS-GAG'ın tam rolü, HS-GAG'ın yalnızca PTD'lere bağlanarak ve bunların membranda yoğunlaşarak aktarımda önemli olmasının dayanan en son hipotez ile bir çatışma noktası vardır; bu, lipit-çift katmanlı translokasyonu geliştirmektedir ancak bunun oluşumu için gerekli değildir {Gump, 2010 #2}.

Negatif bir şekilde yüklü sülfatlanmış proteoglikanlar ve glikoproteinler, tüm memeli hücrelerde bulunmaktadır. Ancak bunlar farklı bir şekilde modifiye edilmektedir ve spesifik varyantlar ubikuitözdür veya tüm spesifik hücre türlerinde bulunmaktadır {Lindahl, 1998 #56}. GPI-bağı proteoglikanlar ve glikoproteinler, PTD'lerin belirli proteoglikanlar için aviditesini arttırabileceğini veya belki de PTD'lerin makroprinositozu harekete geçiren kolesterol membran yapıtaşlarına doğrudan bağlanarak önererek lipit yığınlarında bulunmaktadır. P21-peptidin, belirli HS-GAG formlarına spesifik aviditeye sahip olabileceği ve PTD'lerde aynı motifleri tanımlayabileceği de mümkündür.

Hücre membranlarındaki P21-aracı bağlanması bir molekülde her iki kısım birleştirilerek mR'nin PTD-aracı aktarın geliştirebilip geliştirilemeyeceğini belirlemek üzere test edilmiştir (Şekil 2a). P21-mR-8R kopyalanmış ifade edilmiştir ve saflaştırılmış ve bunun aktivitesi yalnızca P21 (P21-mR olarak adlandırılmaktadır) veya yalnızca 8R (mR-8R) proteinleri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 2a). Veriler, hem P21- hem de 8R- kısımların dahil edilmesinin, test edilen tüm hücre hatlarındaki floransın önemli ölçüde geliştirmek için aynı proteinde sinerji oluşturduğunu göstermiştir. (Şekil 2b). Önemli bir şekilde fare ve insan pluripotent kök hücreleri (CGR-8, HUES7 ve IPS2) ve kardiyomiyositler (HL1) yalnızca, P21-etiketinin dahil edilmesiyle etkili bir şekilde kalı aktarmıştır ve her iki etiket, diğer hücre hatlarına benzer yüksek seviyelerde aktarın üretmek üzere sinerji oluşturmuştur (Şekil 2c). Bu motifler, ayrıca mRFP'nin N- ve C- terminalinde iki olarak yerleştirilmiştir (birinci olarak P21 veya 8R; P21-8R-mR, 8R-P21-mR veya mR-P21-8R, mR-8R-P21) veya P21-mR-8R için görüldüğü üzere benzer sinerji ve hücre aktarın tutumu (Şekil 10) gösteren tüm varyantlar ile bunların terminaleri (başka bir deyişle 8R-mR-P21) değiştirilmiştir. Ayrıca 8R, alternatif iyi karakterize edilmiş PTD'ler (TAT, 8K and 8RQ; {El-Andaloussi, 2005 #36}) için değiş tokuş edilmiştir ve bunların ayrıca P21 ile sinerji oluşturduğunu göstermiştir (Şekil 11).

Hücreleri, farklı zamanlamalar boyunca protein ile inkübe ederek ve bir post-kültür periyodu ekleyerek hücre yüzeyinde üretilen floresan sinyali ile içselleştirilmiş olan arasındaki fark etkili

bir şekilde ayrı edilebilmektedir (Şekil 2d). Hücreler, 1sa olarak adlandırılan kısa inkübasyon süreleri (1 saat) ile floresan membran lokalizasyonunu göstermiştir. Bu kısa inkübasyon ve sonraki bir kültür periyodu (5 saatlik post-kültür ile birlikte 1 saat) ile, 1sa-5sa olarak adlandırılmaktadır aktarıcı gösteren özel intrasellüler floresan yakınında gözlemledik. 6sa olarak adlandırılan daha uzun inkübasyon süreleri (6 saat) kullanılarak hücreler, endozomal-
5 aracılı aktarıcı göstergesi olarak güçlü punktat peri-çekirdek floresan göstermiştir. Bu sinerjistik etki mekanizması GET (GAG-bağlayıcı geliştirilmiş aktarıcı) veya Heparan-sülfat geliştirilmiş aktarıcı alan (HETD)-aracılı getirme olarak açıklanmaktadır

10 **GET, tripsine-duyarlı ve deterjan-çözünbilir hücre membran moleküllerini gerektirmektedir**

GET etkileşiminin ve hücreler tarafından alınan mekanizmasını değerlendirmek için önceden
PTD'yi değerlendirmek için kullanılan bir dizi deney gerçekleştirilmiştir. Hem başlangıç hücre
15 ilişkisi hem de HETD'ler tarafından aktarıcı için hangi hücre membran bileşenlerinin gerektiğini değerlendirmek için benzer aktarıcı, aktarıcı öncesinde hücre membranında enzimatik deplesyonu ile elde edilip edilmeyeceği belirlenmiştir. Hücreler, proteolitik enzim tripsin ile önceden işlenmiştir ve 1sa-5sa rejim protokolü kullanılarak hücre aktarıcı testi etmiştir. Hücre-yüzeyi proteinlerinin enzimatik çıkarılması GET / HETD-aracılı aktarıcı
20 muhtemel olarak inhibe etmiştir (~8.4-kat; $p < 0.05$) (Şekil 2e). Buna karşın iyonik hücre çözülme çözeltisi (CDS) kullanılarak kültür plastiğinden hücrelerin enzimatik olmayan serbest bırakılması HETD-aracılı aktarıcı değiştirmemiştir.

Sonrasında deterjan-çözünbilir hücre-membran moleküllerinin deplesyonunun aktarıcı
25 üzerinde benzer bir etkiye sahip olup olmadığı test edilmiştir. Hücreler, hacim cinsinden %0.1 Triton X-100'de önceden inkübe edilmiştir ve 1sa-5sa protokolü kullanılarak canlı olarak bakılmadan bir düşüş olmadan GET'de (Şekil 2f) bir düşüş (~2.2-kat; $p < 0.05$) gözlemlenmiştir. Bundan dolayı hücre membranında hem proteinin hem de deterjan çözünür kısımları GET / HETD-aktarıcıda P21- ve PTD-sinerjisi vasıtasıyla protein aktarıcı
30 verimliliğini etkilemektedir.

GET, hücre membran HS-GAG'ın mevcudiyetini gerektirmektedir

P21, negatif bir şekilde yüklü HS-GAG'lara katyonik doğal bağlar yüzünden bir HBD ve
35 PTD'lerdir. Ayrıca HS-GAG'ın enzimatik deplesyonu veya serbest GAG'lar ile rekabeti

vasıtasıyla GET / HETD-aracılı aktarımın mekanizmasını onaylaması amaçlanmıştır (Şekil 3). Heparin, HETD proteinlerinin hücre-yüzey bağlanması önlemiştir ve aktarım güçlü bir şekilde inhibe etmiştir (99.8 ± 2.1 ; $p < 0.001$) (Fig 3a, b). Kondroitin sülfat (CS) A, B veya C, aktivite üzerinde küçük bir etkiye sahip olmuştur (Şekil 3b). CS-B ve -C, PTD-proteinlerinin bağlanması etkilediği önceden gösterilmiştir {Wadia, 2004 #25}. Heparin, CS-B ve -C'nin yalnızca PTD protein aktarımını inhibe edilmesinde önemli aktivitelere sahip olduğu onaylanmıştır (8.1-, 2.4- ve 4.1-kat, sırasıyla; $p < 0.05$) ancak yalnızca Heparin HETD'ler tarafından aracılanan GET / aktarımını etkilemiştir (Şekil 3b ve Şekil 12). P21-etiketli proteinler, NIH3t3 ve CGR-8 hücrelerinde Heparinin konsantrasyonları artırılarak aktarım bir doza bağlı inhibisyonunu sergilemektedir (sırasıyla Şekil 3c & d). Yalnızca 8R proteini, en yüksek dozlarda rekabetçi Heparin ile inhibe edilmektedir. HETD proteini kapsamında (P21-mR-8R), dolayısıyla hücre membranı HS-GAG'lar için P21'in aviditesinin PTD bağlanması için CS-GAG'larına baskın gelme ihtimali bulunmaktadır. Bundan dolayı Heparin ve HS-GAG'ların PTD aktivitesini geliştirmek için P21'in önemli hedefi olduğu sonucu çıkarılabilmektedir.

P21-aktivitesi hücrelerine yönelik hücre-membran HS-GAG'nin gerekliliğini daha da iyi anlamak için HS-liyaz enzimi, heparinaz III ile tedavi edilmiştir ve 6sa protokol kullanılarak hücre aktarımını test etmiştir (Şekil 13). Hücre-yüzeyi HS-GAG'lerin enzimatik çıkarılması GET / HETD-aracılı aktarımını muhtemel olarak inhibe etmiştir (1U/ml 97.2 ± 3.4 ; $p < 0.001$). Buna karşın sialik asit GAG'ları (SA-GAG'lar) tüketen nöroaminidaz tedavisi, GET / HETD-aracılı alımı değiştirmemiştir. Analiz, ayrıca, aktarım üzerindeki serumun etkisini belirlemek için uzatılmıştır (Şekil 13b). Ayrıca serumun PTD-aracılı iletim üzerindeki bir negatif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir {Kaplan, 2005 #43}. Serum, sefaroze üzerinde afinite saflaştırılmış P21 peptidi ile inkübe edilmesiyle bunun HETD-aracılı rekombinasyon üzerindeki inhibitör etkisi çıkarılabilmektedir (hacim cinsinden %10, deplezyon ile ~ 7.3 -kat artış; $p < 0.01$) (Şekil 13c). Bu, serumun, P21-membran bağlama için rekabetçi moleküller olarak hareket eden GAG'ları barındırıyor olduğunu göstermektedir. Bunlar, P21-bağlı sefaroze kullanılarak ön-deplezyon ile çıkarılabilmektedir. Bu inhibitör aktivitesi, çözünebilir Heparinin bu hipotezi daha da güçlendiren tükenmiş seruma eklenmesi ile yeniden oluşturulabilmektedir (Şekil 13d). Enzimatik deplezyona ek olarak HS-GAG gerekliliği, HETD-aracılı protein iletimini potansiyel olarak engelleyen HS sentezinin bir potent inhibitörü olan Sodyum Klorat ile hücrelerin tedavi edilmesiyle onaylanmıştır (~ 7.6 -kat; $p < 0.05$) (Şekil 14). Bundan dolayı HS-GAG deplezyonunu spesifik olarak protein aktarımını verimliliğini etkilediği ve bundan dolayı endojen HS-GAG'ların GET / HETD-aracılı protein iletimi için önemli moleküller olduğu

gösterilmiştir. Ayrıca endojen HS-GAG'nin yüksek derecede bu prosese inhibitör edici olduğu gösterilmiştir.

5 HS-GAG'lar, EXT1/EXT2 enzimlerin bir heteromerik kompleksi ile polimerize edilen, glüküronik asidin (GlcUA) ve N-asetilglükozaminin (GlcNAc) disakkaritlerin yinelenmesine dair temelden oluşan bir kompleks şeker yapıdadır {Lawrence, 2008 #51}. GET / HETD-araçları aktarımları üzerindeki HS-GAG'ların rolünü daha da araştırmak için *EXT1*^{-/-} mESC'ler kullanılmıştır bunlar sentezlenmiş hücre membranı HS-GAG endojen olarak bulunmamaktadır {Lin, 2000 #78}.
10 Geleneksel mESC ortamında (hacim cinsinden %20 oranında FCS içeren) kültürlendiğinde *EXT1*^{-/-} mESC'ye karşı yabancı-tip CGR-8 mESC'lerde önemli ölçüde daha düşük aktarım gözlemlenmiştir (~6.8-kat; $p < 0.01$) (Şekil 3e,f). Bu, ayrıca, hücreler FCS'deki serbest GAG'lardan interferans yüzünden muhtemel olacak serumsuz koşullarda kültürlendiğinde görünür olmuştur (~5.6-kat; $p < 0.01$). Aktarım/GET, *EXT1*^{-/-} hücrelerinde bulunmamıştır (mR
15 kontrol seviyeleri üzerinden ~9.7-kat) ve de P21-bağlı olan proteinlerin başlangıçtaki bağlanması olmamıştır. Bunun, eksik *EXT1*^{-/-} hücre membranına eksojen çözünür serum-GAG'ların dahil edilmesi yüzünden olabileceği hipotezi ortaya atılmıştır. Bu, sonraki Heparinaz III tedavisinin bu hücrelerde bağlanmayacağı ve aktarımını inhibe ettiğinden dolayı muhtemeldir.

20 **GET, Lentiviral trasjenezden ziyade daha yüksek intrasellüler protein seviyelerini üretmektedir**

PTD-araçları aktarımları, önemli ölçüde klinik çalışmalar için biyolojik olarak aktif yüklerin taşınması olarak sağlayacak şekilde sınırlanmıştır. Bunlar, artan
25 kanser terapilerinin deneylerini {Gump, 2007 #39}, siRNA'lar {Meade, 2007 #37} ve *in vivo* görüntüleme teknolojilerini {Bullock, 2006 #79} kapsamaktadır. Genomik modifikasyondan kaçınmanın faydaları yanısıra PTD-araçları aktarım gen-terapi yaklaşımlarına yönelik tercih edilen olduğu takdirde yüksek seviyelerde molekül iletimini gerçekleştirmelidir, kısa süreli çevrelerin üzerinden protein seviyelerinin kontrolüne değiştirilebilir olmalıdır ve ayrıca
30 hücre-türü spesifik iletme olarak sağlamalıdır. PTD- veya GET / HETD iletimi ile hücrelerde gerçekleştirilen seviyeler, etkili lentiviral aktarım {Dick, 2011 #10} ve mRFP1'in eksojen ifadesi (stabil EF1 α -promotör tahriki ile) ile gerçekleştirilenler ile karşılaştırılmıştır (Şekil 15). Bu çözünebilir proteinin gerçekleştirilmesi, aktarılan hücrelerden çıkarılmıştır ve florometri (Şekil 15a) ile miktarlar ölçülmüştür veya akış sitometri kullanılmıştır (Şekil 15b). 6 saatlik
35 inkübasyonlar kullanılarak mR-8R seviyeleri, en yüksek test edilen dozlarda (200 μ g/ml) bile

viral transjenez ile gerçekleştirilene kıyasla daha az birkaç sefer (~3-kat; $p<0.05$) olmuştur. Ancak aynı koşullar altındaki P21-mR-8R seviyeleri, transjenik hücrelere kıyasla ~16-kat daha yüksek ($p<0.001$) olmuştur. Önemli bir şekilde önemli bir oranı inkübe edilmiş P21-mR-8R proteinin miktarı çözünebilir intrasellüler protein olarak geri kazanılmıştır (kullanılan ~46±3.5µg/200µg; geri kazanım %~23±1.7). Bu koşullar altında aktarılan hücrelerin, normal şekilde altıda renk bakımından klinik olarak görüldüğünün belirtilmesi önemlidir, böylelikle hücrelerde HETD-etiketli / GET proteinlerinin büyük miktarlarında etkili zenginleştirilmesini gösterilmektedir.

10 Bu proteinlerin hücrelerde konsantre edildiği hızlı inkübasyon periyodu üzerinden ortamda floresan deplesyonunun ölçülmesiyle araştırılmıştır (Şekil 16). Proteinler seyreltilmiştir (20µg/ml) ve serumsuz koşullarda 12 saat boyunca hücreler ile inkübe edilmiştir. 8R-etiketli proteinler, NIH3T3'te %~12 ve HUES7 inkübasyonlarda %~3.5 ile tüketilmiştir. Bu, tam olarak, HUES7 hücrelerine kötü bir şekilde aktarılan 8R-proteinleri ile ancak NIH3T3 hücrelerinden orta seviyelerde aktif sitometrisini yansıtmaktadır (Şekil 2). P21-etiketli proteinler, her iki hücre türünde büyük ölçüde tüketilmiştir (sırasıyla NIH3T3 ve HUES7 hücrelerinde %~37 and ~25; $p<0.05$), burada HETD-proteinleri, ortamdan yüksek seviyelere tüketilmiştir ve proteinin büyük çoğunluğu çıkarılmıştır (sırasıyla NIH3T3 ve HUES7 hücrelerinde %~72 ve ~66; $p<0.01$).

20 Floresan ($T_{1/2}$) yarım ömrünün tüketmesi için gerekli süre belirlenmiştir, burada P21-mR-8R yalnızca ~9.4 saat gerektirmektedir, buna karşın mR-8R ~62 saat gerektirmektedir ve 7 günden sonra bir yarım deplesyonu asla gerçekleştirilmeyen etiketsiz protein bulunmaktadır (Şekil 16). Bu veriler, eksojen GET-protein/HETD-proteininin hücrelere hızlı ve etkili bir zenginleştirilmesini kanıtlayan stometrik veri ile uyumludur. Bundan dolayı bu önemli bir protein konsantrasyonunun nispeten kısa bir inkübasyon periyodu (6 saat) içerisinde hücrelerde gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir. Bir günden daha az bir sürede ekstrasellüler proteinin çoğunluğu GET iletimi kullanılarak etkili bir şekilde içselleştirilmiştir. Bu sistem, stoikiyometrinin tam düzenlenmesine bağlı olacaktır, oysa gen-terapi yaklaşımlarında stokastik transgen ifadesi varyasyonundan ve entegre vektörlerin susturulmasından kaçınılmaktadır.

GET, Cre-aracılı genom modifikasyonunu geliştirmektedir

35 HETD'lerin HS-GAG'lar vasıtasıyla hücre membranlarına hızlı bir şekilde bağlanıp etkili bir

şekilde hücrelere aktarıldığı belirlenmiştir ancak yine de aynı modunun PTD'ler için olduğu gibi makropinositoz vasıtasıyla olup olmadığı onaylanmıştır. Ayrıca bu proteinin bir oran endozomlar kaçmasını ve başarılı bir şekilde iletilmiş olduğunu düşünülmesi değerlendirilmemiştir. Önceki çalışmalar, Cre rekombinazın başarılı nükleer aktivitesi değerlendirilerek floresan etiketli proteinlerin (örneğin membran, vesikül veya fonksiyonel sitozolik/nükleer proteinini ayırt edemeyenler gibi) doğrudan ölçümü ile ilişkili sorunları önlemiştir {Gump, 2010 #2}. Bu sistem, canlı NIH3T3 fare fibroblast hücrelerde (NIH3T3: LSL-eGFP hücreler) bir loxP-STOP-loxP (LSL) geliştirilmiş yeşil floresan protein (eGFP) raporör geninin bir selüller aynı göstergesi olarak ölçülmesi için kullanılmıştır (Şekil 4a). Bu sistem, yeşil floresanın aktivasyonu hücreye girmesi için eksojen Cre proteinini gerektirdiğinden, nükleer-translokasyona maruz kaldığından ve transgenin LSL fragmentini eksize ettiğinden dolayı kesindir. Bu, canlı hücrelerde oluşmalıdır ve eGFP'nin sonraki ifadesi için toksik değildir. Ancak bu proses, eGFP'yi aktifleştirmek için iletilecek yalnızca bir fonksiyonel Cre rekombinaz molekülünü gerektirmektedir bu yüzden iletilen yükün tam miktarını belirlenmesine olanak sağlamamaktadır. Bu meselenin üstesinden gelmek için Cre proteinleri, kısa bir maruziyet süresi (1 saat) boyunca kısa sürelerle iletmiştir ve 48 saat sonrasında yeşil floresan aktifleştirmek için gerekli minimum doz (Şekil 4c) belirlenmiştir.

NIH3T3'ün aktarıldığı Cre'yi transjenik olarak aşırı ifade etmek için SIN Cre lentivirüslerine sahip LSL-eGFP hücreler, bu sistemin kullanıldığı onaylayan tüm hücrelerde eGFP-ifadesinin tam (%92±6; $p<0.001$) aktivasyonunu yaklaşımsızca yol açmıştır (Şekil 4b). Floresan sistemin faydaları ve Cre-rekombinaz proteininin iletilmiş floresan-versiyonları Cre cDNA'sının N-terminaline kopyalanan mRFP1 ile proteinlerin saflaştırılmasıyla muhafaza edilmiştir. NIH3T3'ün işlemi: MR-Cre (Cre'ye birleştirilmiş mRFP) sahip LSL-eGFP hücreleri, en yüksek dozlarda (500µg/ml) rekombinasyona ve eGFP aktivasyonuna (%22.1±6.7; $p<0.05$) neden olmuştur (Şekil 4d). eGFP aktivasyonu, 4°C'de inhibe edilmiştir ve serum-konsantrasyona bağlı şekilde negatif olarak etkilenmiştir. mR-Cre-8R, 8R PTD'nin Cre'nin fonksiyonel iletimini geliştirdiğini göstermiştir (~22-kat; $p<0.01$).

Bağlanma ve içselleştirmeyi onaylayan rekombinasyonu (%4.3±2.5; $p<0.05$) ortaya çıkarmak için düşük bir dozda (1µg/ml) hücreler ile bir dakika kadar kısa inkübasyon olarak gerekli olan GET-proteini / HETD-proteini, P21-mR-Cre-8R, etkili ve hızlı bir prosesidir. Orta bir doz (10µg/ml) için GET / HETD-aktarıldığı yalnızca PTD seviyelerinin yukarılarında bir fonksiyonel iletimi (~15-kat ($p<0.01$)) gerçekleştirmiştir ve tüm NIH3T3: LSL-eGFP hücrelerini tam olarak yeniden birleştirmiştir (Şekil 4d,e). Önemli bir şekilde bu aktivite, mR-Cre'den ($p<0.001$)

~340-kat daha iyidir. Heparinaz III, serbest-heparin ve serumsuz deneyler, Cre rekombinasyon sistemi kullanılarak yenilenmiştir. Heparinaz III ön-tedavisinin, rekombinasyonu bazal-seviyelere azalttığı ve ortam serumunun heparinaz tarafından tüketilen hücre membran GAG'lerinin yenilenmesinde bir rol oynadığı onaylanmıştır. Tüm bu genel veriler, floresan iletim sonuçları ile iyi bir şekilde ilişkilidir ve protein yükünün fonksiyonel aktarımında önemli artışları gerçekleştirmek için P21 ve PTD- kısımları arasında bir sinerji göstermektedir.

GET proteini, lipit yığılma makropinositozlar tarafından hücrelere girmektedir

10 Önceden PTD-aracı içselleştirmenin diğer endositotik yollardan ziyade makropinositoz vasıtasıyla olduğu gösterilmiştir {Wadia, 2004 #25}. Sonrasında GET-proteinleri / HETD-proteinlerinin selüler alımı, Cre tahlil sistemi kullanılarak spesifik bir endositotik yol vasıtasıyla oluşup oluşmadığı belirlenmiştir. Hücre plazma membranından kolesterolün 15 çıkarılması, kaveola ve makropinositoz dahil birkaç lipit yığılma aracılı endositotik yolları bozmaktadır {Anderson, 1998 #29; Nichols, 2001 #30; Liu, 2002 #28}. NIH3t3: Metil-β-silodekstrin ve nistatin ile tedavi edilmiş LSL-eGFP hücreleri, selüler kolesterolü tüketmek veya ayrı tutmak üzere kullanılmıştır, sonrasında HETD-etiketli proteinleri aktarmıştır. Lipit yığılma hem metil-β-siklodekstrini (Şekil 17a) hem de nistatini (Şekil 17b) tahribi, 20 fonksiyonel iletimin bir doza bağlı inhibisyonuna neden olmuştur. Bu veriler, GET / HETD-aracı aktarımını spesifik olarak lipit yığılma aracılı endositleri gerektirdiğini göstermektedir.

Makropinositoz, makropinosomlar olarak adlandırılan vesiküllere giren aktin membran çöküntülerini gerektiren endositozun bir hizi, lipit rafine bağlı ve reseptör-bağlı formudur 25 {Nichols, 2001 #30; Liu, 2002 #28; Conner, 2003 #22}. Makropinositozun aslında HETD-aracı aktarımını endositotik mekanizması olduğunu onaylamak için hücreler, makropinositoz-inhibe eden bileşikler ile önceden tedavi edilmiştir (Şekil 11a,b). Amilorit, makropinositoz için gerekli Na⁺/H⁺ değişiminin spesifik bir inhibitörüdür {West, 1989 #31}. Sitoklasin D, makropinosom-bağlı membran çöküntülerini için gerekli olan F-aktin uzantısını bir inhibitörüdür 30 {Sampath, 1991 #32}. Amilorit ve Sitoklasin D, HETD-proteinlerinin hücre bağlanması bozmamıştır ancak hücrelere fonksiyonel aktarımını bir doza bağlı azaltmaya neden olmuştur (selüler Şekil 17c ve 17d). Bu veriler, P21'in kargo molekülleri tarafından içselleştirilmesi için PTD tarafından kullanılan makropinositotik yolu geliştirmektedir.

GET-iletimi, genel makropinositozu teşvik etmektedir

Makropinositozun indüksiyonu üzerinde GET-bağlanmasında / HETD-bağlanmasında etkileri araştırılmıştır. PTD-aracılı olarak, önceden, genel seviyede makropinositozda bir artış ile diğer proteinlerin alınmasını teşvik ettiği gösterilmiştir {Wadia, 2004 #25}. Hücreler, GET / HETD protein, P21-mR-8R ile kombinasyon halinde bir floresan akışkan-fazlı makropinositotik yapıya FITC-etiketli 70kDa nötr dekstran ile inkübe edilmiştir. Diğer çalışmalar {Oliver, 1984 #24; Araki, 1996 #23; Wadia, 2004 #25}, nötr dekstranları amilorit-duyarlı makropinositoz tarafından alındığını göstermiştir. P21-mR-8R, düzenli-durum kontrol seviyelerinde akışkan-faz dekstran alınmada önemli bir doza bağlı olarak artışı indüklemiştir. Bu makropinositozu uyararak için PTD-etiketliye karşı GET / HETD aktivitesi karşılaştırılmıştır. P21-mR-8R, P21 vasıtasıyla HS-GAG ile birleşmenin ve sonrasında bunun PTD-aracılı olarak üzerindeki etkisinin makropinositotik alınmayı uyardığını gösteren aynı konsantrasyonda mR-8R ile gerçekleştirilen uyarı üzerinden FITC-dekstran alınma 2.5-kat ($p < 0.05$) geliştirmiştir.

15 **Önemli miktarlarda GET-iletmiş protein, Klorokuin ile etkili bir şekilde serbest bırakılabilen Endozomlarda kapsanmaktadır**

PTD-iletmiş moleküllerin çoğunluğu, bu vesiküllerden serbest bırakılma etkisi olduğunu gösteren inkübasyondan sonra bile makropinosomlarda kapsanmış kalmaktadır. İyi bir şekilde ayarlanmış ve derecelendirilmiş miktarlarda iletim kontrol edildiği takdirde, içselleştirilmiş proteinin çoğunluğu fonksiyonel olarak düşünülebilirse faydalı olacaktır. Hücreler, bunları asidifikasyonunu önleyerek endozomları tahrip eden bir iyon-yaşayan ATPaz olan klorokuin ile tedavi edilmiştir {Seglen, 1979 #33} (Şekil 17e). Benzer dozları, PTD-iletmiş proteinlerin fonksiyonel iletimini büyük ölçüde geliştirdiği gösterilmiştir {Wadia, 2004 #25}. Klorokuinin alt-sitotoksik dozları ($100 \mu\text{M}$), bir alt-eşik değer dozda ($0.1 \mu\text{g/ml}$) fonksiyonel HETD-etiketli / GET protein iletiminde önemli bir artışa (95.3 ± 4.8 -kat; $p < 0.001$) neden olmuştur, bu da bunun, GET/HETD medikal uygulaması için çözünmesi önemli bir mesele olduğunu göstermektedir. Yine de GET-iletim / HETD-iletim sistemi, klorokuin tedavi ile $> 10 \text{pg/ml}$ 'lik konsantrasyon (1 saat) inkübasyonları ile önemli ve ölçülebilir seviyelerde rekombinasyonu (4.8 ± 2.9 ; $p < 0.05$) gerçekleştireceğimiz kadar etkili olmuştur (Şekil 17f). Bundan dolayı endozomal kaçış teknolojileri ile GET / HETD-iletim verimliliğinin kombinasyonu, hücrelerde yüksek fonksiyonunun tam ve geçici bir şekilde kontrollü miktarları olarak sağlayabilmektedir.

GET-aracılı içselleştirme, hücre membran ilişkisinden sonra etkilidir

Düşük miktarlarda GET-protein fonksiyonel niceliklerde protein aktivitesi kullanan inkübasyonlar için bile hücreler içerisinde gözlemlenmiştir. Ancak en fazla GET proteininin, verimli bir şekilde içselleştirdiğini kategorik olarak ve net bir şekilde kanıtlamak için bir dizi analiz, sellüler veya ekstrasellüler lokalizasyona yanıt olan raportörler kullanılarak yürütülmüştür. DhaA²⁹'dan elde edilen bir kendi kendine etiketli protein olan HALO (Halo^{Etiket}) kullanılarak HALO, sentetik kloroalkan-bazlı ligandlara bir kovalent eklenti oluşturulmaktadır hücre geçirimli ve geçirimsiz ligandlar bulunmaktadır HALO'nun intraya karşı ekstrasellüler etiketlenmesi, etiketsiz HALO'nun (intraseleüler için) ve harici hücre membranında (ekstrasellüler için) LAMP2b-HALO'nun transjenik aşırı ifadesi kullanılarak ve hücre geçirimli (HALO^{ETİKET} Oregon Green) veya geçirimsiz (HALO^{ETİKVe ark} exafluor⁴⁸⁸) ligandlarla ile etiketlenerek onaylanmıştır (Şekil 20). GET-HALO proteinleri yapılmıştır ve rekombinant olarak ifade edilmiştir (Şekil 21a) ve hücre geçirimsiz ligand ile etiketlemeye karşı duyarlılık ile içselleştirmeyi test eden hücrelere bunlar iletilmiştir. Bir saatlik inkübasyon, GET-proteinlerinin çoğunlukla ekstrasellüler olarak lokalize kaldığı ve hücre membranına eklendiğini göstermiştir (Şekil 21b). Ancak sonraki inkübasyon (5sa sonraki inkübasyon ile 1 sa maruziyet; 1sa-5sa) ile GET-proteini (P21-HALO-8R) etkili bir şekilde içselleştirilmektedir (hücre geçirimli ligand duyarlı ancak geçirimsiz ligand duyarsız kalmaktadır) (Şekil 21c). Bu deneyler, pH-duyarlı olan ve <pH6³⁰ çevrelerde neredeyse tüm floresans kaybeden RFP'nin mNektarin (mNekt) varyantı kullanılarak yinelenmiştir (Şekil 22). HALO aktarımları uyumda mNekt, 1 sa sonrasında çoğunlukla membran lokalize ve asidik pH-ortam (pH5.5) inkübasyonuna floresan duyarlı kalmıştır (Şekil 22d). Sonraki inkübasyon post-iletim (1sa-5sa) sonrasında GET-mNekt floresan, ekstrasellüler pH'a karşı artırı duyarlı değildir (Şekil 22e); ancak şaşırtıcı bir şekilde mutlak floresan seviyeleri, tahminen proteinin endozomal asidifikasyon¹ sırasında maruz kaldığı dahili pH değişimi yüzünden GET-mR ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaltılmıştır. Bu veriler, GET protein membran ilişkisinin hızlı olduğunu ve aktarımları etkili post-hücre bağlamadığını göstermektedir. GET proteininin membran kleransını, iletim prosesinde bir hızlandırıcı olarak olabileceği ve bunun, aktarımlar arasındaki sürenin değiştirilmesiyle GET-mR'nin çoklu aktarımları (1sa) gerçekleştirerek test edildiği hipotezi ortaya atılmıştır (Şekil 23a). Aslında başlangıç aktarımları sonrasında yeniden-aktarımları, ikinci aktarımları verimliliğini düşürmektedir ancak yeni aktarımlar arasındaki 1 sa kadar az süre, yeniden aktarımları maksimum verimliliğini elde etmek için gerekmektedir (Şekil 23b).

GET-iletimi, antibiyotik seçimin NEO-verilen direnci ile hayatta kalmayı teşvik etmektedir

GET/HETD sistemi, etiketsiz proteinden daha iyi birkaç derecelik büyüklükte önemli ölçüde molekülü iletebildiği görülmüştür. Sonrasında sistemin, uzatılmış protein aktivitesini iletip iletmediği araştırılmıştır ve bir sistem, antibiyotik seçim kapsamında direnç sağlamak üzere girişimde bulunması için tasarlanmıştır (Şekil 5). Bunun, klinik translasyon için gerekli olacak GET-yüklerinin / HETD-yüklerinin kesintisiz iletimine ve fonksiyonuna dair daha yansıtıcı analiz olduğu düşünülmektedir. Tek seferde eGFP tarafından raporlanacak hücrelere iletilecek bir tek enzimi 'başarı' olarak gerektiren Cre-bazlı olarak farklı olarak NEO-bazlı analiz, antibiyotiğin aktivitesini olumsuzlamak için birkaç gün boyunca ve önemli miktarlarda kesintisiz iletimi gerektirmektedir. G-418 sülfat (Genetisin), zincir uzamasını inhibe ederek polipeptit sentezi bloke eden bir aminoglikosid antibiyotik {Eustice, 1984 #69}.

Bunu test etmek için hem MEF hem de NIH3T3 hücreleri, hücrelerin plakalandığı ve bir GET/HETD NEO-yük, P21-mR-NEO-8R ile üç ardışık günlük aktarımda maruz bırakıldığı bir seçim protokolüne maruz bırakılmıştır. Sonrasında hücreler yeniden plakalanmıştır ve eş zamanlı olarak bir ilave üç gün boyunca G-418 ile ve devam eden GET/HETD NEO aktarımı ile seçilmiştir (Şekil 5a). Seçim sonrasında bu kültürler, kalan hücre sayıları için tripan mavi eklüzyonu kullanılarak canlılık bakımından değerlendirilmiştir ve ayrıca CANLI/ÖLÜ hücreleri etiketlemek için kalsein AM/etidiyum homodimer-1 kullanılarak boyanmıştır. Bunlar, aynı rejim kapsamında işlenen hücreler ile karşılaştırılmıştır ancak bir NEO-ifade eden lentivirüs, SIN NEO ile aktarılmıştır böylelikle G-418 direncini vermek üzere geleneksel transjenik yaklaşım gösterilmektedir.

Bu veriler, aktarılmış P21-mR-NEO-8R ile seçilen hücrelerin bir doza bağlı olarak hayatta kalmayacakları açıkça görülmüştür (Şekil 5b). Bu hayatta kalma, P21-mR-NEO-8R, daha düşük G-418 dozları ile yüksek dozlarda iletildiğinde (~3.3-kat daha iyi hayatta kalma; $p < 0.05$) SIN NEO entegrasyonu (~3.6-daha iyi hayatta kalma; $p < 0.05$) tarafından transjenik olarak verilen ile karşılaştırılabilir olmuştur (Şekil 5c-e). En yüksek dozlarda G-418, yalnızca SIN NEO transjenez ile olumsuzlanabilmektedir. Birlikte alındığında bu deneyler, GET-iletilmiş /HETD-iletilmiş proteinin, molekülün önemli miktarlarda kesintisiz iletimini sağlayabilmesi ve kesin antibiyotik-seçim altında memeli hücrelerin hayatta kalmasını teşvik edebilmesi prensibine dair kanıt sağlamaktadır.

NANOG'nin GET-iletimi, Pluripotensinin Kendi kendine yenilenmesini teşvik etmektedir

Bu teknoloji, klinik uygulamalar için kabul edildiği takdirde hücre kaderini ve ayrıca kontrol hücresi metabolizmasını değiştirmesi için bunun kullanılması göstermesi önemlidir. Bu teknolojinin potansiyel olarak önemli bir uygulaması kök hücrelerinin yeniden programlanması, kendi kendine yenilenmesinin ve farklılaşmasını tahrik edilmesine olacaktır. iPSC teknolojisi, orijinal retroviral protokollerin {Takahashi, 2007 #82} yerini alacak teknolojilere dayanarak genom entegre edici olmayan DNA {Yu, 2011 #91}, RNA {Warren, 2010 #4} ve proteine {Kim, 2009 #71; Zhou, 2009 #72} olanak sağlamak üzere değişik şekilde geliştirilmiştir. PTD-iletimi aracılığıyla yeniden programlama, halihazırda, HTD-iletiminin pluripotent hücre kaderini teşvik etmek için ötelenebilir olduğunu göstermeyi amaçlanmıştır {Kim, 2009 #71; Zhou, 2009 #72} (Şekil 6).

Bu hipotezi test etmek için CGR-8 mESC'ler, GET / HETD-aracılığıyla iletimi, Lösemi inhibitör faktörünün (LIF) geri çekilmesi ile bunların pluripotent kendi kendine yenileme fenotipini sürdürebildiğini belirlemek üzere kullanılmıştır. GET/HETD NANOG-yükü, mESC'lerde Nanog rolünü başlangıçta izole etmek için kullanılmaya {Chambers, 2003 #70} benzer bir tahlilde {Dixon, 2010 #16} iletilmiştir. CGR-8 hücreleri, jelatinlenmiş plastiğe plakalanmıştır ve GET/HETD NANOG-yükü, P21-mR-NANOG-8R ile üç ardışık günlük aktarıma maruz bırakılmıştır. LIF bulunmayan koşullarda günlük olarak aktarıma devam eden ilave üç geçişin (geçiş başında üç gün) içinden geçirilmiştir (Şekil 6a). Bu kültürler, hücre sayımlarına her bir geçişte değerlendirilmiştir ve üç LIF-eksik geçişten sonra morfolojik değişim, alkalik fosfataz (AP) aktivitesi bakımına ve pluripotensi ve farklılaşma ile ilişkili gen ifadesi için (örneğin *Oct4*, *Rex1* ve *Fgf5*) QPCR tarafından değerlendirilmiştir. Bunlar, önceden aynı tahlilde CGR-8 hücrelerinin kendi kendine yenilenmesini kurtardığını gösterdiğini, NANOG-ifade eden lentivirüs, SIN NANOG ile aktarılan hücreler ile karşılaştırılmıştır {Dixon, 2010 #16}.

Bu veriler, P21-mR-NANOG-8R'nin, nispeten düşük dozlara (5-10 µg/ml) sahip CGR-8'in önemli miktarlarda AP aktivitesini kurtardığını açıklamıştır (Şekil 6b). Yüksek dozda P21-mR-NANOG-8R numunelerinde AP aktivitesi, SIN NANOG transjenik tarafından gerçekleştirilen ile benzer olmuştur. Transjenikler ve yüksek dozda P21-mR-NANOG-8R-aktarılan CGR-8 hücreleri, LIF-eksik kültürlerde benzer bir seviyeye yayılmıştır (~87.6-kat daha fazla; $p < 0.001$) (Şekil 6c) ve ayrıca pluripotensinin (her iki $p < 0.05$) muhafazasını göstergesi olan benzer bir seviyeye (LIF barındıran kültürlerden daha düşük) *Oct4* ifadesini muhafaza etmiştir (Şekil 6d). Önceden gözlemlendiği üzere hem DNA hem de protein yöntemleri ile aktarılan

hücreler, ICM-ila-epiblast geçiş fenotipini gösteren *Fgf5*'i yukarıya regüle etmiştir ve *Rex1* ifadesini aşağıya regüle etmiştir. {Dixon, 2010 #16}. Bu deneyler, GET / HETD-iletilmiş proteinin farklılaşmayı önleyebilmesi ve daha sonra iPSC teknolojisine uygulanabilen pluripotent fenotipini muhafaza etmesi bakımından bir gösterim sağlamaktadır

5

MYOD'un GET-iletimi Miyojenezi tahrik etmektedir

Rejeneratif tıp veya hastalık modelleme için iPSC teknolojisinin vaadini gerçekleştirmek için pluripotent hücrelerin çok-soylu farklılaşma potansiyelinin kontrol altına alındığına dair belirtidir {Robinton, 2012 #30}. Proses, bu hücrelerin protokoller gibi ekstrasellüler sitokin miliyu modüle edilerek çeşitli soylara farklılaşmasını yönlendirilmesinde gerçekleştirilmesine rağmen nispeten etkisiz kalmaktadır P21-gelişimi tarafından fonksiyonel PTD-aracıyla yüksek verimliliği göz önünde bulundurulduğunda GET/HETD teknolojisinin ayrıca, transkripsiyon faktörlerinin aktarılması için açılanan ötesinde farklılaşmış hücre-kaderlerine doğru pluripotent hücreleri yeniden yönlendirilmesi üzere kullanılabilmektedir {Do Kwon, 2005 #74; Hidema, 2012 #75; Liang, 2013 #73}.

