



Lazer Ablasyonu ile Sentezlenmiş Levan Kaplı Altın Nanoparçacıkların siRNA Transfeksiyon Ajantı Olma Potansiyeli Üstüne Çalışma

A Study on The siRNA Transfection Reagent Potential of Levan-Capped Gold Nanoparticles Synthesized by Laser Ablation

Ömer Aktürk¹, Beste Çağdaş Tunali^{*1}

¹Kırıkkale Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 71450, Kırıkkale, TÜRKİYE

Başvuru/Received: 27/05/2021

Kabul / Accepted: 24/08/2021

Çevrimiçi Basım / Published Online: 31/01/2022

Son Versiyon/Final Version: 31/01/2022

Öz

Bu çalışmada, altın nanoparçacık (AuNP) temelli kısa interferanslı RNA (siRNA) transfeksiyon vektörü tasarlanmıştır. Sıvı içinde atımlı lazer ablasyon yöntemiyle (PLAL) levan polisakariti içeren ortamda sentezlenen AuNP'ler (Levan-AuNP), karakterizasyon testlerinin ardından MCF-7 meme kanseri hücrelerinde siRNA transfeksiyon çalışmalarında kullanılmıştır. Hedefsiz siRNA sekansı ile gerçekleşen %48'lik Levan-AuNP-siRNA etkileşimi A260 absorbans ölçümleriyle bulunmuştur. Farklı derişimlerde Levan-AuNP ve 50 nM siGLO Green transfeksiyon indikatörü hazırlanarak MCF-7 hücrelerindeki optimum siRNA transfeksiyon koşulları belirlenmiştir. Transfeksiyon çalışmalarında öncelikle üçlü floresan boyama (siGLO Green, propidyum iyodür (PI) ve Hoechst 33342) yapılmış ve sitotoksikite görülmemiştir. Özellikle en yüksek derişimdeki Levan-AuNP grubunda ilk günde transfeksiyon gerçekleşirken, tek başına siGLO Green grubunda transfeksiyon gerçekleşmemiştir. 2 ve 4 günlük inkübasyonda ise tüm gruplarda transfeksiyon gözlemlenmiştir. PI ve Hoechst kullanılmadan yapılan ikinci transfeksiyon çalışmalarında ise siGLO Green floresan şiddetinin belirgin şekilde arttığı ve özellikle Levan-AuNP-siGLO Green komplekslerinde daha kuvvetli ve noktalı bir floresan ışımaya görülmüştür. Ortalama floresan şiddetleri ölçümlerine göre, tüm Levan-AuNP gruplarında istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde artış bulunmuştur. Sonuç olarak, bu çalışmada geliştirilen Levan-AuNP'nin, mevcut transfeksiyon ajanlarına alternatif olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler

“Levan, altın nanoparçacık, lazer, siRNA, transfeksiyon”

Abstract

Here, gold nanoparticle (AuNP)-based small interfering RNA (siRNA) vector was developed. AuNPs synthesized by pulsed laser ablation in liquid (PLAL) method in a medium containing levan polysaccharide (Levan-AuNP) were characterized, then utilized in siRNA transfection studies on MCF-7 breast cancer cells. The interaction between non-targeted siRNA sequence and Levan-AuNP-siRNA was found to be 48% via A260 absorbance measurements. Optimal conditions for siRNA transfection in MCF-7 cells were determined by preparing different concentrations of Levan-AuNP and 50 nM siGLO Green transfection indicator. In transfection studies, initially triple fluorescent staining protocols (siGLO Green, propidium iodide (PI), and Hoechst 33342) were conducted and no cytotoxicity was observed. In 1 day-incubation, the transfection was realized especially in the highest concentration Levan-AuNP group while it was unsuccessful in siGLO Green group alone. Transfection was observed in all groups after 2 and 4 days of incubation. In the secondary transfection studies without PI and Hoechst, the fluorescence intensity of siGLO Green increased significantly, and stronger and punctuate fluorescence emission was seen in Levan-AuNP-siGLO Green complexes. Regarding the mean fluorescence intensity measurements, a statistical significance was confirmed in all Levan-AuNP groups. As a whole, the developed Levan-AuNP could be proposed as alternatives to the existing transfection agents.

Key Words

“Levan, gold nanoparticle, laser, siRNA, transfection”

1. Giriş

Gen terapisi, hastalıkların tedavisi ya da önlenmesi için nükleik asitlerin kullanılması yoluyla genlerin düzenlenmesi, tedavi edilmesi ya da değiştirilmesi yollarıyla olabilir (Rao ve Zacks, 2014) ve genetik hastalıklar, kanser, viral enfeksiyonlar ve kardiyovasküler bozukluklar gibi birçok farklı hastalıkların tedavi edilmesi ya da önlenmesi konularında gelecek vaat eden bir yaklaşımdır (Alireza vd., 2019). Gen dağıtımı, terapötik proteini kodlayan plazmid DNA (Hardee vd., 2017) ya da RNA interferansı (RNAi) (Krzysztoń vd., 2019) dağıtımı şekillerinde olabilir. RNAi terapötiklerinin (ya da gen susturucu RNA) farklı türleri vardır; bunlar mikroRNA (miRNA), kısa saç tokası RNA (shRNA) ve kısa interferanslı RNA (siRNA) olarak bilinir (Sajid vd., 2020). RNAi'nin temel prensibi; çift sarmal RNA'nın hedef sekansına homologlaşması ile indüklenen sekansa özgü mRNA molekülünün bozunmasıdır (Krzysztoń vd., 2019). Sentetik siRNA'nın, memeli hücrelerinde, örneğin MCF-7 ve MDA-MB-231 gibi kanser hücre hatlarında (Kamaruzman vd., 2018), RNAi'yi indükleyebildiği literatürdeki çalışmalarda gösterilmiştir. siRNA'nın yüksek terapötik potansiyeline rağmen, klinik çalışmalarda uygulaması kısıtlıdır, çünkü çıplak siRNA ya da modifiye edilmemiş siRNA'nın, kan dolaşımına bırakıldığında (ya da serum içinde), çok kısa yarı ömürleri vardır ve serum endonükleazları ve RNazları tarafından enzimatik bozunuma uğrarlar (Sajid vd., 2020). Bunun gibi hücre dışı (enzimatik degradasyon, hızlı renal temizlenme, siRNA'nın biyolojik membranlardan geçememesi, immün sistemin aktivasyonu vb.) ve hücre içi (endozomal hapis, hücre içi doğru bölgeye ulaşması, hedef dışı etkiler vb.) birçok bariyeri aşmak için siRNA'nın farklı taşıyıcılar içine koyulduğu çalışmalar literatürde bildirilmiştir (Sajid vd., 2020).