Bunun için etkili MYOD miyojenik faktörünün iletimi {Bichsel, 2013 #92}, iskelet kas spesifikasyonunu tahrik etmek üzere kullanılmıştır (Şekil 7). Bu hipotezi test etmek için bir *in vitro* farklılaşma protokolü, HUES7 hücrelerinin jelatine plakalandığı ve geleneksel ortamı geri çekildiği durumlarda tasarlanmıştır. Bu koşullar altında hücreler, sonrasında düşük konsantrasyonlarda at serumuna sahip koşullarda bir ilave üç günlük kültürün geldiği, bir GET/HETD MYOD-yük, P21-mR-MYOD-8R ile yedi günlük ardışık aktarıma maruz bırakılmıştır (Şekil 7a). Bu kültürler, morfolojik değişim bakımından değerlendirilmiştir, miyojenik işaretçi MİYOJENİN için immüno boyanmıştır. DAPI boyama ile miyojenik-bağlı çok çekirdeklenme bakımından değerlendirilmiştir ve QPCR tarafından miyojenik gen ifadesi bakımından değerlendirilmiştir (endojen *MYOD* ve *ACTA1*). Bunlar, aynı rejim kapsamından işlenen hücreler ile karşılaştırılmıştır ancak bir *MYOD*-ifade eden lentivirüs, SIN MYOD ile aktarılmıştır

Bu veriler, *MYOD* ve *ACTA1* ifadesini (sırasıyla $p < 0.01$ ve < 0.05) (Şekil 7c) yükselttiği büyük çok çekirdeklenmiş MİYOJENİN-pozitif miyotüplerin bir yüksek yüzdesini (62.1 ± 8.9 ; $p < 0.01$) (Şekil 7b-f) açıklamıştır. Bu, P21-mR-MYOD-8R yüksek dozlarda iletildiğinde SIN MYOD transjeniğinde gözlemlenen farklılaşma ile karşılaştırılabilir olmuştur. Birlikte alındığında bu deneyler, GET / HETD-iletilen proteinin, terminal olarak farklılaşmış bir somatik hücre türüne HUES7 hücrelerinin kaderini yönlendirebilme prensibinin kanıtıdır

sağlamaktadır

Açıklama

5 Bir protein-aktarılan alan (PTD) bir HS-GAG bağlama (HBD)-peptidi gibi bir hücre membranı bağlama peptidi ile birleştirilerek, hücre membran hedeflemesini geliştirmek için, hücre türlerini aktarması zor olan, bir dizi hücre tutumunu yönlendirmesi için fonksiyonel olarak yüksek derecede etkili iletime olanak sağlayan bir teknoloji geliştirilmiştir. GET/HETD sisteminin, hayatta kalmayı kendi kendine yenilenmeyi teşvik etmek üzere veya istenilen bir soya doğru pluripotent hücrelerin farklılaşmasını yönlendirmek üzere yararlanılabilmektedir. Bu sistem, teknik olarak modifiye RNA sistemleri {Warren, 2010 #4} karmaşık değildir, ve bir genin veya proteinin ekzojen fonksiyonunu iletmek üzere belirlenmiş teknikler üzerinden birkaç önemli avantaj sunmaktadır. Ayrıca viral gen-terapi yaklaşımları için gerekli sert biyolojik sınırlardan kaçınılarak GET/HETD-tahrikli protein aktarılan teknolojisini, bu tür yaklaşımların daha erişilebilir yapmaktadır

Daha da temel olarak teknoloji protein bazlı olduğundan dolayı tüm DNA-bazlı metodolojilere özgü genomik entegrasyon ve insersiyonel mutajenezeye dair riski tamamen ortadan kaldırmaktadır {Gump, 2007 #39}. Ayrıca endozomal kaçışı geliştirilebildiği takdirde bizim yaklaşımın protein stoikiyometrisinin sıkı bir şekilde kültürlerin içerisinde regüle edilmesine olanak sağlanacaktır. Bu, entegre edici vektörlerin ifadesinde stokastik varyasyonu ve ayrıca viral susturmaya dair kontrol edilemez etkileri önleyecektir. GET/HETD teknolojisi, ayrıca, yeniden programlama teknolojilerine doğrudan uygulanabilmektedir. Pluripontesi indüksiyon {Chan, 2009 #63; Smith, 2009 #64} sırasında gözlemlenen fenotik değişikliklerin adını adını özelliği göz önünde bulundurulduğunda ve yönlendirilmiş-farklılaşma protokolleri {Burrige, 2011 #81} için tek tek transkripsiyon faktörlerinin ayrı aşamaya özgü rolleri oynaması muhtemel görülmektedir.

GET/HETD teknolojisi tarafından yapılabilen tek tek faktör fonksiyonu üzerinden geçici kontrol için benzersiz potansiyeli, bu değişkenlerin, hücre-kaderi kontrolünün verimliliğini ve kinetiğini geliştirmek üzere tes edilmesine olanak sağlamaktadır

Protein bazlı aktarılan geçici ve mutejenik özelliği, ayrıca, burada araştırmaların dâhilinde önemli klinik faydalar üretebilmektedir. Aslında immünoterapi için kanser veya patojen antijenleri ifade etmek için protein aktarılan kullanımı {Rabinovich, 2009 #67}, protein aktarılan

immünojenik olmayan niteliklerinden faydalanabilmektedir.

İletilen proteinin çoğunluğu, endozomun içerisinde kapsanabilmektedir. PTD alan TAT ve diğer PTD etkileşimine dair mekanistik yönere ve vesiküllerden yükün serbest bırakılmasına dair amaç ile makropinositomlardan kaçış odaklanmıştır {Heitz, 2009 #42}. Mesele, PTD'ler hücre yüzeyine doğru avidite tarafından gerçekleştirilebilenin ötesine proteinleri iletme amacıyla başka bir açıdan yaklaşmıştır

TAT-Cre ileten önceki çalışmalar, bir fonksiyonel yükün etkili PTD-araç iletimine yönelik hedef kitleleme adımı makropinozom kaçış olduğunu önermiştir, ancak bu veri, bu kaçış prosesi nihai olarak PTD'lerin hastalığı tedavi etmek üzere başarılı bir şekilde kullanılmayacağına {Sugita, 2007 #80} kontrol etmesine rağmen PTD-aktarma prosesinin kendisinin fizyolojik olarak olabilecek en etkili olduğunu önermektedir. Burada açılan GET/HETD-aktarma, aktarma zor hücreler için en fazla üç büyüklük derecesi ile mevcut sistemleri geliştirmektedir. Vesikül kaçışın GET/HETD sistemi ile eşleştirilmesi, önemli bir gelişim olacaktır. Konseptin kanıt olarak bu, endozomal tahrip edici, Klorokuinin kullanımı ile gösterilmiştir. GET/HETD-aktarma sırasında makropinositom-entegresinin azaltılmasına proteinlerin pg/ml konsantrasyonları kullanılarak fonksiyonel iletimi gösterilmiştir (Şekil 17f).

PTD-araç iletiminin mevcut anlaşılmasında GAG'ların yoğun bir ormanında, PTD'lerin bağlandığı bir übiküitöz negatif olarak yük ile hücre membranına sağlanması dair hipotezden oluşmaktadır {Gump, 2007 #39}. Yük etkisi bakımından değişiklik bu bağlama, PTD'lerin hücreleri aktarma veya makropinositotik alımı indükleme kabiliyetinden bağlanması GET/HETD, hücre membranlarında daha fazla olarak bağlayarak bir PTD tarafından araç edilen başarılı aktarma teşvik ederek etiketli proteinlere sahip bu olayı daha abartmış versiyonunu etkili bir şekilde oluşturmuştur. İzolasyonun kaynağına bağlı olarak farklı verimliliklere ve hücre türü aktivitelerine sahip P21'e benzer bir şekilde alternatif HBD fonksiyonu. 8R'nin değiştirilmesi, diğer PTD'lerin (TAT, 8K, 8RQ) başarılı bir GET/HETD'de kullanılabileceğini göstermiştir (Şekil 11).

HS-GAG'lar gibi GAG'ların çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahip olduğu ve büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinleri {Sasisekharan, 2006 #55; Gandhi, 2008 #54} barındıran bir dizi protein ile etkileşimler aracılığıyla kan koagülasyonu ve inflamatuvar yanılar {Lortat-Jacob, 2002 #53; Varki, 2008 #52} gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte geniş çapta kapsandığı bilinmektedir. Etkileşimler, çeşitli biyolojik süreçlerin regüle edilmesine önemli bir

rol oynayan GAG'ların disakkarit bileşimine ve modellerine bağlı olarak HS-GAG'ların heterojenliği, farklı patolojik koşullar altında bir dizi bağli gen ve çoklu HS-GAG-düzenleme enzimlerinin ifade modelleri ile belirlenmektedir {Lindahl, 1998 #56; Nakato, 2002 #57; Sasisekharan, 2002 #60; Bengtsson, 2003 #59; Gesslbauer, 2007 #58}.

5 Mukopolisakkaridozlar, osteoartrit ve miyeloma kanseri gibi inflamatuvar prosesler ve hastalıkların, GAG'ların farklı disakkaridi ile ilişkili olduğu raporlanmıştır. Bundan dolayı GAG'ların varyasyonlarının (başka bir deyişle mevcudiyet ve nicelik) değerlendirilmesi, hastalıkların teşhisi ve tanısı için büyük bir potansiyele sahiptir.

10 GAG etkileşiminin teşvik edilmesinin, PTD-etiketli biyolojik olarak aktif makromoleküler yükün etkinliğini geliştirmeye dair keşif, hastalığın tedavisi ve deneysel araştırması için yeni alanlar açmaktadır

DeneySEL ProSEDÜRLER

15

Rekombinant Proteinlerin İfadesi ve Saflaştırılması

cDNA, Prof. R. Y. Tsien'den (University of California, ABD) bir tür hediye olarak *mRFP1* (*mR*) için elde edilmiştir {Campbell, 2002 #12}. *8R*, *TAT*, *8K*, *8RQ*, *P21*, *Cre*, *NANOG*, *MYOD* ve *NEO* cDNA'lar, yeni baştan sentezlenmiştir (Eurofins MWG Operon). cDNA'lar, BL21 (DE21) pLysS *Escherichia coli*'de (Novagen) çerçeve içi füzyonlar ve ifade edilmiş proteinleri oluşturmak için pGEX6-P1 ifade vektörüne (Novagen) kopyalanmıştır. 37°C'de 220rpm'de çalkalanan LB üstel olarak büyüyen LB kültürleri (OD₆₀₀ = 0.4) 24 saat boyunca 25°C'de 1 mM IPTG kullanılarak indüklenmiştir. Bakteriyel pelletler, IX STE ekstraksiyon tamponunda (1mM DTT, 0.2 mg/ml lizozim ve IX proteaz proses inhibitör kokteyli içeren 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) lizlenmiştir ve soniklenmiştir (7 genlik, 1 dakika, 5 süre). Çözünmez protein, His₆-GST inklüzyon vücut çözünürleştirme ve yeniden doğallaşma kiti kullanılarak canlandırılmıştır (AKR-110; Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA). Rekombinant proteinler, Glütinyon-Sefaroz reçinesi (GE Healthcare) kullanılarak afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. GST-etiketleri, IX klevaj tamponunda (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA ve 1 mM DTT) PreScission™ Proteaz klevajı (GE healthcare) ile reçineden çıkarılmıştır ve ayrılmıştır. Protein konsantrasyonu, bir standart olarak rekombinant mR proteini kullanılarak 595nm'de ölçülen absorbanza sahip bir BCA-bazlı protein tahlili (BioRad) kullanılarak belirlenmiştir. Bütünlük ve tam-uzunluk ifadesi SDS-PAGE tarafından onaylanmıştır. Rekombinant proteinlerin floransı (eksitasyon: 584 nm; emisyon: 607 nm),

numuneler (floresan/ μg) arasındaki tüm preparasyonların $<10\%$ yoğunluk farkı ile belirlenmiştir. Standartlar ve numuneler, TECAN sonsuz 200PRO çok modlu okuyucu kullanılarak analiz edilmiştir. Alikuotlar -80°C 'de depolanmıştır.

5 Hücre Kültürü

NIH3T3 fare fibroblast hücreleri, HEK293T insan embriyonik böbrek hücreleri, C2C12 fare miyoblast hücreleri, iHMSC ölümsüzleştirilmiş insan mezenkimal kök hücreleri ({Okamoto, 2002 #8} açıldığında gibi oluşturulan) ve MEF ürin embriyonik fibroblastlar ({Anderson, 2007 #9} açıldığında gibi hasat edilen), 2mM L-glütamin, 100birim/ml penisilin ve 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomisin ile ilave edilen hacim cinsinden 10% fetal kalf serumu (FCS; Sigma) sahip DMEM'de sürdürülmüştür. CGR-8 fare embriyonik kök hücreleri (mESC'ler) ve *EXT1*-/- mESC'ler (Dr. D. E. Wells, University of Houston, ABD tarafından bir tür hediye; {Lin, 2000 #78}), DMEM, hacim cinsinden 20% FCS, 100birim/ml lösemi inhibitör faktör (LIF), esas olmayan amino asitler, 100 μM β -mekaptoetanol (Sigma) 2mM L-glütamin, 100birim/ml penisilin ve 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomisinde sürdürülmüştür. HL1 fare kardiyomiyosit hücreler, açıldığında gibi sürdürülmüştür {Claycomb, 1998 #7}. HUES7 insan embriyonik ve IPS2 indüklenmiş pluripotent kök hücreleri, önceden açıldığında gibi kültürlenmiştir {Dick, 2011 #10}. HUES7 hücrelerinden elde edilen HUES7fib insan fibroblastlar üretilmiştir ve önceden açıldığında gibi kültürlenmiştir {Dick, 2011 #10}. Tüm hücreler, 5% CO_2 altında 37°C 'de kültürlenmiştir.

Akış Sitometrisi ve Mikroskopi

Akış sitometrisi için hücreler, (aksi belirtilmediği sürece) tripsinlenmiştir, ağrı/hacim cinsinden 4% PFA'da sabitlenmiştir, PBS'de (pH7.5) yeniden askıda bırakılmıştır ve bir 488nm yeşil lazer kullanılarak bir MoFlo™ DP (DAKO) Akış Sitometresinde analiz edilmiştir. (50,000 hücre; ileri/yan saçma ile canlı hücrelerde kapalı Medyan floresan, çıkarılmış etiketlenmemiş/aktarılmış hücrelerden temele ve deney kontrolüne yönelik oranlar olarak alınan değerlere sahip istatistiksel analizler için kullanılmıştır. Gösterilen veriler, üç kopyalı numunelerin üç deneyidir. Mikroskopi için kültürler, PBS ile iki kere durulanmıştır ve evriltmiş floresan mikroskop (Nikon Eclipse TS100) ile görüntülenmiştir.

Floresan İletim Tahlili

35

Çoklu hücre hatları test edilmesi için test edilmiş hücre hattına ilişkin yüzeyin üzerine 2×10^5 hücre/kuyucuk (12-kuyucuklu plakada) plakaladık, 2 saat boyunca hücreleri bağladık ve hücre-türü spesifik büyüme ortamında rekombinant proteinler ile aktardık. Aktarılan hücreleri PBS ile yıkandıktan sonra akış sitometrisi için %4 PFA'ya tripsinlenmiştir ve sabitlenmiştir.

5 Membran lokalizasyonu, intrasellüler lokalizasyon veya her ikisi için yukarıdaki gibi hücreleri plakaladık, ancak kültürler, aktarımdan 1 saat önce serumsuz ortamda önceden inkübe edilmiştir. Hücre etkileşimini değerlendirmek için membran lokalizasyonu, serumsuz ortamda 1 saatlik bir kısım aktarımla gerçekleştirilmiştir. Aktarımla verimliliğini değerlendirmek için intrasellüler lokalizasyon, yalnızca serumsuz ortamda 5 saatlik inkübasyon sonrasında 10 saatlik bir kısım aktarımla gerçekleştirilmiştir. Hücre birleşmesi (membran ve intrasellüler seviyeler), serumsuz ortamda 6 saat boyunca hücreler aktarılarak değerlendirilmiştir. Akış sitometrisi için hücreler tripsinlenmiştir, yıkandıktan ve %4 PFA'da sabitlenmiştir ve mikroskopi hücreleri için PBS'de yıkandıktan sonra görüntülenmiştir. Hücre-yüzey proteinlerinin tripsin depleasyonu için hücreler, 37°C'de 15 dakika boyunca tripsin/EDTA 15 (Invitrogen) veya EDTA-bazlı hücre çözünme çözeltisi (CDS) (Sigma) ile tedavi edilmiştir, sonrasında PBS ve 1X soya fasulyesi tripsin inhibitörü (PBS'de 10 mg/ml; Sigma) ile yıkandıktan. Sonrasında hücreler, serumsuz ortamda 37°C'de 1 saat boyunca proteinler ile tedavi edilmiştir. Hücre membranları deterjan depleasyonu için hücreler, 37°C'de 10 dakika boyunca hacim cinsinden %0.1 Triton-X100 (Tx100) barındıran PBS (pH7.5) ile tedavi edilmiştir. Sonrasında hücreler, serumsuz ortamda 37°C'de 1 saat boyunca proteinler ile tedavi edilmiştir. GAG-tedavisi için hücreleri aktarımla öncesinden serum olmadan DMEM'de GAG'lar ile önceden tedavi edilmiştir ve aktarımla ortamında kapsanmıştır. Bu, heparin ve kondroitin sülfat A, B ve C (0-50 µg/ml).

20

25 **Toplam İletilen Protein Analizleri**

5×10^6 NIH3t3 hücreleri plakalanmıştır (T25 şişelerinde), serumsuz DMEM'de 1 saat boyunca hücreler önceden inkübe edilmiştir ve 6 saat boyunca serumsuz DMEM'de mR-8R veya P21-mR-8R (0-200 µg/ml; 1 ml hacim) ile bunlar aktarılmıştır. SIN-mR lentivirüsleri ile aktarılan NIH3t3 hücreleri, transjenik sistemler tarafından gerçekleştirilen seviyeler bakımından bir kontrol olarak kullanılmıştır {Dixon, 2011 #15; Dick, 2011 #10}. Hücreler, tripsinizasyon ile hasat yapılmıştır, akış sitometrisi için %4 PFA'da sabitlenmiştir veya florometri için soğuk HKM tamponunda ekstrakte edilen çözümlü proteine sahip soğuk PBS'de birkaç kere yıkandıktan (IX tam EDTA-serbest proteaz inhibitör kokteyline sahip 20mM HEPES, pH 7.5, 35 5mM KCl, 0.5 mM MgCl₂ ve 0.5 mM DTT) {Medina, 2000 #14}. Ekstraktlar soniklenmiştir,

santrifüj edilmiştir ve analizler öncesinden 100mM'lik bir nihai konsantrasyonu vermesi için NaCl eklenmiştir. Florometri, standartlar olarak 100mM NaCl ile HKM tamponunda seyreltilmiş saflaştırılmış mRFP proteini ile çözümlü ekstraktlar karşılaştırmak üzere kullanılmıştır. Akış sitometrisi, intakt hücrelerde toplam iletilen proteini değerlendirmek üzere kullanılmıştır

5

Ortam Deplezyon Değerlendirmesi

2 x 10⁶ NIH3t3 hücreleri veya HUES7 HESC'ler plakalanmıştır (6-kuyucuklu plakalarda), serumsuz DMEM'de 1 saat boyunca hücreler önceden inkübe edilmiştir ve 12 saat boyunca serumsuz DMEM'de rekombinant proteinler (20µg/ml; 1 ml hacim) ile bunlar aktarılmıştır. Ortam hasat edilmiştir ve florometri, hücre inkübasyonu öncesinde olana karşı ortamda kalan floresan karşılaştırmak üzere kullanılmıştır. Floresan ön-inkübasyon, %100 floresan birimleri ve çıkarılan ortamın temel serumsuz ortamı olarak tahsis edilmiştir.

15 Heparin-bağlama tahlili, Heparinaz tedavisi ve Serumdan P21-bağlama moleküllerinin deplezyonu

Heparin bağlama aktivitesi için 100rpm'de çalkalayarak 37°C'de 1 saat boyunca 50µl PBS-yıkandıktan sonra Heparin-sefaroz bozukları (Sigma) ile DMEM'de 1 ml rekombinant proteinleri (20µg/ml) inkübe ettik. Ortam ön- ve post-inkübasyon florometri ile karşılaştırılmıştır. Heparinaz tedavisi için 2 x 10⁵/kuyucukta (12-kuyucuklu plakada) NIH3t3 hücrelerini plakaladık ve Heparinaz III (0-1 U/ml) veya Heparin (0-50µg/ml) ile 1 saat boyunca serumsuz ortamda önceden inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler yıkandıktan sonra Heparinaz III veya Heparin barındıran mR veya P21-mR-8R (serumsuz ortamda veya farklı FCS konsantrasyonlarına sahip ortamda 20µg/ml) ile 12 saat boyunca aktarılmıştır. FCS, afinite kromatografisi ile P21-bağlayıcı malzemedен tüketilmiştir. Bu, *Escherichia coli*'de ifade edilen GST-P21 proteini ile önceden absorbe edilen 2 ml Glütatyon-Sefaroz reçinesi (GE Healthcare) ile 50 ml FCS inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

30 Makropinositoz Değerlendirme

Genel makropinositoz üzerinde protein aktarımlarının etkilerini ölçmek için hücreler, 1 saat boyunca 4°C veya 37°C'de farklı rekombinant proteinler (0-10µg/ml) ile birlikte 100µg/ml FITC-70kDa nötr dekstran (Sigma) ile inkübe edilmiştir. Hücreler tripsinlenmiştir ve akış sitometrisi tarafından PBS'de yıkandıktan sonra

35

Cre Rekombinasyon Tahlili

Cre Rekombinaz aktivitesini ölçmek için NIH3T3: LSL-eGFP hücre hattı pZ/EG plazmit transfeksiyon ve G-418 seçimi kullanılarak oluşturulmuştur {Novak, 2000 #6}. Cre aktivitesinin onaylanması rekombinasyona etkili bir şekilde yol açmış ve eGFP aktivasyon hücreleri, SIN-Cre lentivirüsleri (Dixon ve ark. 2011'de açıklandığı gibi) ile aktarılmış ve >%95 hücre, eGFP-pozitif 48 saat post-aktarımla onaylanmış 2×10^5 hücre/kuyucuk plakalanmış (12-kuyucuklu plakada), 1 saat boyunca serum olmadan DMEM'de önceden inkübe edilmiştir ve serum olmadan DMEM'de Cre proteinleri (0-500 $\mu\text{g/ml}$) tedavi edilmiştir. Cre inkübasyon hücreleri tripsinlendikten sonra tam ortama yeniden plakalanmış ve 2 gün boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler, serum olmadan DMEM'de başlangıç zaman-periyodu boyunca ilaçlar ile önceden tedavi edilmiştir, Cre-aktarımla ortamından çıkarılmış ve yeniden plakalama sonrasında eklenmiştir. Ön tedaviler şunları kapsamış heparin (0-50 $\mu\text{g/ml}$), kondroitin sülfat A, B ve C (0-50 $\mu\text{g/ml}$), klorokuin (0-100 μM), sitokalsin-D (0-10 μM), amilorit (0-5 mM), metil- β -siklodekstrin (0-5mM) ve nistatin (0-50 $\mu\text{g/ml}$). İnkübasyonlar sonrasında hücreler tripsinlenmiştir, yıkılmış ve %4 PFA'da sabitlenmiştir ve % rekombine edilmiş hücreler, akış sitometrisi ile belirlenmiştir. MR-Cre-8R ve P21-mR-Cre-8R karşılaştırmaları için 100 $\mu\text{g/ml}$ ve 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonları sırasıyla kullanılmış ve veri, % maksimum rekombinasyon olarak ifade edilmiştir (başka bir deyişle Cre'nin başlangıç dozunda gerçekleştirilen maksimum rekombinasyona göre %).

NEO Antibiyotik-Direnç Tahlili

NEO aktivitesini ölçmek için G-418 antibiyotik seçiminin mevcudiyetinde NIH3T3 ve MEF'nin hayatta kalması ve proliferasyonu değerlendirilmiştir. Hücre sayıları canlı ve canlı ölü oranları ölçülmüştür. NEO aktivitesinin, NIH3T3 ve MEF hücrelerinin G-418 seçimi kapsamında hayatta kalmaya ve proliferasyona etkili bir şekilde yol açmasını onaylamak için hücreler, SIN-NEO lentivirüsleri (Dixon ve ark. 2009'da açıklandığı üzere) ile aktarılmış ve NEO aktarımla hücre ölümünü önlediği ve sert G-418 seçimi kapsamında canlı olarak muhafaza ettiği onaylanmıştır. Bu, NEO protein aktarımlarına kıyasla kullanılmış 3×10^5 MEF hücre/kuyucuğu veya 1×10^5 NIH3T3 hücre/kuyucuğu (12-kuyucuklu plakalarda) plakaladıkları ve 3 gün boyunca P21-mR-NEO-8R (0-100 $\mu\text{g/ml}$) barındıran %10 FCS ile DMEM'de bunları kültürledik. Hücreler, MEF hücreleri için 3×10^5 hücre/kuyucukta veya NIH3T3 hücreleri için 1×10^5 hücre/kuyucukta yeniden plakalanmıştır. Hücreler, dirençli olmayan hücreleri öldürmek

için 3 günlük bir ilave günlük besleme için P21-mR-NEO-8R (0-100µg/ml) ve G-418 sülfat (0-300µg/ml) barındıran %10 FCS ile DMEM'de kültürlenmiştir. Hücreler sayılarak tripan mavi eklüzyon kullanılarak canlılık bakımından değerlendirilmiştir veya CANLI/ÖLÜ boyama kullanılarak tahlil edilmiştir {Bayoussef, 2012 #13}.

5

NANOG Kendi Kendine yenileme Tahlili

NANOG aktivitesini ölçmek için CGR-8 mESC'lerden LIF-geri çekimini kullandık ve alkali fosfataz (AP) aktivitesini, hücre sayım ölçtük ve niceliksel PCR (QPCR) ile gen ifade değişimlerini değerlendirdik. NANOG aktivitesinin, LIF olmadan kendi kendine yenilenmeyi kurtarmaya etkili bir şekilde yol açtığını onaylamak için SIN-NANOG lentivirüsler (Dixon ve ark. 2009'da açıkladığı gibi) ile aktardık ve CGR-8 kendi kendine yenilemenin etkili bir şekilde kurtarıldığını ve bunun NANOG protein aktarımları ile karşılamalarda kullanıldığını onayladık. 2×10^5 hücre/kuyucuk plakalanmıştır (6-kuyucuklu plakada), günlük olarak taze ortam ile besleyerek P21-mR-NANOG-8R (0-50µg/ml) barındıran bir geçiş/3 gün boyunca LIF ile büyüme ortamında önceden inkübe edilmiştir. Hücreler, P21-mR-NANOG-8R (0-50µg/ml) barındıran LIF olmadan (ve LIF ile kontroller olarak) büyüme ortamında 2×10^5 hücre/kuyucukta plakalanmıştır (6-kuyucuklu plakada). Hücreler, bu ortam ile günlük beslenmiştir ve 3 günde bir sayılmıştır ve 3 geçişe kadar hücrelerin ona biri yeniden plakalanarak geçirilmiştir. Üçüncü geçişten sonra post-LF geri çekim hücreleri, AP aktivitesi için boyanmıştır (86R-1kiti; Naftol AS-BI ve hıkkimzomor LB'ye dayanarak; Sigma)) boyanmıştır ve QPCR analizleri için işlenmiştir. İlgili ifade seviyeleri ($\Delta\Delta CT$), TaqMan™ Gen İfadesi Ana Karşı ve spesifik TaqMan™ Gen İfadesi Tahlilleri (Applied Biosystems) kullanılarak QPCR belirlenmiştir.

25

MYOD Miyojenez Tahlili

MYOD aktivitesini ölçmek için HUES7 HESC'lerin farklılaşmasını kullandık ve hücre morfolojisini, hücre çekirdeklenmesini, niceliksel-PCR (QPCR) ile gen ifade değişimlerini ve MYOGENIN protein ifadesini değerlendirdik. MYOD aktivitesinin, HESC'lerin miyojenik farklılaşmasını etkili bir şekilde yol açtığını onaylamak için SIN-MYOD lentivirüsler (Dixon ve ark. 2009'da açıkladığı gibi) ile aktardık ve MYOD'un, MYOD protein aktarımlarına kıyasla kullanılarak çok çekirdeklenmiş miyotüp farklılaşmasını yönlendirdiğini onayladık. 1×10^6 hücre/kuyucuk, %0.1 jelatin-kaplı plakalara (6 kuyucuklu plakada) plakalanmıştır ve tripsin kullanan bir geçiş kullanılarak 1 hafta boyunca %10 FCS ile DMEM'de kültürlenmiştir.

35

Hücreler, 1×10^6 hücre/kuyucukta, %0.1 jelatin-kaplı plakalara yeniden plakalanmış ve P21-mR-MYOD-8R (0-50µg/ml) barındıran %10 FCS ile DMEM'de kültürlenmiştir. Hücreler, bu ortam ile 7 gün boyunca günlük beslenmiştir. Kültür ortamı sonrasında, %2 at serumu (HS) ile DMEM'ye değiştirilmiştir ve kültürler bir ilave 7 gün boyunca sürmüştür. Sonrasında hücreler, QPCR için işlenmiştir veya %4 PFA'da sabitlenmiştir ve immüno boyanmıştır {Bayoussef, 2012 #13}. Çekirdekler, önceden açıkladığı üzere DAPI kullanılarak etiketlenmiştir (Dixon ve ark. 2009). MYOGENIN-pozitif çekirdekler/toplam çekirdeklerin yüzdesinin miktarı tayin edilmiştir, koşul başında minimum 200 çekirdek sayılmıştır. İlgili ifade seviyeleri ($\Delta\Delta CT$), TaqMan™ Gen İfadesi Ana Karşılaştırma ve spesifik TaqMan™ Gen İfadesi Tahlilleri (Applied Biosystems) kullanılarak QPCR belirlenmiştir.

Antikor, Nükleik Asit ve Nanopartikül iletim

Biyotinlenmiş-Keçi anti-Tavşan ve FITC-Tavşan anti-fare antikorları (Sigma), pSIN-GFP (Dixon ve ark. 2014), GFP (Miltenyi Biotech) için modifiye nükleotit RNA (modRNA) ve GAPDH'ye (Sigma) karşı FAM-etiketli siRNA ve nanomag-D (250nm) (MircoMod), GET-proteinleri veya -peptitleri ile karmaşıklaştırılmış ve hücrelere eklenmiştir. Antikorlar için komplekslerin, hücre eklemesi öncesinde 20 dk boyunca büyüme ortamından oluşması olarak sağlanmıştır. Nükleik asitler için bir 2:1 peptit:nükleik asit yük oranı karmaşıklaştırma için kullanılmıştır. GET- veya LIPO2000 (lipofektamin 2000; Invitrogen) transfeksiyonu, 12 kuyucuklu plakalarda 100,000 hMSC'lerin transfeksiyonu başında 10 µg veya 1 µg nükleik asidi kullanılmıştır. GET-peptidi, tam imalatçı talimatlarına göre LIPO2000'i ikame etmiştir. MNP'ler için 25µM'lik nihai konsantrasyonda peptit, imalatçı talimatlarına göre 2mg MNP'ler kullanılarak bir EDAC/NHS reaksiyonunda kullanılmıştır. Koyu lacivert, ağırlık/hacim cinsinden %2.5 HCl'de potasyum ferrosiyanit (ağırlık/hacim cinsinden %2.5) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İstatiksel Analiz

GraphPad Prism yazılım paketi kullanılarak istatiksel karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir. Varyans Tukey-Kramer analizi kullanılarak karşılaştırmalar yapılmıştır (ANOVA). Sonuçlar, $p < 0.05$ olduğu takdirde düşünülmüştür.

Örnek Sekanslar

35

Örnek HS-GAG bağlayıcı sekanslar

P21 amino asit sekansı

(SEKANS KİMLİK NUMARASI 1)

5 KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK

P21 nükleotit sekansı (bir metiyonin/ATG ile):

(SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2)

10 aagcgcaagaagaagggcaaaggcctgggcaagaagcgcgatccgtgcctgcaagtataag PDGF (194-211) amino asit sekansı

(SEKANS KİMLİK NUMARASI 3)

GRPRESGKKRKRRLKPT

15 PDGF (194-211) nükleotit sekansı

(SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4)

ggccgcccgcgcgaaagcggcaaaaaacgcaaacgcaaacgcctgaaaccgacc

FGF7B amino asit sekansı

20 (SEKANS KİMLİK NUMARASI 5).

TYASAKWTHNGGEMFVALNQ

FGF7B nükleotit sekansı

(SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6)

25 Acctatgcgagcgcgaaatggaccataacggcgcgaaatgtttgtggcgctgaaccag

FGF2 HBD B(247-262) amino asit sekansı

(SEKANS KİMLİK NUMARASI 7).

TYRSRKYTSWYVALKR

30

FGF2 HBD B(247-262) nükleotit sekansı

(SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8)

acctatgcgagccgcaaataaccagctggtatgtggcgctgaaacgc

35 **8R protein aktarımları alan sekans kodlayan nükleotitler:**

(SEKANS KİMLİK NUMARASI: 9) CGA AGA CGC AGG AGA CGT CGA AGG

Örnek iletim molekül nükleotit sekansı (P21-yük-8R):

5

(SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10)

aagcgcaagaagaagggcaaaggcctgggcaagaagcgcgatccgtgcctgcgcaagtataagNcgaagacgca
gga gacgtcgaagg

10

N= çeşitli uzunlukta yük nükleik asit sekansı (başka bir deyişle nükleotit kalınları sayı değişkenlik gösterebilmektedir) veya başka bir molekül bütünlüğü.

15

ScFv antikorları nanokor varyantlarından her birinin iki versiyonu yapıldı. Bir versiyon, ScFv vHH alanı (Çerçeve alanı 1-CDR1-Çerçeve alanı 2-CDR2-Çerçeve alanı 3-CDR3-IgA Mentşe Alanı Çerçeve alanı 4) ile aynı sekansa sahiptir ve diğerinde CDR1 2, ve 3 alanları bir genel vHH alan sekansına greft edilmiştir. Her iki versiyon karşılaştırılabilir aktiviteye sahiptir ve greftleme versiyonu, CDR alanları basit bir şekilde bir genel antikorun üzerine greft edilmesinin ayrıca işe yaradığını kanıtlamak üzere oluşturulmuştur.

20

Aşağıda, HS4C3, ve AO4BO8 ScFv vHH ve greft edilmiş vHH'nin sekansları verilmektedir:

HS4C3 ScFv vHH

25

(SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11)

EVQLVESGGGLVQPRGSLRLSCAAS**GFTVSSNE**MSWIRQAPGKGLEWVSS**ISGG**
STYYADSRKGRFTISRDN SKNTLYLQMN NLR AEGTAA YYC**GRRLKD**PSTPPTPS
PSTPPTPSPS

30

CDR1 GFTVSSNE
CDR2 ISGGST
CDR3 GRRLKD

HS4C3 ScFv vHH nükleotit sekansı

35

(SEKANS KİMLİK NUMARASI: 12)

gaagtgcagctggtgaaagcggcgccgctggtgcagccgcgccgagcctgcgctgagctgcgcgcgagcgg
ctttaccgtgagcagcaacgaaatgagctggattcgccaggcgccgggcaaaggcctggaatgggtgagcagcattagcg
gcggcagcacctattatgcggatagccgcaaaggccgtttaccattagccgcgataacagcaaaaacacctgtatctgca
5 gatgaacaacctgcgcgcggaaggcaccgcgccgctattattgcggcccgccgctgaaagatccgagcaccgcccgcgacc
ccgagcccgcgagcaccgcccgcgaccgcccgcgagcccgcgagc

HS4C3 greft edilmiş vHH

10

(SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13)

QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTAS**GFTVSSNEL**GWFRQAPGQERWAVAA**ISG**
GSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVTLQMNNLKPEDTAIYYC**GRRLKD**WGQGTQ
VTVSSPSTPPTPSPSTPPTSPS

15

CDR1 GFTVSSNE
CDR2 ISGGST
CDR3 GRRLKD

20 HS4C3 greft edilmiş vHH nükleotidi

(SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14)

caggtgcagctggtgaaagcggcgccgagcgtgcagggcgccgagcctgcgctgagctgcaccgagcgg
ctttaccgtgagcagcaacgaaactgggctggttcgccaggcgccgggccaaggaacgctgggcggtggcgcgattagc
25 ggcggcagcacctattatgcggatagcgtgaaaggccgctttaccattagccgcgataacgcgaaaaacacctgacacctg
cagatgaacaacctgaaaccggaagataccgagatttattattgcggcccgccgctgaaagattggggccagggcaccga
ggtagccgtgagcagcccgcgagcaccgcccgcgaccgcccgcgagcccgcgagcaccgcccgcgagcccgcgagcccgcgagc

AO4B08 ScFv vHH

30

(SEKANS KİMLİK NUMARASI: 15)

EDQLVESGGGLVQPGGSLRPSCAAS**GFAFSSYA**LHWVRRAPGKGLEWVSA**IGT**
GGDTYYADSVMGRFTISRDNKKSlyLHMNSLIAEDMAVYYC**SLRMNGWRAH**
QPSTPPTPSPSTPPTSPS

35

CDR1 GFAFSSYA (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 22)
CDR2 IGTGGDT (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 24)
CDR3 SLRMNGWRAHQ (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 26)

5 AO4B08 ScFv vHH nükleotit sekansı

(SEKANS KİMLİK NUMARASI: 16)

gaagatcagctggtgaaagcggcggcggcctggtgcagccggcgaggcagcctgcgcccagctgcgaggcagcgg
ctttgcgttagcagctatgcgctgcattgggtgcgccgagccgggcaaaggcctggaatgggtgagcgcgattggcac
10 cggcggcgatacctattatgcggatagcgtgatgggccgtttaccattagccgcgataacgcgaaaaaagcctgtatctg
catatgaacagcctgattgcggaagatatggcgggtgattattgcagcctgcgcatgaacggctggcgcgcatcagccg
agcaccgccgaccgccgagccgccgaccgccgaccgccgagccgccgagc

AO4B08 greft edilmiş vHH

15

(SEKANS KİMLİK NUMARASI: 17)

QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTAS**GFAFSSYA**LGWFRQAPGQERWAVAA**IGT**
GGDTYYADSVKGRFTISRDNKNTVTLQMNILKPEDTAIYYC**SLRMNGWRAH**
QWGQGTQVTVSSPSTPPTPSPSTPPTPSPS

20

CDR1 GFAFSSYA (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 22)
CDR2 IGTGGDT (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 24)
CDR3 SLRMNGWRAHQ (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 26)

25 AO4B08 greft edilmiş vHH nükleotidi

(SEKANS KİMLİK NUMARASI: 18)

caggtgcagctggtgaaagcggcggcggcagcgtgcagcggcgaggcagcctgcgctgagctgcaccgcgagcgg
ctttgcgttagcagctatgcgctgggtggtttgccaggcggccagggaacgctgggcgggtggcggcgattggca
30 ccggcggcgatacctattatgcggatagcgtgaaaggccgtttaccattagccgcgataacgcgaaaaacaccgtgacc
tgcatgaacaacctgaaaccggaagataccgcgatttattattgcagcctgcgcatgaacggctggcgcgcatcagt
ggggccagggcaccaggtgaccgtgagcagccgagcaccgccgaccgccgagccgccgagcaccgccgaccgcc
gagccgccgagc

35

Referanslar:

- 1.Gump JM & Dowdy SF (2007) TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. *Trends in molecular medicine* 13(10):443-448.
- 5 2.EI-Andaloussi S, Holm T, & Langel U (2005) Cell-penetrating peptides: Mechanisms and applications. *Curr Pharm Design* 11(28):3597-3611.
- 3.Goun EA, Pillow TH, Jones LR, Rothbard JB, & Wender PA (2006) Molecular transporters: Synthesis of oligo-guanidinium transporters and their application to drug delivery and real-time imaging. *Chembiochem* 7(10): 1497-1515.
- 10 4.Meade BR & Dowdy SF (2007) Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. *Adv Drug Deliver Rev* 59(2-3):134-140.
- 5.Fischer R, Fotin-Mleczek M, Hufnagel H, & Brock R (2005) Break on through to the other side - Biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides. *Chembiochem* 6(12):2126-2142.
- 15 6.Nakase I, Takeuchi T, Tanaka G, & Futaki S (2008) Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Adv Drug Deliver Rev* 60(4-5):598-607.
- 7.Heitz F, Morris MC, & Divita G (2009) Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Brit J Pharmacol* 157(2): 195-206.
- 20 8.Gump JM, June RK, & Dowdy SF (2010) Revised Role of Glycosaminoglycans in TAT Protein Transduction Domain-mediated Cellular Transduction. *J Biol Chem* 285(2):1500-1507.
- 9.Norbury CC, Hewlett LJ, Prescott AR, Shastri N, & Watts C (1995) Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* 3(6):783-791.
- 25 10.Meier O, ve ark. (2002) Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol* 158(6):1119-1131.
- 11.Conner SD & Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422(6927):37-44.
- 30 12.Wadia JS, Stan RV, & Dowdy SF (2004) Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med* 10(3):310-315.
- 13.Skehel JJ, Cross K, Steinhauer D, & Wiley DC (2001) Influenza fusion peptides. *Biochem Soc T* 29:623-626.
- 35 14.Han X, Bushweller JH, Cafiso DS, & Tamm LK (2001) Membrane structure and fusion-

triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nat Struct Biol* 8(8):715-720.

15. Sakuma T, Higashiyama S, Hosoe S, Hayashi S, & Taniguchi N (1997) CD9 antigen interacts with heparin-binding EGF-like growth factor through its heparin-binding domain. *Journal of biochemistry* 122(2):474-480.

16. Higashiyama S, Abraham JA, & Klagsbrun M (1993) Heparin-Binding EGF-Like Growth-Factor Stimulation of Smooth-Muscle Cell-Migration - Dependence on Interactions with Cell-Surface Heparan-Sulfate. *J Cell Biol* 122(4):933-940.

17. Thompson SA, ve ark. (1994) Characterization of Sequences within Heparin-Binding EGF-Like Growth-Factor That Mediate Interaction with Heparin. *J Biol Chem* 269(4):2541-2549.

18. Kaplan IM, Wadia JS, & Dowdy SF (2005) Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropi-nocytosis (vol 102, pg 247, 2005). *J Control Release* 107(3):571-572.

19. Lawrence R, Lu H, Rosenberg RD, Esko JD, & Zhang LJ (2008) Disaccharide structure code for the easy representation of constituent oligosaccharides from glycosaminoglycans. *Nat Methods* 5(4):291-292.

20. Lin X, ve ark. (2000) Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice. *Dev Biol* 224(2):299-311.

21. Dick E, Matsa E, Young LE, Darling D, & Denning C (2011) Faster generation of hiPSCs by coupling high-titer lentivirus and column-based positive selection. *Nat Protoc* 6(6):701-714.

22. Anderson RGW (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67:199-225.

23. Nichols BJ & Lippincott-Schwartz J (2001) Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* 11(10):406-412.

24. Liu NQ, ve ark. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropi-nocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol* 76(13):6689-6700.

25. West MA, Bretscher MS, & Watts C (1989) Distinct Endocytotic Pathways in Epidermal Growth Factor-Stimulated Human Carcinoma A431 Cells. *J Cell Biol* 109(6):2731-2739.

26. Sampath P & Pollard TD (1991) Effects of Cytochalasin, Phalloidin, and Ph on the Elongation of Actin-Filaments. *Biochemistry-U S A* 30(7):1973-1980.

27. Oliver JM, Berlin RD, & Davis BH (1984) Use of Horseradish-Peroxidase and Fluorescent Dextran to Study Fluid Pinocytosis in Leukocytes. *Method Enzymol* 108:336-

347.

28.Araki N, Johnson MT, & Swanson JA (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropi-nocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* 135(5):1249-1260.

5 29.Seglen PO, Grinde B, & Solheim AE (1979) Inhibition of the Lysosomal Pathway of Protein-Degradation in Isolated Rat Hepatocytes by Ammonia, Methylamine, Chloroquine and Leupeptin. *Eur J Biochem* 95(2):215-225.

30.Eustice DC & Wilhelm JM (1984) Mechanisms of Action of Aminoglycoside Antibiotics in Eukaryotic Protein-Synthesis. *Antimicrob Agents Ch* 26(1):53-60.

10 31.Yu JY, Chau KF, Vodyanik MA, Jiang JL, & Jiang Y (2011) Efficient Feeder-Free Episomal Reprogramming with Small Molecules. *Plos One* 6(3).

32.Warren L, ve ark. (2010) Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7(5):618-630.

15 33.Kim D, ve ark. (2009) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4(6):472-476.

34.Zhou HY, ve ark. (2009) Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins (vol 4, pg 381, 2009). *Cell Stem Cell* 4(6):581-581.

20 35.Takahashi K, ve ark. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861-872.

36.Dixon JE, ve ark. (2010) Axolotl Nanog activity in mouse embryonic stem cells demonstrates that ground state pluripotency is conserved from urodele amphibians to mammals. *Development* 137(18):2973-2980.

25 37.Chambers I, ve ark. (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113(5):643-655.

38.Robinton DA & Daley GQ (2012) The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481(7381):295-305.

39.Do Kwon Y, ve ark. (2005) Cellular manipulation of human embryonic stem cells by TAT-PDX1 protein transduction. *Mol Ther* 12(1):28-32.

30 40.Hidema S, Tonomura Y, Date S, & Nishimori K (2012) Effects of protein transduction with intact myogenic transcription factors tagged with HIV-1 Tat-PTD (T-PTD) on myogenic differentiation of mouse primary cells. *J Biosci Bioeng* 113(1):5-11.

41.Liang QL, Mo ZY, Li XF, Wang XX, & Li RM (2013) Pdx1 protein induces human embryonic stem cells into the pancreatic endocrine lineage. *Cell Biol Int* 37(1):2-10.

35 42.Bichsel C, ve ark. (2013) Direct Reprogramming of Fibroblasts to Myocytes via

Bacterial Injection of MyoD Protein. Cell Reprogram 15(2):117-125.

43.Chan EM, ve ark. (2009) Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. Nat Biotechnol 27(11):1033-U1100.

5 44.Smith KP, Luong MX, & Stein GS (2009) Pluripotency: Toward a Gold Standard for Human ES and iPS Cells. J Cell Physiol 220(1):21-29.

45.Burridge PW, ve ark. (2011) A Universal System for Highly Efficient Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells That Eliminates Interline Variability. Plos One 6(4).

10 46.Campbell RE, ve ark. (2002) A monomeric red fluorescent protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(12):7877-7882.

47.Okamoto T, ve ark. (2002) Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. Biochem Bioph Res Co 295(2):354-361.

48.Anderson D, ve ark. (2007) Transgenic enrichment of cardiomyocytes from human embryonic stem cells. Mol Ther 15(11):2027-2036.

15 49.Claycomb WC, ve ark. (1998) HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(6):2979-2984.

20 50.Dixon JE, Dick E, Rajamohan D, Shakesheff KM, & Denning C (2011) Directed differentiation of human embryonic stem cells to interrogate the cardiac gene regulatory network. Mol Ther 19(9):1695-1703.

51.Medina D, Moskowitz N, Khan S, Christopher S, & Germino J (2000) Rapid purification of protein complexes from mammalian cells. Nucleic Acids Res 28(12).

25 52.Novak A, Guo CY, Yang WY, Nagy A, & Lobe CG (2000) Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. Genesis 28(3-4):147-155.

53.Bayoussef Z, Dixon JE, Stolnik S, & Shakesheff KM (2012) Aggregation promotes cell viability, proliferation, and differentiation in an in vitro model of injection cell therapy. J Tissue Eng Regen M 6(10):e61-e73.

30 **Hücre Penetran Peptitler Kullanılarak Demir Oksit Nanopartikül Alınım Etkinliğinin Geliştirilmesi**

Önceki teknik

35 Süperparamanyetik Demir Oksit nanopartiküller (SPIIONS), bir demir oksit çekirdek ve yüzey

5 kaplamadan oluşan küçük oldukça manyetize partiküllerdir. SPIONS, MRI kontrast ajanlarda¹ kullanıma yönelik klinik olarak onaylanmıştır ve günümüzde hedeflenmiş ilaç dağılımı hipertermi tedavisi ve hücre etiketlemede³ kullanıma yönelik olarak araştırılmaktadır SPIONS, MRI kontrast ajanlarında kullanıma yönelik onaylanmıştır ve ticari olarak mevcut ürünler, Lumiren, Resivist ve Feridex'i kapsamaktadır¹

10 SPIONS uygulaması hücrelerin içine içselleştirilmekte olan yeterli bir konsantrasyonu gerektirmektedir ve nanopartiküllerin gerekli hedeflenmesi olmadan etkisiz bir çözüme yol açabilmektedir. Hücre içselleştirmesinin etkinliği, örnek vermek gerekirse⁴ boyut, kaplama ve ek ligandlara bağlı olabilmektedir. Literatür, içselleştirme ajanları tutturulmadan, araştırmacıların hücre başına 15-30 pg'lık bir aralıkta elde ettiğini göstermektedir^{5,6}. Nanopartikül kaplama üzerindeki fonksiyonel gruplardan, monoklonal antikolar, hücre penetran peptitler ve içselleştirme ajanları olarak küçük moleküllerin tutturulmasıyla hücre içselleştirilmesinin artırılmasına hedef alması için faydalanılabilmektedir.⁷

15

Günümüzde araştırılan bir hücre penetran peptit, Arg-Gly-Asp'dir (RGD). RGD, $\alpha v \beta 3$ intergrini hedef alması için tasarlanmıştır. İntergrin, yaygın biçimde kanser hücrelerinde bulunabilmektedir, dolayısıyla ayrıca bir hedefleme peptiti olarak kullanılabilir. Araştırma, RGD peptidinin, nanopartikül aldığı %50 oranında artırılmıştır.⁹

20

Aşağıdaki çalışma, buradaki buluşa ait bir hücre penetran peptide, özellikle P218R'ye odaklanmaktadır Peptit, iki alana sahiptir, P21, hücre zarfında heparan sülfata (HS) bağlanmaktadır ve 8R, aktarıma yardımcı olmaktadır Çalışmanın amacı P218R'nin etkinliğini tanımlamak ve bunun mekanizmasını araştırmaktır

25

Malzemeler ve Yöntemler

Nanopartikül etiketleme

30 0.5M MES tamponunda çözünen 0.1 M NHS'ye sahip bir 31 mM EDAC, sırasıyla 1:5'lik bir oranda Nanomag-D (250 nm) partiküllerine eklenmiştir ve 1 saat boyunca karıştırılmıştır Sonrasında partiküller, bir 0.1M MES tamponunda yıkanmaktadır ve aynı tamponda çözünen gerekli etiketleme ajanının 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 'si, etiketleme çözeltisi ve nano-partiküllerin 1:1'lik bir oranını vermesi için eklenmiştir, etiketleme çözeltisinin bir alikvotu, etiketleme etkinliğinin test edilmesi için tutulmuştur. Daha sonra solüsyon, 3 saat boyunca oda sıcaklığında sürekli

35

olarak karıştırılmaktadır. Partiküller etiketlendiğinde, 25 mM'lik bir glisin çözeltisi partiküllere eklenmektedir, sonrasında 30 dakika boyunca daha fazla inkübe edilmektedir. Etiketleme çözeltisinin bir alikotu, daha önceki alikot ve PBS'de %0.1 BSA'da bulunan partiküller ile karşılaştırılmasına için tutulmaktadır. Partiküller, nihayetinde 1 mg/ml'lik bir çözelti vermesi için PBS'de %0.1 BSA'da seyreltilmektedir. Etiketleme çözeltisinin her iki alikotu ve etiketlenmiş nanopartiküllerin bir kısmının floresans için değerlendirilmiştir.

Hücre Kültürü

10 NIH 3T3 fibroblast hücreleri, Dulbecco'nun modifiye Kartal ortamında (DMEM; Gibco) kültürlenmiştir, 37°C ve %5 CO₂'de hacim cinsinden %10 Fetal Buzağ Serumu (FCS, Sigma), 2mM L-glutamin ve (PS) ile takviye yapılmıştır. Sonrasında hücreler, konflüente kadar kültürlenmiştir.

15 Hücre Etiketleme

Konflüent hücreler, 200,000 hücre/kuyucukta 12 kuyucuklu plakalara bölünmüştür ve 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. 24 saat sonra 50 µg Nanomag-D demir oksit nanopartiküller (250 nm) ve 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 2, 1, 5 ve 10 µm hücre penetran peptitten biri, ya %10 FCS DMEM ya da serumsuz DMEM ortamına hücrelere eklenmiştir ve 24 saat boyunca demir nanopartiküllerinin içselleştirilmesi için bekletilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler, fazla nanopartikülleri gidermek için PBS'de yıkandıktan sonra nitel Prusya mavisi boyama, nicel kolorimetrik demir tahlili veya floresan aktive akış sitometrisi için hasat edilmiştir.

25

Prusya Mavisini Boyama

Hücreler etiketlenmiştir, sonrasında 4°C'de 15-20 dakika boyunca ağzı kapalı hacim cinsinden %4 PFA'da onarılmıştır. %2.5 HCL'de %2.5 potasyum ferrosiyanyürün bir boyama çözeltisi, hücrelere eklenmiştir ve oda sıcaklığında bir saat boyunca inkübe edilmiştir. Nanopartiküllerin mevcut olması halinde, demir konsantrasyonuna orantılı bir mavi boyama meydana gelmiştir.

Nicel Kolorimetrik Demir Tahlil Hücreleri etiketlenmiştir, tripsinize edilmiştir ve peletlenmiştir, sonrasında tüm ortam giderilmiştir. 40 µl %37 HCL hücrelere eklenmiştir ve çözünene kadar 70°C'de ısıtılmıştır. Sonrasında 50µl NaOH ile nötrleştirilmiştir. Yüksek bir demir

konsantrasyonunu kapsayan o numuneler, 1:10 seyreltilmiştir, sonrasında 40 µL Quantichrom işleyen reaktif eklenmiştir ve Quantichrom demir tahlilindeki talimatlar izlenmiştir.

5 Akış Sitometrisi

Hücreler, 50 µg Nanomag-D partikülleri, 1 µM P218R ve 0, 0.1, 1 ve 5 µg/ml FitC-BSA'da biri ile etiketlenmiştir. Sonrasında hücreler, onarımlı hücrelerdir ve yeşil floresanla değerlendirmek için bir Coulter Altra akış sitometresinin içinden geçirilmektedir. Bulgular, sonrasında Wesal yazılım ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

Sonuçlar

Nanopartikül ve Hücre etiketleme

Nanomag-D (250 nm) partikülleri, şekil 32'de gösterildiği üzere mR, P21mR, 8RmR ve P21mR8R ile başarılı bir şekilde etiketlenmiştir. Grafikler, etiketleme sonrası solüsyonunda floresanda bir indirgenmeyi ve proteinin, karboksilik asit grubu ile tepkimeye girdiği ve Nanomag partiküllerinin yüzeyine bağlandığı hipotezini kuran partiküller üzerinde artmış bir floresan açığı bir şekilde göstermektedir. Grafikler, proteinin tamamıyla partikül yüzeyi ile tepkimeye girmediğini ancak proteinlerin aşırı derecede eklenmesi göz önünde bulundurulduğunda bunun bir sorun olarak görülmediğini göstermektedir. Grafiklerin bir başka özelliği, 8R ile karşılaştırılan P21 alanındaki floresan etiketleme sonrasında daha aydınlatıcı bir indirgenme olduğu için partiküllere bağlanmaya yönelik daha yüksek bir afinite ve P21'e yönelik nanopartiküllerden sergilenen daha yoğun bir sinyale sahiptir. Proteinin, partiküllerin bağlama kapasitesinin fazlalığında eklenmesi göz önünden bulundurulduğunda bu tür bir indirgenme beklenmemiştir. P21 alanındaki rolü, bir hücre zarında HS'ye bağlanmasında ayrıca proteinin, iki maddenin benzer yapıları göz önünde bulundurulduğunda partiküllerin dekstran yüzeyine bağlandığı sonucuna varabilmektedir.

P21'in dekstran yüzeyine bağlandığı hipotezini daha fazla test etmek amacıyla, P21mR8R ile önceden etiketlenmiş olan her iki partikül hücrelere eklenmiştir ve partiküller ve P218R, hücrelere ayrı bir şekilde eklenmiştir. Prusya mavisini boyanmış sonuçlar şekil 32'de gösterilmektedir. Etiketlenmemiş partikül kontrolü için hiçbir mavi boya görülmemiştir, bu nedenle sadece bir sayıda partikül sonucuna varılması hücreler ile ilişkilendirilmiş olmalıdır.

Ancak her iki değişken için boya, tepkimeye girip protein önceden bağlanmadığında bile mavi bir renk üretmiştir. Protein, partikül alınma meydana gelmesi amacıyla bazınoktalarda partiküle bağlanmalı. En olası hipotez, P21'in, dekstran yüzeyine bağlanmasıdır.

5 Nanopartikül Alınma Nicel Değerlendirmesi

Protein Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Şekil 33'te gösterildiği üzere Prusya mavisi boyama, P218R'nin, tek başına P21 ve 8R ile karşılaştırıldığında partikül alınma en etkili peptididir. Demir tahlili sonuçları hücrelerin, 1µM P218R ve 50µg Nanomag-D partikülleri ile 24 saat boyunca inkübe edilmesi durumunda partiküllerin %100'ünün, hücreler ve 63 pg/hücre ile ilişkili hale geldiğini göstermiştir. Bu nedenle yalnızca 1 µM P218R'nin, %100 partikül alınma için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

15

Nanopartikül Hücre İlişkilendirmesi için gerekli sürenin değerlendirilmesi

Tüm sonuçlar, optimum nanopartikül hücre ilişkilendirmesinin, şekil 34'te gösterildiği üzere 24 saatte olduğunu belirtmiştir. 24 saatlik zaman noktasında partiküllerin %100'ü hücreler ile ilişkilendirildiği için; bu ayrıca şekil 33'te gösterilen sonuçlara uymaktadır. Grafik ayrıca, eklenmiş peptit ile partikül alınma dramatik artışın bariz kanıtıdır. Bu bilgiden yola çıkarak yüzde alınma 24 saat sonra eklenmiş peptit olmadan %7'den eklenmiş peptit ile %96'ya artmaktadır.

25 Serumsuz Ortam Etkisi

Şekil 35'teki sonuçlar, serum yüzdesi %20'ye arttıkça alınma %30'luk bir azalma göstermektedir. Bu azalma, yalnızca 1 µM P218R eklenmesi durumunda %16'ya azalmaktadır. Serum miktarı arttıkça alınmadaki bu azalma, endositozda azalmaya atfedilmiştir, çünkü serumsuz koşullar, besinlerdeki azalmadan dolayı endositozu indüklemektedir. Endositoz indirgenmesinin, peptit eklendiğinde azalmasında halinde, endositozu artırabileceği varsayılabilir. Peptit eklemenin, hücreler tarafından alınan Fitc-BSA miktarı arttıkça endositozu artırıyor bulunmuştur, öte yandan nanopartiküller, alınma etkilememiştir, bu sonuçlar, şekil 35'te bulunmaktadır. Fitc-BSA alınmadaki artış partikül alınma da bir artışa yol açan endositozda bir artış ile ilişkilendirilebilmektedir. Hücrelerin, serumsuz koşullarda olması

35

durumunda daha az ayırtıcı bir fark mevcuttur, çünkü tek başına serumsuz endositozu artırmaktadır.

P21 bağlanmasında yönelik Rekabetçi Faktörler

5

P21'in, hücre zarlarında HS'ye bağlandığı kanıtlanmıştır. Bu nedenle heparinin, ortama eklenmesi halinde bağlanmayacağı ve dolayısıyla nanopartikül alınma rekabetçi biçimde inhibe edeceği hipotezi yapılabilmektedir. Sonuçlar, şekil 35'te gösterilmektedir. Grafik, heparinin, bağlanmaya yönelik bir inhibitör olduğunu kanıtlamaktadır ve inhibisyon derecesi, P21'in, hücre zarındaki HS'ye göre heparin için daha yüksek afiniteye sahip olduğunu kanıtlamaktadır ve dolayısıyla P21 bağlanmasında, nanopartiküllerin alınma mekanizması için esas olduğunu kanıtlamaktadır. P21 ayrıca, nanopartiküllerin yüzeyinde dekstrana bağlanabilmektedir, dolayısıyla dekstranın artan konsantrasyonlarında ortama eklenmiştir. Sonuçlar, şekil 35'te gösterilmektedir. Dekstran konsantrasyonu arttıkça nanopartikül alınmada %18'lik bir azalma mevcuttur. Dekstran, partikül bağlanması için rekabetçi bir inhibitör olarak işlev gösterecektir ve inhibisyonda sınırlıdır. Dolayısıyla P21, hücre zarı için daha yüksek bir afiniteye sahiptir.

10

15

Açıklama

20

Sonuçlar, küçük bir miktarda P218R eklenmesinin, %100 demir oksit nanopartikülü alınma yol açtığını göstermektedir. Hücrelerin mikroskopisi ve tripsinizasyonu, partiküllerin içselleştirildiğini belirtmektedir. Deneyler ayrıca, partiküllerin %90 ilişkilendirilmesini gösteren mezenkimal kök hücreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Alınma arkasındaki mekanizma, peptidin iki alanının simbiyotik eylemine bağlıdır. Hipotez, P21'in, hem hücre zarındaki HS'ye hem de nanopartiküllerin kaplamasındaki dekstrana bağlanabilmesine dairdir, peptit, bu vasılayla hem nanopartikülün hem de hücrenin her ikisinin aynı P21'e tutturulabildiği çoklu bağlama noktalarından birine sahiptir. Bu nedenle partiküle önceden bağlanan protein, ayrıca partikülü hücrenin yakın çevresinde tutan membrana bağlanabilmektedir. Sonrasında 8R, endositoz ile nanopartikül aktarımında yardımcı olabilmektedir. Veya diğer mekanizma, peptidin nanopartiküle önceden bağlanmasında kapsayabilmektedir, sonrasında bir hücre zarında yakın çevresinde olması durumunda HS, daha yüksek bir bağlanma etkinliğine sahiptir, dolayısıyla P21 hücreye bağlanmaktadır. Bu, sonrasında içselleştirilmekte olan partiküle yol açabilmektedir. P218R'nin kullanılması dair avantajlar, in vivo çevre ile daha fazla ilişkilendirilebilen serum ortamındaki etkinliği ve sistemin, nanopartiküllerin yüzey

25

30

35

kaplamasında fonksiyonel grup kullanılmıgerektirmemesidir. Serbest fonksiyonel grup, hedef alan moleküller veya ilaçlar, partiküle kovalent biçimde tutturulabildiğini ifade etmektedir.

5 Netice

Peptit P218R'nin, nanopartiküllerin %100 hücre ilişkilendirmesine neden olduğu bulunmuştur. Bunun, pek çok uygulama, örneğin antikorların tutturulmasıyla nanopartiküllerin spesifik dokular için hedef alınması veya ilaç dağıtım için kullanılabilen bir dekstran bağlama mekanizmasından kaynaklandığı bulunmuştur.

Referanslar

- 1.Singh, A & Sahoo, S, (2013), Magnetic Nanoparticles: a novel platform for theranostics, Drug Disc Today,
- 2.Arruebo, M ve ark., (2007) Magnetic Nanoparticles for drug delivery, Nanotoday, 3, 22
- 3.Wang, Z ve Cuschieri A, (2013) Tumor cell labelling by magnetic nanoparticles with determination of intracellular iron content and spatial distribution of the intracellular iron, Int. J. Mol. Sci, 14, 9111
- 4.Sun, C, Lee, J ve Zhang, M, (2008), Magnetic Nanoparticles in MR Imaging and drug delivery, Adv Drug Deli Rev, 60, 1253
- 5.Schlorf, T ve ark., (2011), Biological properties of iron oxide nanoparticles for cellular and molecular magnetic resonance imaging, Int. J. Mol. Sci. 12, 12
- 6.Markides, H ve ark., (2013) Whole body tracking of superparamagnetic iron oxide nanoparticle labelled cells - a rheumatoid arthritis mouse model, Stem cell Res & ther, 4, 126
- 7.Peng ve ark., (2008), targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumour imaging and therapy, Int. J. of Nanomed. 3, 311
- 8.Zhang, C ve ark., (2007), Specific Targeting of Tumor Angiogenesis by RGD-Conjugated Ultrasmall Superpara-magnetic Iron Oxide Particles Using a Clinical 1.5-T Magnetic Resonance Scanner, Can. Res. 67, 1555
- 9.Ji, S ve ark., (2012), RGD-conjugated albumin nanoparticles as a novel delivery vehicle in pancreatic cancer therapy, Cancer Biology & Therapy 13:4, 206.

35

GET (Glikozaminoglikan (GAG)-bağlayıcı Geliştirilmiş Aktarıcı) aracılığıyla Terapötik Moleküllerin Etkili Hücre Tipi Spesifik İletimine Yönelik Modifiye CPP'ler

Giriş

5

Bu çalışmanın birinci amacı mRFP'nin P21 8R'ye sahip hücrelerin içine iletilmesinde GET-aracılı sinerjistik artışın, P21'in, büyüme faktörü kaynaklı HS-GAG bağlama alanları ile değiştirilmesi durumunda gözlemlenip gözlemlenemediğini araştırmaktır. Bu çalışmanın ikinci amacı spesifik bir hücre yüzeyi HS-epitopu hedef alınarak hücrelerin heterojen bir popülasyonunda hücre tipi spesifik iletimi göstermektir. Merry ve ark. mezodermal diferansiyasyon esnasında hücrelerin bir alt popülasyonun hedef alınmasında bir HS-epitop bağlama antikorunun kullanıldığını göstermiştir [13]. Bu antikorun değişken bölgesi, hücre tipi spesifik iletimin bir örneğini göstermek için 8R'ye konjuge edilmiştir. Bu çalışmanın üçüncü amacı terapötik biyomoleküllerin GET-aracılı iletimini göstermektir. Raportör genin (pSIN GFP) transfeksiyonu, P21 LK15 8R peptit ile optimize edilmiştir ve bir 'alt standart' ticari lipit esaslı transfeksiyon reaktifi Lipofektamin2000 ile karşılaştırılmıştır.

10

15

GET aracılığıyla Hücre Tipi Spesifik İletim

20 *DeneySEL Prosedürler*

Peptitlerin Preparasyonu

Peptitler, mRFP, mRFP 8R, P21 mRFP 8R, FGF1A mRFP, FGF1A mRFP 8R, FGF2A mRFP, FGF2A mRFP 8R, FGF4A mRFP, FGF4A mRFP 8R, FGF7A mRFP, FGF7A mRFP 8R, FGF1B mRFP, FGF1B mRFP 8R, FGF2B mRFP, FGF2B mRFP 8R, FGF4B mRFP, FGF4B mRFP 8R, FGF7B mRFP, FGF7B mRFP 8R, FGF1C mRFP, FGF1C mRFP 8R, FGF2C mRFP, FGF2C mRFP 8R, FGF4C mRFP, FGF4C mRFP 8R, FGF7C mRFP, FGF7C mRFP 8R, ATIII mRFP, ATIII mRFP 8R, PDGF mRFP, PDGF mRFP 8R, VEGF mRFP, VEGF mRFP 8R, HS4C3 mRFP ve HS4C3 mRFP 8R, BL21 (DE21) pLysS *Escherichia coli* (Novagen) ekspres edilen pGEX6-PI vektörünün (Novagen) içine cDNA'lar olarak klonlanmıştır ve daha önce açıklanan biçimde saflaştırılmıştır [12]. Bütünlük ve tam uzunlukta peptit ekspresyonu, SDS-PAGE ile doğrulanmıştır. Rekombinant peptitlerinin floresan TEACAN infinite 200PRO çok modlu okuyucu kullanılarak doğrulanmıştır. Numuneler arasındaki floresan yoğunluk ölçümlerindeki fark < %10'dur.

30

35

Peptit Tahlili

Bradford tahlili, protein konsantrasyonunu nicemlendirmek için kullanılmaktadır [14]. Absorbans, bir standart olarak rekombinant mRFP protein kullanılarak 595nm'de ölçülmüştür [12]. Numuneler, TECAN infinite 200PRO çok modlu okuyucu kullanılarak analiz edilmiştir.

NIH3T3, CGR-8 ve HUES7 Hücrelerinin Hücre Kültürü

NIH3T3, CGR-8 ve HUES7 hücreleri, daha önce açıklanan biçimde büyütülmüştür ve sürdürülmüştür [12]. NIH3T3 fare fibroblast hücreleri, Dulbecco'nun modifiye Eagle ortamında (DMEM) 2mM L-glutamin ve 100 ug/ml streptomiyosin ile takviye yapılan hacim cinsinden %10 fetal kalf serumu (FCS) ile sürdürülmüştür. CGR-8 fide embriyonik kök hücreleri, 1000 birim/ml lösemi inhibitör faktör (LIF), 100µM β-mekaptoetanol, 2mM L-glutamin ve 100ug/ml streptomiyosin ile takviye yapılan hacim cinsinden %20 FCS ile DMEM'de sürdürülmüştür. HUES7 insan embriyonik kök hücreleri, jelatin kaplı doku kültür cam şişesinde kültürlenmiştir. Hücreler, 1000 birim/ml LIF, 100µM β-mekaptoetanol, 2mM L-glutamin ve 100ug/ml streptomiyosin ile takviye yapılan hacim cinsinden %20 FCS ile DMEM'de sürdürülmüştür. Tüm hücreler, nemlendirilmiş %5 CO₂ koşullar altında 37°C'de inkübe edilmiştir.

Hücelere Peptit İletimi

Hücreler, 12-kuyucuklu plakalarda 2 x 10⁵ hücre/kuyucukta tohumlanmıştır ve bir %5 CO₂ nemlendirilmiş inkübatörde 37°C'de 1mL'lik ilgili büyüme ortamında (GM) 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Peptit, 500ul GM'de 20ug/ml'ye seyreltilmiştir. Hücrelerin her bir çukurcuğu havalandırılmış fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmıştır ve 500ul peptit çözeltisi ile değiştirilmiştir. Hücreler, bir %5 CO₂ nemlendirilmiş atmosferde 37°C'de 20 saat boyunca peptit ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücrelerin her bir çukurcuğu, PBS ile yıkanmıştır akış sitometrisine yönelik preparasyonda %3.7 paraformaldehit (PFA) ile tripsinize edilmiştir ve onarılmıştır. Her bir deney, iki kopya halinde yapılmıştır ve 3 defa tekrarlanmıştır n=3.

Bry-GFP ES Hücrelerinin Sürdürülmesi ve Diferansiyasyonu, EB'lerin Üretimi

35

Bry-GFP murin embriyonik kök hücre hattı sürdürülmüştür ve daha önce açıklanan biçimde farklılaştırılmıştır [13]. Bry-GFP hücreleri, DMEM-ES'de besleyicilerde sürdürülmüştür (1.5×10^5 M *monofiyogliserol* (MTG), 10ng/ml LIF ve 2mM L-glutamin ile takviye yapılan %15 FCS'ye sahip DMEM).

5

Bry-GFP hücreleri, EB'ler olarak farklılaştırılmıştır. Diferansiyasyondan önce hücreler, iki defa geçirilmiştir, ilk olarak DMEM-ES'de jelatin kaplı bir cam şişenin üzerine ve ikinci olarak *İscove'nin modifiye Dulbecco ortamı* (IMDM)-ES'de bir cam şişenin içine geçirilmiştir (1.5×10^4 M *monofiyogliserol* (MTG), 10ng/ml LIF ve 2mM L-glutamin ile takviye yapılan %15 FCS'ye sahip IMDM). Sonrasında hücreler, 4×10^4 M MTG, 300ug/ml transferin, 25ug/ml askorbik asit ve Petri-kademeli tabaklarda 2mM L-glutamin ile takviye yapılan %15 FCS'ye sahip IMDM'de 2.8 gün boyunca EB'ler olarak farklılaştırılmıştır. Çözüşümden 3 saat önce EB'ler, 50ug/ml HS4C3 mRFP veya HS4C3 mRFP 8R ile tedavi edilmiştir. Diferansiyasyonun ardından EB'ler, hücre çözüşüm tamponunda 10 dk inkübasyon ve çalkalama ile tekli hücreler halinde ayrılmıştır ve PFA'da onarılmıştır.

10

15

Akış Sitometrisi Analizi

Hücreler, bir 488nm yeşil lazer ve/veya 633nm kırmızı lazer kullanılarak bir MoFlo™ DP (DAKO) Akış Sitometresinde analiz edilmiştir. (40,000 hücre; ön/yan saçılım ile canlı hücreler üzerinde geçit yapılmıştır). Medyan floresan, istatistiksel analiz için kullanılmıştır.

20

Sonuçlar ve İnceleme

GET'i Kapsaması İçin Modifiye Edilen CPP'ler

25

Bu çalışmada fibroblast büyüme faktörü (FGF)-1, FGF-2, FGF-4, FGF-7, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve antitrombin-III'ün (ATIII) HS-GAG bağlayıcı alanları 8R ile birleştirilmiştir. Bu büyüme faktörleri, embriyonik gelişme ve anjiyogenezde önemli biyolojik roller oynamaktadır. Ayrıca P21'e benzer şekilde, hücre yüzeyi HS-GAG'ler ile etkileşime geçtiği gösterilmiştir. H 3T3 murin fibroblast, CGR8 murin embriyonik kök hücreler ve HUES-7 insan embriyonik kök hücreler, peptitlerden herhangi birinin, mRFP iletiminde bir GET-aracı olarak artışı sergileyip sergilemediğini araştırmak için bu modifiye CPP'ler ile tedavi edilmiştir (Şekil 37). Ayrıca modifiye peptitlerden herhangi birinin, farklı hücre türlerinden herhangi birinde daha bolca eksprese edilmiş olan HS epitopları tercih hedef almayacağına

30

35

araştırması önemlidir.

Hücrelerin için GET-aracı geliştirilmiş aktarımları gösteren dört modifiye CPP'nin bir paneli tanımlanmıştır. P21 8R, FGF2B 8R, FGF7B 8R ve PDGF 8R, tek başına bir 8R'yi fazla kullanarak hücrelerin içine mRFP'nin aktarımında 30-100 kat artış sergilemiştir (Şekil 38 ve 39). P21 8R, FGF7B 8R ve PDGF 8R, HUES-7 embriyonik kök hücrelerin içine tercih edilen aktarımları göstermiştir. Bu, aktarım yapılıncaya kadar zor olduğu düşünülen bir hücre türünün içine CPP'lerin tercih edilen aktarımları sergilemektedir. FGF2B 8R, CGR8 ve HUES7 embriyonik kök hücrelerinin içine pluripotensi spesifik aktarımları göstermiştir. Üç hücre türünün içine modifiye CPP'lerin farklı iletim profilleri, farklı büyüme faktörlerinin HS-GAG bağlayıcı alanları farklı hücre yüzeyi HS-epitopları hedef aldığı ve bağladığı önermektedir. Spesifik hücre türleri ile daha bol biçimde eksprese edilen HS-epitopları hedef alınması uygulamalar için daha uygun olan CPP'lerin seçimi için kullanılabilmektedir.

15 GET Aracı Plazmid DNA İletimi

Deneysel Prosedürler

Peptitlerin Preparasyonu

20

P21-LK15-8R peptidi, katı faz t-Boc kimya (Novabiochem (Beeston, Nottinghamshire, UK)) kullanılarak sentezlenmiştir.

Hücre kültürü

25

NIH3T3 fare fibroblast hücreleri, DMEM'de 2mM L-glutamin ve 100ug/ml streptomiyosin ile takviye yapılmış hacim cinsinden %10 fetal buzağı serumu (FCS) ortamı ile sürdürülmüştür. Hücreler, nemlendirilmiş %5 CO₂ koşullar altında 37°C'de inkübe edilmiştir.

Plazmid DNA Preparasyonu

30

DNA (pSIN GFP), E. coli'de çoğaltılmış DNA, bir QIAGEN Plazmid Maksi kiti (Qiagen) kullanılarak ekstrakte edilmiştir ve saflaştırılmış DNA, %100 etanolde çöktürülmüştür ve dH₂O'da rehidre edilmiştir. Plazmid saflığı nanodamlarla kullanılarak uydurulmuştur.

35

Peptit-DNA Kompleks Oluşturma Tahlili

10ug DNA, 60ul 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan-sülfonik asit (HEPES)-tamponlu salinde (10mM HEPES, 150mM sodyum klorür (NaCl) çözeltisi, pH 7.4) seyreltilmiştir. 1mM YO-PRO-1
5 istif çözeltisi, 0.1mM dimetil sülfoksitte (DMSO) seyreltilmiştir. 2.7ul seyreltilmiş YO-PRO-1 çözeltisi, HEPES-tamponlu çözeltide 60ul'ye kadar üretilmiştir ve seyreltilmiş DNA'ya damlalar halinde eklenmiştir. DNA/YO-PRO-1 solüsyonu karıştırılmış ve folyoya sarılmış ve oda sıcaklığında 5 saat boyunca inkübe edilmiştir. 5 saat sonra DNA/YO-PRO-1 çözeltisi, HEPES-tamponlu çözeltide 1ml'ye kadar üretilmiştir ve 100ul alikuot, tedavi koşulu başında eppendorf
10 tüplerinin içine pipetlenmiştir. Arzu edilen (+/-) yük oranlarında karşılaşılan peptit miktarları her bir eppindorfa eklenmiştir (Ek 1). Peptit/DNA/YO-PRO-1 solüsyonları karıştırılmış ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sonrasında floresan ölçümleri, TECAN infinite 200PRO çok modlu okuyucu kullanılarak analiz edilmiştir. Benzer şekilde, 120ul HEPES-tamponlu salinde seyreltilmiş YO-PRO-1 çözeltisinin 2.7ul'sini seyrelterek ve
15 yukarıdaki prosedürü takip ederek hiçbir DNA kontrolü yapılmamıştır.

Transfeksiyon Deneyinin Tasarımı ve Optimizasyonu

Hücreler, 12-kuyucuklu plakalarda kuyucuk başında 80,000 hücrede tohumlanmıştır ve bir %5
20 CO₂ nemlendirilmiş inkübatörde 37°C'de 1mL %10 GM'de bir gecede inkübe edilmiştir. Nükleik asit verilecek hücrelerin her bir çukurcuğu için DNA, 100ul Opti-MEM®'de seyreltilmiştir ve karıştırılmış Peptit, optimal (+/-) yük oranında seyreltilmiş DNA'ya doğrudan eklenmiştir. Çözelti sonrasında karıştırılmış ve oda sıcaklığından 25 dk boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler havalandırılmış PBS ile yıkanmıştır ve 400ul Opti-MEM® ile
25 değiştirilmiştir. Hücrelerin her bir çukurcuğu, 100ul Peptit/DNA kompleksi ile tedavi edilmiştir ve bir %5 CO₂ nemlendirilmiş atmosferde 37°C'de inkübe edilmiştir. Ek 2, her bir kuyucuk için kullanılan farklı tedavi koşullarını göstermektedir. İnkübasyonun ardından hücreler, PBS ile yıkanmıştır ve 1ml GM ile değiştirilmiştir. 48 saat sonra hücrelerin her bir çukurcuğu, PBS ile yıkanmıştır ve %3.7 PFA ile tripsinize edilmiştir ve onarılmıştır. Deneyler, 3 defa tekrarlanmıştır.

30 Lipofektamin2000 transfeksiyon optimizasyonu, imalatçılarının kılavuzunda (Invitrogen) açıklanan biçimde gerçekleştirilmiştir. Hücreler, 12-kuyucuklu plakalarda kuyucuk başında 80,000 hücrede tohumlanmıştır ve bir %5 CO₂ nemlendirilmiş inkübatörde 37°C'de 1mL GM'de bir gecede inkübe edilmiştir. Nükleik asit verilecek hücrelerin her bir çukurcuğu için
35 DNA, 100ul Opti-MEM®'de seyreltilmiştir ve karıştırılmış 1.5ul Lipofektamin2000,

seyreltilmiş DNA'ya doğrudan eklenmiştir. Karıştırma sonrasında karıştırılmış ve oda sıcaklığından 25 dk boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler havalandırılmış PBS ile yıkanmış ve 400ul Opti-MEM® ile değiştirilmiştir. Hücrelerin her bir çukurcuğu, 100ul Lipofektamin2000/DNA kompleksi ile tedavi edilmiştir ve bir %5 CO₂ nemlendirilmiş atmosferde 37°C'de inkübe edilmiştir. 6 saat sonra hücreler, PBS ile yıkanmış %3.7 PFA ile tripsinize edilmiştir ve onarılmıştır. Bu, Lipofektamin2000'in DNA'ya optimal oranı bulmak için Lipofektamin2000'in (3ul ve 4.5ul) değişken hacimleri ile tekrarlanmıştır. Deneyler, 3 defa tekrarlanmıştır.

10 Akış Sitometrisi Analizi

Hücreler, bir 633nm kırmızı lazer kullanılarak bir MoFlo™ DP (DAKO) Akış Sitometresinde analiz edilmiştir. (40,000 hücre; ön/yan saçılım ile canlı hücreler üzerinde geçit yapılmıştır). Medyan floresan, istatistiksel analiz için kullanılmıştır.

15

Sonuçlar ve Açıklama

Peptidin DNA'ya Bağlanması

20 YO-PRO-1 tahlili, bir DNA bağlama peptidinin DNA yoğunlaşma becerisini araştırmak için kullanılabilmektedir. YO-PRO-1, bir floresan DNA/boya kompleksini oluşturmak için DNA'yı bağlayan bir siyanin boyasıdır. Peptidin farklı (+/-) yük oranları floresan DNA/boya kompleksine eklenebilmektedir. Peptit, DNA'yı bağlayarak boyaya üstün geldiği için floresan yoğunluğunda bir azalma gözlemlenmektedir. Bu çalışmada LK15, modifiye hücre penetran peptidin DNA bağlama becerisini iyileştirmesi için P21 8R aktarım proteinine eritilmiştir. LK15 peptidin TAT'ye füzyonunun, pDNA'nın, HT29 ve HT1080 kültürlenmiş hücrelerin içine transfeksiyonunu önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir [19]. Tat'nin üzerinde Tat-LK15'in iyileştirilmiş aktarım etkinliğinin, peptit ve DNA'nın iyileştirilmiş yoğunlaşma becerisinden ve hücre zarı boyunca daha iyi DNA aktarımından kaynaklandığı düşünülmektedir [20].

30

(+/-) yük oranının bir grafiği, P21 LK15 8R'nin pSIN GFP'ye optimum oranını araştırmak için % floresana karşı çizilmiştir (Şekil 40). Sonuçlar, P21 LK15 8R'nin pSIN GFP'ye optimal (+/-) yük oranının esasla 2:1 olduğunu göstermiştir. Bu oran, transfeksiyon deneylerinde kullanılmıştır.

35

P21 LK15 8R aracılığıyla pDNA Raportör Geninin Transfeksiyonu

Hücre zarının fosfolipit iki katmanı nükleik asitlere delinmez bir bariyer olarak işlev göstermektedir ve dolayısıyla pDNA, hücrenin içine taşınmasını kolaylaştırmak için bir modifiye CPP'ye konjuge edilecektir [2]. Bu çalışmada, raportör geni pSIN GFP'nin NIH 3T3 murin fibroblast hücrelerinin içine GET-aracılığıyla transfeksiyonu, transfeksiyon süresi (3, 6 veya 24 sa), transfeksiyon ortamı (serumlu veya serumsuz) ve DNA miktarı (1, 4 veya 10ug) açılardan optimize edilmiştir. Raportör geni pSIN GFP, P21 LK15 8R kullanılarak hücrelerin içine nükleik asit verilmiştir, burada P21, hücre yüzeyi HS-GAG'leri hedef almaktadır ve bunları bağlamaktadır. LK15, pSIN GFP'yi karmaşıklaştırmaktadır ve 8R, hücre zarı boyunca pSIN GFP'yi kalıplaştırmaktadır. P21 LK15 8R'ye sahip pSIN GFP'nin transfeksiyon etkinliği, ticari olarak kullanılan lipit-esaslı transfeksiyon reaktif lipofektamin2000'in transfeksiyon etkinliği ile karşılaştırılmıştır. Hücreler, GFP'nin geçici ekspresyonuna yönelik sürenin elde edilmesine imkan tanımak için transfeksiyondan sonraki 48 saatte onarılmıştır ve transfeksiyon etkinlikleri, akış sitometrisi ile nicemlenmiştir (Şekil 41).

Gen taşıma sistemleri, etkili in-vivo uygulamalar için serum dirençli olmalıdır ancak çoğu gen taşıyıcı lipofektamin2000 dahil olmak üzere, serum içeren ortamda transfeksiyon etkinliğinde şiddetli düşüşler sergilemiştir [21]. Bunun, serum moleküllerinin gen taşıyıcısı rekabetçi biçimde bağlanmasından kaynaklandığına inanılmaktadır dolayısıyla DNA'yı bağlamak için mevcut serbest gen taşıyıcıları azaltılmaktadır [22]. P21 LK15 8R'nin transfeksiyon etkinliği, serum ve serumsuz transfeksiyon ortamında karakterize edilmiştir. Optimal transfeksiyon koşulları hücrelerin, transfeksiyon etkinliğinin $17.9 \pm 4.8\%$ 'e eriştiği serum koşullarında 24 saat boyunca 10ug DNA ile nükleik asit verilmesi durumunda mevcuttur (Şekil 42). Bu, serumsuz koşullarda ($54.7 \pm 10.3\%$, Ek 3) lipofektamin2000 için gözlemlenen optimize transfeksiyon etkinliğinden 3 kat daha düşüktür ancak P21 LK15 8R transfeksiyonunun serum-direnci, terapötik biyomoleküllerin klinik/ in-vivo iletiminin herhangi bir türü için avantajlıdır. Ek olarak endozomal kaçış stratejilerinin, CPP-aracılığıyla transfeksiyonların etkinliğini artırdığı bir şekilde belgelenmiştir.