Bu sebeple, siRNA'nın bozunmaya karşı korunması için uygun bir dağıtım sistemine enkapsüle edilmelidir. Bu dağıtım sistemleri; viral (retrovirüsler, adenovirüsler ve adeno-ilişkili virüsler) ya da viral olmayan (lipid, polimer, metal nanoparçacık vb.) vektörler şeklinde tasarlanabilmektedir (Khan vd., 2012). Viral vektörler ev sahibi hücreye genetik materyalin aktarımı konusunda çok etkili olsa da böyle virüslerin klinik uygulamaları, immünojeniklik, karsinojeniklik, enflamatuvar etki ve güvenlik kaygıları sebebiyle kısıtlanmaktadır (Ding vd., 2014). Viral olmayan vektörlerin ise viral vektörlere kıyasla, kromozomlara entegre olmama, düşük immünojenite, büyük genleri dağıtabilme, enfeksiyon riskinin olmaması, daha az masraflı olması ve en önemlisi de nispeten düşük bir ücret karşılığında büyük çapta üretim potansiyelleri gibi birçok avantajı vardır (Khan vd., 2012).

Polisakkaritler, viral olmayan gen dağıtım sistemi olarak önemli adaylar olarak kabul edilmektedirler, çünkü fizikokimyasal özellikleri hassas bir şekilde ayarlanıp değiştirilebilen moleküler çeşitlilikleri vardır (Khan vd., 2012). Gen dağıtım amacıyla kullanılan farklı doğal (kitozan, dekstran, siklodekstrin) ya da yarı sentetik (dekstran-spermine) polisakkaritler literatürde bildirilmiştir (Khan vd., 2012). Levan molekülü de früktozun polimerizasyonu sonucunda oluşan bir homopolisakkarittir (Srikanth vd., 2015). Literatürde levan kullanılarak bazı farklı peptid (BSA) (Sezer vd., 2011) ya da floresanlı görüntüleme problemleri (indosiyanın yeşili) (Kim vd., 2015) gibi malzemeler başarılı bir şekilde levan içinde enkapsüle edilmiştir. Sezer vd., (2017), yine başka bir çalışmada presipitasyon yöntemiyle vankomisin (Gram-pozitif bakterilere karşı etkili bir glikopeptid antibiyotik) yüklü levan temelli bir mikroparçacık geliştirmişlerdir. Ayrıca levanın kopresipitasyon yöntemi ile enzim immobilizasyonu için bir alternatif olabileceği de bildirilmiştir (Maciel vd., 2012). *Pseudomonas mandelii* bakterisi tarafından sentezlenen levanın antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı da yakın zamanlı bir çalışmada bildirilmiştir (Koşarsoy ve Cihangir, 2020).

Literatürde, AuNP'lerin farklı yüzey modifikasyonları ile siRNA için uygun bir taşıyıcı olarak geliştirilebildiğini gösteren birçok çalışma vardır (Aktürk vd., 2019). Altın nanoparçacık kullanılarak geliştirilen siRNA transfeksiyon çalışmalarında sıklıkla bildirilen ve tercih edilen siRNA kompleksleştirme yöntemi AuNP yüzeyinin katyonik olarak modifiye edilmesi olmuştur (Ding vd., 2014; Ferreira vd., 2020; Kumar vd., 2019). Yöntem, sadece transfeksiyon verimi (ya da hücre içine alımı) düşünüldüğünde çok başarılı olmuş olsa da katyonik yapıların hücreler üstündeki toksik etkileri sebebiyle (Xue vd., 2014), azaltılmış katyonik ligand içeren, hatta nötral, zwitteriyonik ve anyonik yapıdaki AuNP'ler üzerine çalışmalar yapılmış ve bu şekilde de nanoparçacıkların hücre içine alımının mümkün olduğu görülmüştür (Okoampah vd., 2020). Daha önceki çalışmalarımızda, biyolojik polimerler (ipek serisini ve levan) kullanarak sentezlediğimiz altın nanoparçacıkların sulu ortam kararlılığının ve *in vitro* biyoyumuluğun iyileştiği tespit edilmiştir (Aktürk vd., 2019; Aktürk vd., 2020; Aktürk, 2020). Ayrıca, UVC ışınımı altında sentezlediğimiz levan (*Bacillus subtilis* bakterisi ile fermentasyonla sentezlediğimiz) kaplı AuNP'lerin özellikle hücre membranı üstünde çökelti şeklinde birikerek hücre içine alındığını yakın tarihli son çalışmamızda bildirmiş bulunmaktayız (Aktürk, 2020). Bütün bu özellikler, levan kaplı altın nanoparçacıkların siRNA transfeksiyon ajanı olma potansiyeline olumlu katkılar sağlayabileceğini göstermektedir.

Yapılan literatür taramasından varılan çıkarımlar; altın nanoparçacık ve levan molekülleri birleştirilerek uygun bir siRNA transfeksiyon ajanı geliştirilebileceğini göstermektedir. Daha önce bu şekilde bir kombinasyonla siRNA transfeksiyon çalışması da yapılmamıştır. Hipotezimize göre; Levan-AuNP hücrelere herhangi bir zarar vermeden geçebilir, daha sonra taşıdığı kargoyu (yani siRNA) hücre sitozolüne endositik yollardan kaçarak bırakabilir ve nihayetinde de nükleusa ulaşabilir. Bu hipotez kapsamında yapılmış olan transfeksiyon testleri ile MCF-7 meme kanseri hücrelerine FAM işaretli SİGLO Green transfeksiyon indikatörünün levan-AuNP ile kompleksleştikten sonra transfekte olup olmadığı ve bunun çıplak siRNA'ya kıyasla ne oranda gerçekleştiği araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, gelecekte yapılması planlanan gen susturma (bir gen knockdown mekanizması) çalışmaları için ön optimizasyon sonuçları olarak değerlendirilebilir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