30

Neticeler

Büyüme faktörü kaynaklı hücre yüzeyi HS-GAG bağlama alanlarını kapsaması için modifiye edilmiş olan CPP'lerin bir paneli, modifiye edilmemiş CPP'ler ile karşılaştırıldığında hücrelerin içine aktarımında 30-100 kat artış göstermiştir. Hipotez, bu peptitlerin GET-aracılığıyla hücre içine

35

- HS-GAG bağlama alanı aracılığıyla hücre zarıyla etkileşimin artırılması ve ii) 8R aracılığıyla hücre zarı boyunca proteinin aktarılmasında peptidin ikili işlevselliğinden kaynaklandığına Modifiye CPP'ler, farklı hücre türlerinin içine mRFP'nin tercih edilen iletim profillerini göstermiştir, bu, farklı hücre türlerinde daha bol biçimde eksprese edilen spesifik HS-epitopların hedef alan HS-GAG bağlama alanlarından kaynaklanmaktadır. Gelecekteki iş, CPP'lerin, spesifik antikor-kaynaklı HS-epitopu bağlama alanlarını kapsaması için modifiye etmektir. Antikolarların HS-epitopu bağlama kütüphaneleri, GET aracılığıyla terapötik moleküllerin hücre tipi spesifik iletimi için kullanılabilir.
- 5
- 10 Terapötik moleküllerin iletimine yönelik bu peptitlerin kullanılarak göstermek amacıyla P21 LK15 8R, hücrelerin içine raportör geni pSIN GFP'yi iletmeleri için kullanılmıştır. Sonuçlar, herhangi bir endozomal kaçış stratejisi olmaksızın, serum koşullarında $17.9 \pm 4.8\%$ kadar GET-aracılı transfeksiyon etkinliği göstermiştir. HS-GAG bağlama alanlarını kapsaması için modifiye edilen CPP'ler, terapötik biyomoleküllerin in-vivo iletimi için viral ve lipid esaslı iletim
- 15
- vehikülleri kullanmaya alternatifler olarak büyük umut vaat etmektedir.

Referanslar

- [1] Bechara C, Sagan S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *Febs Letters* 2013;587:1693-702.
- 20 [2] Tanaka K, Kanazawa T, Ogawa T, Suda Y, Takashima Y, Fukuda T, ve ark. A Novel, Bio-Reducible Gene Vector Containing Arginine and Histidine Enhances Gene Transfection and Expression of Plasmid DNA. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2011;59:202-7.
- [3] Mitchell DJ, Kim DT, Steinman L, Fathman CG, Rothbard JB. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *Journal of Peptide Research*
- 25 2000;56:318-25.
- [4] Nakase I, Niwa M, Takeuchi T, Sonomura K, Kawabata N, Koike Y, ve ark. Cellular uptake of arginine-rich peptides: Roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Molecular Therapy* 2004;10:1011-22.
- [5] Ma DX, Shi NQ, Qi XR. Distinct transduction modes of arginine-rich cell-penetrating
- 30 peptides for cargo delivery into tumor cells. *International Journal of Pharmaceutics* 2011;419:200-8.
- [6] El-Sayed A, Futaki S, Harashima H. Delivery of Macromolecules Using Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides: Ways to Overcome Endosomal Entrapment. *Aaps Journal* 2009;11:13-22.
- 35 [7] Shiraishi T, Nielsen PE. Enhanced delivery of cell-penetrating peptide-peptide nucleic

acid conjugates by endo-somal disruption. *Nature Protocols* 2006;1:633-6.

[8] Matsubara Y, Chiba T, Kashimada K, Morio T, Takada S, Mizutani S, ve ark. Transcription activator-like effector nuclease-mediated transduction of exogenous gene into IL2RG locus. *Scientific Reports* 2014;4.

5 [9] Parelkar SS, Letteri R, Chan-Seng D, Zolocheska O, Ellis J, Figueiredo M, ve ark. Polymer-Peptide Delivery Platforms: Effect of Oligopeptide Orientation on Polymer-Based DNA Delivery. *Biomacromolecules* 2014;15:1328-36.

[10] Yang HY, Vonk LA, Licht R, van Boxtel AMG, Bekkers JEJ, Kragten AHM, ve ark. Cell type and transfection reagent-dependent effects on viability, cell content, cell cycle and
10 inflammation of RNAi in human primary mesen-chymal cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014;53:35-44.

[11] Ma Y, Gong C, Ma YL, Fan FK, Luo MJ, Yang F, ve ark. Direct cytosolic delivery of cargoes in vivo by a chimera consisting of D- and L-arginine residues. *Journal of Controlled Release* 2012;162:286-94.

15 [12] James E. Dixon GM, Nina Lane, Chris Denning and Kevin M. Shakesheff Highly Efficient Delivery of Functional Proteins by the Synergistic Effect of GAG Binding Motifs and Cell-Penetrating Peptides. Unpublished 2014.

[13] Baldwin RJ, ten Dam GB, van Kuppevelt TH, Lacaud G, Gallagher JT, Kouskoff V, ve ark. A Developmentally Regulated Heparan Sulfate Epitope Defines a Subpopulation with
20 Increased Blood Potential During Mesodermal Differentiation. *Stem Cells* 2008;26:3108-18.

[14] Bradford MM. RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-54.

25 [15] Schamhart DHJ, Kurth KH. Role of proteoglycans in cell adhesion of prostate cancer cells: From review to experiment. *Urological Research* 1997;25:S89-S96.

[16] Delehedde M, Deudon E, Boilly B, Hondermarck H. Proteoglycans in breast cancer. *Pathologie Biologie* 1997;45:305-11.

[17] Shao C, Shi XF, Phillips JJ, Zaia J. Mass Spectral Profiling of Glycosaminoglycans
30 from Histological Tissue Surfaces. *Analytical Chemistry* 2013;85:10984-91.

[18] Thompson KE, Bashor CJ, Lim WA, Keating AE. SYNZIP Protein Interaction Toolbox: in Vitro and in Vivo Specifications of Heterospecific Coiled-Coil Interaction Domains. *Acs Synthetic
Biology* 2012;1:118-29.

[19] Saleh AF, Aojula H, Arthanari Y, Offerman S, Alkotaji M, Pluen A. Improved Tat-mediated plasmid DNA transfer by fusion to LK15 peptide. *Journal of Controlled Release*
35

2010;143:233-42.

[20] Dufourcq J, Neri W, Henry-Toulme N. Molecular assembling of DNA with amphipathic peptides. Febs Letters 1998;421:7-11.

[21] Zhang X, Hu HM, Liu TB, Yang YY, Peng YF, Cai QQ, ve ark. Multi-armed poly(L-glutamic acid)-graft-polypro-pyleneimine as effective and serum resistant gene delivery vectors. International Journal of Pharmaceutics 2014;465:444-54.

[22] Wu HM, Pan SR, Chen MW, Wu Y, Wang C, Wen YT, ve ark. A serum-resistant polyamidoamine-based polypeptide dendrimer for gene transfection. Biomaterials 2011;32:1619-34.

10

Ek 1. Farklı (+/-) yük oranlarında 1ug pSIN GFP'ye eklenen P21 LK15 8R'nin miktarları gösteren tablo

Peptit/DNA (+/-) Yük Oranı	Peptidin konsantrasyonu (uM)	Peptidin hacmi (ul)
1:5	0.49	0.05
1:3	0.82	0.07
1:2	1.23	0.12
1:1	2.47	0.24
2:1	4.94	0.49
3:1	7.41	0.74
5:1	12.35	1.23
10:1	24.7	2.46

Ek 2. pSIN GFP'nin NIH 3T3 hücrelerine P21 LK15 8R tarafından transfeksiyonunun optimizasyonuna yönelik farklı tedavi koşulları gösteren tablo

Kuyucuk	DNA miktarı (ug)	Transfeksiyon Ortamı (Optimem, OptiMEM + %10 Serum)	Transfeksiyon Zamanı (sa)
1	1	Opti-MEM®	3sa
2	1	Opti-MEM® + %10 serum	3sa
3	1	Opti-MEM®	6sa
4	1	Opti-MEM® + %10 serum	6sa
5	1	Opti-MEM®	24sa
6	1	Opti-MEM® + %10 serum	24sa
7	4	Opti-MEM®	3sa
8	4	Opti-MEM® + %10 serum	3sa
9	4	Opti-MEM®	6sa
10	4	Opti-MEM® + %10 serum	6sa
11	4	Opti-MEM®	24sa
12	4	Opti-MEM® + %10 serum	24sa

13	10	Opti-MEM®	3sa
14	10	Opti-MEM® + %10 serum	3sa
15	10	Opti-MEM®	6sa
16	10	Opti-MEM® + %10 serum	6sa
17	10	Opti-MEM®	24sa
18	10	Opti-MEM® + %10 serum	24sa

SEKANS LİSTESİ

5 <110> The University of Nottingham

<120> Aktarım

<130> JA66493P.WOP

<150> GB1322396.1

<151> 2013-12-18

10 <160> 55

<170> PatentIn versiyon 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

15 <213> Homo sapiyen

<400> 1

Lys Arg Lys Lys Lys Gly Lys Gly Leu Gly Lys Lys Arg Asp Pro Cys
1 5 10 15

Leu Arg Lys Tyr Lys
20

<210> 2

<211> 63

20 <212> DNA

<213> Homo sapiyen

<400> 2

aagcgcaaga agaagggcaa aggcctgggc aagaagcgcg atccgtgcct gcgcaagtat

60

aag

63

25 <210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 3

Gly Arg Pro Arg Glu Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu Lys
1 5 10 15

Pro Thr

5 <210> 4
<211> 54
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 4

10 ggccgcccgc gcgaaagcgg caaaaaacgc aaacgcaaac gcctgaaacc gacc 54

<210> 5
<211> 20
<212> PRT

15

<213> Homo sapien <400> 5

Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly Gly Glu Met Phe Val
1 5 10 15

Ala Leu Asn Gln
20

<210> 6
<211> 60
20 <212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 6

acctatgcga gcgcaaatg gaccataac ggcggcgaaa tgtttgtggc gctgaaccag 60

<210> 7
25 <211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 7

Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg
1 5 10 15

30 <210> 8
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 8

35 acctatgcga gccgcaata taccagctgg tatgtggcgc tgaacgc 48

<210> 9
<211> 24

<212> DNA
<213> Yapay Sekans

<220>
<223> Aktarılan alan sekansı

5 <400> 9
cgaagacgca ggagacgtcg aagg 24

<210> 10
<211> 88
<212> DNA
10 <213> Yapay Sekans

<220>
<223> İletim molekülü sekansı

<220>
<221> diğer_özellik
15 <222> (64)..(64)
<223> n; a, c, g, veya t'dir

<400> 10

aagcgcaaga agaagggcaa aggcctgggc aagaagcgcg atccgtgcct gcgcaagtat 60
aagncgaaga cgcaggagac gtcgaagg 88

20 <210> 11
<211> 118
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>
25 <223> Bağlayıcı molekül

<400> 11

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Arg	Gly	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Val	Ser	Ser	Asn	
			20					25					30			
Glu	Met	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	
	50					55					60					
Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	
65					70					75					80	

Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Gly Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Gly Arg
85 90 95

Arg Leu Lys Asp Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro
100 105 110

Pro Thr Pro Ser Pro Ser
115

<210> 12

<211> 354

<212> DNA

<213> Yapay Sekans

5 <220>

<223> Başlayıcı molekül

<400> 12

```
gaagtgcagc   tgggtgaaaag cggcggcggc   ctggtgcagc   cgcgcggcag   cctgcgcctg           60
agctgcgcgg   cgagcgggctt taccgtgagc   agcaacgaaa   tgagctggat   tcgccaggcg           120
ccgggcaaaag   gcctggaatg  ggtgagcagc   attagcggcg   gcagcaccta   ttatgcggat           180
agccgcaaaag   gccgctttac  cattagccgc   gataacagca   aaaacaccct   gtatctgcag           240
atgaacaacc   tgcgcgcgga  aggcaccgcg   gcgtattatt   gcggcccgcg   cctgaaagat           300
ccgagcacc   cgccgacccc  gagcccgagc   accccgccga   ccccgagccc   gage                   354
```

<210> 13

<211> 129

5

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Bağlayıcı Molekül

10

<400> 13

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn
20           25           30
Glu Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Trp Ala Val
35           40           45
Ala Ala Ile Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
50           55           60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Thr Leu Gln
65           70           75           80
Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Gly Arg
85           90           95
Arg Leu Lys Asp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Pro
100          105          110
Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro
115          120          125
Ser
```

<210> 14

<211> 387

<212> DNA
<213> Yapay Sekans

<220>
<223> Bağlayıcı Molekül

5 <400> 14

caggtgcagc	tggtggaaag	cggcggcggc	agcgtgcagg	cgggcggcag	cctg'gcctg	60
agctgcaccg	cgagcggctt	taccgtgagc	agcaacgaac	tgggctggtt	tcgccaggcg	120
ccgggccagg	aacgctgggc	ggtggcggcg	attagcggcg	gcagcaccta	ttatgcggat	180
agcgtgaaag	gccgctttac	cattagccgc	gataacgcga	aaaacaccgt	gaccctgcag	240
atgaacaacc	tgaaaccgga	agataccgcg	atttattatt	gcggccgcg	cctgaaagat	300
tggggccagg	gcaccaggt	gaccgtgagc	agcccagca	ccccccgac	cccagcccg	360
agcaccgcc	cgaccgcgag	cccgagc				387

<210> 15
<211> 124
<212> PRT

10 <213> Yapay Sekans

<220>
<223> Bağlayıcı Molekül

<400> 15

Glu	Asp	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Pro	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Leu	His	Trp	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Ala	Ile	Gly	Thr	Gly	Gly	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Met
	50					55					60				
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Lys	Ser	Leu	Tyr	Leu
65					70					75					80
His	Met	Asn	Ser	Leu	Ile	Ala	Glu	Asp	Met	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser
				85					90					95	
Leu	Arg	Met	Asn	Gly	Trp	Arg	Ala	His	Gln	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Thr
			100					105					110		
Pro	Ser	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Thr	Pro	Ser	Pro	Ser				
		115					120								

<210> 16
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> Yapay Sekans

5 <220>
 <223> Bağlayıcı Molekül

<400> 16

gaagatcagc	tgggtgaaag	cgggcgcggc	ctgggtgcagc	cgggcggcag	cctgcgcccc	60
agctgcgcgg	cgagcggtt	tgcgtttagc	agctatgcgc	tgcattgggt	gcgccgcgcg	120
ccgggcaaag	gcctggaatg	ggtgagcgcg	attggcaccg	gcggcgatac	ctattatgcg	180
gatagcgtga	tgggcccgtt	taccattagc	cgcgataacg	cgaaaaaaag	cctgtatctg	240
catatgaaca	gcctgattgc	ggaagatatg	gcggtgtatt	attgcagcct	gcgcatgaac	300
ggctggcgcg	cgcacagcc	gagcaccocg	ccgacccoga	gcccgagcac	cccgcgcacc	360
ccgagcccga	gc					372

10 <210> 17
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> Bağlayıcı molekül

<400> 17

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Trp Ala Val
35 40 45
Ala Ala Ile Gly Thr Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Thr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95
Leu Arg Met Asn Gly Trp Arg Ala His Gln Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr
115 120 125
Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser
130 135

5 <210> 18

<211> 405

<212> DNA

<213> Yapay Sekans

<220>

10 <223> Bağlayıcı molekül

<400> 18

caggtgcagc	tggtggaaag	cggcggcggc	agcgtgcagg	cgggcggcag	cctgcgcctg	60
agctgcaccg	cgagcggcctt	tgcgtttagc	agctatgcgc	tgggctggtt	tgcgcaggcg	120
ccgggccagg	aacgctgggc	ggtggcggcg	attggcaccg	gcggcgatac	ctattatgcg	180
gatagcgtga	aagcccgctt	taccattagc	cgcgataacg	cgaaaaacac	cgtgaccctg	240
cagatgaaca	acctgaaacc	ggaagatacc	gcgatttatt	attgcagcct	gcgcatgaac	300
ggctggcgcg	cgcacacagtg	gggccagggc	accaggtga	ccgtgagcag	cccgagcacc	360
ccgccgaccc	cgagcccagag	caccccgcgc	accccagacc	cgagc		405

<210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