Levan (*Erwinia herbicola*'dan elde edilmiş 1 g levan, Sigma-Aldrich, Almanya), etanol [Absolute, $\geq 99.8\%$ (GC)], glutaraldehit (Derece I, %25 H₂O içinde), fosfat tamponlu salin (PBS) tabletler, dimetil sülfoksit (DMSO, moleküler biyoloji için) ve RPMI-1640 besi ortamı (L-glutamin ve sodyum bikarbonatlı) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından alınmıştır. Fetal bovin serum (FBS, Avrupa derecesinde ısı ile inaktifleştirilmiş, Güney Amerika orijinli), penisilin-streptomisin-Amfoterisin B çözeltisi (penisilin G sodyum tuzu: 10,000 birim.mL⁻¹, streptomisin sülfat: 10 mg.mL⁻¹, amfoterisin B: 25 µg.mL⁻¹) ve tripsin/EDTA çözelti A fenol kırmızılı (100 mL, %0,25 tripsin ve %0,02 EDTA) Biological Industries (USA) firmasından temin edilmiştir. 5 nmol siGENOME hedefsiz siRNA (Hedef Sekansı: UAGCGACUAAACACAUCAA), 5 nmol siGLO Green transfeksiyon indikatörü ve 5X siRNA tamponu Dharmacon™ (A Horizon Discovery Group Company, Australia) firmasından alınmıştır. Bütün diğer kimyasallar (hepsi analitik derecede) ve sarf malzemeler, aksi belirtilmediği müddetçe, ISOLAB (Germany) firmasından alınmıştır.

2.2. Altın Nanoparçacık Sentezi

Öncelikle ticari levan de-iyonize su (2,5 L HPLC Plus, Sigma-Aldrich) içinde 10 mg.mL⁻¹ derişiminde hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan çözeltiden 10 mL alınıp 50 mL'lik beher içine aktarılmış ve 1 g'lık saf (%99,99) altın plaka (Kırıkkale'deki yerel bir altın satıcısından temin edilmiştir) bu beherin tabanına yerleştirilmiştir. Nanoparçacıklar, sıvı içinde atımlı lazer ablasyan (PLAL) adı verilen yöntemle nanosaniye Q-switch Nd-YAG lazer aletinin (Model: AML-1201, China) çalışma parametreleri (frekans = 10 Hz, atım zamanı = 10 ns, atım enerjisi = 1000 mJ, dalgaboyu = 532 nm), lazer kafası ve altın plaka yüzeyi arasındaki uzaklık (2 cm) ve lazer sayımı (1000 kez, yaklaşık 2 min) ayarlanarak sentezlenmiştir. Deneyden önceki ve sonraki altın plakanın kuru ağırlıkları hassas terazide ölçülerek çözelti içine salınan miktar 0,6 mg olarak bulunmuştur. Sentezlenen altın nanoparçacık (Levan-AuNP) için Transmisyon Elektron Mikroskobu mikrofrafisi (High Contrast Transmission Electron Microscopy, CTEM, 120 kV, Tecnaï™ G2 Spirit Biotwin, FEI) Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkezi Laboratuvarı'nda çekilmiştir, ayrıca Fourier Dönüşümlü Kızılötesi spektrumları (FTIR, Vertex 70 V, Bruker) ve zeta potansiyel değerleri de (Zetasizer Nano ZS instrument, Malvern Instruments, Malvern, UK) Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (KÜBTUAM) elde edilmiştir.

2.3. Altın Nanoparçacık-siRNA Kompleksleştirme Çalışmaları

Altın nanoparçacık sentezlendikten sonra öncelikle laminar akış kabini içinde bulunan UVC ışınına bir cam petri içinde 1 h boyunca sterilizasyon amacıyla maruz bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak kullanılan çıplak siRNA (5 nmol siGENOME hedefsiz siRNA) 250 µL'lik 1X siRNA tamponu içinde çözünerek 20 µM'lık çözelti elde edilmiştir. Daha sonra 25 µL'lik alikotlar halinde -80 °C buzdolabında deneylerde kullanılabilecek kadar stoklanmıştır. Deney için çözdürülen alikotlar (25 µL, 20 µM) ilk dilüsyon için 1X siRNA tamponu ile (25 µL) karıştırılmış ve stok (50 µL, 10 µM'lık) hazırlanmıştır. Deneyler sırasında siRNA derişimini doğru tespit edebilmek için son derişim 1 µM siRNA olarak belirlenmiştir; bunun için 450 µL Levan-AuNP (10 mg.mL⁻¹), 50 µL siRNA (10 µM) ile karıştırılmıştır (G1). siRNA kontrol (G2) için 450 µL MB-H₂O (Molecular biology grade water, Biological Industries, Israel) ile 50 µL siRNA (10 µM) ile ve Levan-AuNP kontrolü (G3) için ise 450 µL Levan-AuNP (10 mg.mL⁻¹), 50 µL 1X siRNA tamponu ile karıştırılmıştır. Cihazın körünü (BLANK) almak için kullanılan boş kontrolde (G4) ise 50 µL 1X siRNA tamponu, 450 µL MB-H₂O ile karıştırılmıştır. Bütün karışımlar viyaller içinde hazırlanmış ve orbital karıştırıcı içinde 1 h boyunca oda koşullarında yavaşça (200 rpm) karıştırılmaya bırakılmıştır. Daha sonra bütün örnekler steril ependorf tüplerine aktarılıp santrifüj edilmiştir (10000 rpm ya da 10845 RCF, 4 °C, 30 min). Süpernatantta kalan kısım mikro-UV spektrofotometre (micro-UV spectrophotometer instrument, MSPTouch-200, INOVIA Technology) cihazının RNA-40 moduyla ölçülmüş ve siRNA-Levan-AuNP etkileşimi (E_{siRNA} ya da Levan-AuNP ile kompleksleşen siRNA) Levan-AuNP ile birlikte çöken siRNA'nın oranı aşağıdaki eşitlik (Eş. 1) kullanılarak sayısal olarak ifade edilmiştir:

$$E_{siRNA} (\%) = \frac{E_{kileşen_{siRNA} miktarı}}{E_{klenen_{siRNA} miktarı}} \times 100 \quad (1)$$

E_{siRNA} derişimi 1 µM olarak ayarlanmış ve son etkileşen siRNA derişimi de (ya da miktarı) eklenenden, süpernatant derişimi (ya da miktarı) çıkarılarak bulunmuştur. Levandan kaynaklı 300-200 nm dalga boyu aralığında bir pik çıktığı için A260 ölçümlerinde Levan-AuNP kontrolleri kullanılarak düzeltme (yani G1-G3 miktarı) yapılmıştır. Tek başına siRNA kontrolü kullanılarak da siRNA'nın santrifüjle kendiliğinden çöküp çökmediği kontrol edilmiştir. Sonuçlar bar grafiği şeklinde, G1 ve G2 grupları istatistiksel açıdan kıyaslanarak sunulmuştur.