5 <220>
 <223> Aktarim alan
 <400> 19

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

10 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

<220>
 <223> Aktarim alan

15 <400> 20

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5

20 <210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

<220>
 <223> CDR

25 <400> 21

Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn Glu
 1 5

30 <210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

<220>
 <223> CDR

 <400> 22
 5

 Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

 <210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 10 <213> Yapay Sekans

 <220>
 <223> CDR
 15 <400> 23

 Ile Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

 <210> 24
 20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

 <220>
 25 <223> CDR

 <400> 24

 Ile Gly Thr Gly Gly Asp Thr
 1 5
 30
 <210> 25
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans
 35
 <220>
 <223> CDR

 <400> 25
 40

 Gly Arg Arg Leu Lys Asp
 1 5

 <210> 26
 <211> 11
 45 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

 <220>
 <223> CDR

 <400> 26

Ser Leu Arg Met Asn Gly Trp Arg Ala His Gln
1 5 10

<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

5

<220>
<223> CDR

10 <400> 27

Gly Met Arg Pro Arg Leu
1 5

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

15

<220>
<223> CDR

20 <400> 28

His Ala Pro Leu Arg Asn Thr Arg Thr Asn Thr
1 5 10

<210> 29
<211> 6
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

25

<220>
<223> CDR

30 <400> 29

Gly Ser Arg Ser Ser Arg
1 5

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

35

<220>
<223> CDR

40 <400> 30

Gly Arg Thr Val Gly Arg Asn
1 5

<210> 31
<211> 7
<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> CDR

5

<400> 31

Gly Lys Val Lys Leu Pro Asn
1 5

10

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

15

<220>

<223> CDR

<400> 32

Ser Gly Arg Lys Gly Arg Met Arg
1 5

20

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

25

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> CDR

<400> 33

Arg Arg Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5

30

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

35

<223> CDR

<400> 34

Leu Lys Gln Gln Gly Ile Ser
1 5

40

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> CDR

<400> 35

Ala Met Thr Gln Lys Lys Pro Arg Lys Leu Ser Leu
1 5 10

<210> 36
<211> 12
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

5 <220>
<223> CDR

<400> 36

Ser Gly Arg Lys Tyr Phe Arg Ala Arg Asp Met Asn
1 5 10

10 <210> 37
<211> 15
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>
<223> Aktarım alanı

15 <400> 37

Arg Gln Ile Lys Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

20 <210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>
<223> Aktarım alanı

<400> 38

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

25 <210> 39
<211> 18
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

30 <220>
<223> Aktarım alanı

<400> 39

Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

5 <220>
<223> Aktarım alanı

<400> 40

Arg	Arg	Leu	Ser	Tyr	Ser	Arg	Arg	Arg	Phe
1				5					10

10 <210> 41
<211> 12
<212> **PRT**
<213> **Yapay** Sekans

<220>
<223> Aktarım alanı

15 <400> 41

Pro	Ile	Arg	Arg	Arg	Lys	Lys	Leu	Arg	Arg	Leu	Lys
1				5					10		

<210> 42
<211> 12
<212> PRT
20 <213> Yapay Sekans

<220>
<223> Aktarım alanı

<400> 42

Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Thr	Ser	Lys	Leu	Met	Lys	Arg
1				5					10		

25 <210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>
30 <223> Aktarım alanı

<400> 43

Arg	Arg	Arg	Arg	Asn	Arg	Thr	Arg	Arg	Asn	Arg	Arg	Arg	Val	Arg
1				5					10					15

<210> 44
<211> 19
35 <212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Aktarın alanı

<400> 44