2.4. siRNA Transfeksiyon Testleri

siRNA transfeksiyon deneyleri için siGLO Green transfeksiyon indikatörü kullanılmıştır. Öncelikle 5 nmol olarak alınan ürün firma prosedürüne uygun olarak siRNA tamponu içinde (1X) çözünerek 20 µM olarak hazırlanmış, 50 µL'lik alikotlar halinde -80 °C buzdolabında deneylerde kullanılabilecek kadar stoklanmıştır. siRNA'ların son derişimi, 48 kuyucuklu plakalarda MCF-7 hücrelerine (20,000 hücre/kuyucuk) eklenirken 50 nM olarak ayarlanmıştır (Firma tarafından önerilen molarite). Bu molarite sabit tutularak transfeksiyon kimyasalının (yani Levan-AuNP grubu) derişimi değiştirilmiş böylece farklı deney grupları son karışımdaki Levan-AuNP'nin derişimine göre (Grup A: 0,9 mg.mL⁻¹, Grup B: 0,45 mg.mL⁻¹, Grup C: 0,225 mg.mL⁻¹, Grup D: 0,1125 mg.mL⁻¹, Grup E: 0 mg.mL⁻¹) oluşturulmuştur (Tablo 1). siRNA-Levan-AuNP karışımı hücrelerle karıştırıldığı zaman 10 kat daha dilüsyona uğramıştır. Grup F ise ne siGLO Green transfeksiyon indikatörü ne de Levan-AuNP içermeyen kontrol grubudur. Bu gruplar arasındaki farklılar, yani transfeksiyon verimi, nitel olarak floresan mikroskopuyla 1, 2 ve 4 günlük inkübasyon süreleri sonunda incelenmiştir. Uygulanan işlemin olası sitotoksik etkisi sonucu hücrelerin apoptozis mi yoksa nekroza uğrayıp mı öldüklerini anlamak ve hücrelerin tam olarak yerini tespit etmek için ayrıca Hoechst 33342 ve propidyum iyodür ikili floresan boyaması da inkübasyon süreleri sonunda yapılmıştır. Hoechst 33342 ve propidyum iyodür boyaları

kullanılmadan ayrıca 2 ve 4 günlük inkübasyon süreleri sonunda da siGLO Green indikatörünün floresan ışmaları incelenmiş ve farklı gruplar arasındaki kıyaslamalar bir görüntü analiz programı (ImageJ, NIH, USA) vasıtasıyla ortalama floresan şiddetleri ölçülerek (yani “mean gray value” ölçümü yapılarak) yapılmıştır. Floresan mikroskobu görüntülerindeki 3 farklı bölgeden bütün bölgenin ortalama floresan şiddeti ölçülmüş ve istatistik analizi yapılmıştır. Literatürde de benzer şekilde görüntü analizi yapılan çalışmalar mevcuttur (Chang vd., 2011; Li vd., 2014).

Tablo 1. siRNA transfeksiyon testleri için hazırlanan deney grupları

Gruplar	5 µM stoktan eklenen siRNA hacmi (µL)	Eklenen Levan-AuNP (10 mg.mL ⁻¹) hacmi (µL)	Hücre besiyeri hacmi (µL)	Son Levan-AuNP derişimi (mg.mL ⁻¹)
Grup A	20	180 (+ 0 µL MB-H ₂ O)	1800	0,9
Grup B	20	90 (+ 90 µL MB-H ₂ O)	1800	0,45
Grup C	20	45 (+ 135 µL MB-H ₂ O)	1800	0,225
Grup D	20	22,5 (+ 157,5 µL MB-H ₂ O)	1800	0,1125
Grup E	20	0 (+ 180 µL MB-H ₂ O)	1800	0
Grup F	0 (+ 20 µL 1X siRNA tamponu)	0 (+ 180 µL MB-H ₂ O)	1800	0

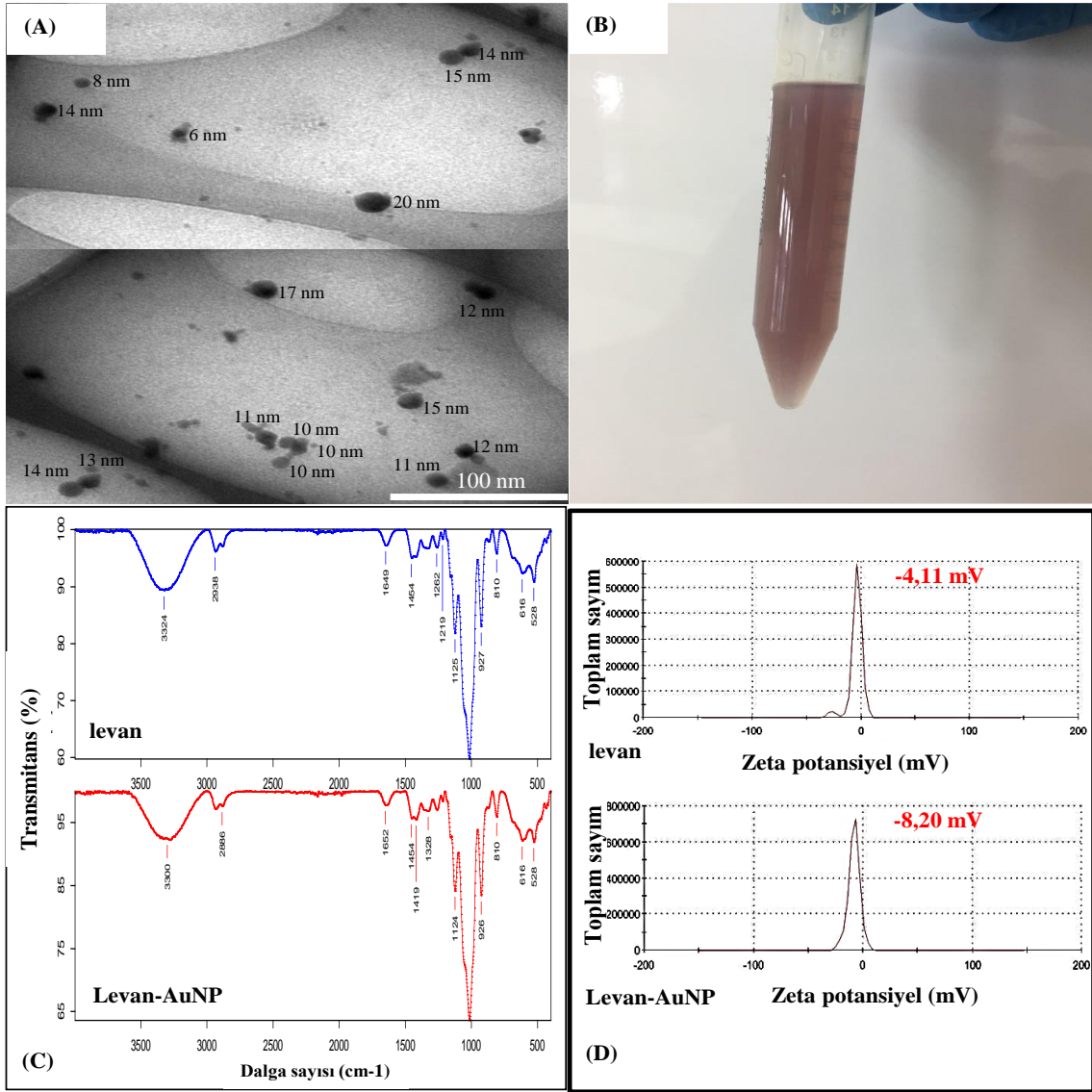
2.5. İstatistik Analizi

Elde edilen bulgular, Excel paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Excel programındaki Veri Çözümleme Aracı kullanılarak gruplar arasındaki anlamlı farklar tek-etken ANOVA (Varyans Analizi) istatistik analizi ile değerlendirilmiştir. İkili gruplar arasındaki istatistiksel kıyaslama ise yine Excel’de eşit varyanslar varsayarak t-Test ile yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklar $p < 0,05$ değeri için anlamlı kabul edilmiştir. Data; ortalama \pm standart sapma şeklinde ifade edilmiştir.

3. Sonuçlar ve Tartışma

3.1. Altın Nanoparçacık Sentez ve Karakterizasyonu

TEM mikrografisine bakıldığında (Şekil 1A), oluşan nanoparçacıklar küresel gözükmektedir. Sentez sırasında kullanılan levan, görüntüde gölgeler şeklinde koyu arka yapı oluşturmuştur. Nanoparçacıkların birbirinden ayrık bir şekilde durması, kullanılan levanın nanoparçacık agregasyonunu verimli bir şekilde engellediğini kanıtlamaktadır. Ayrıca literatürde benzer şekilde lazer ablasyonu ile sentezlenen altın nanoparçacıkların büyük kümelenmeler veya zincir benzeri yapılar oluşturduğu kaydedilmiştir (Naharuddin vd., 2020). Mikrografilerde çok küçük ve kirlilik gibi görünen nanoparçacıklar (deneylerde herhangi bir saflaştırma veya boyut eleme yöntemi kullanılmadığı için) hesaba katılmadığı takdirde Levan-AuNP’lerin boyut aralığı 8-20 nm aralığında değişmektedir. Lazer ablasyonu sonucunda, AuNP’lere özgü karakteristik renk dönüşümü (kırmızı, soluk pembe) oluşmaktadır (Şekil 1B). Levadaki OH grupları ile altın nanoparçacıklarda ablasyon sonucu oluşan oksit grupları arasında etkileşim olduğu düşünülmektedir. FTIR analizinde görülen OH fonksiyonel gruplarının (3300-3321 cm⁻¹) pik şiddet ve yerlerindeki belirgin değişimler bunu doğrular niteliktedir (Şekil 1C). Levana özgü diğer karakteristik piklerin Levan-AuNP grubunda da korunması iyi bir kaplama olduğuna işaret eder (Aktürk, 2020). PLAL yöntemi ile sentezlenen altın nanoparçacıkların yüzeylerinde oksit katmanların oluştuğu daha önce de bildirilmiş (Sylvestre vd., 2004) ve bu fonksiyonel grupların hidrojen bağı etkileşimine girebileceği belirtilmiştir (Bailly vd., 2019). Çalışmada kullanılan hem ticari levanın hem de Levan-AuNP gruplarının negatif zeta potansiyeli vardır (Şekil 1D), yani siRNA kompleksleştirme çalışmalarında negatif yüklü Levan-AuNP ile negatif yüklü siRNA arasında herhangi bir elektrostatik etkileşim beklenmemektedir.