Lys Met Thr Arg Ala Gln Arg Arg Ala Ala Ala Arg Arg Asn Arg Trp
1 5 10 15

Thr Ala Arg

<210> 45

5 <211> 13

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Aktarın alanı

10 <400> 45

Thr Arg Arg Gln Arg Thr Arg Arg Ala Arg Arg Asn Arg
1 5 10

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

15 <213> Yapay Sekans

<220>

<223> Aktarın alanı

<400> 46

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10

20 <210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

25 <223> Aktarın alanı

<400> 47

Gly Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10

<210> 48

<211> 27

30 <212> PRT

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Aktarın domain

<400> 48

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
20 25

<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

5 <220>
<223> Aktarım alanı

<400> 49

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Ala Leu Lys Leu
1 5 10 15

Ala

10 <210> 50
<211> 27
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>
<223> Aktarım alanı

15 <400> 50

Met Gly Leu Gly Leu His Leu Leu Val Leu Ala Ala Ala Leu Gln Gly
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20 25

20 <210> 51
<211> 27
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>
<223> Aktarım alanı

<400> 51

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20 25

25 <210> 52

<211> 27
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>
5 <223> Aktarım alanı

<400> 52

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15
Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20 25

<210> 53
<211> 27
10 <212> PRT
<213> Yapay Sekans

<220>
<223> Aktarım alanı

15 <400> 53

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15
Ala Trp Ser Gln Pro Lys Ser Lys Arg Lys Val
20 25

<210> 54
<211> 21
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

20 <220>
<223> Aktarım alanı

<400> 54

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15
Lys Lys Arg Lys Val
20

25 <210> 55
<211> 21
<212> PRT
<213> Yapay Sekans

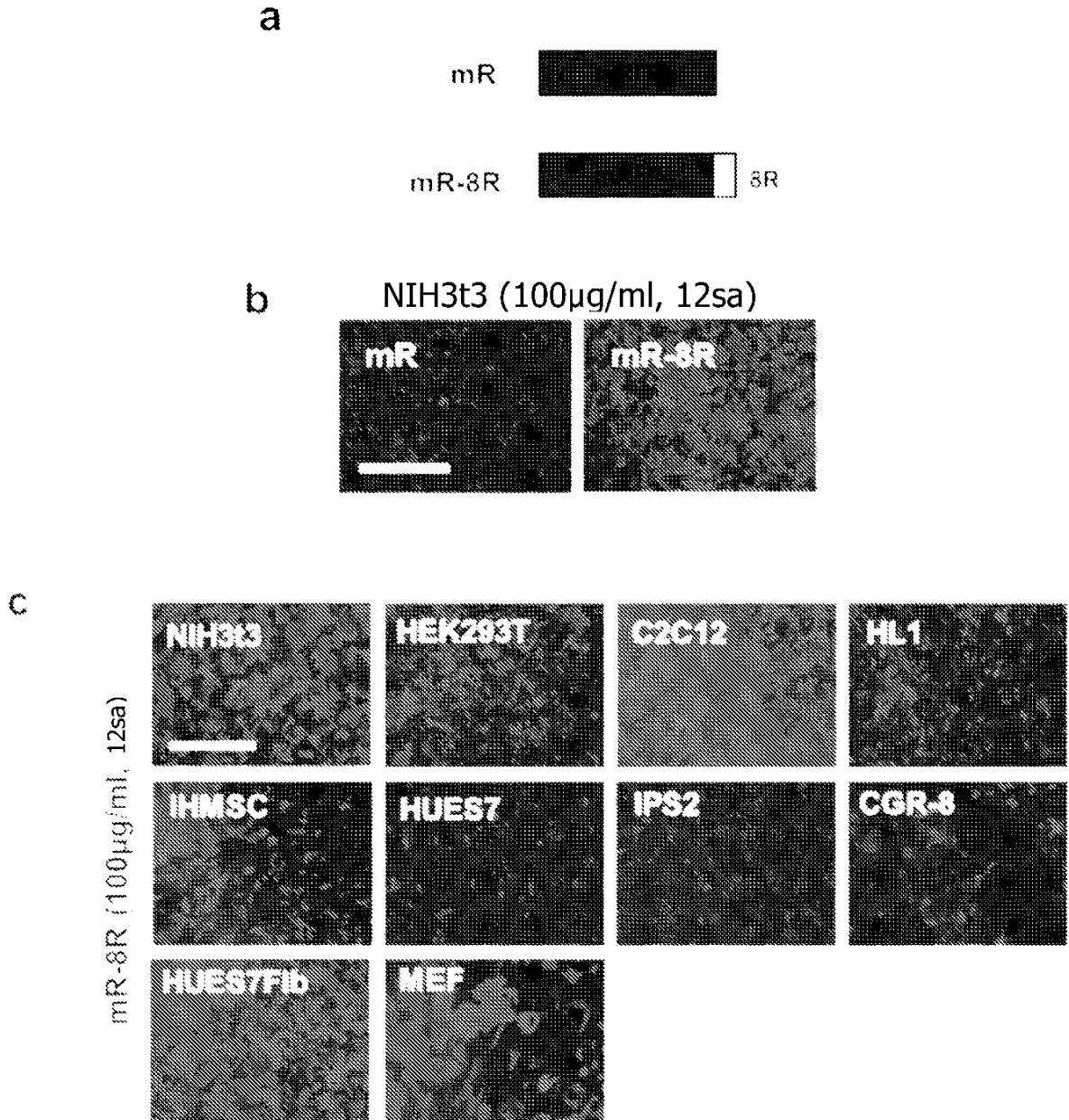
<220>
30 <223> Aktarım alanı

<400> 55

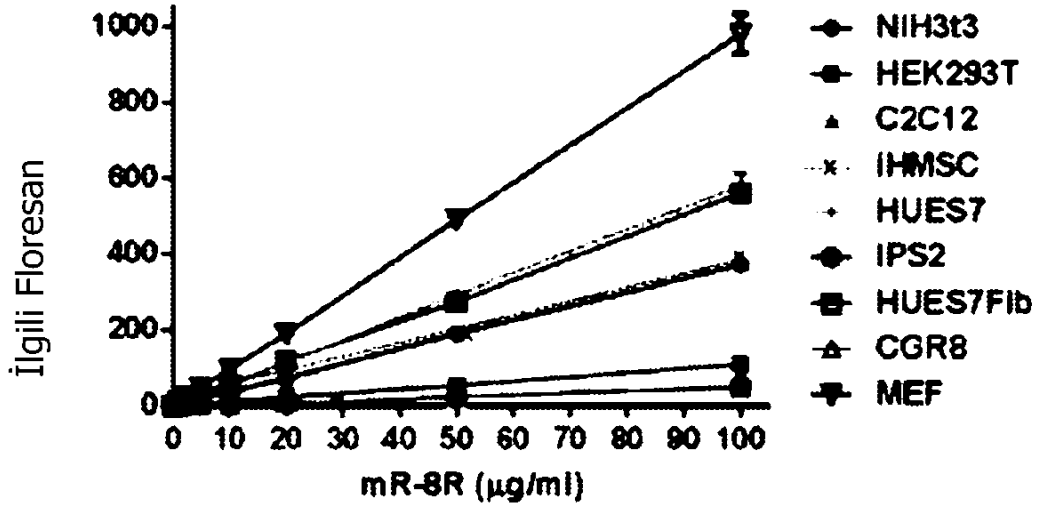
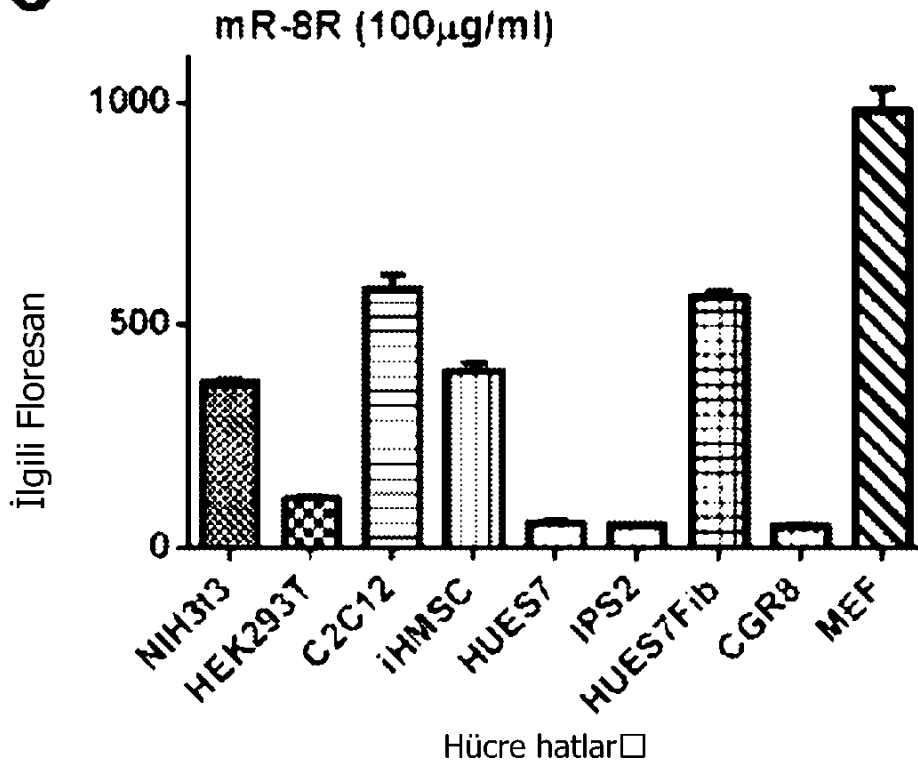
Lys Glu Thr Trp Phe Glu Thr Trp Phe Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
20

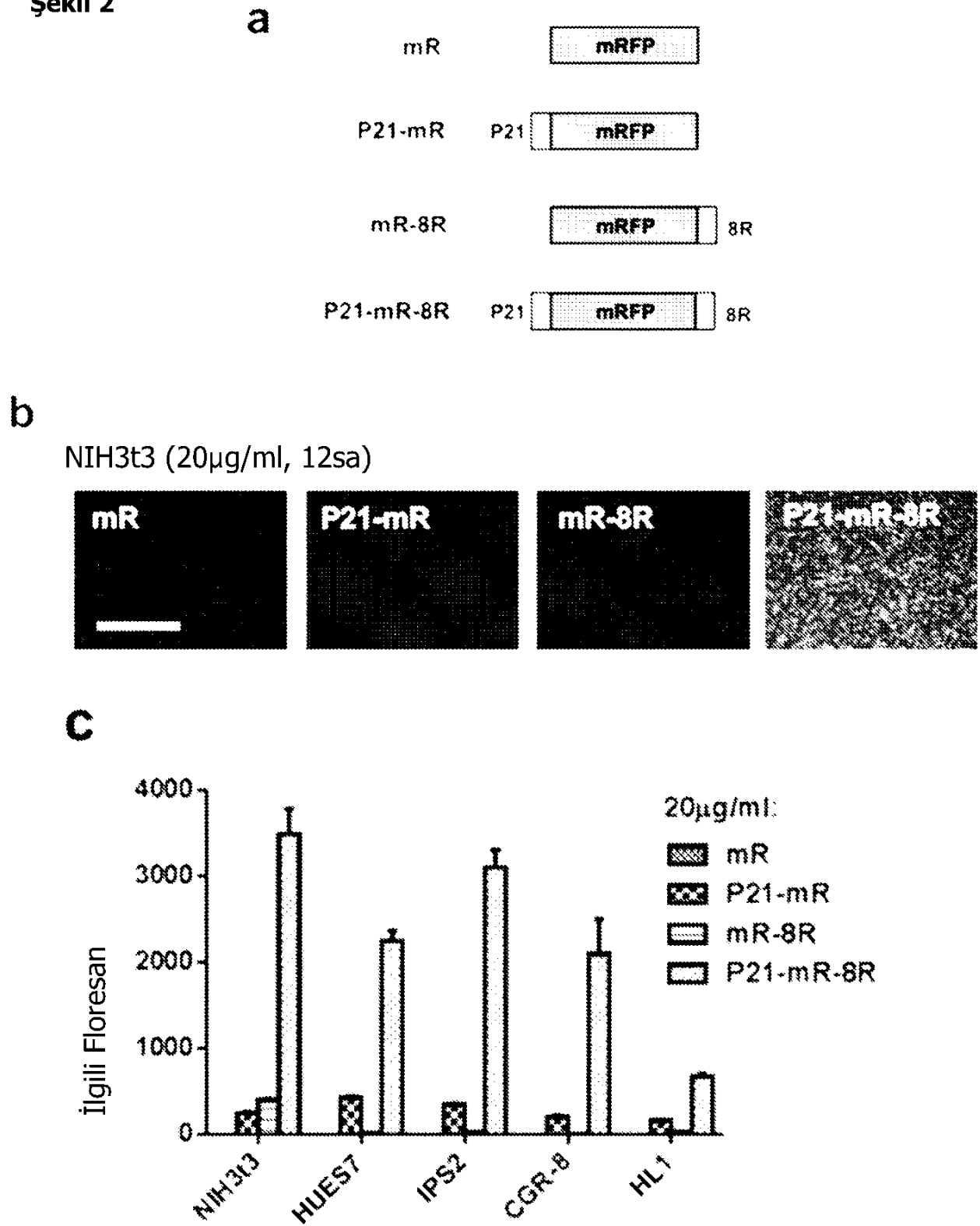
Şekil 1



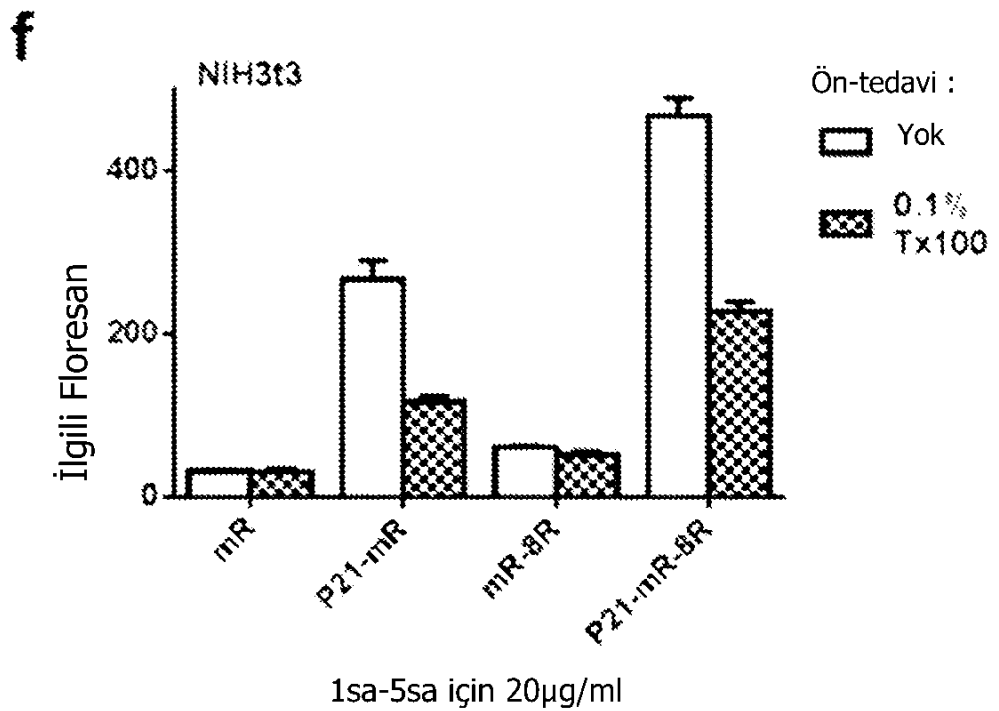
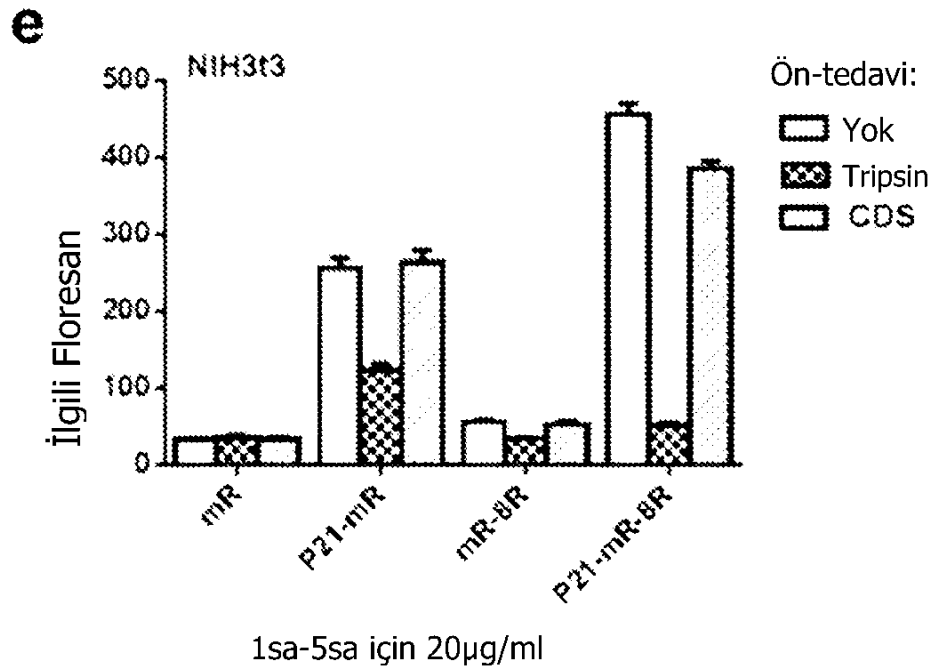
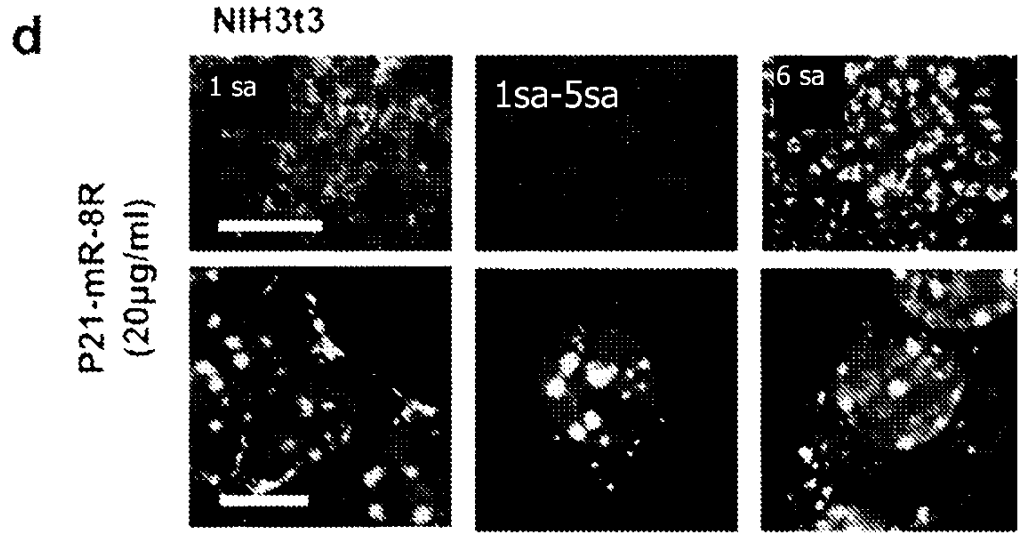
Şekil 1 devam □

d**e**

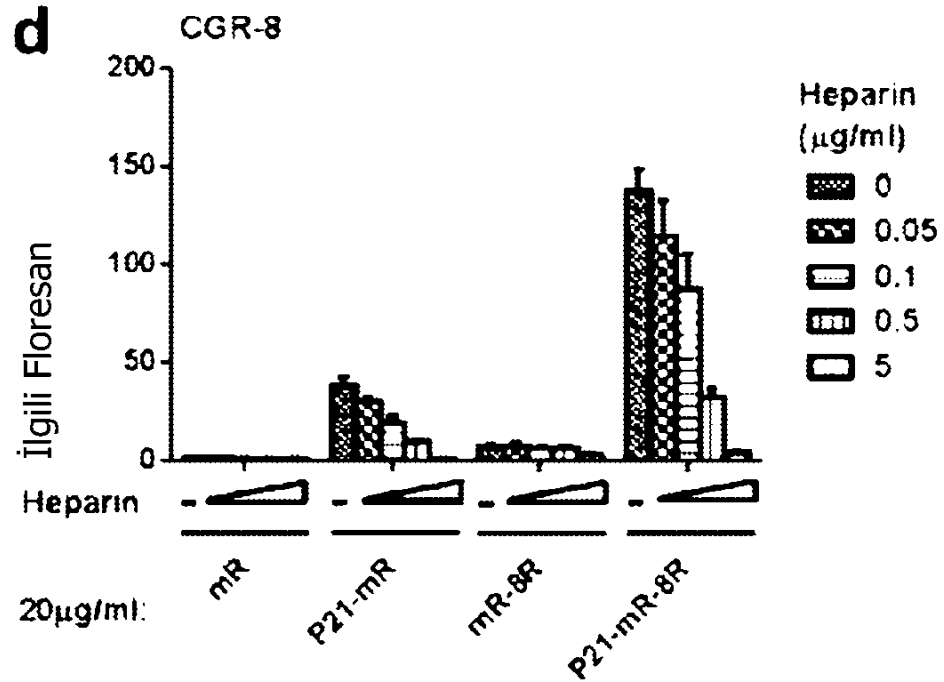
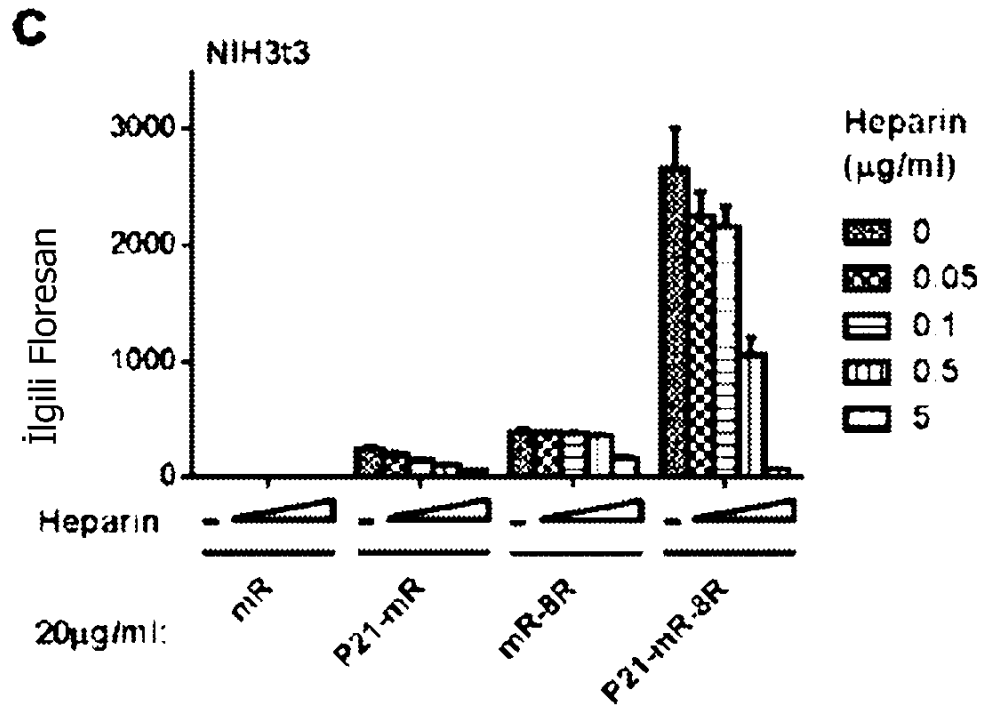
Şekil 2



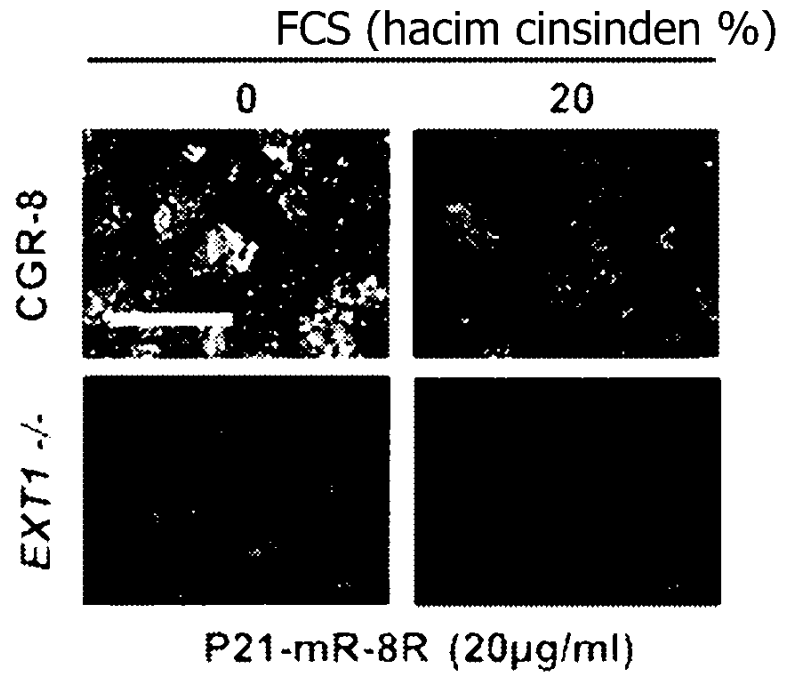
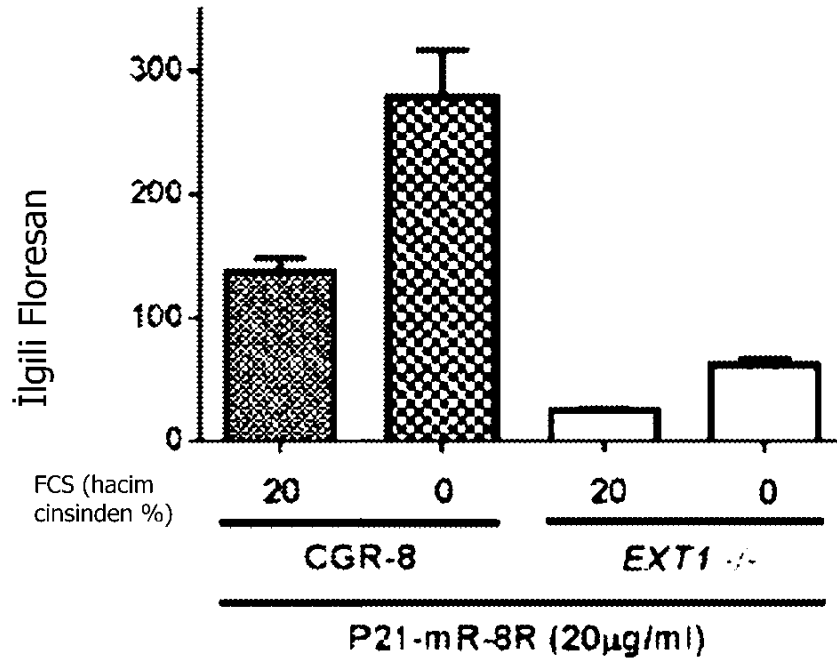
Şekil 2 devam □



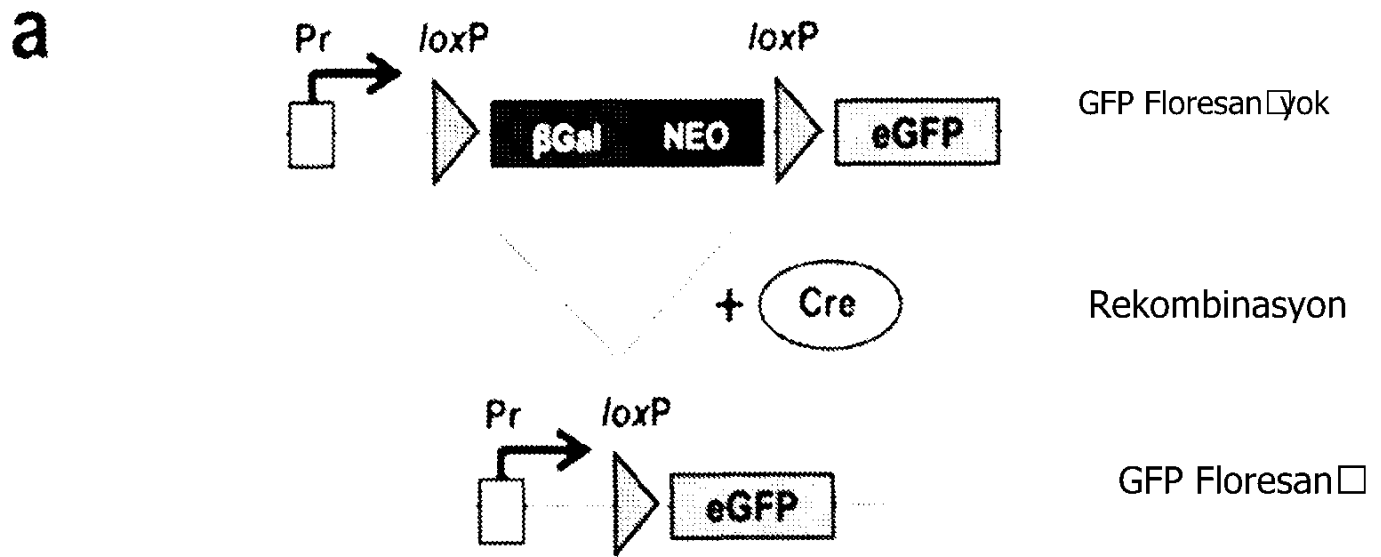
Şekil 3 devam □



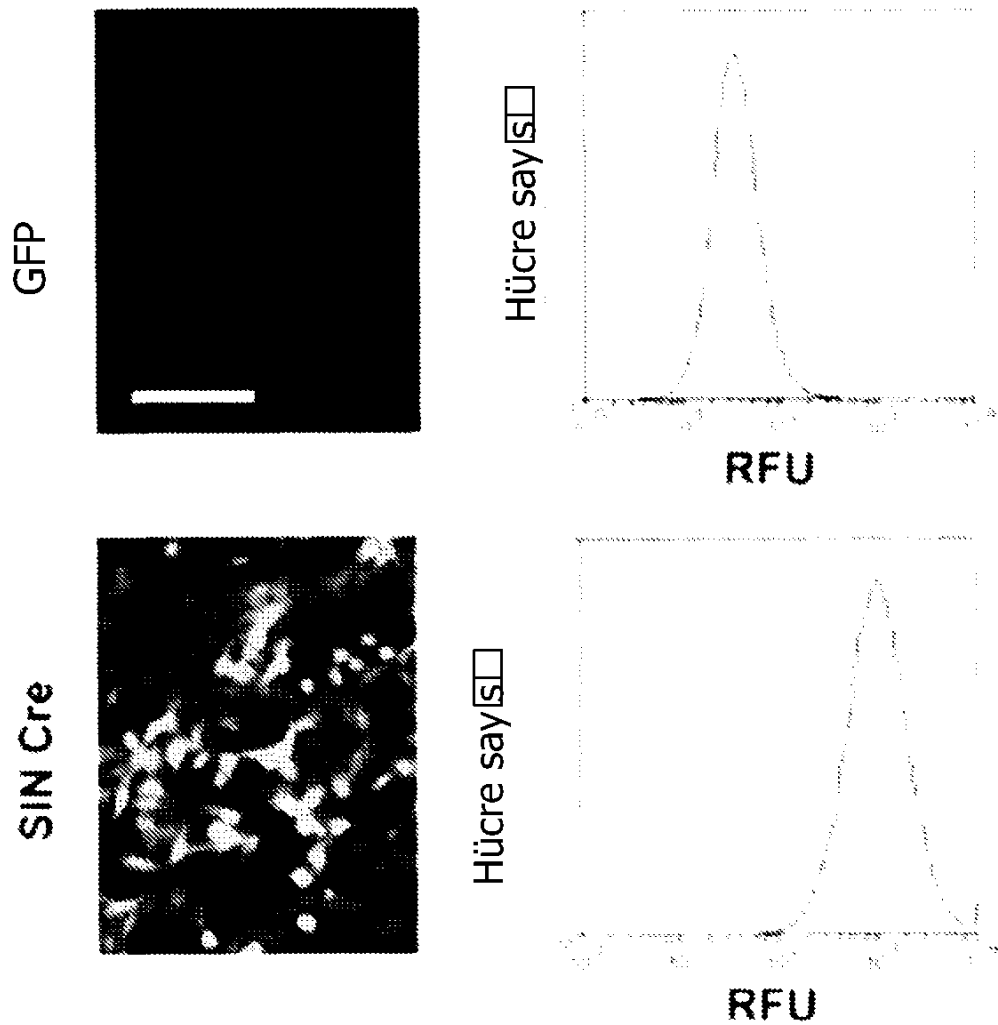
Şekil 3 devam □

e**f**

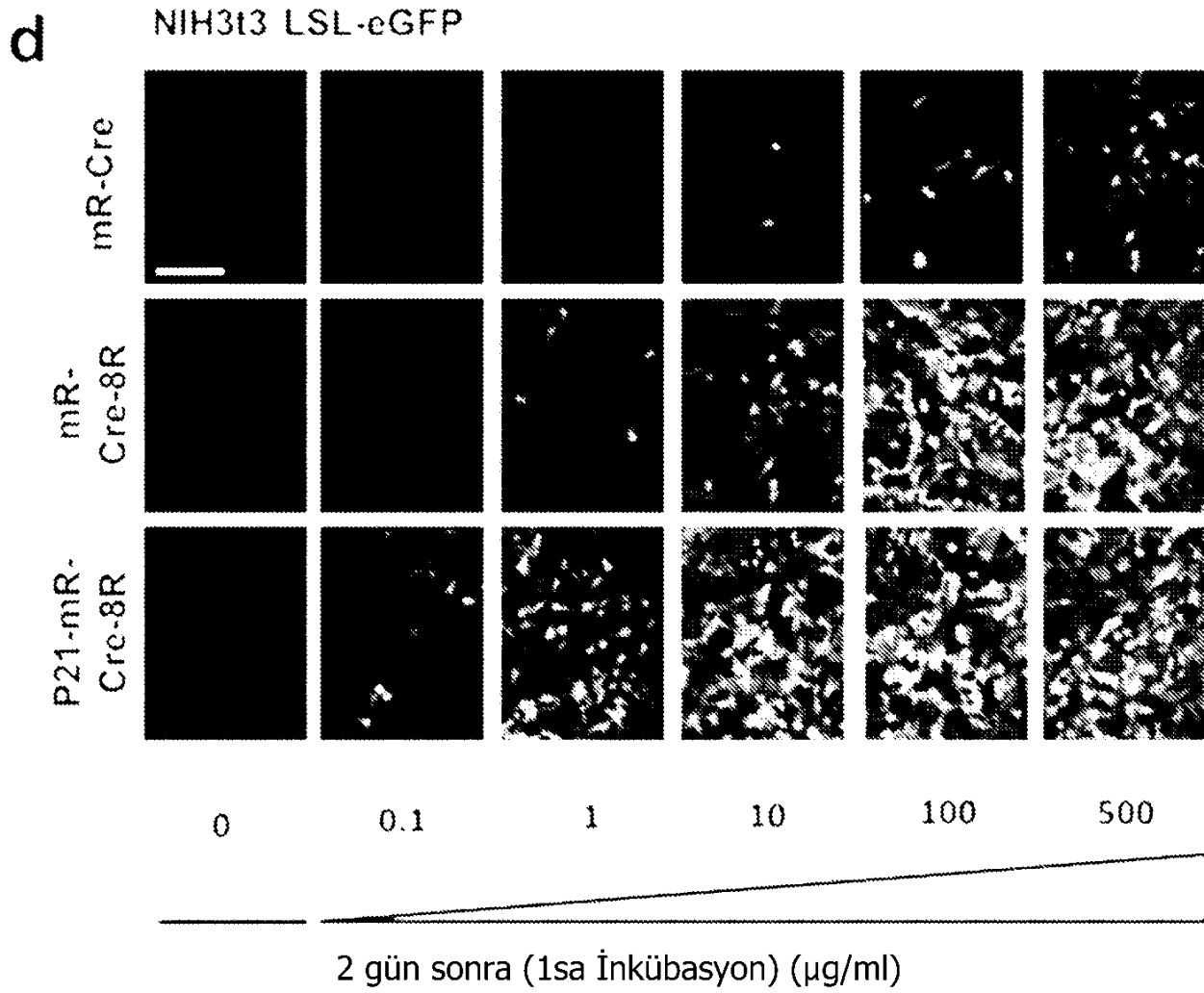
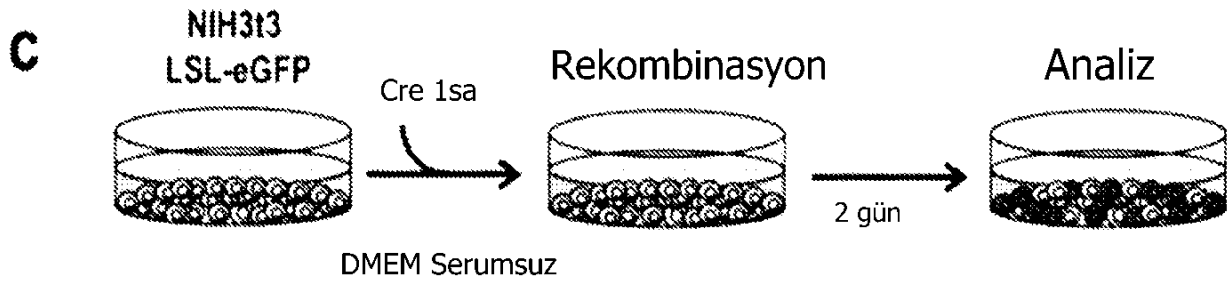
Şekil 4

**b**

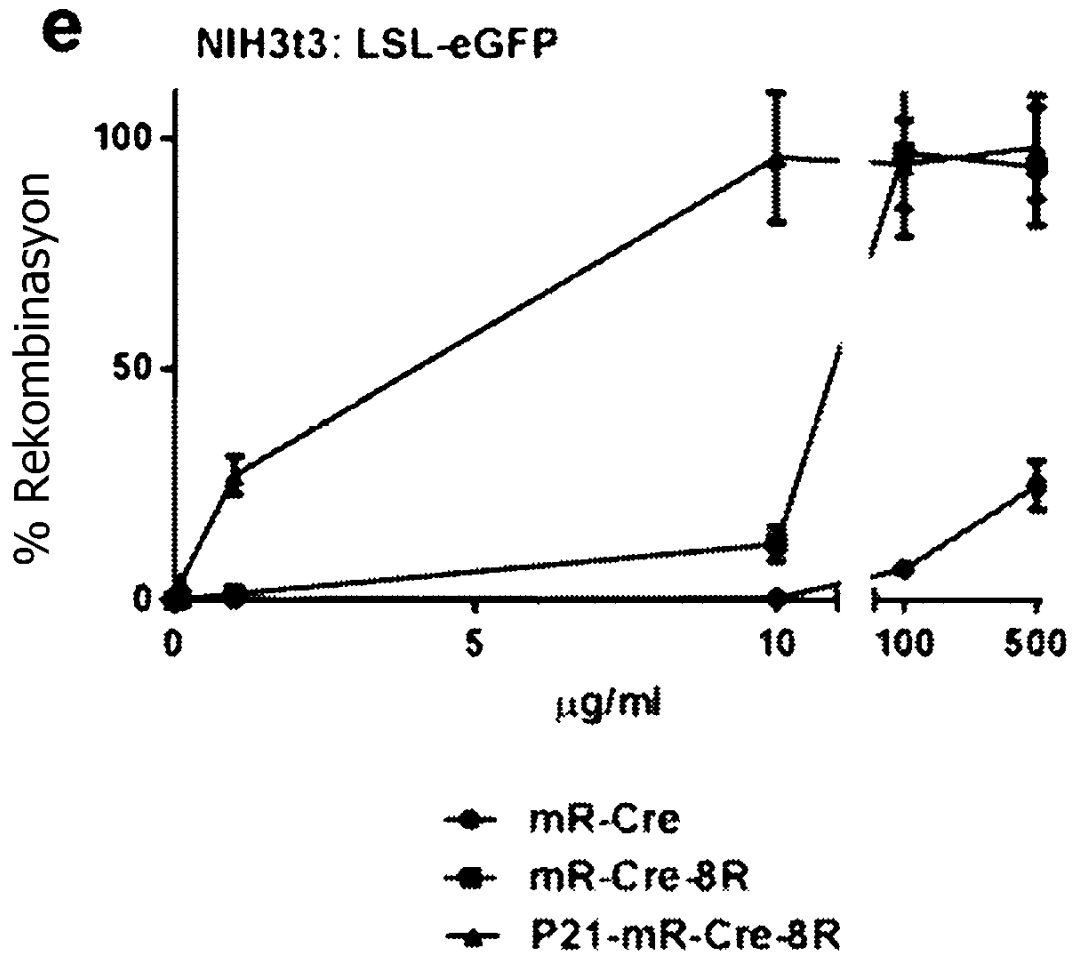
NIH3t3 LSL-eGFP



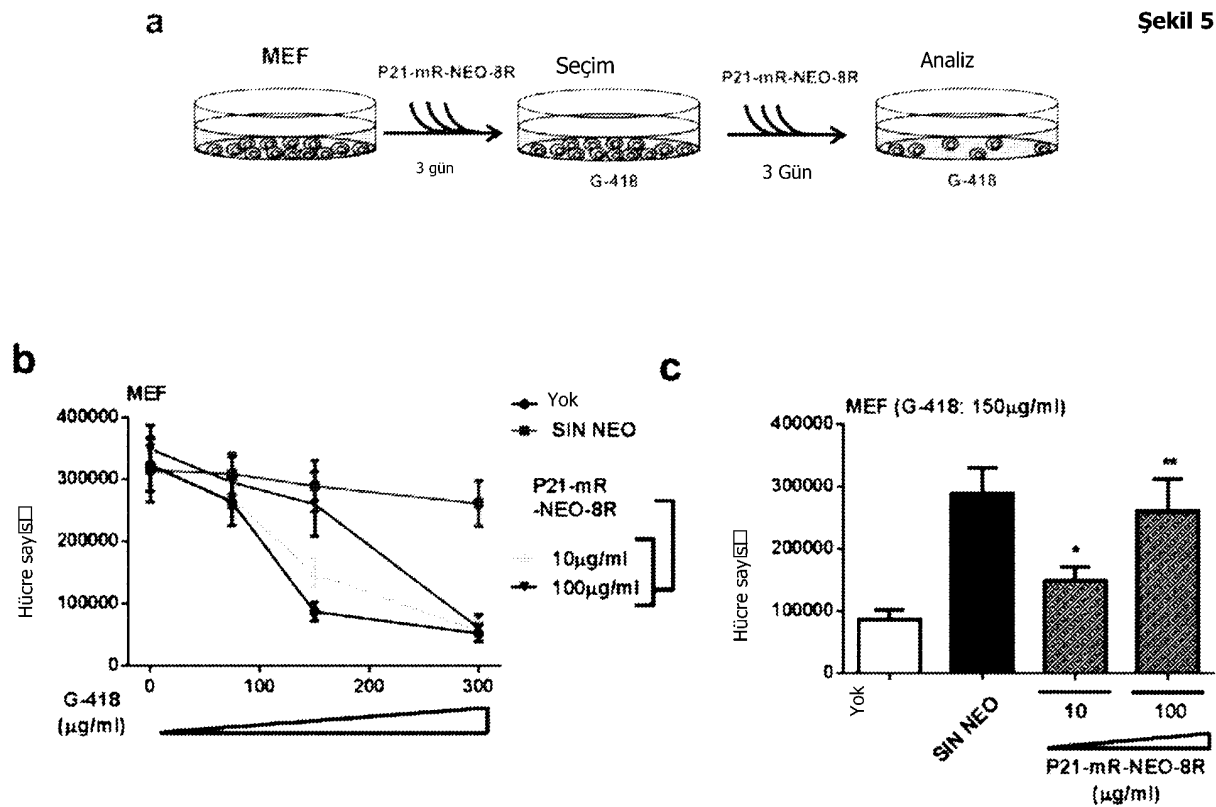
Şekil 4 devam □

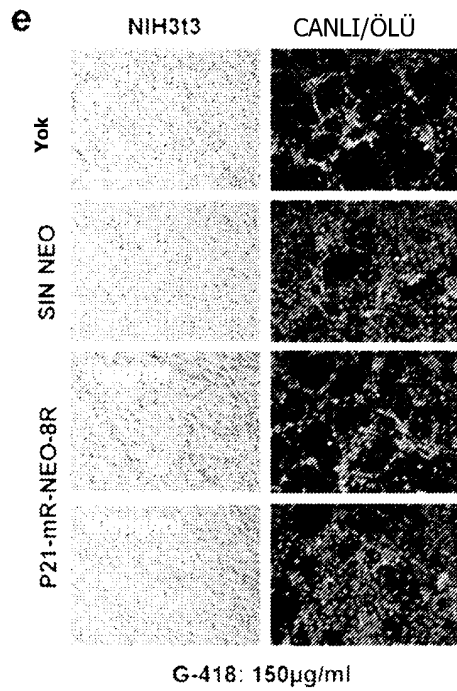
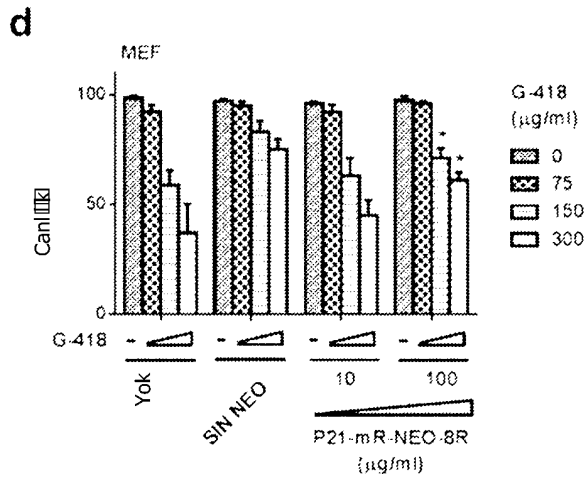


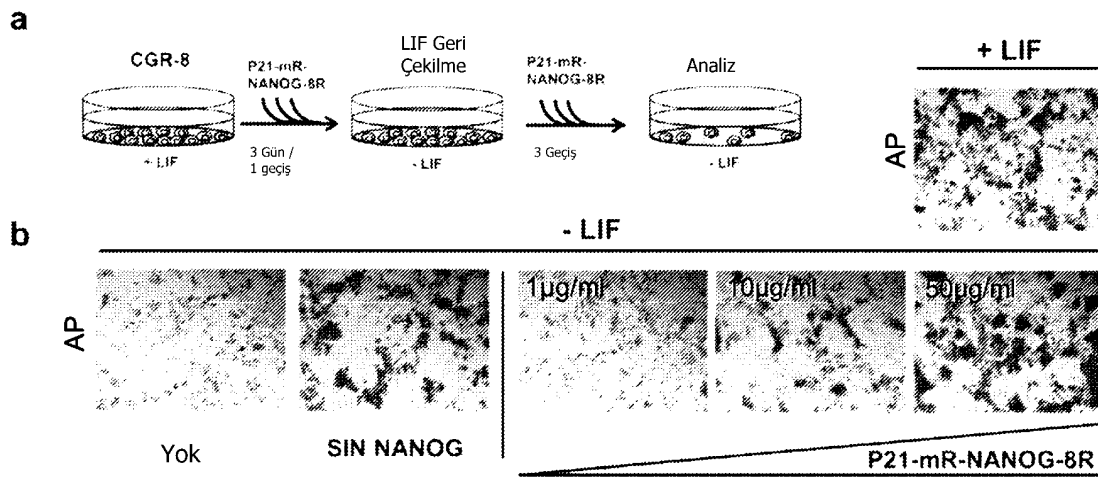
Şekil 4 devam □



Şekil 5

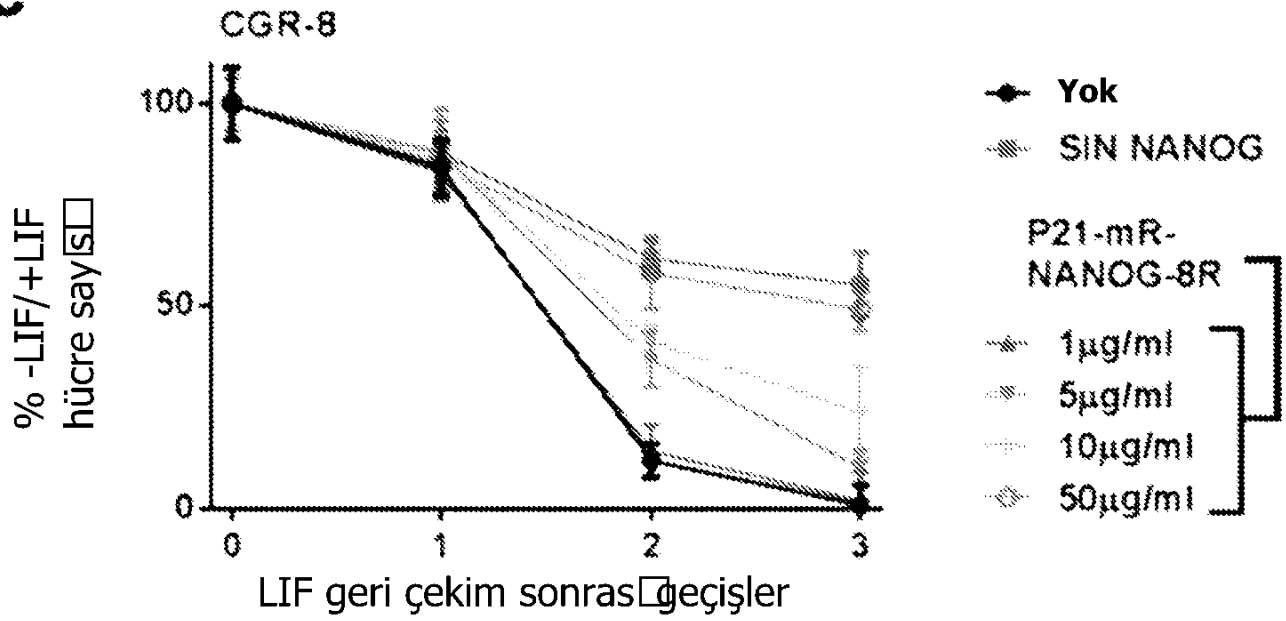




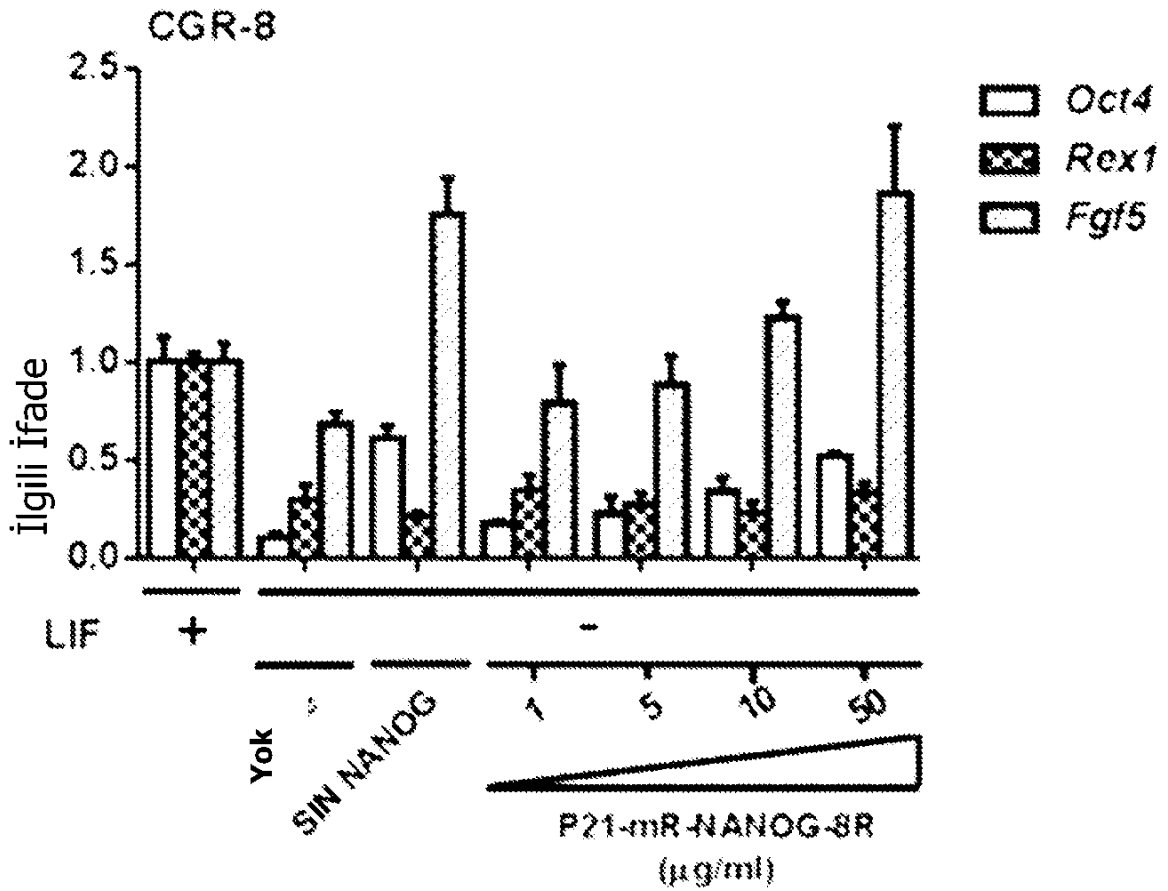


Şekil 6

c

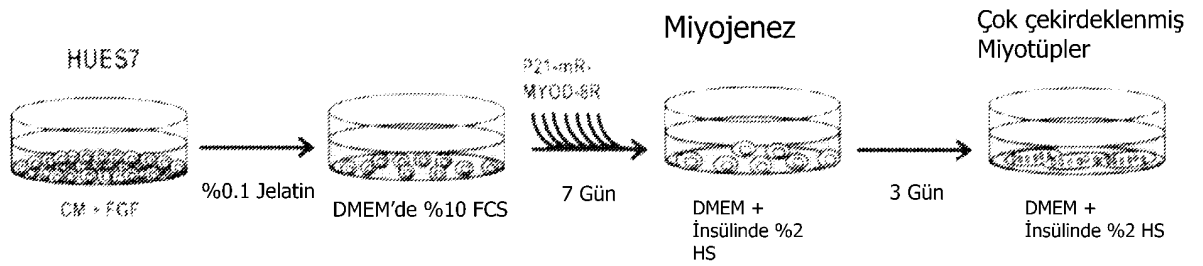


d

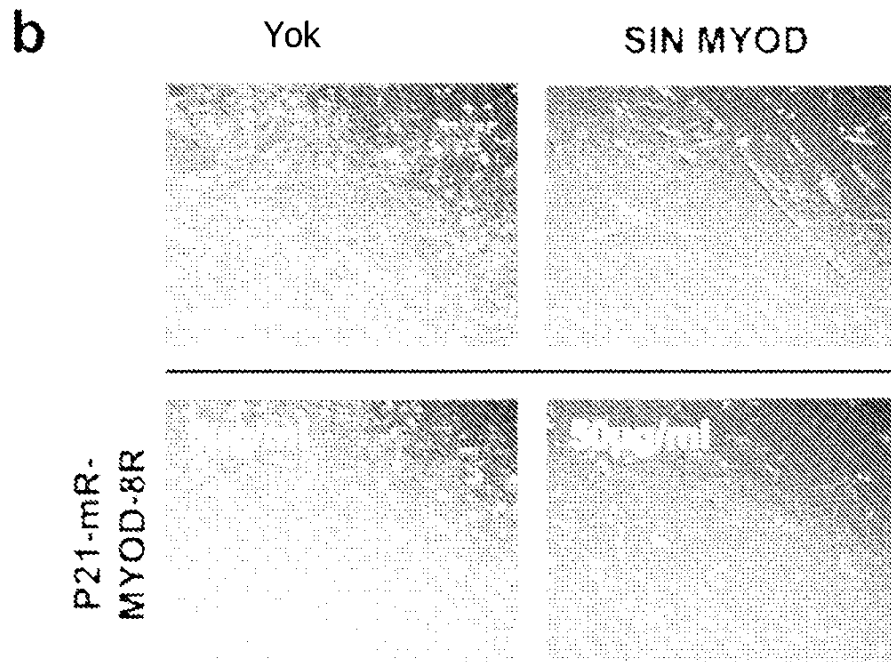


Şekil 7

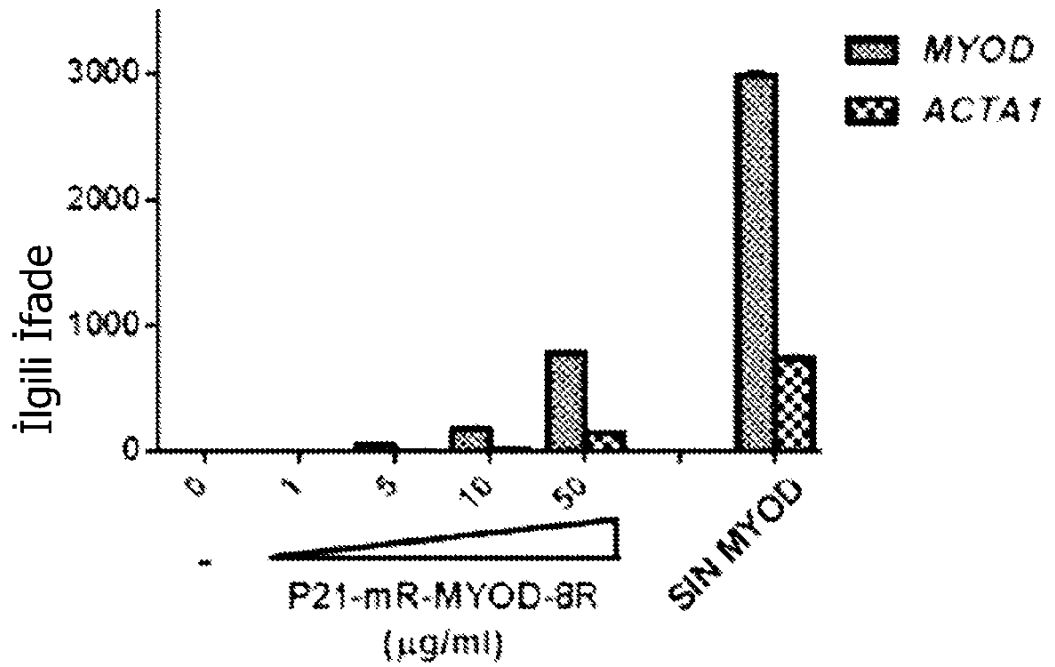
a



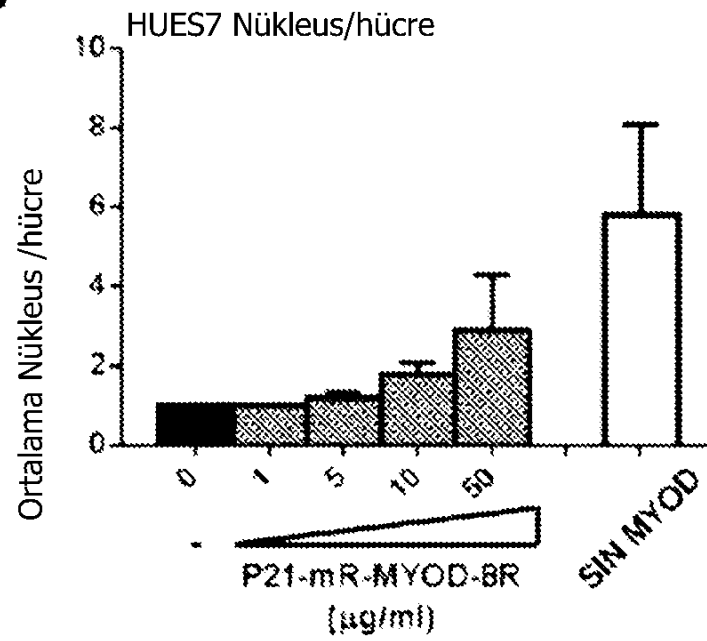
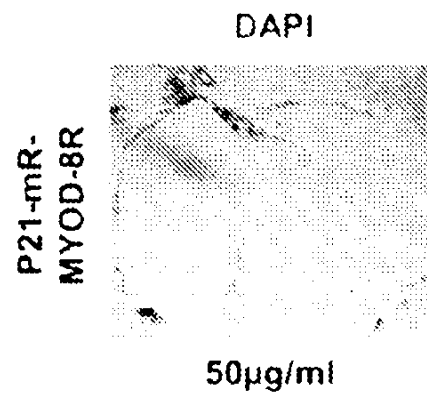
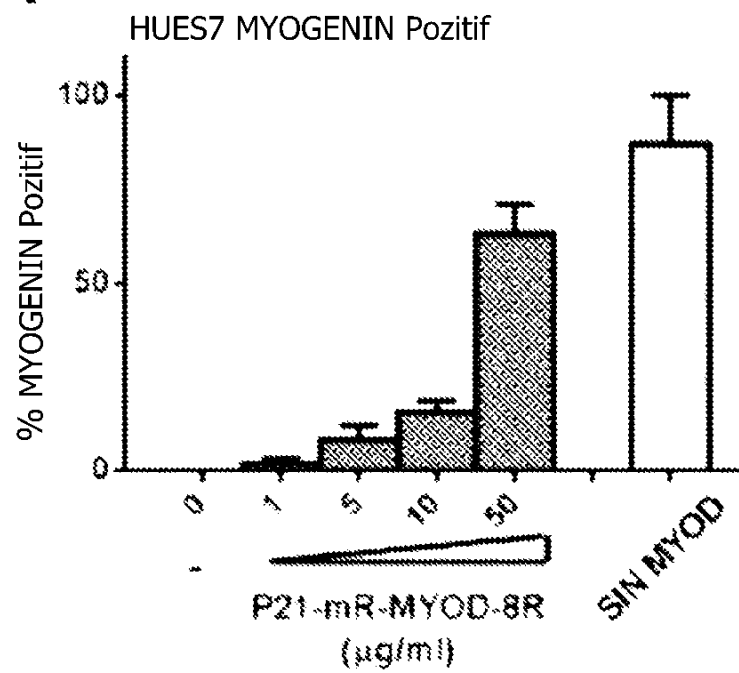
Şekil 7 devam □

**c**

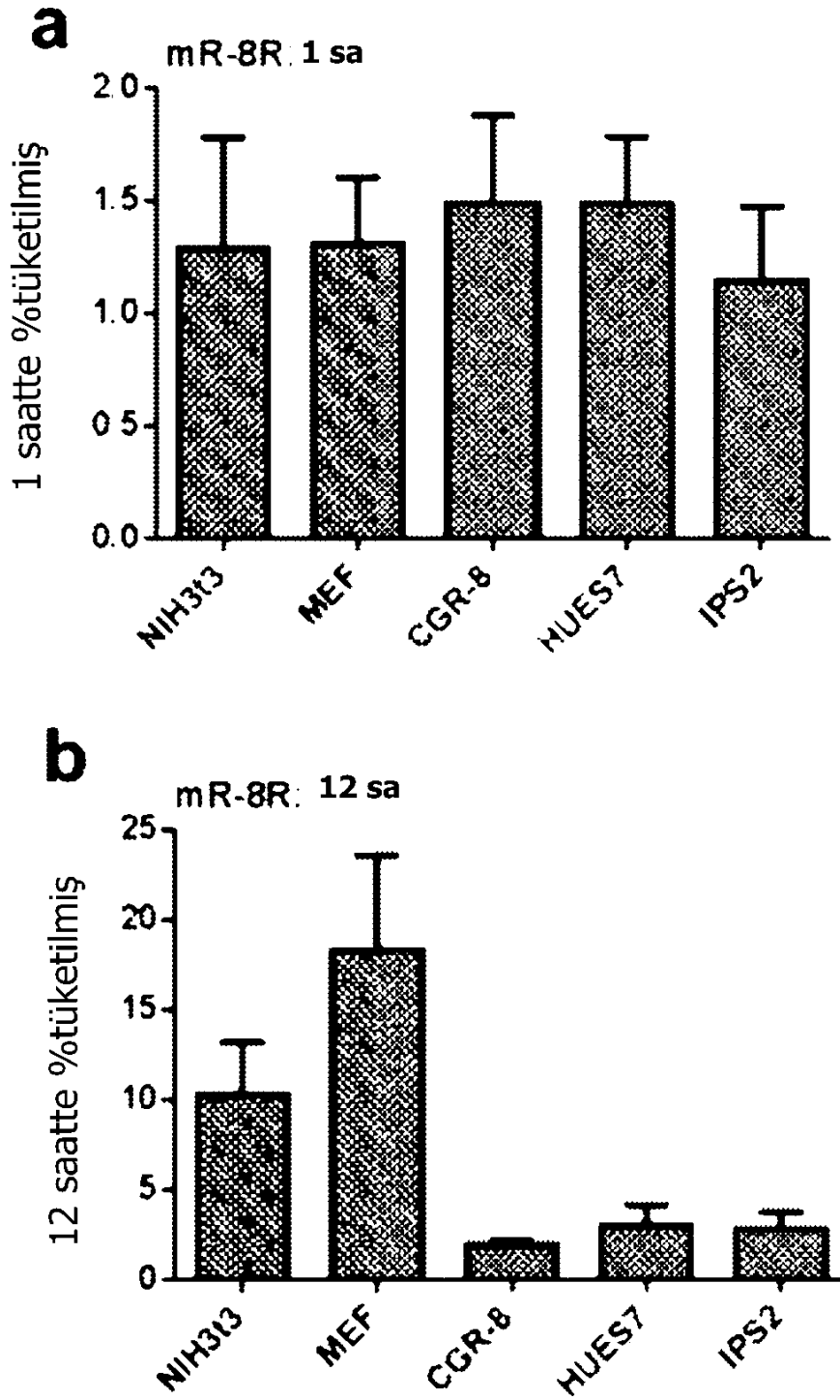
HUES7 Miyojenik Gen ifadesi



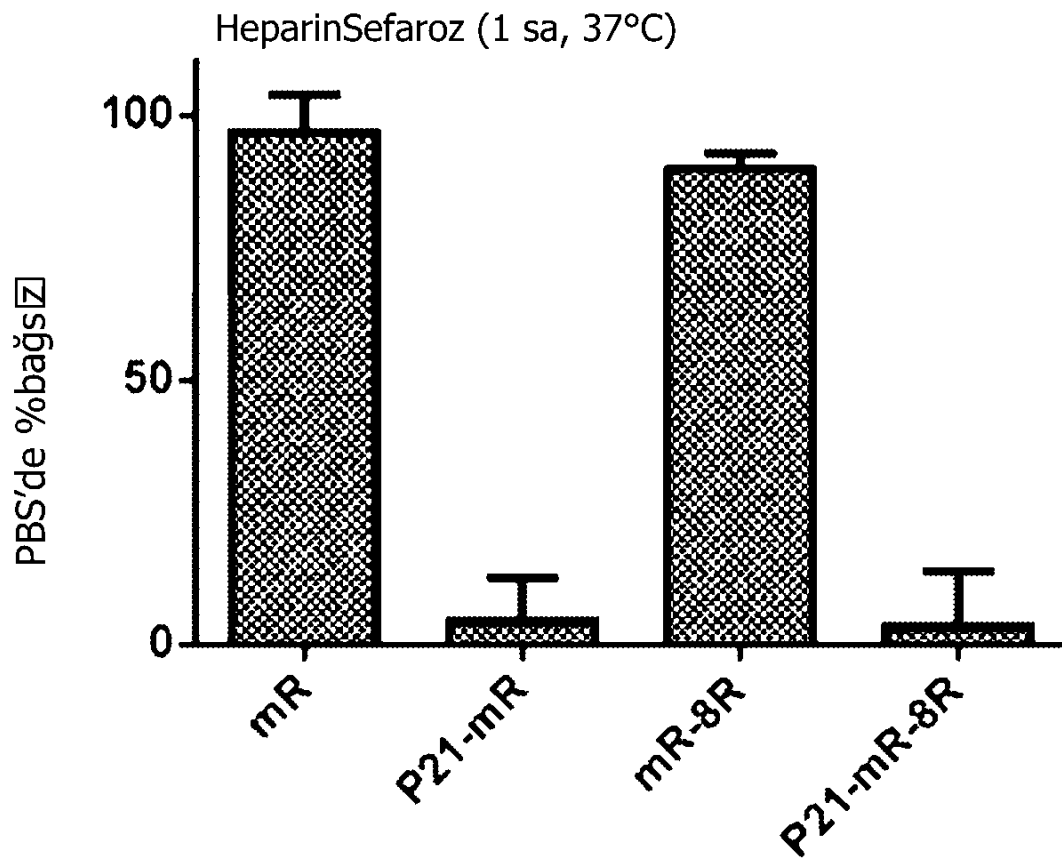
Şekil 7 devam □

d**e****f**

Şekil 8

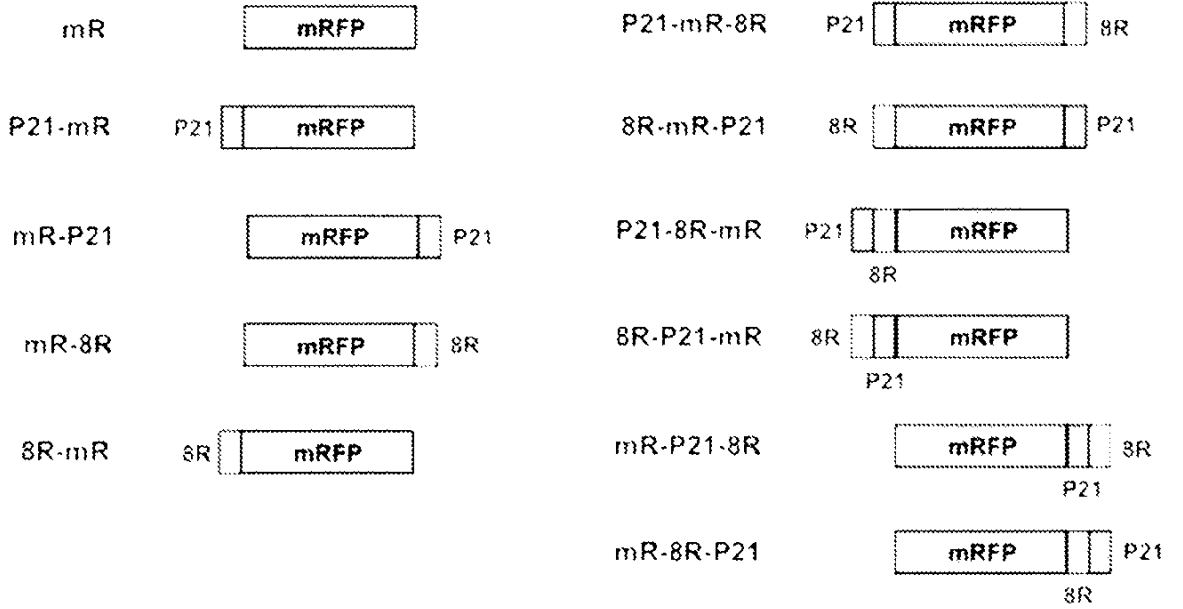


Şekil 9

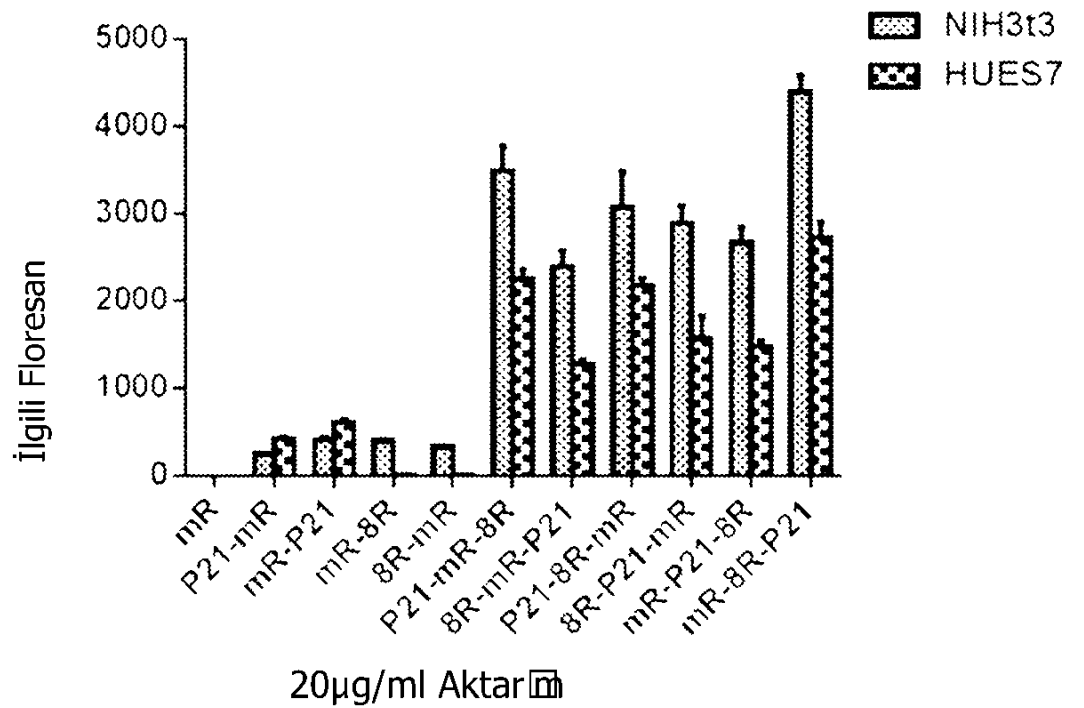


Şekil 10

a