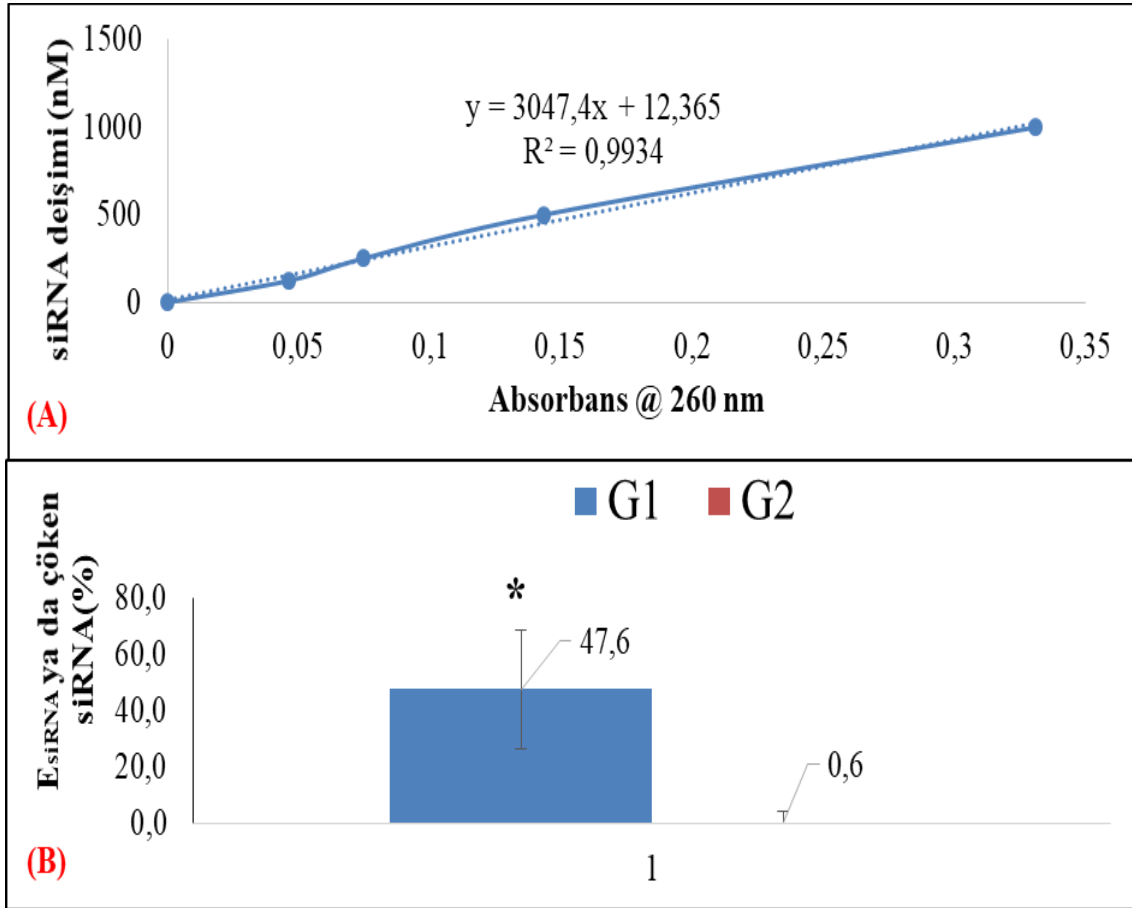
Şekil 1. Ticari levan ve Levan-AuNP grubunun karakterizasyon test sonuçları: (A) TEM mikrografileri, (B) altın nanoparçacık oluşumunu teyit eden karakteristik kırmızı renk değişimleri, (C) FTIR spektrumları ve (D) zeta potansiyel ölçümleri.

3.2. Altın Nanoparçacık ve siRNA Kompleksleştirme Çalışmaları

Tek başına siRNA kontrol kullanılarak hazırlanan farklı dilüsyonlarda (1000, 500, 250, 125 ve 0 nM) mikro-UV spektrofotometre cihazının RNA ölçüm modu (RNA-40) seçilerek elde edilen absorbans ölçümleriyle (Tablo 2) RNA nicelik tespiti için doğrusal kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 2A). İlk yapılan ölçümlerde 125 nM altı ölçümler cihazın tespit sınırının dışında kaldığı görüldüğü için doğrusal bir kalibrasyon eğrisi için alt değerler kullanılmamıştır. Firmanın verdiği protokol bilgileri doğrultusunda 1X siRNA tamponu içinde 1000 nM (1 μ M) olarak hazırlanan siRNA derişimi mikro-UV spektrofotometre cihazının RNA-40 modu ile kontrol edilmiş ve firma protokollerinde belirtilen değere (1 μ M siRNA = 13,3 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) yakın çıkmıştır. Yine aynı protokolde, belirtilen değerden sapmaların 1X siRNA tamponu içindeki tuzlardan kaynaklanabileceği söylenmektedir.

Tablo 2. Mikro-UV spektrofotometre cihazının RNA ölçüm sonuçları

siRNA konsantrasyonu (nM)	1000	500	250	125
A260	0,333	0,141	0,071	0,047
A260/A280	2,21	2,16	2,41	2,3
Ölçülen RNA konsantrasyonu ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)	13,343	5,673	2,846	1,919



Şekil 2. (A) Mikro-UV spektrofotometre cihazı ölçüm sonuçları ile elde edilen siRNA kalibrasyon eğrisi, (B) % E_{siRNA} (siRNA-Levan-AuNP etkileşimi) ya da çöken % siRNA ölçümüyle G1 (siRNA+ Levan-AuNP) ve G2 (siRNA) gruplarının kıyaslanması. *: ikili gruplar arasında istatistiksel fark ($p < 0,05$).

Bu çalışmada, süspansiyon edilmiş siRNA'nın derişimini en doğru şekilde bulmak için tercih edilen yöntem 260 nm dalga boyunda absorbans ölçümü olmuştur. Zaten bilindiği üzere, zeta potansiyel ve dinamik ışık saçılımı ile hidrodinamik boyut ölçümleri, nitel olarak siRNA yüklemesini teyit etmektedir, ancak siRNA'nın 260 nm dalga boyunda (siRNA'nın pik absorbansı) absorbans ölçümü ile nicelik tayini daha önemli bilgiler sağlamaktadır (Melamed vd., 2017). Levan-AuNP ile etkileşime giren siRNA'nın, santrifüj işlemi sonunda birlikte çöktüğü kabul edilerek yapılan hesaplamalara göre yaklaşık %48 oranında enkapsülasyon değeri bulunmuştur (Şekil 2B). Bu değer, tek başına siRNA çökme oranıyla kıyaslandığında (santrifüj işlemi kaynaklı çökmelerden gelebilecek hataları elimine etmek için) istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde yüksek çıkmıştır. Levan-AuNP'nin santrifüj işlemi sonunda çökmesi tüp tabanında oluşan pembe renkli pelet ile görsel olarak onaylanmış ve süspansiyon içinde işlem sonunda çökmeyen, geri kalan numuneden kaynaklı A260 değeri için düzeltme (G1-G3) yapılmıştır. Zaten, bunu kontrol için yapılan başka ölçümlerde, G3 grubunun (sadece Levan-AuNP) santrifüj öncesi ve sonrası ortalama A260 değerleri, sırasıyla, 1,3 ve 0,7 olarak ölçülmüştür. Yöntem, görüldüğü üzere kolaydır ve siRNA-nanoparçacık etkileşimini nicel olarak gösterebilmektedir, ancak süpernantatta kalan siRNA-nanoparçacık komplekslerinin miktarını saptayamadığı için ölçüm hassasiyeti çok yüksek değildir ve ayrıca RNA türünü (sense ve antisense iplikleri) ayırt etmek bu yöntemle mümkün değildir. Levan moleküllü amfifilik bir yapıya sahiptir (hidrofobik bir boşluk ve hidrofilik bir dış kısma sahiptir) ve bu özellik sayesinde suda kendiliğinden toplanıp nanoparçacık oluşturabilir (Kim vd., 2015). Literatürde bu özellik kullanılarak levan moleküllü içinde enkapsüle edilmiş farklı terapötik (Sezer vd., 2017) ya da görüntüleme ajanı (Kim vd., 2015) örnekleri mevcuttur. Levan kaplı altın nanoparçacıklar da suda oluşturdukları sıkı küresel konformasyonları sayesinde santrifüj işlemi sonunda kolaylıkla çökmekte ve siRNA molekülünü de yapıları içinde hapsederek tuttıkları düşünülmektedir. Bu çalışmada geliştirdiğimiz taşıyıcı molekül de zayıf anyonik yapıda levan moleküllüyle kaplı AuNP nanoparçacık olmuştur. Çöktürme yöntemi ile enkapsüllenen siRNA miktarı %48 civarında olduğu için ayrıca Levan-AuNP yapısının gelecekte katyonik moleküllerle modifiye edilmesi ile (yani yarı sentetik polimerler sentezlenerek) bağlanma verimi elektrostatik etkileşimle artabilecektir. Anyonik yapıda polisakaritlerin katyonik polimerlerle (PEI ve spermin gibi) modifiye edilip gen transfeksiyon ajanı olarak kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur (Khan vd., 2012). Bu şekilde siRNA kompleksleşme verimi artarken diğer yandan da sitotoksitenin azaldığı bildirilmiştir (Khan vd., 2012).

3.3. siRNA Transfeksiyon Testleri

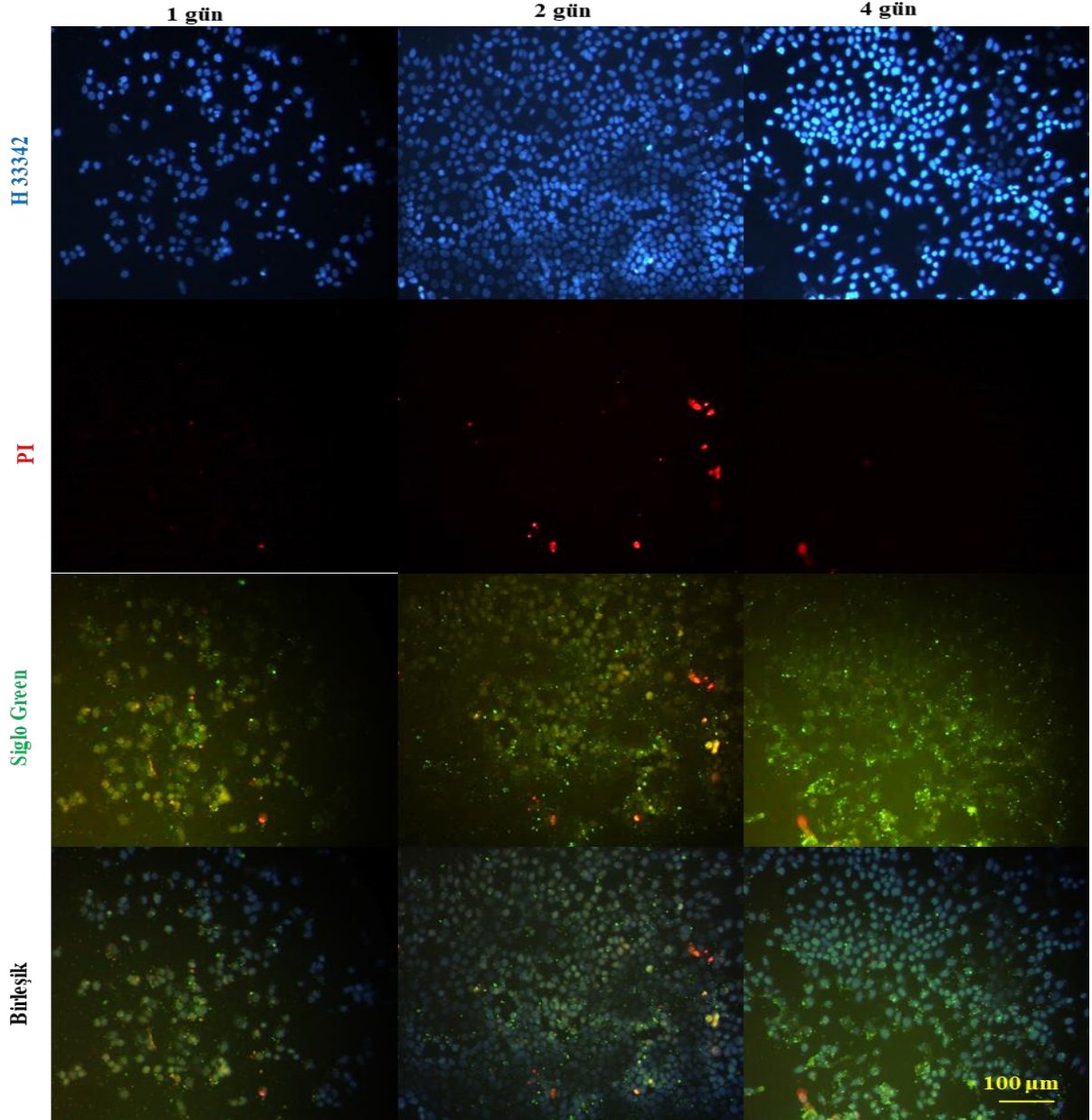
Transfeksiyon uygulaması için hazırlanan farklı deney gruplarının MCF-7 hücrelerindeki olası sitotoksik etkisini daha çok apoptotik mi yoksa nekrotik yolak ile mi gerçekleştirdiği H33342 ve PI ikili floresan boyamasıyla incelenmiştir (Şekil 3-8). Tüm deney grupları için yapılan apoptotik indekslemeye göre, en yüksek apoptotik etki Levan-AuNP/siGLO (0,9 mg.mL⁻¹/50 nM) örneği uygulaması sonucu (4. gün) %50 olarak saptanmış, bunu %10 ile siGLO (50 nM) uygulaması (4. gün) izlemiş ve diğer tüm gruplar (1, 2 ve 4. günler) için apoptotik indeks değeri %1'in altında bulunmuştur (Tablo 3). Belirtilen gruplarda (Levan-