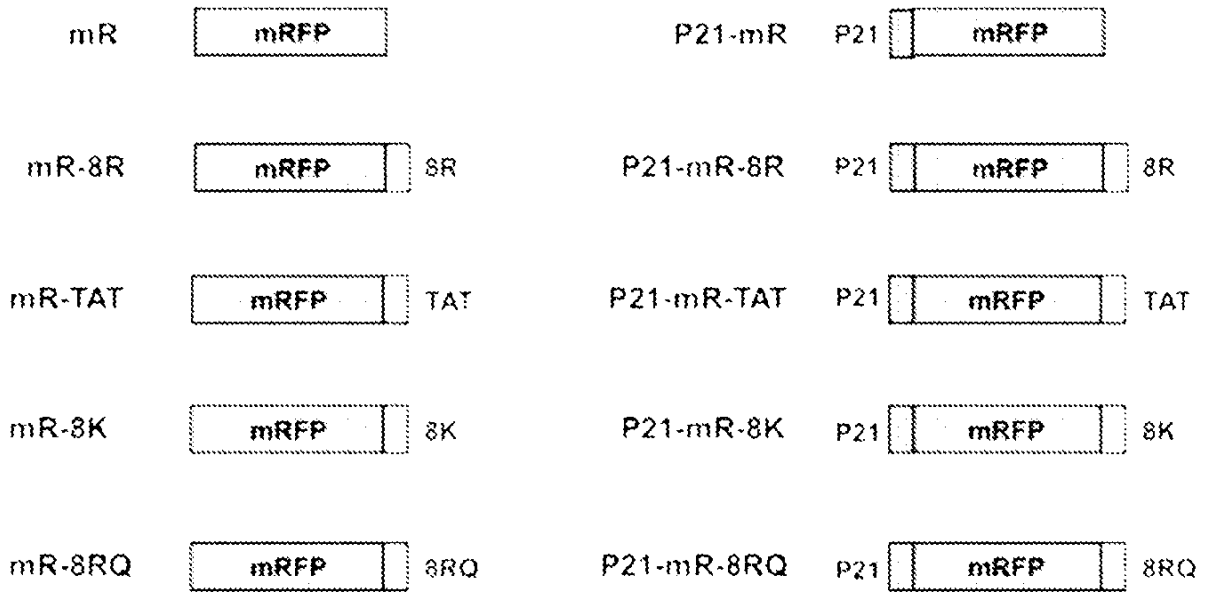


b

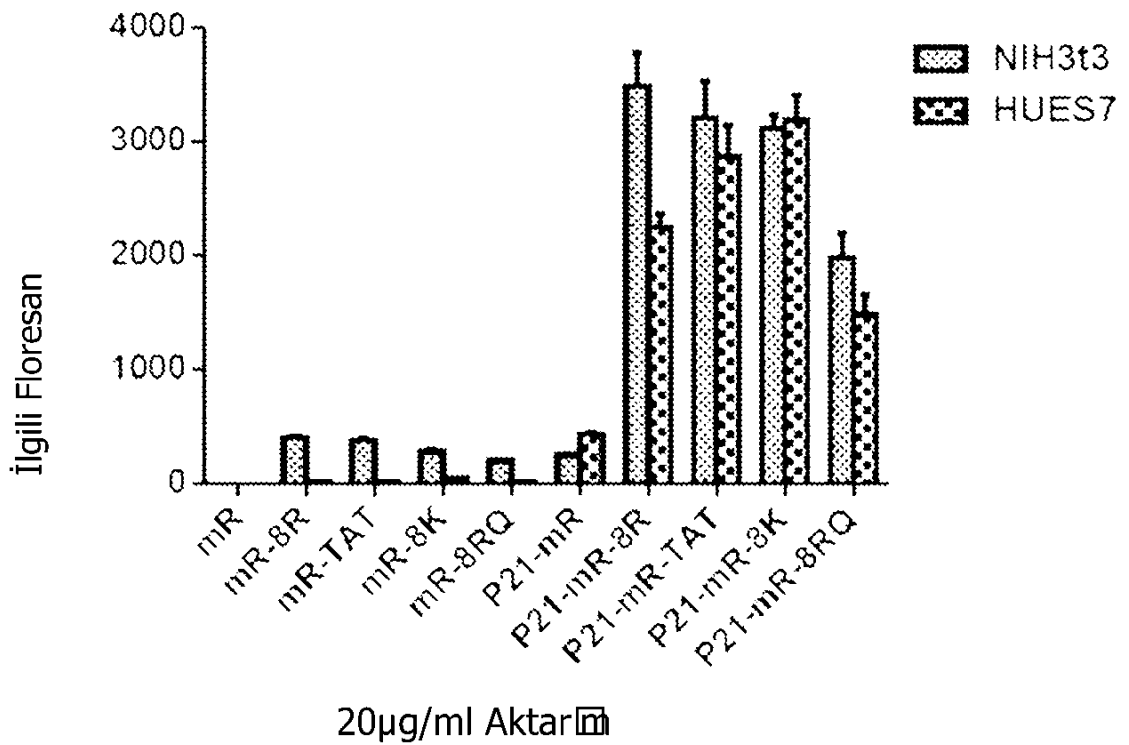


Şekil 11

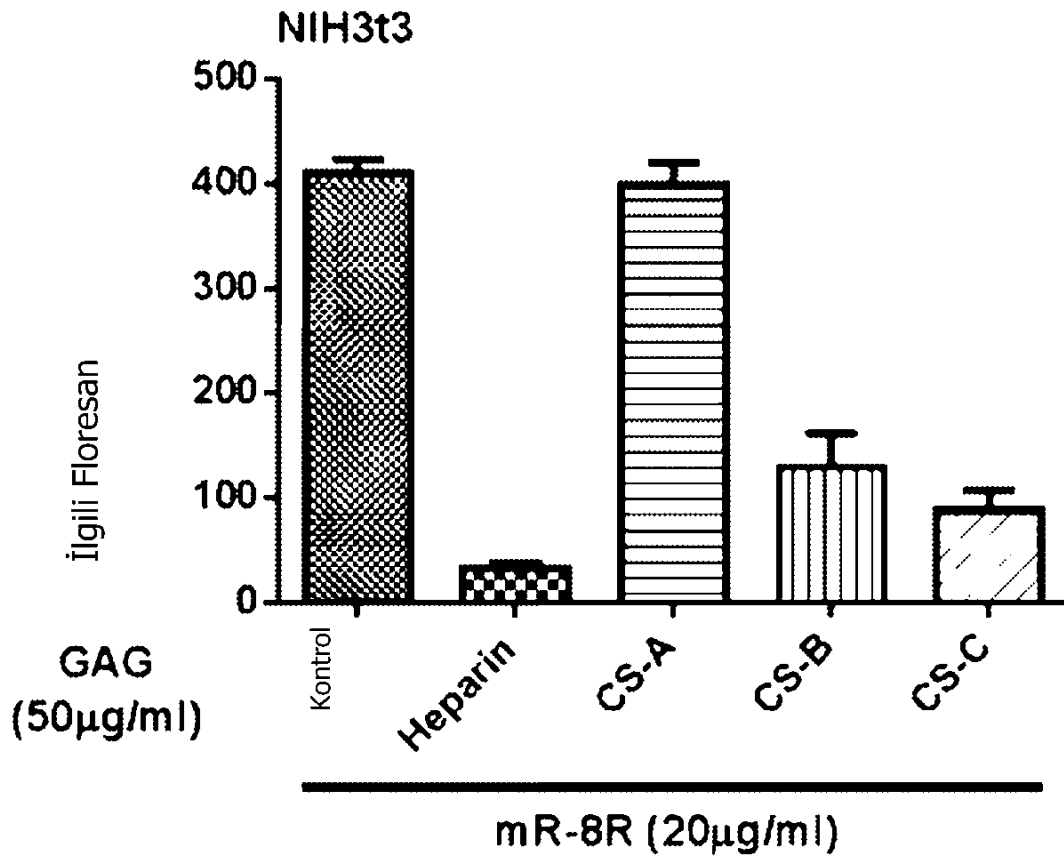
a



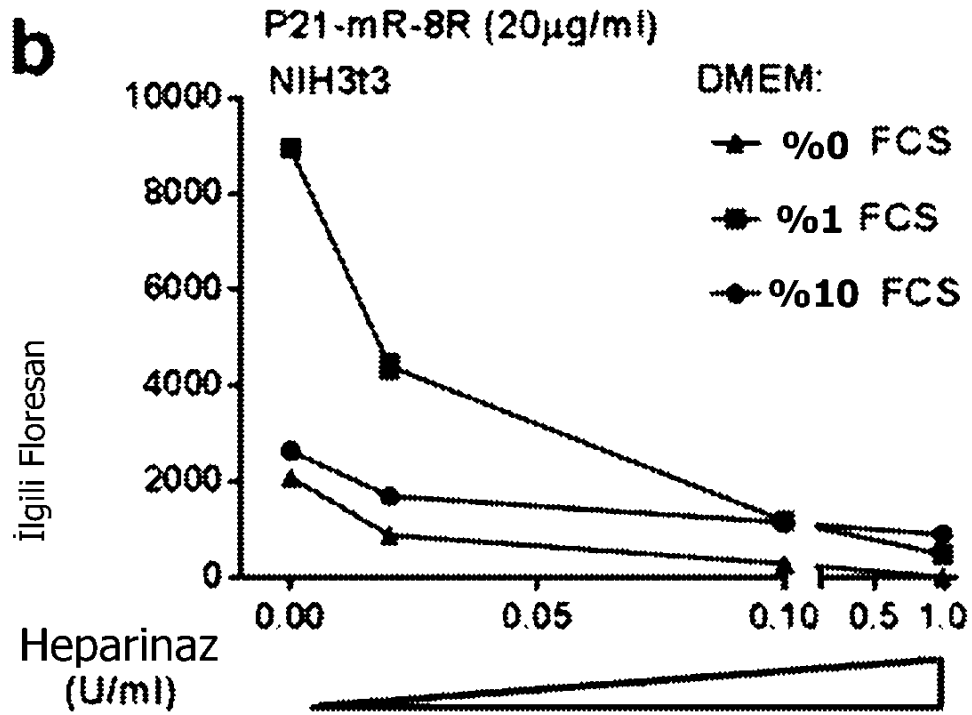
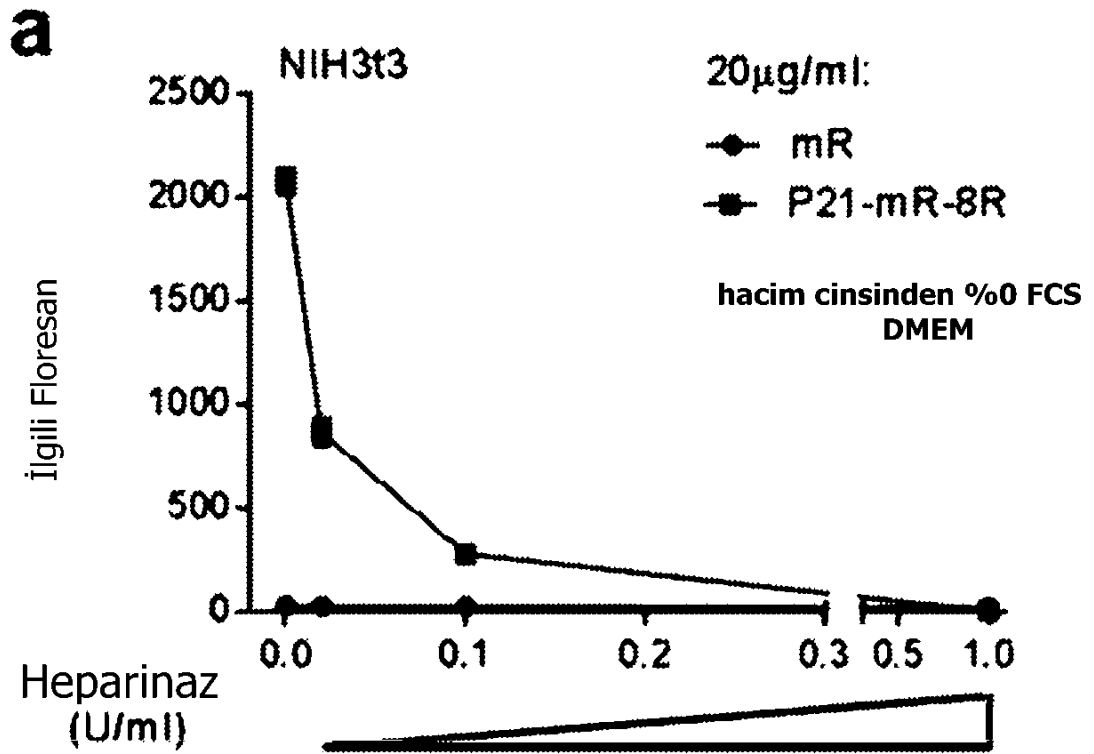
b



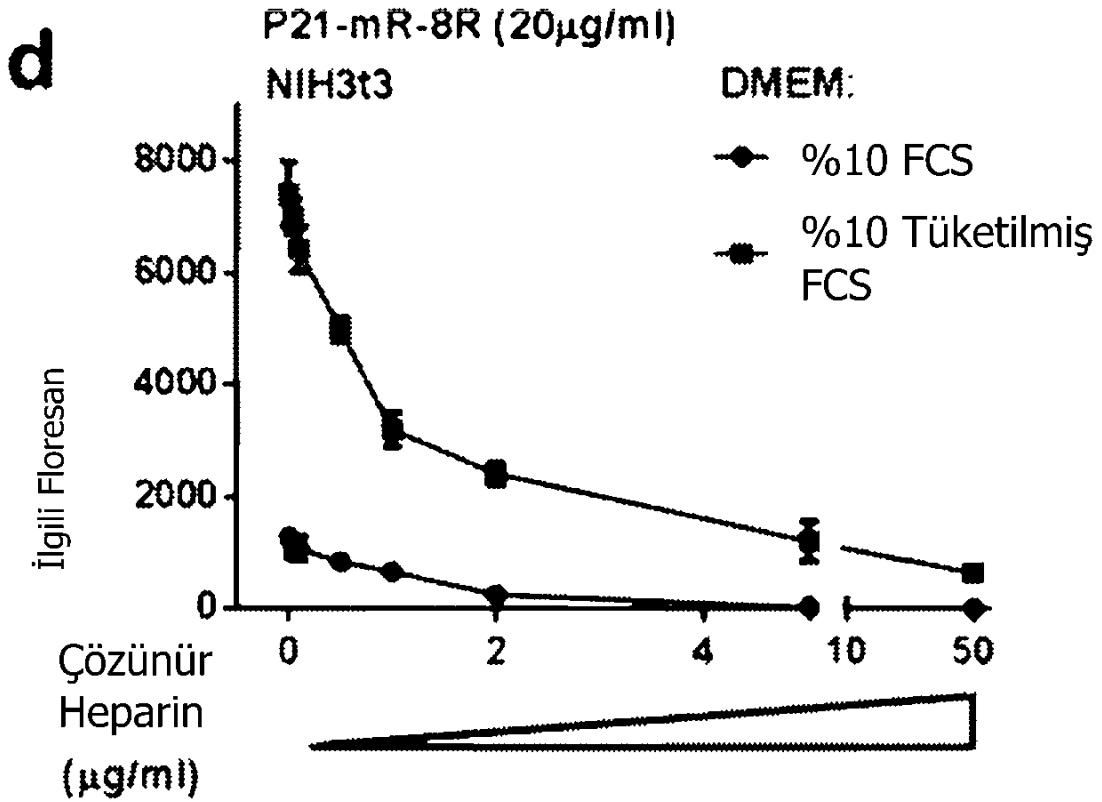
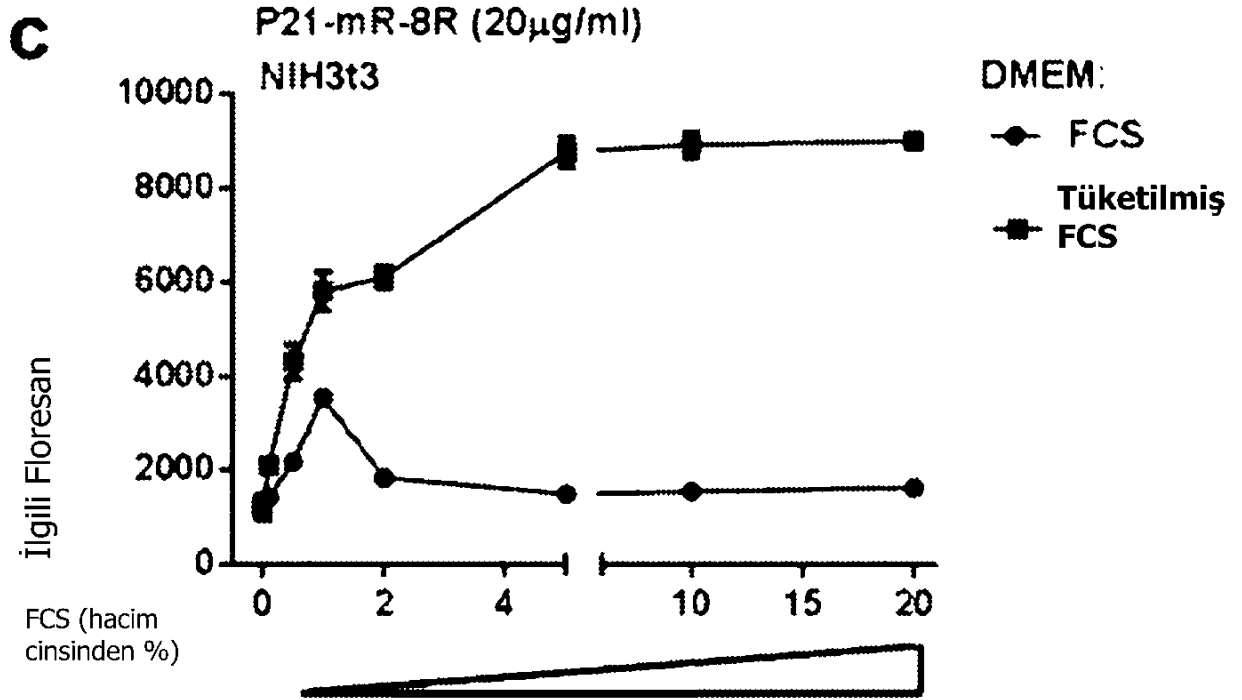
Şekil 12



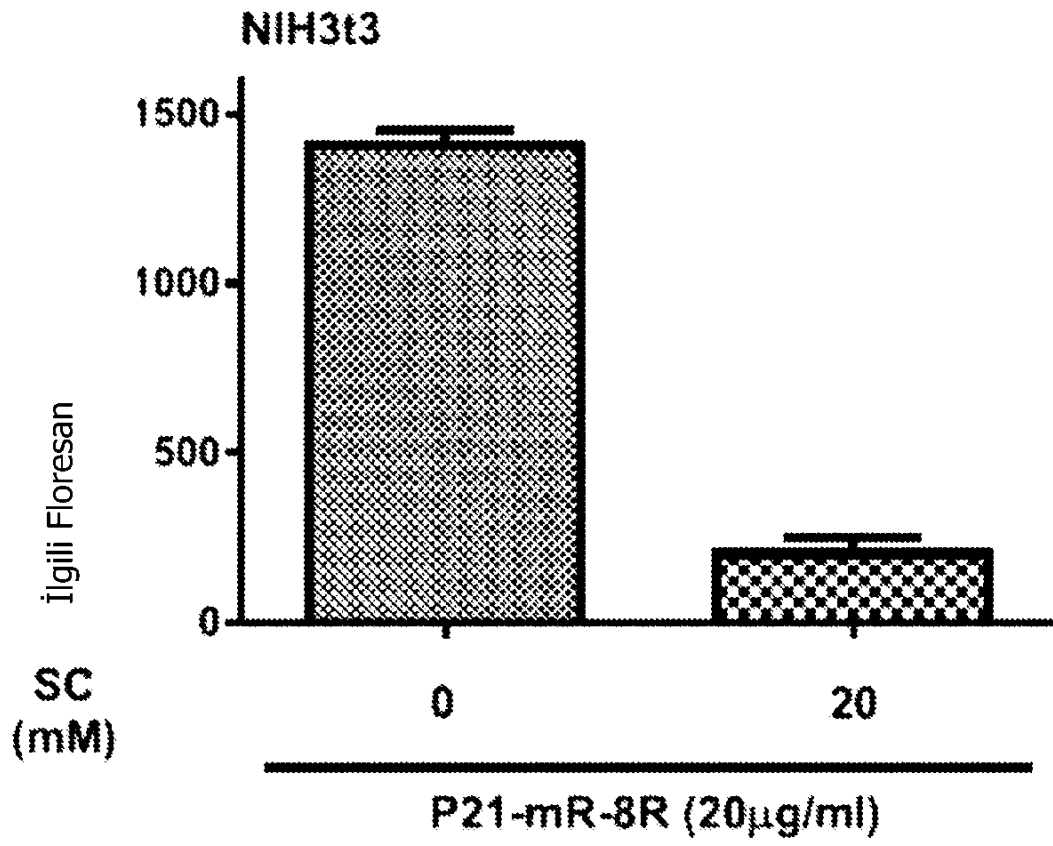
Şekil 13



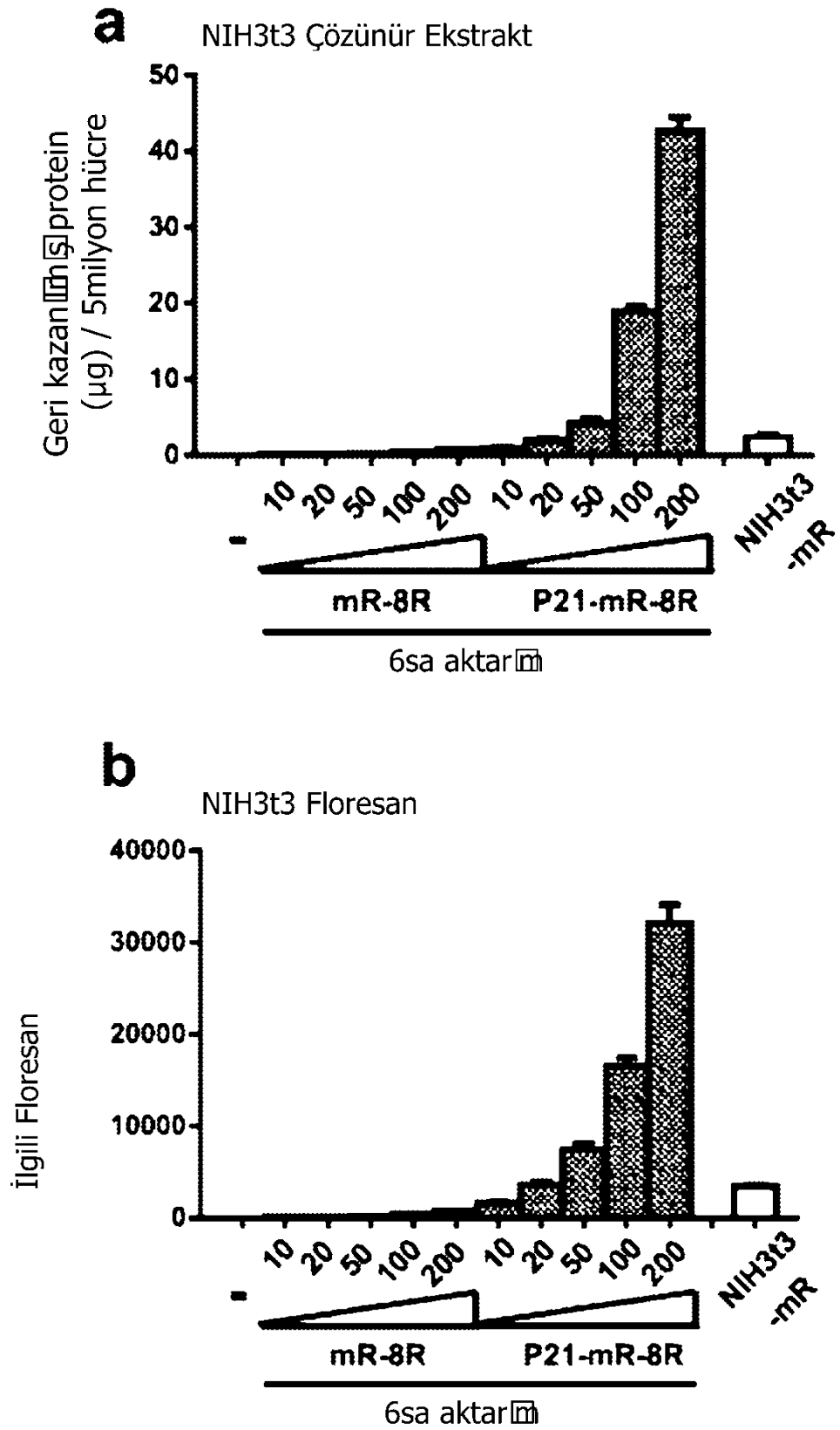
Şekil 13



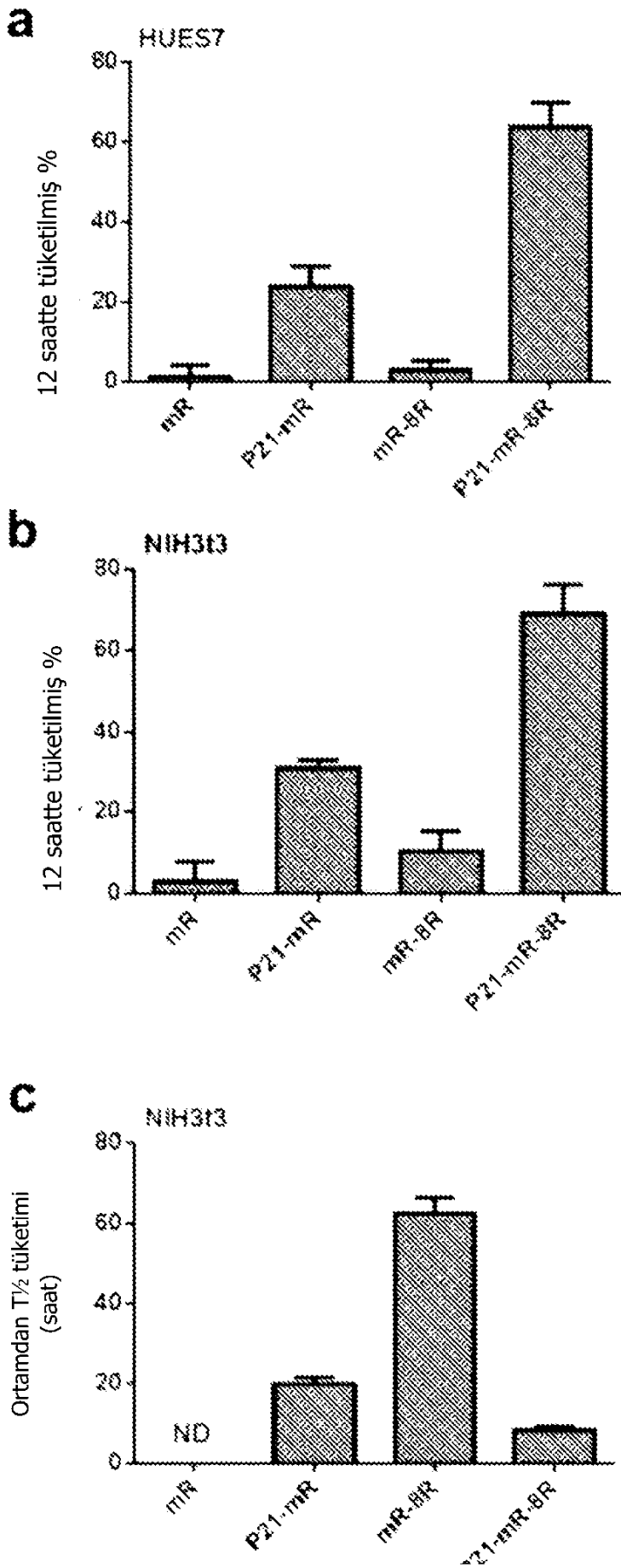
Şekil 14



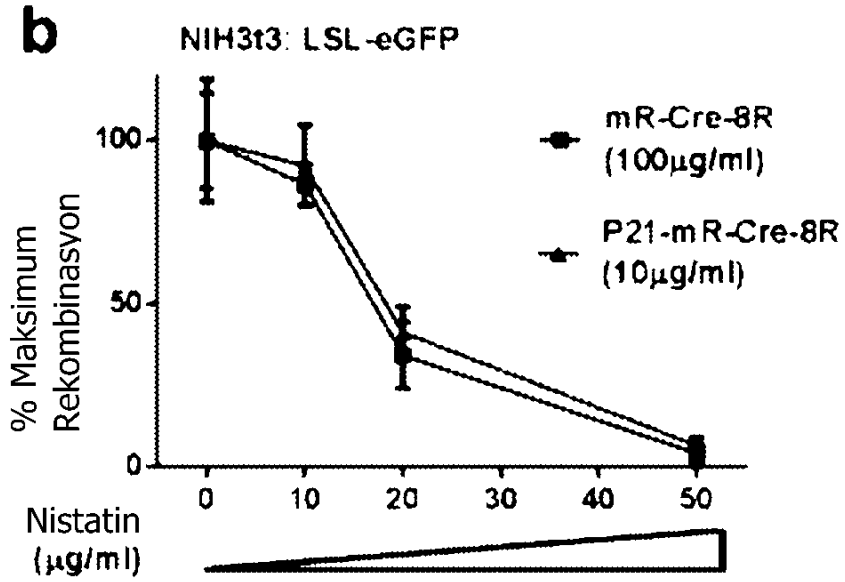
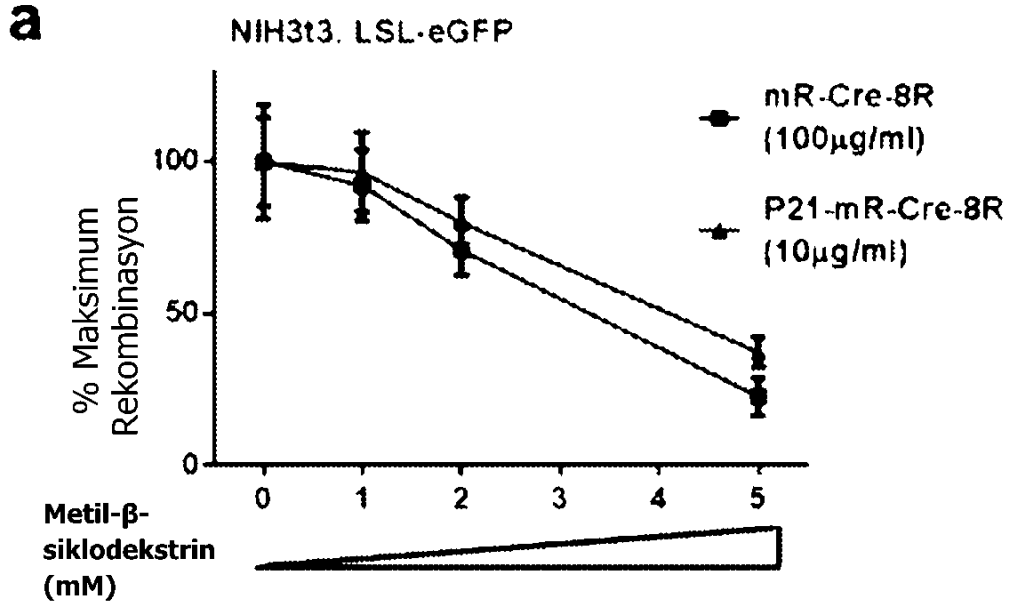
Şekil 15



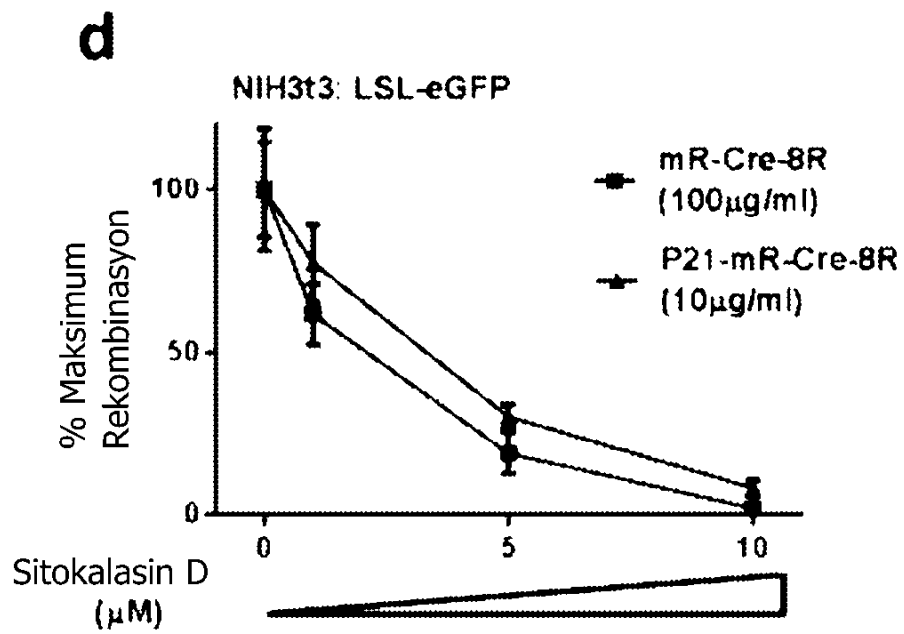
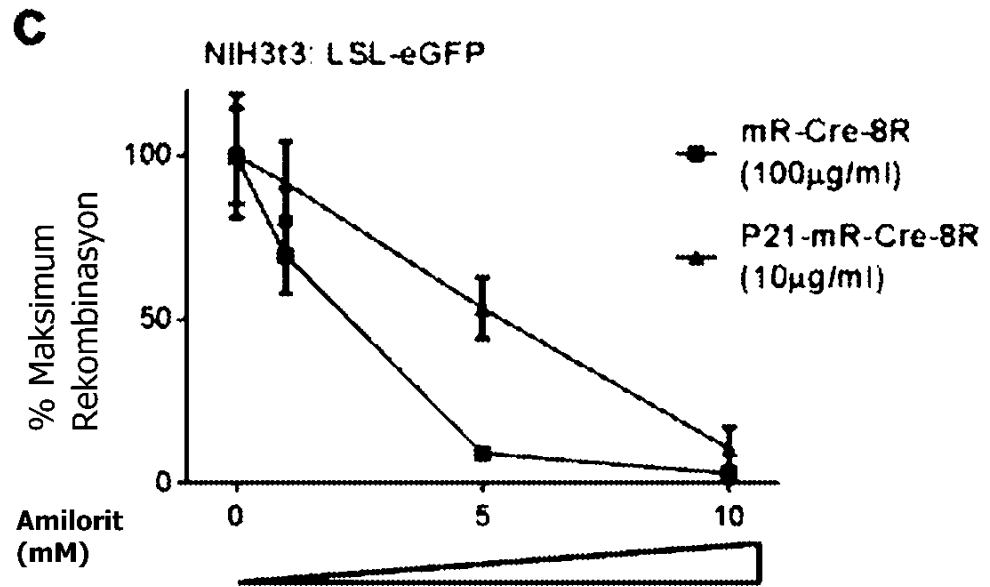
Şekil 16



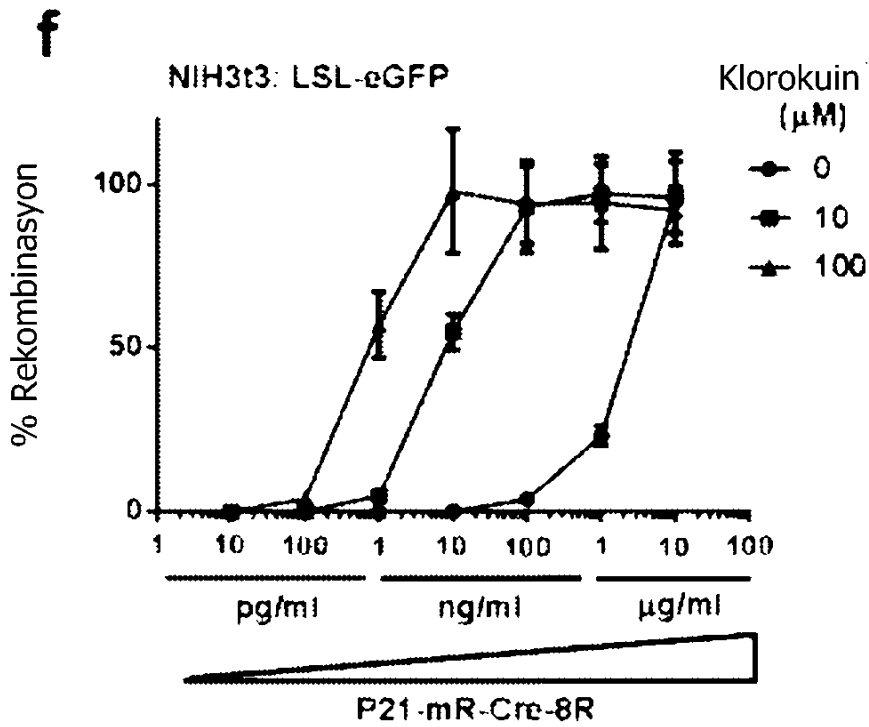
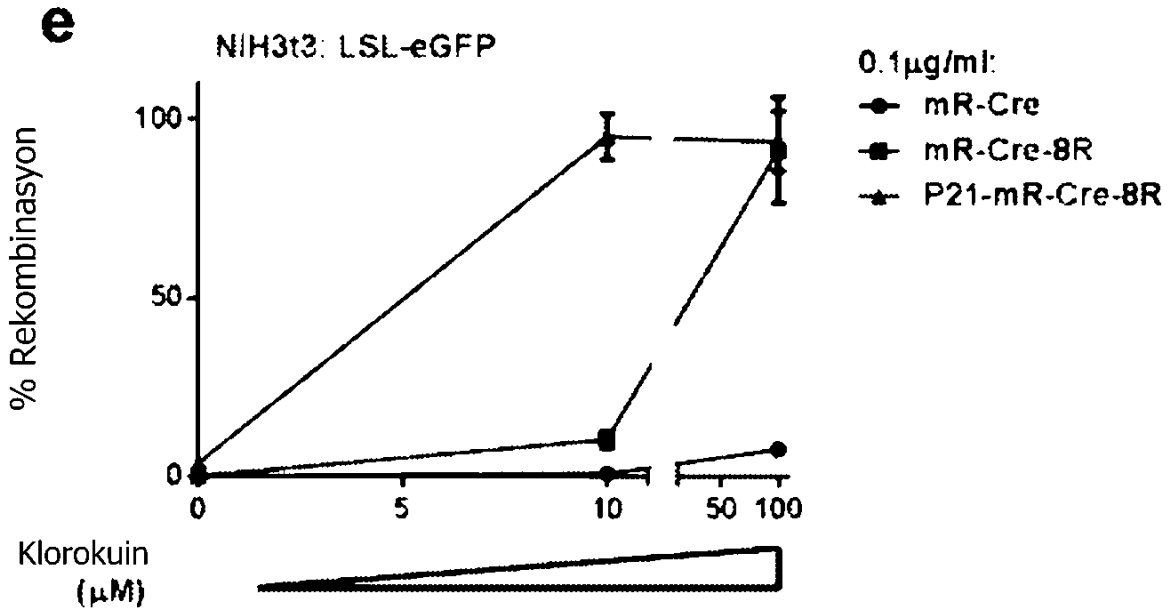
Şekil 17



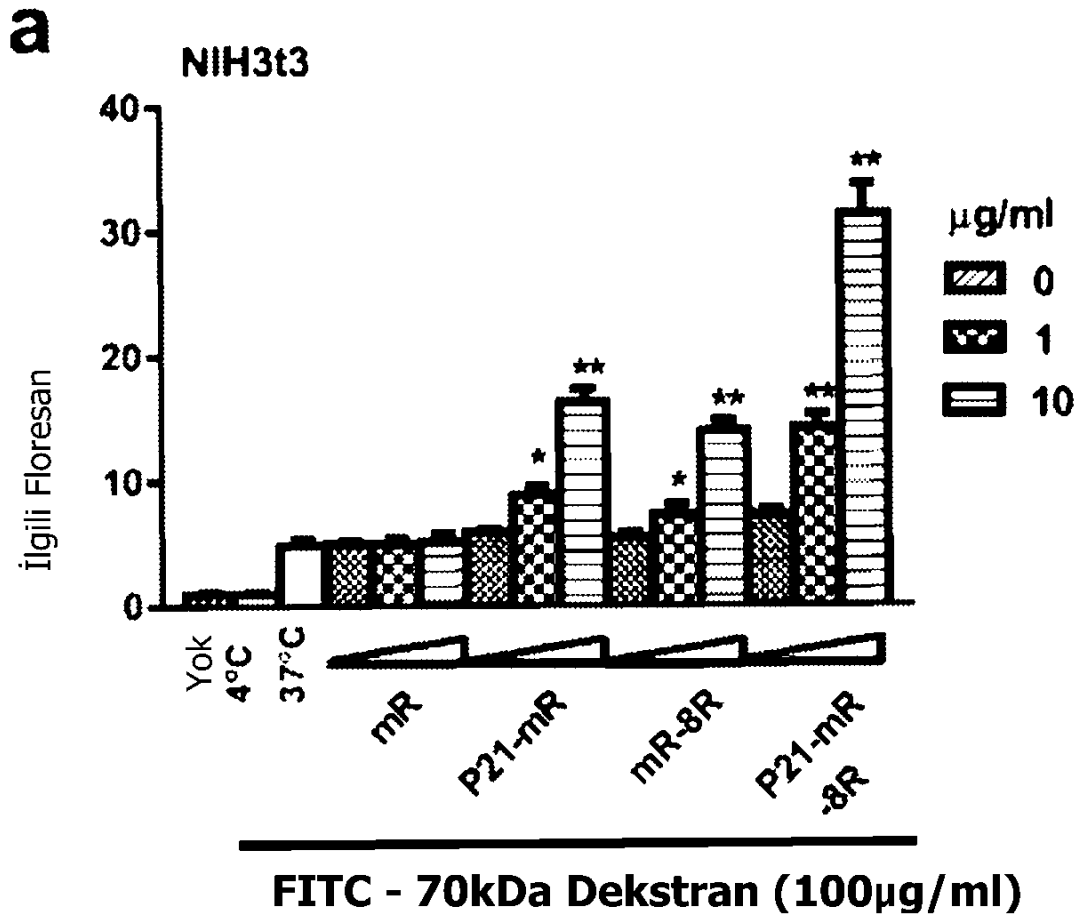
Şekil 17 devam □



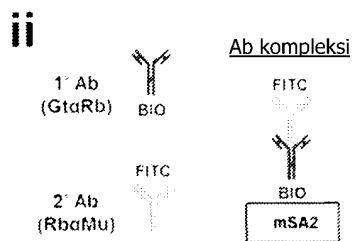
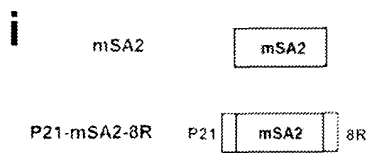
Şekil 17 devam □



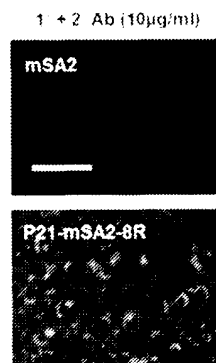
Şekil 18



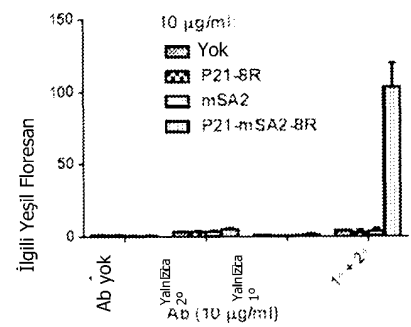
a Antikorlar

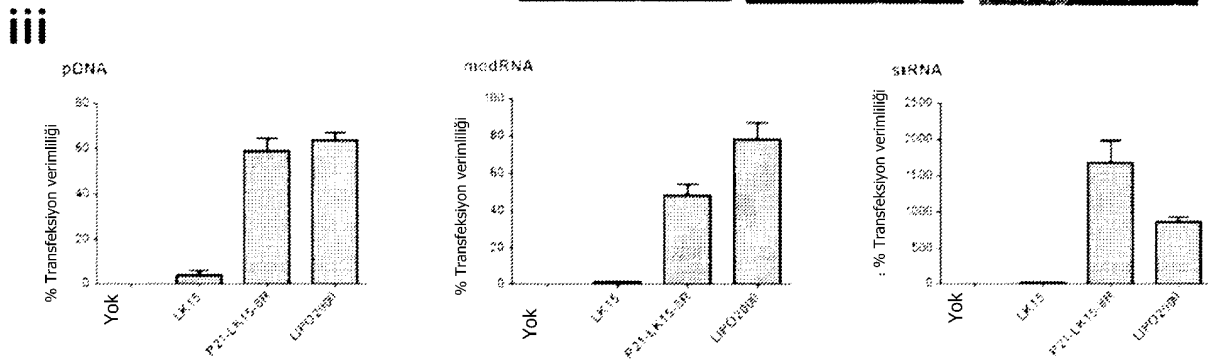
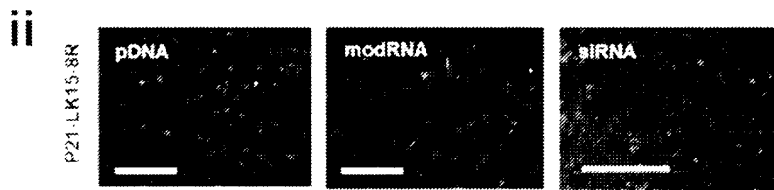
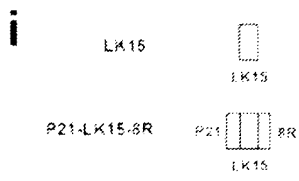


iii

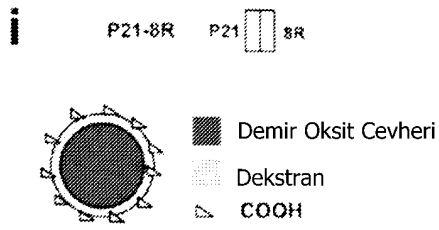


iv

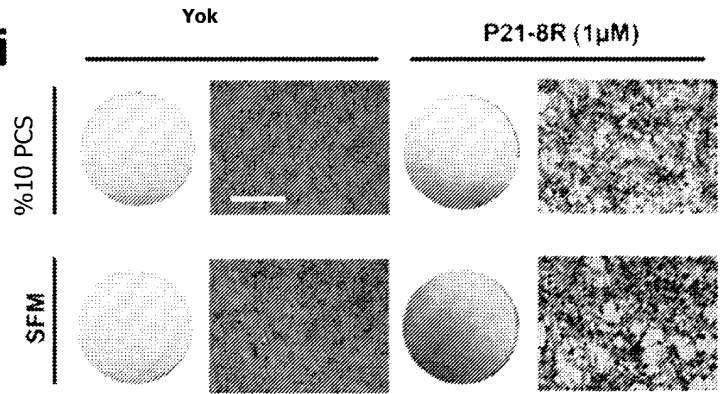


b Nükleik asitler

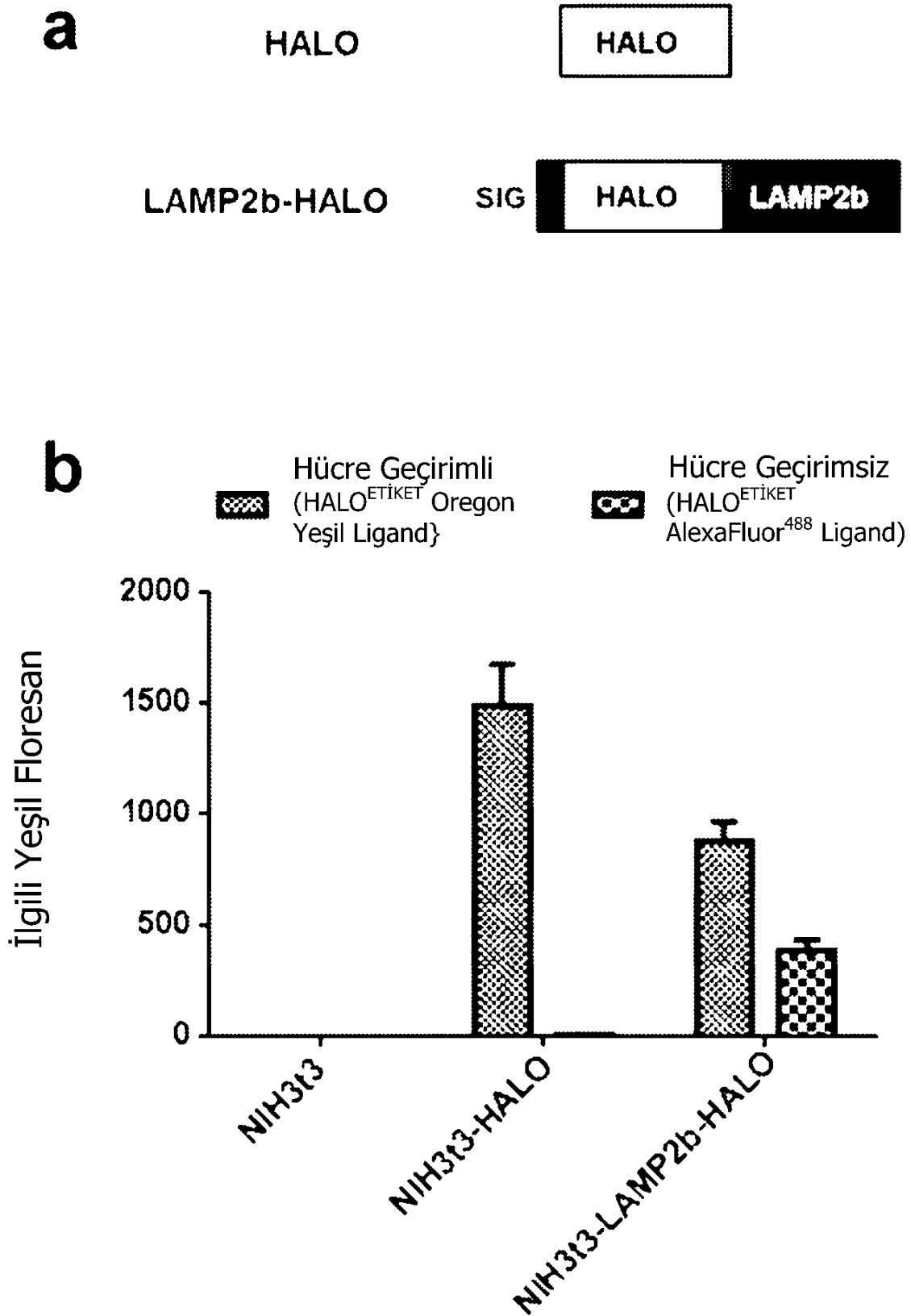
C Nanopartiküller



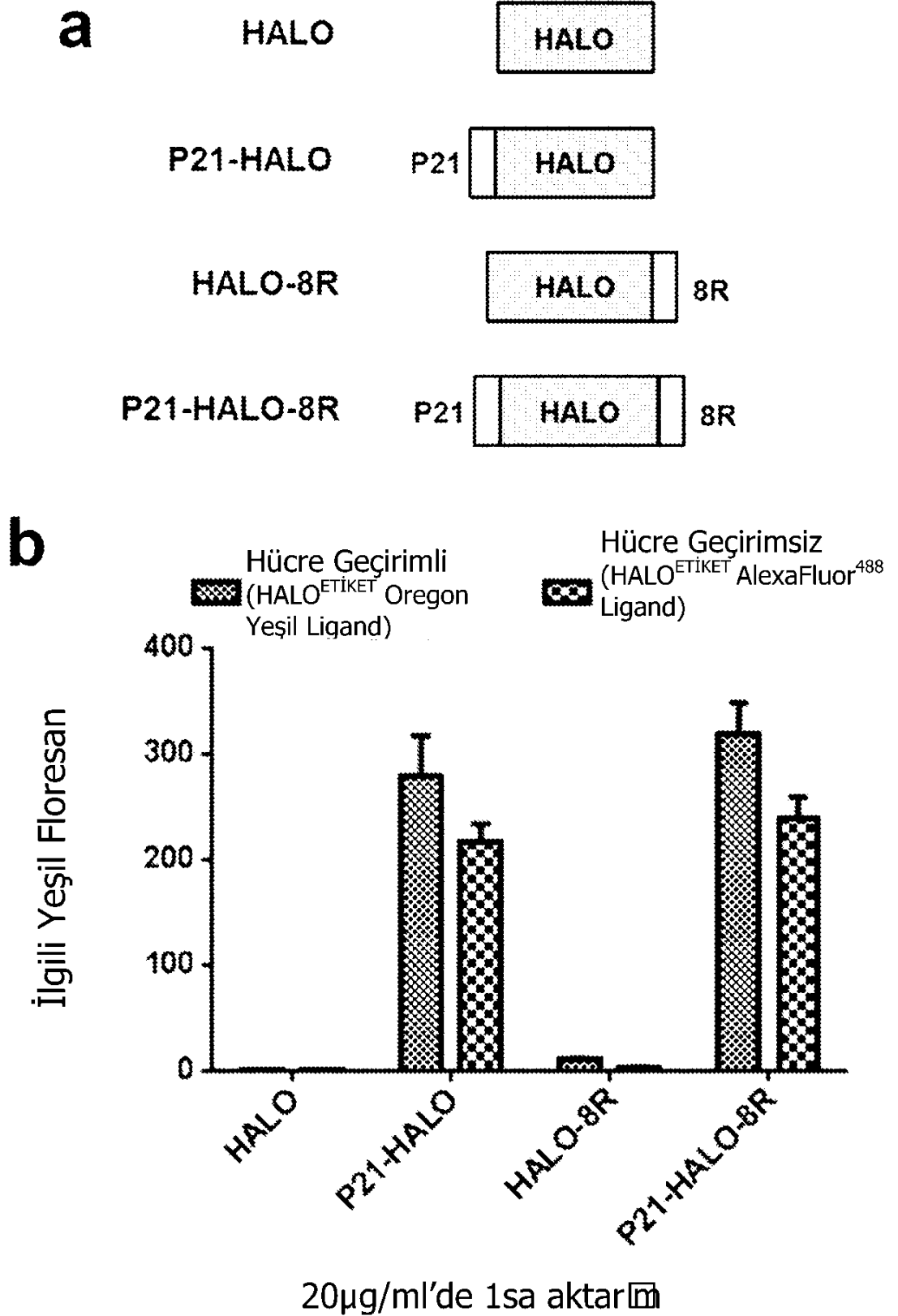
ii



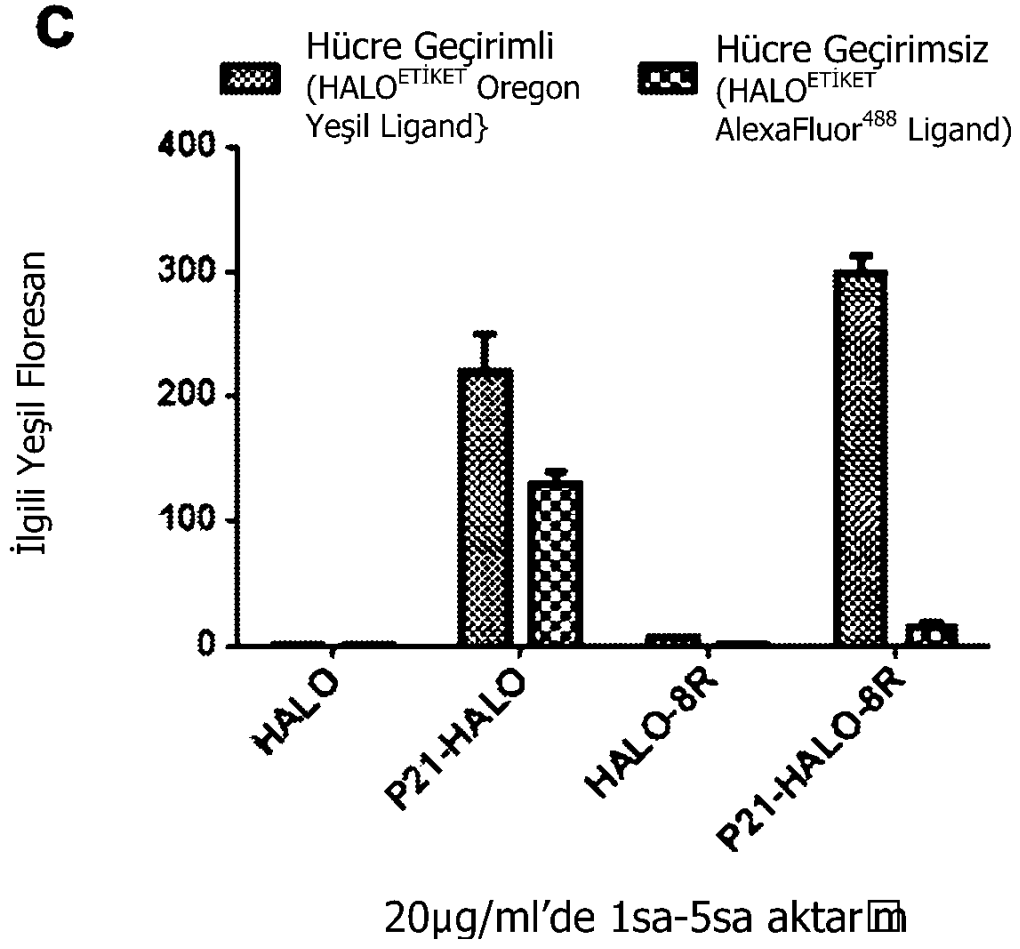
Şekil 20



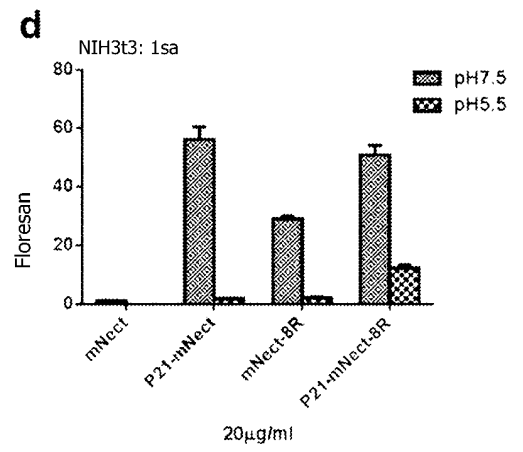
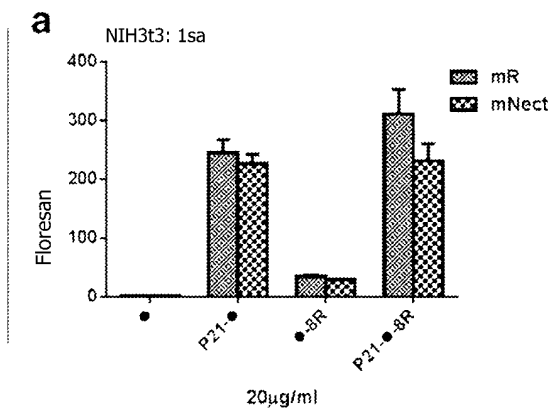
Şekil 21



Şekil 21 devam □

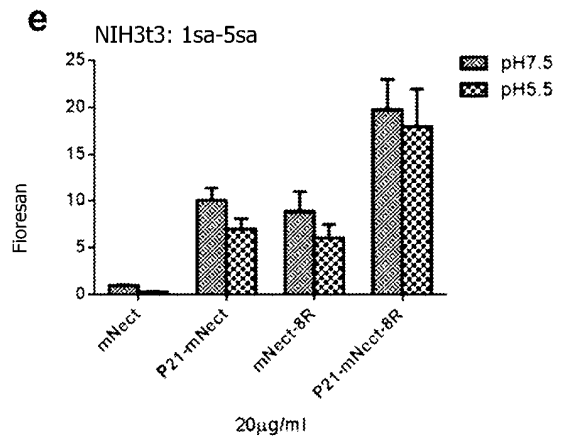
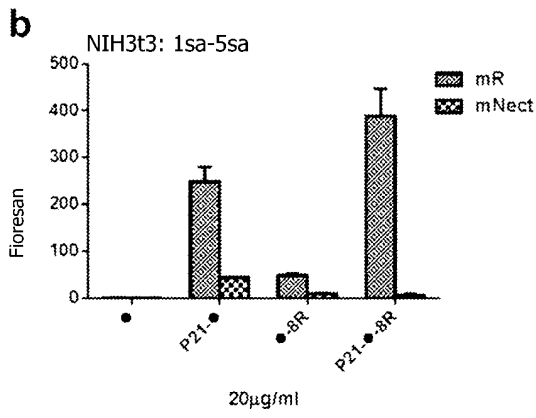


Membran bağlama
1sa

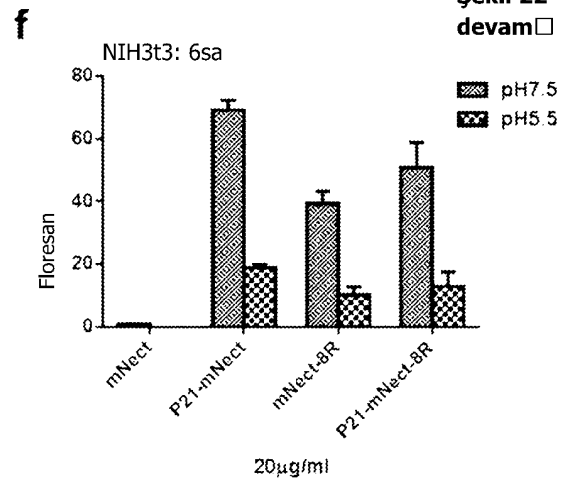
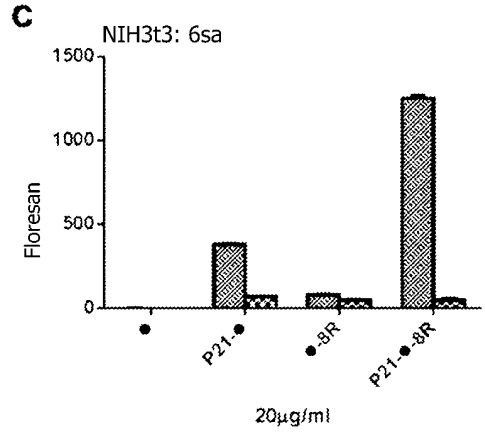


Şekil 22

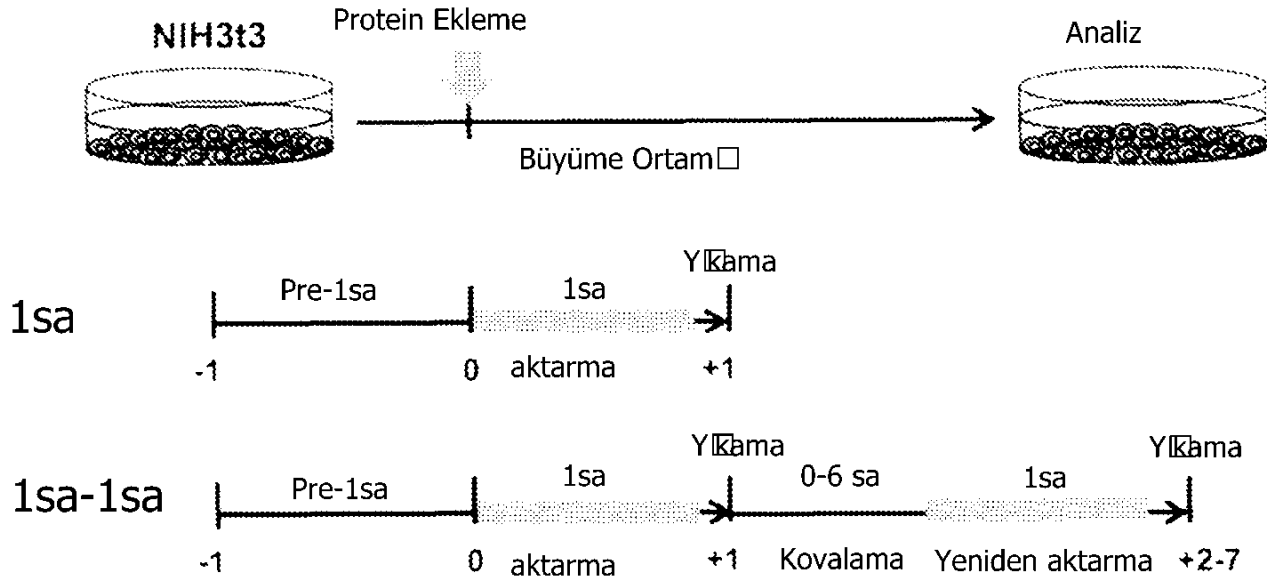
Aktar **1sa-5sa**



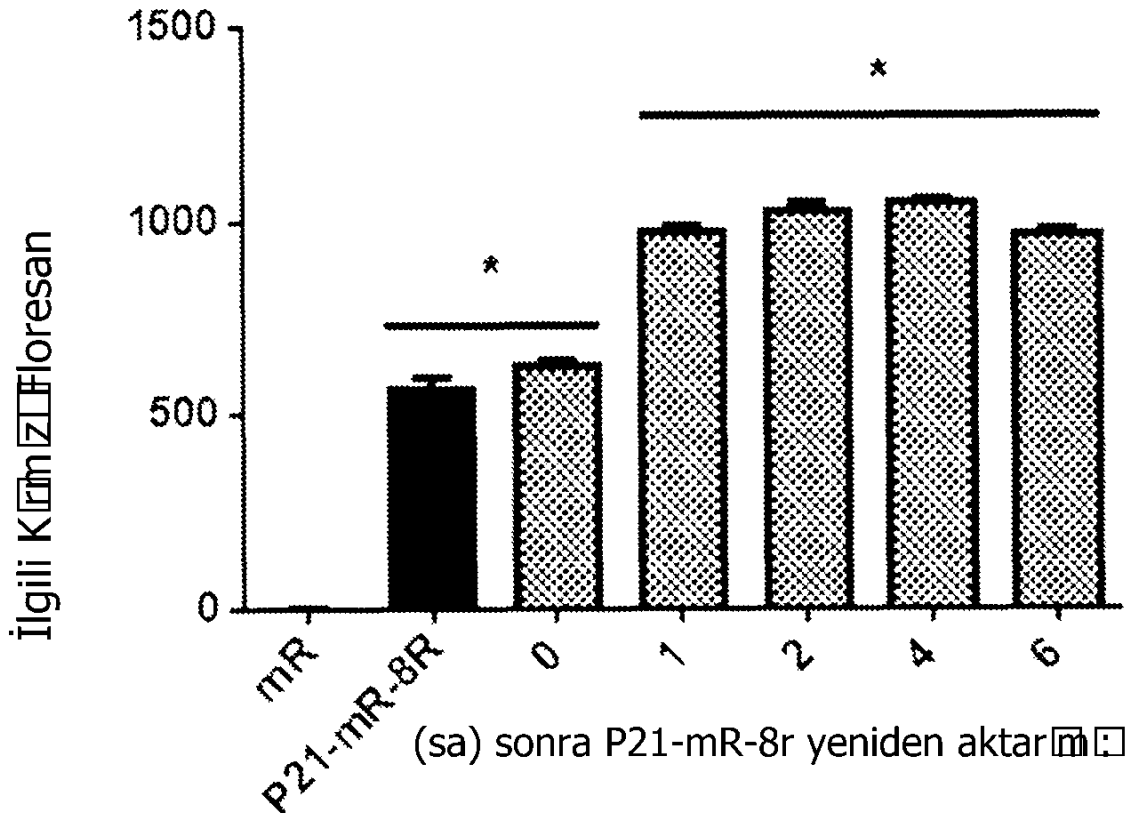
Kesintisiz İletim
6sa



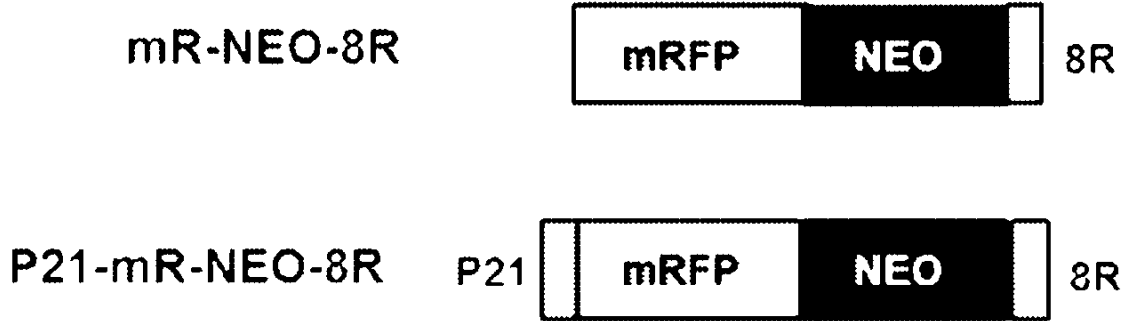
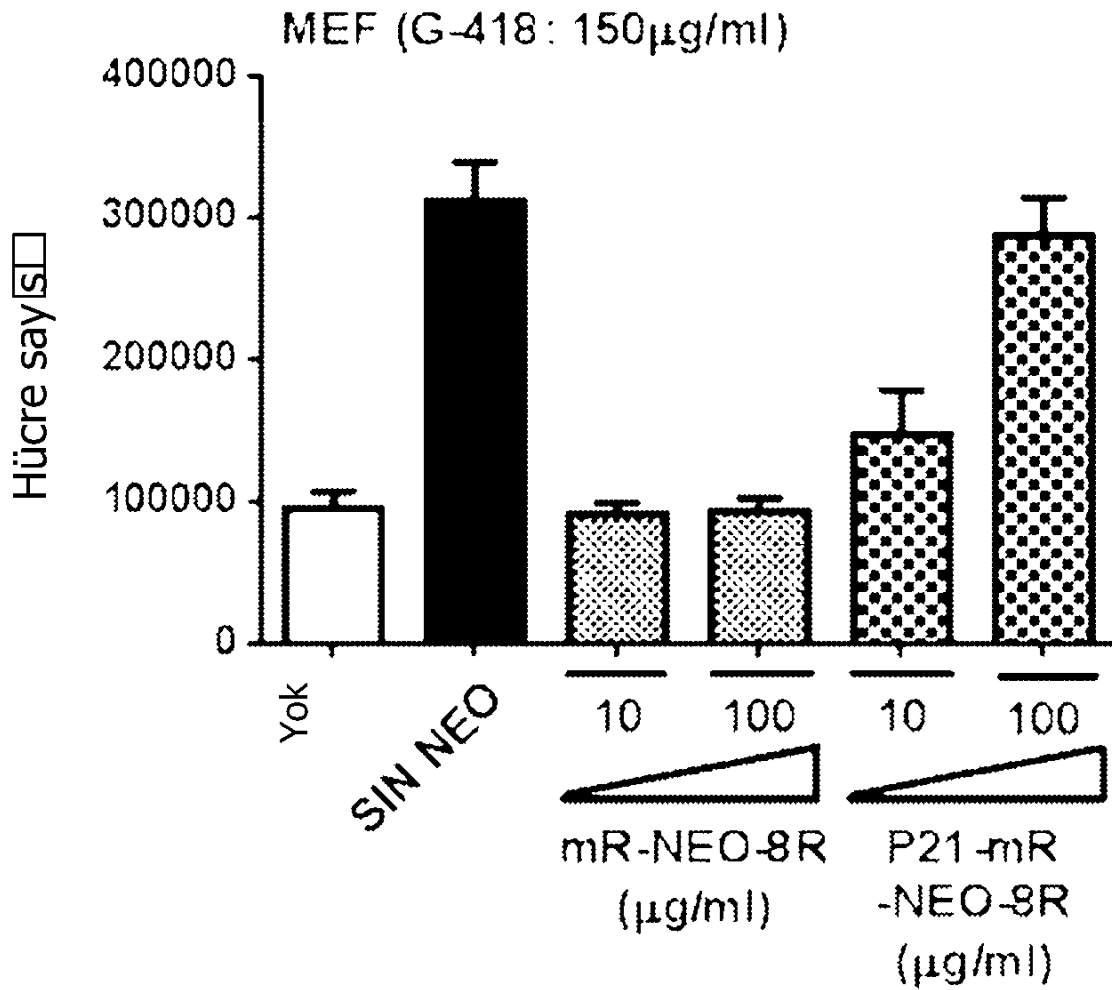
Şekil 23

a**b**

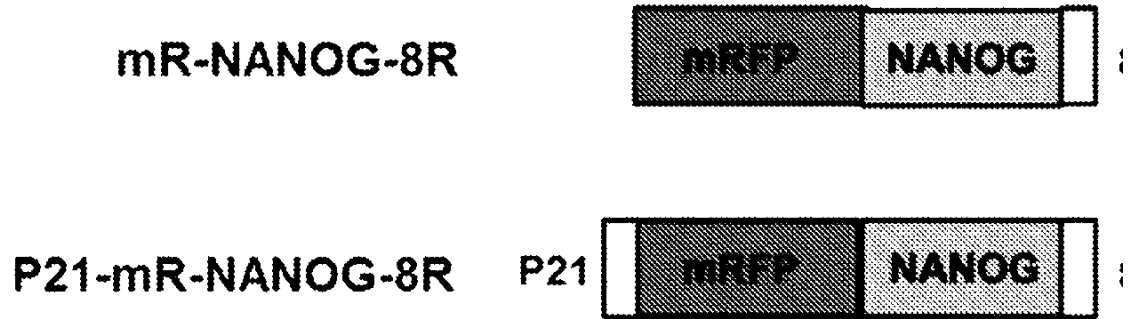
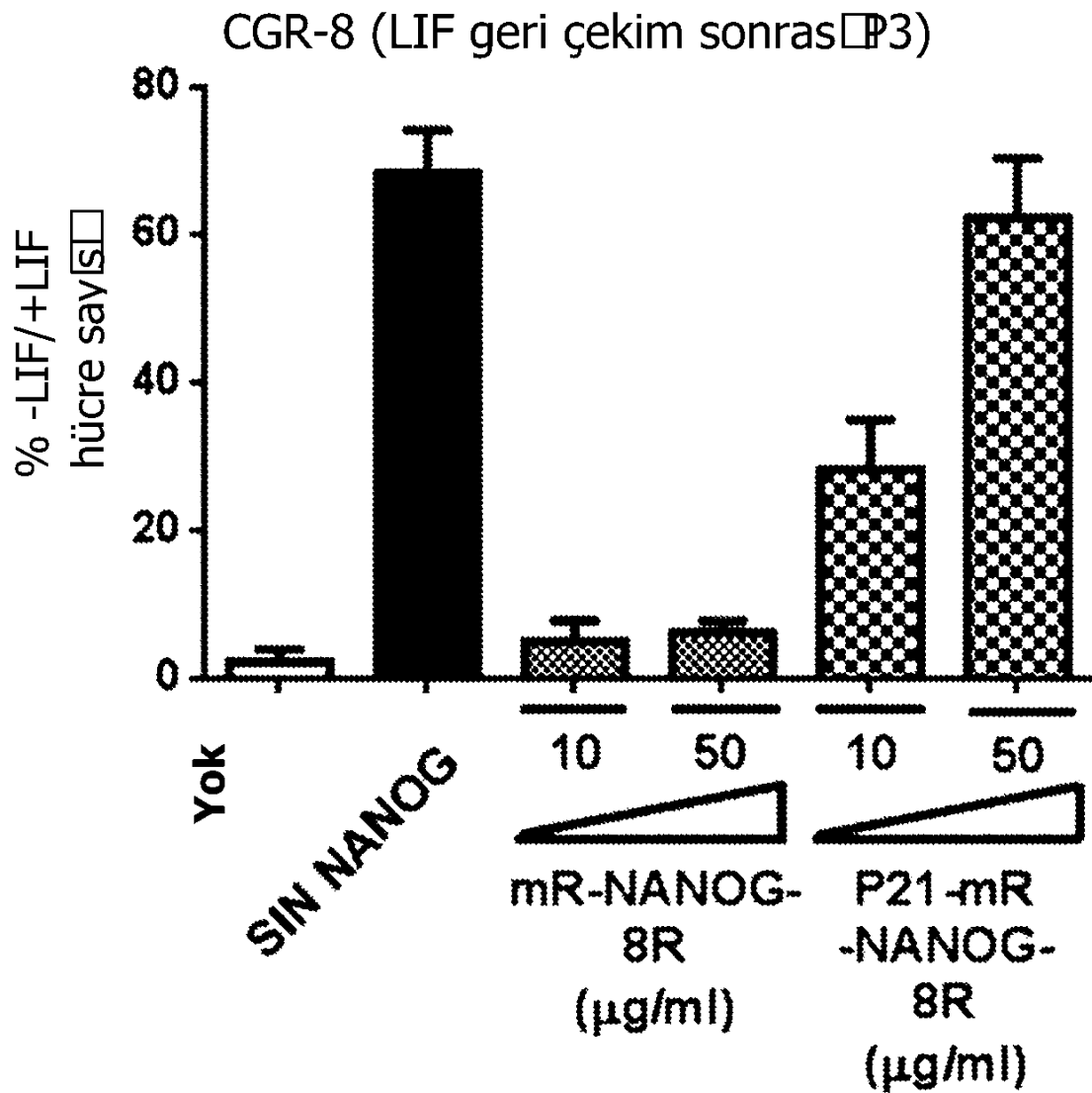
NIH3t3: Yeniden aktarma



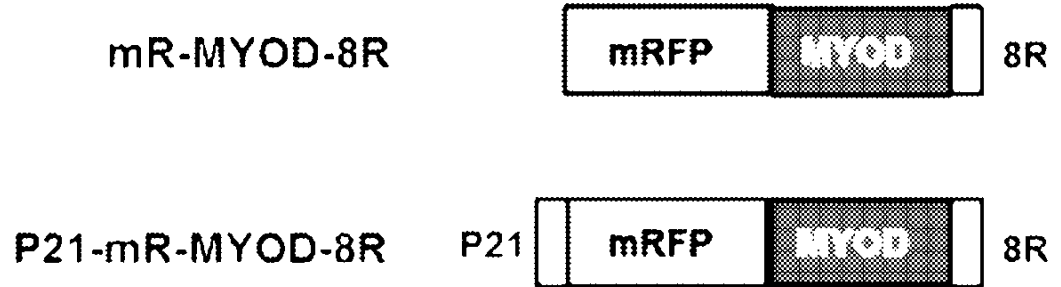
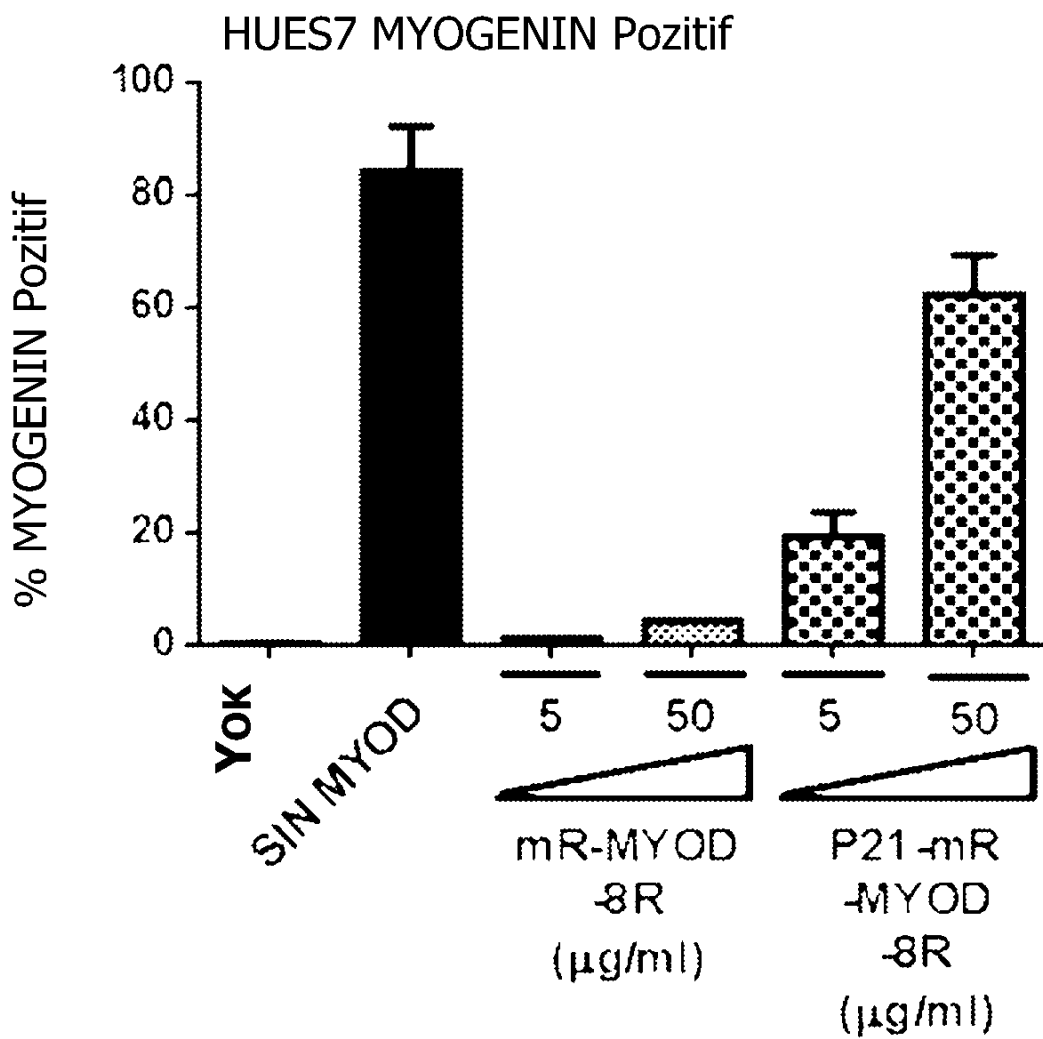
Şekil 24

a**b**

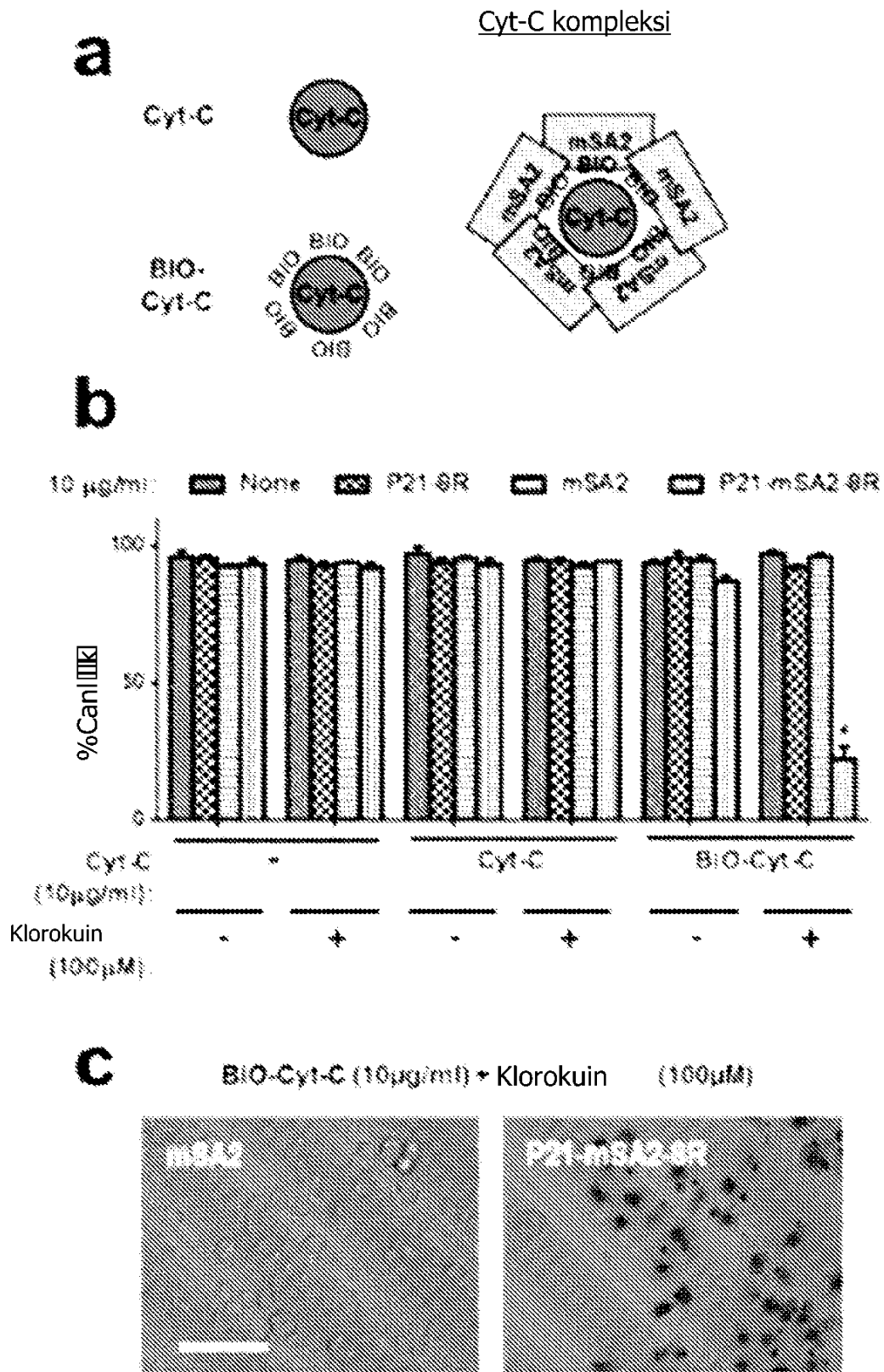
Şekil 25

a**b**

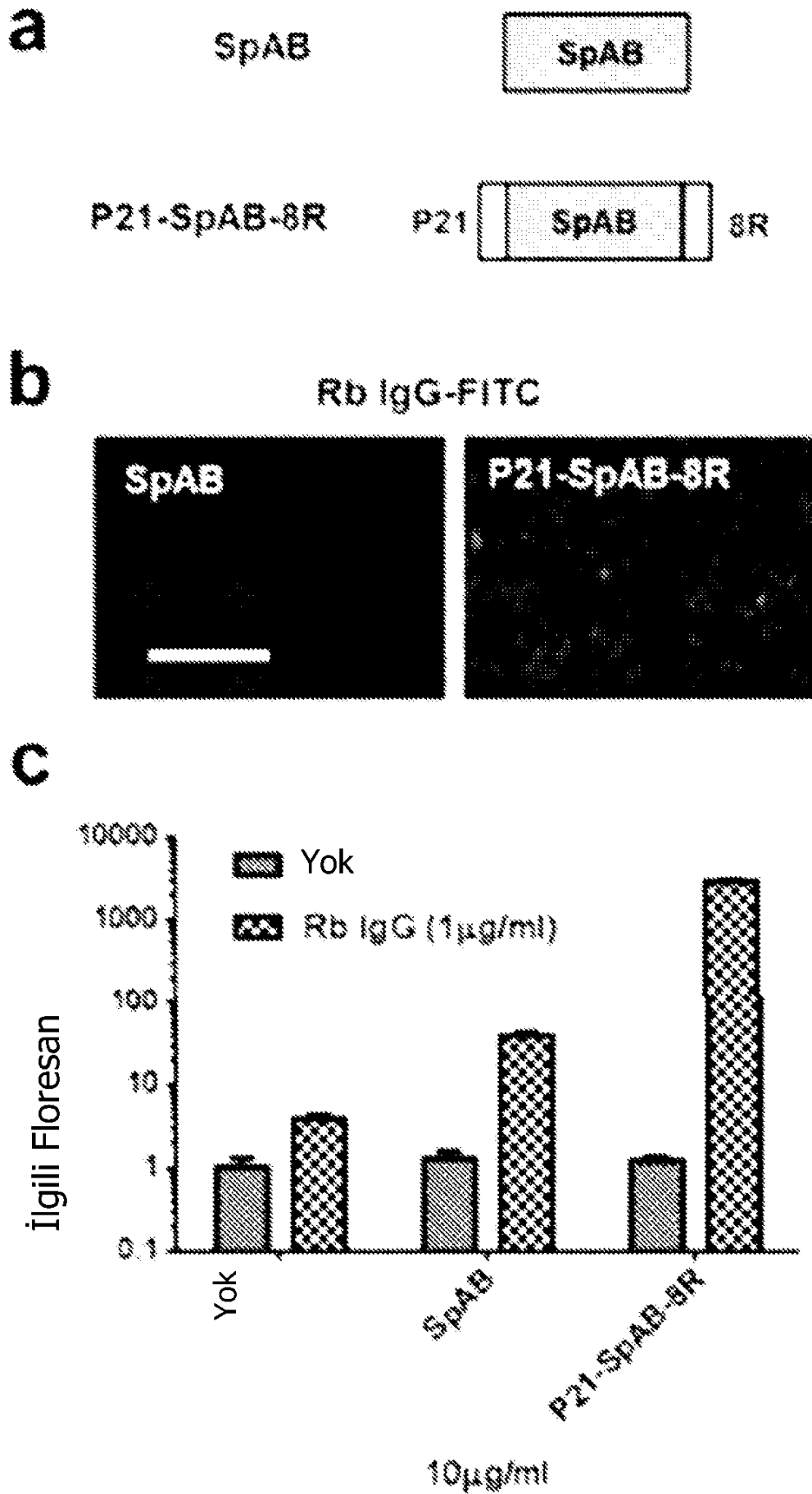
Şekil 26

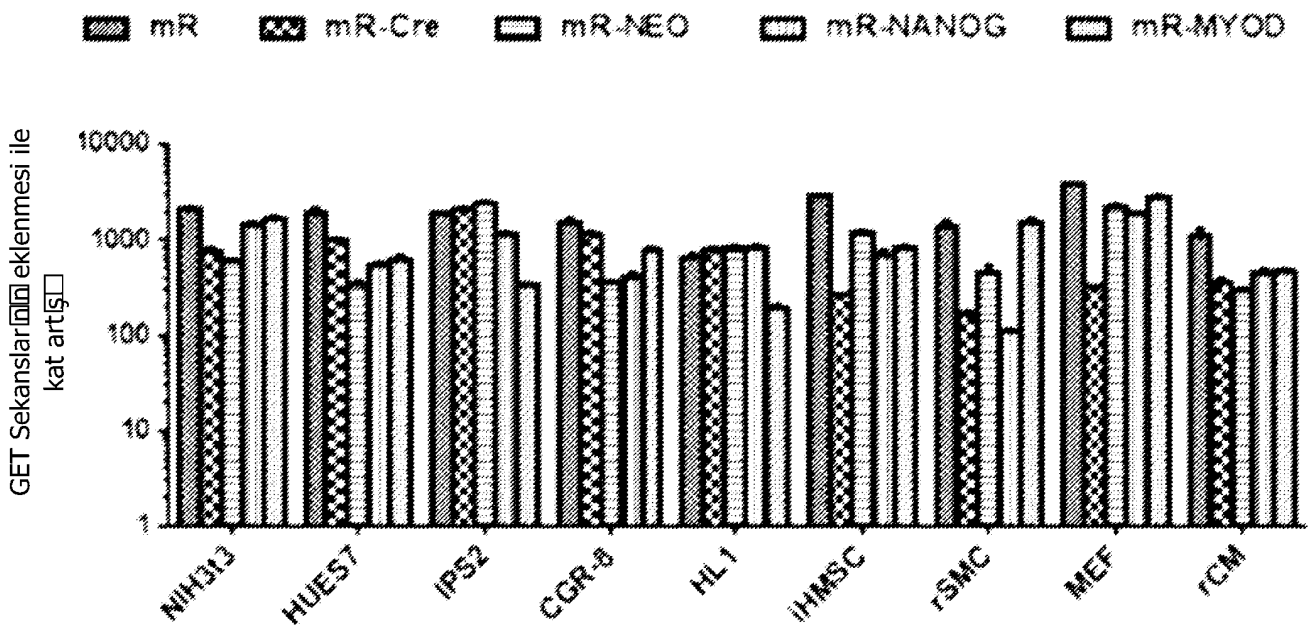
a**b**

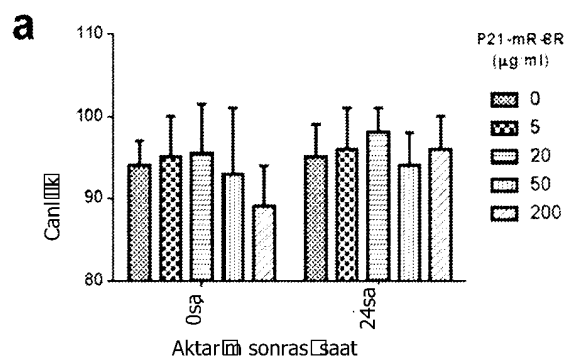
Şekil 27



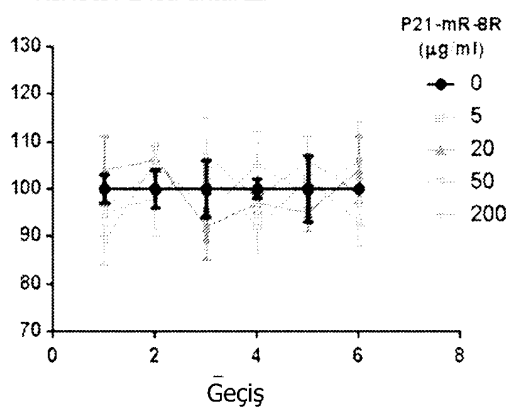
Şekil 28



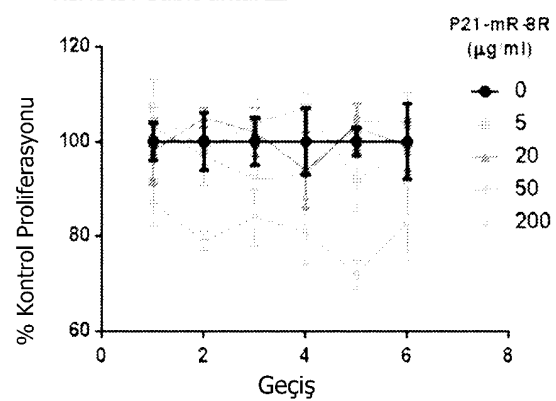


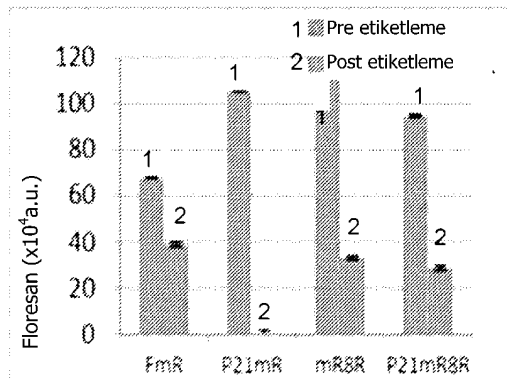
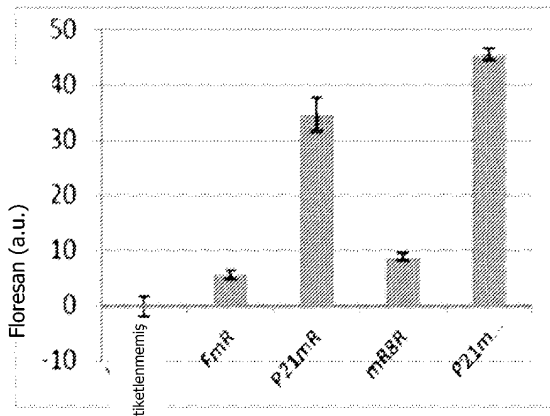
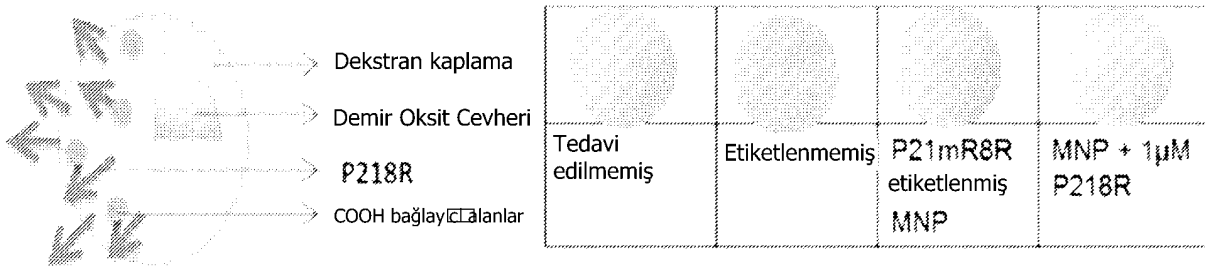


NIH3t3: 24sa aktarım



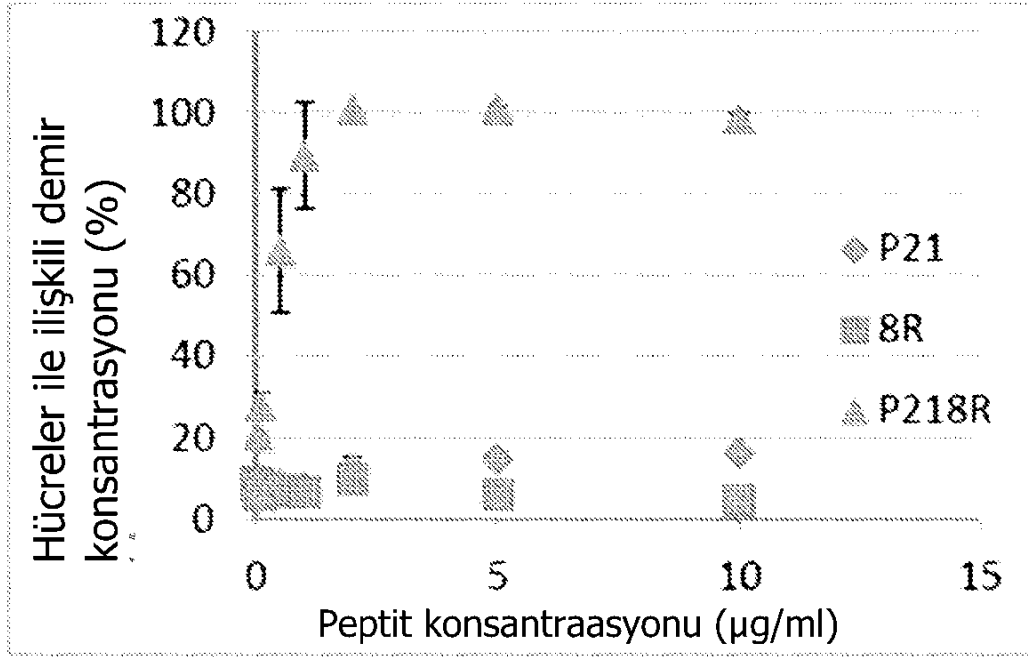
NIH3t3: Sabit aktarım





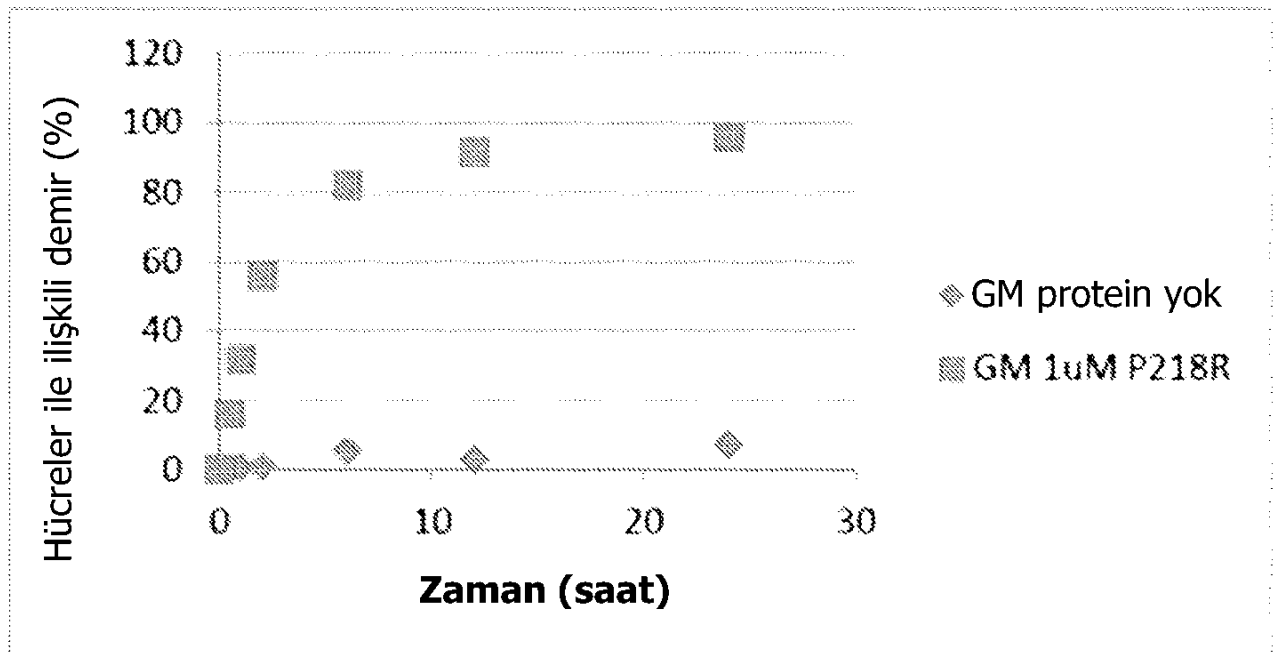
Şekil 33

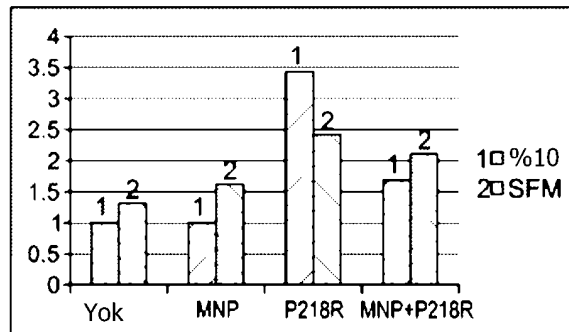
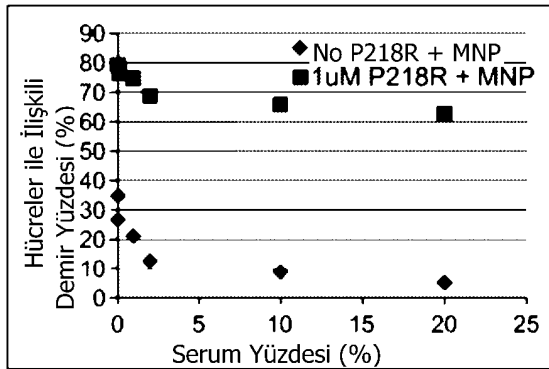
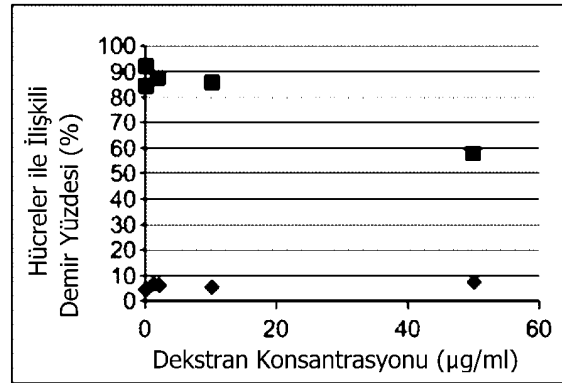
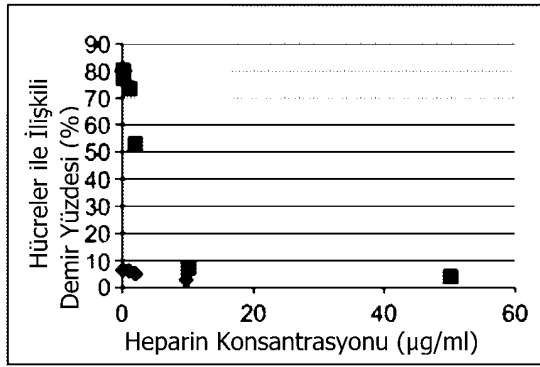
		NIH 3t3: 50 µg Nanomag (250 nm) ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir								
Peptit Son. (µg/ml)		0	0.01	0.05	0.1	0.5	1	2	5	10
P21										
8R										
P218R										



Şekil 34

NIH 3t3: 50 µg Nanomag-D (250nm) ile inkübe edilmiştir							
Zaman (saat)	0	0.5	1	2	6	12	24
Protein Yok							
1µM P218R							





Şekil 35

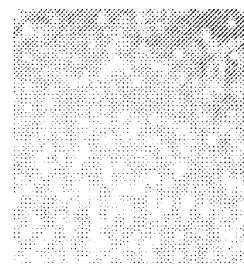
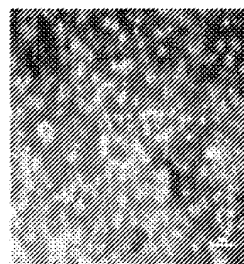
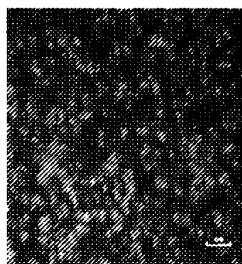
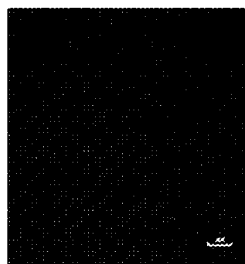
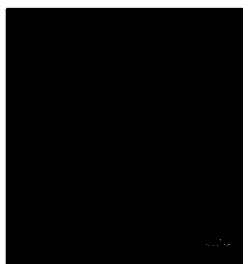
kontrol

FmRFP

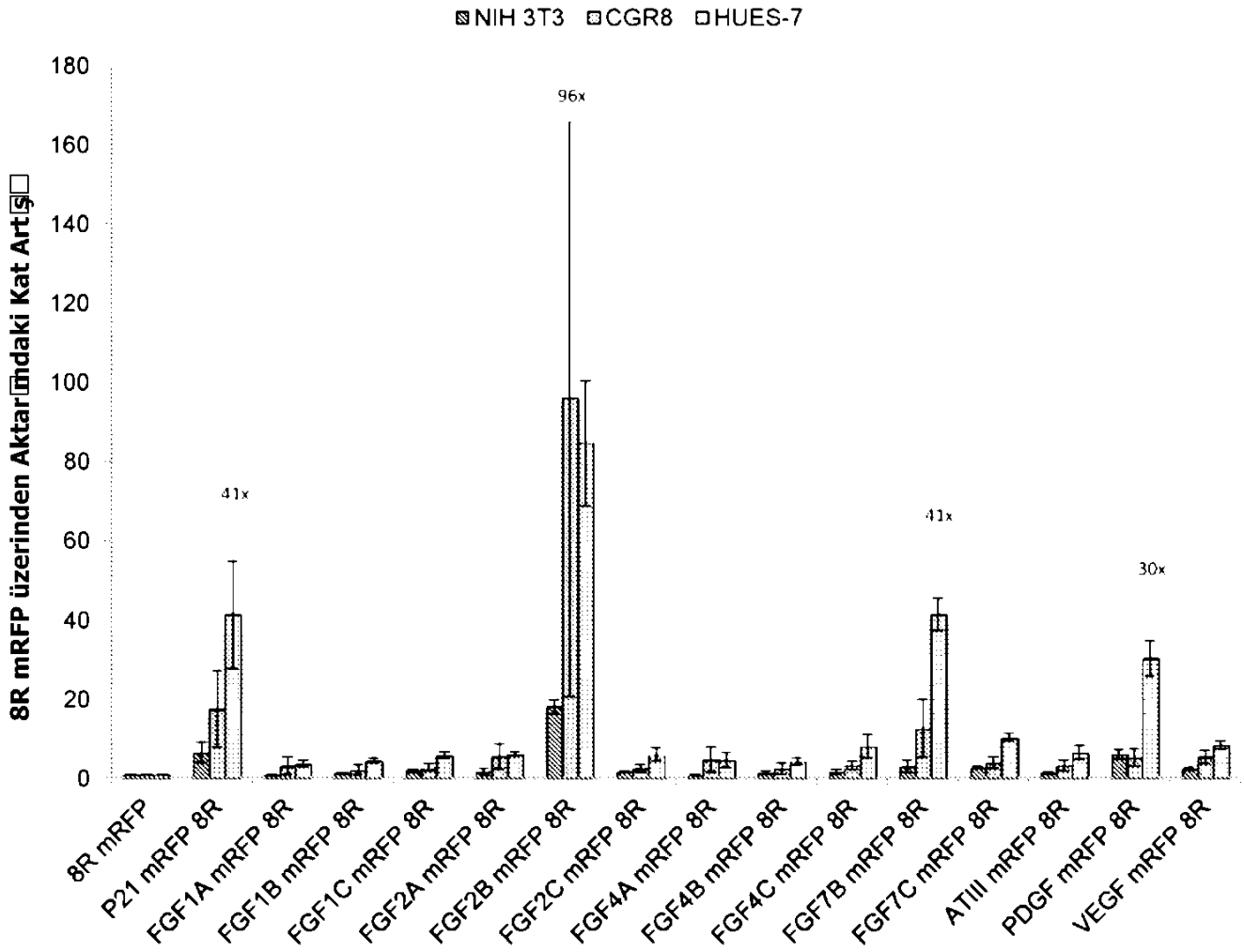
P21 mRFP

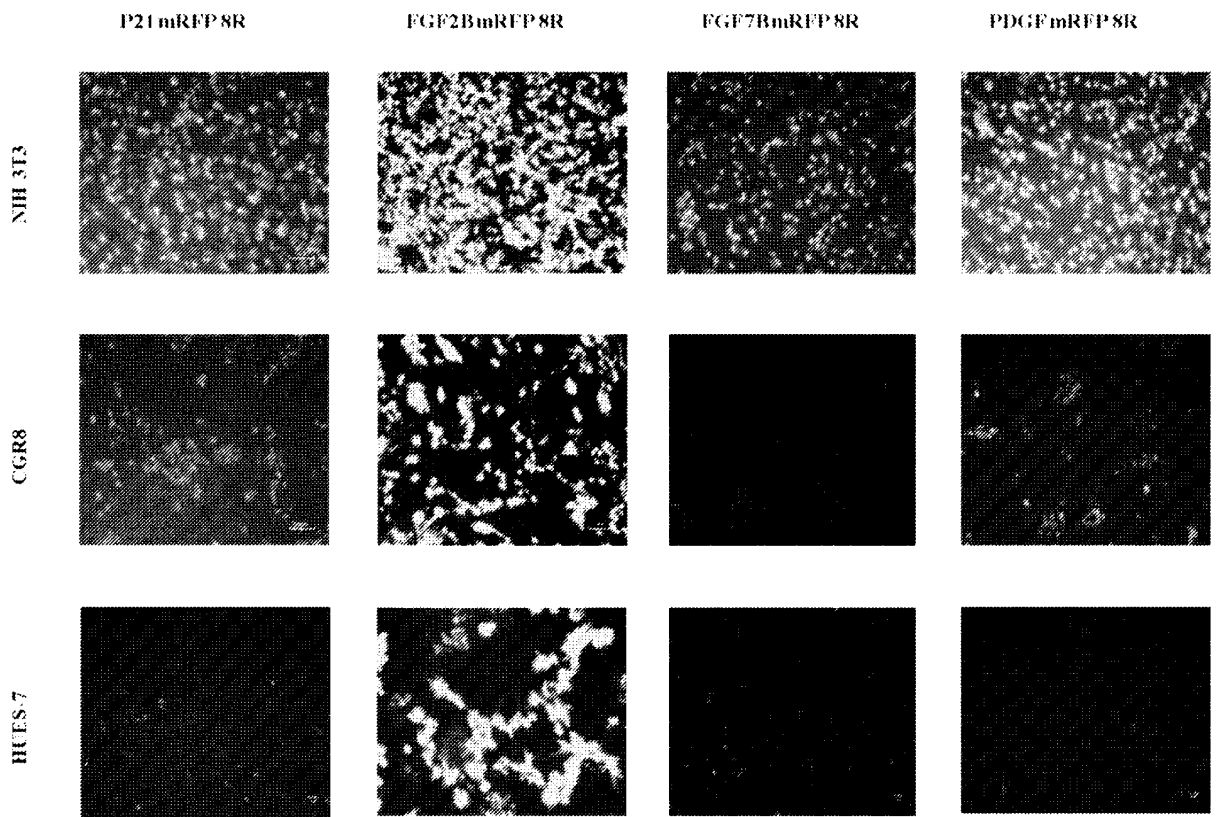
mRFP 8R

P21 mRFP 8R



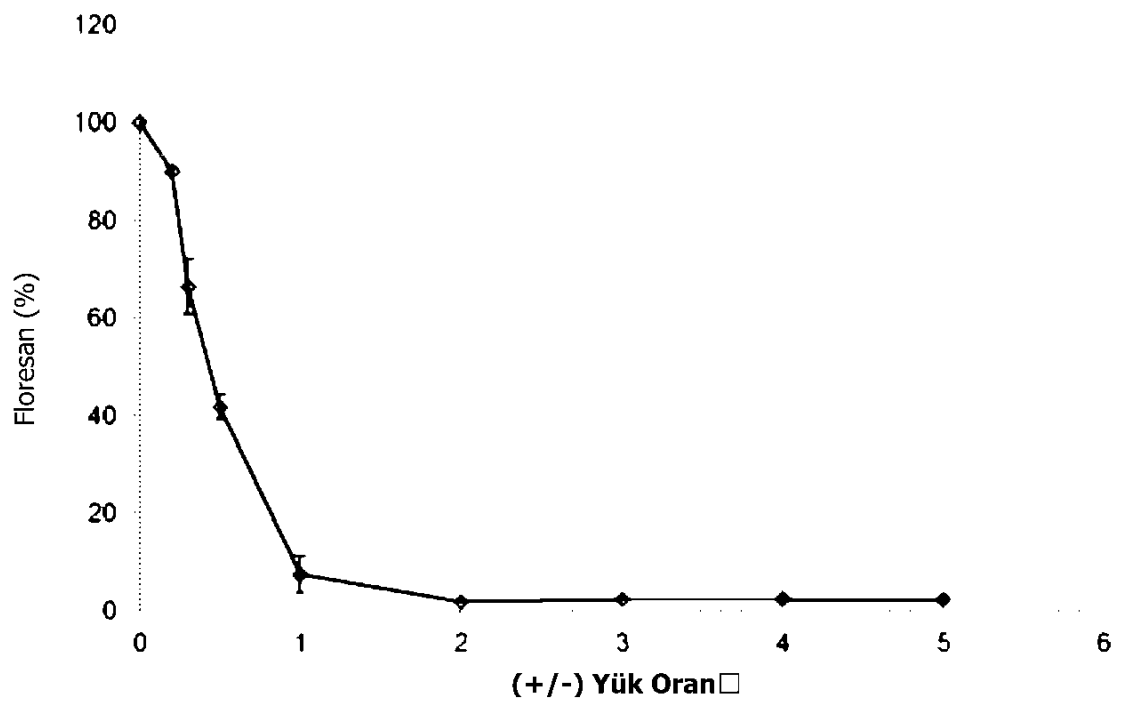
Şekil 38

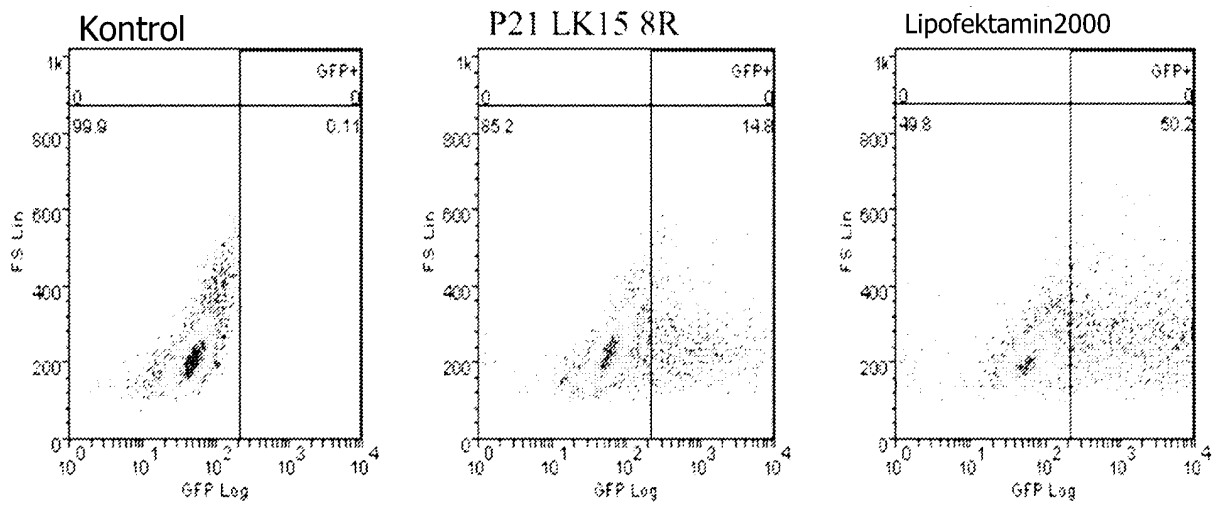




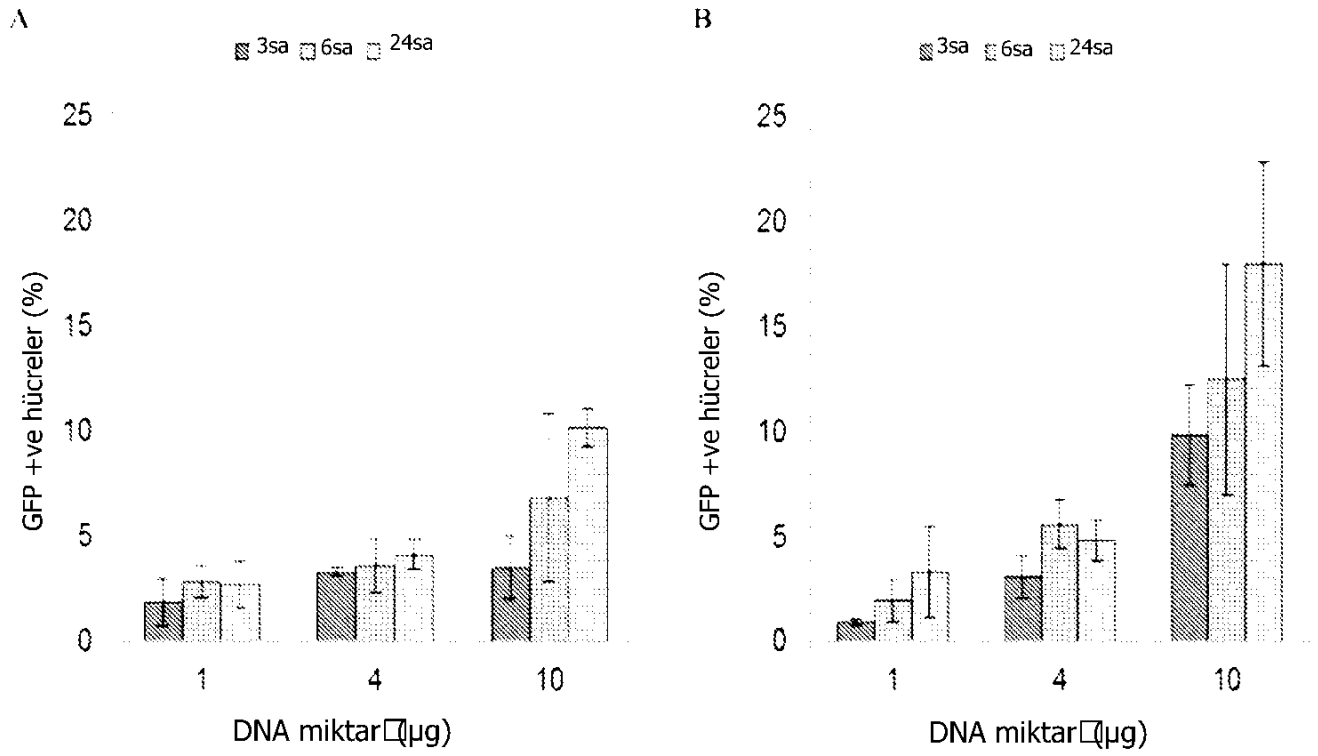
Şekil 39

Şekil 40





Şekil 42



Şekil 43