AuNP/siGLO (0,9 mg.mL⁻¹/50 nM) ve siGLO (50 nM)), 4. gündeki artan apoptotik etkinin, hedef hücrelerin uygulanan örneğe maruziyet süresinin uzaması ile ilgili olabileceği değerlendirilmiştir. Queiroz ve arkadaşlarının (Queiroz vd., 2017) yapmış oldukları bir çalışmada benzer şekilde, Levan (0,1 mg.ml⁻¹, 48 h) uygulanan MCF-7 hücrelerinde oksidatif stres kaynaklı antiproliferatif ve pro-apoptotik etkilerin görüldüğü bildirilmiştir. Nekrotik indeks değerleri ise en yüksek siGLO (50 nM) ve Levan-AuNP/siGLO (0,9 mg.mL⁻¹/50 nM) örnekleri uygulaması (2. gün) sonucunda %5 olarak bulunmuş, diğer tüm gruplar için nekrotik indeks değerleri bu değer altında hesaplanmıştır (Tablo 3). Literatürde özellikle yüzeyi katyonik olarak modifiye edilmiş (pozitif yüklü) AuNP için sitotoksik sonuçlar olduğu bildirilmiştir (Roesler vd., 2011; Remant vd., 2011; Goodman vd., 2004; Godbey ve Mikos, 2001). Polietilenimin (PEI) (Goodman vd., 2004) ve kuaterner amonyum (Godbey ve Mikos, 2001) gibi katyonik yapıda kimyasallar negatif yüklü hücre membranına bağlanmayı sağlamakta ve hücre lizisine sebep olmaktadır.

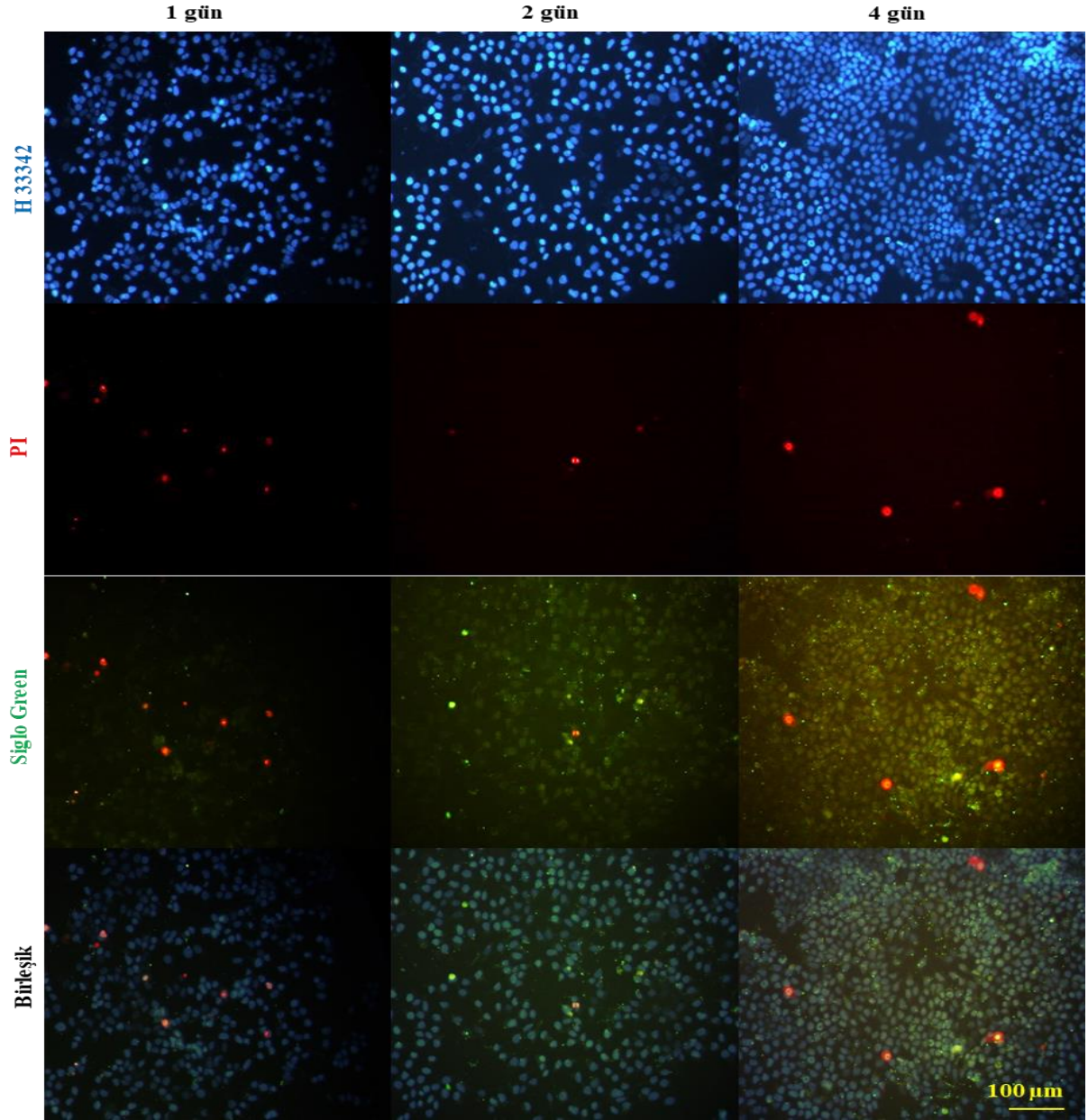
Tablo 3. Deney gruplarının uygulanması sonrasında MCF-7 meme kanseri hücreleri için hesaplanan apoptotik ve nekrotik indeks değerleri (%)

	Apoptotik İndeks (%)			Nekrotik İndeks (%)		
	1 gün	2 gün	4 gün	1 gün	2 gün	4 gün
Grup A: Levan-AuNP/siGLO (0,9 mg.mL ⁻¹ /50 nM)	-	<1	50	-	5	<1
Grup B: Levan-AuNP/siGLO (0,45 mg.mL ⁻¹ /50 nM)	<1	<1	<1	4	<1	<1
Grup C: Levan-AuNP/siGLO (0,225 mg.mL ⁻¹ /50 nM)	<1	<1	<1	3	4	<1
Grup D: Levan-AuNP/siGLO (0,1125 mg.mL ⁻¹ /50 nM)	<1	<1	<1	2	1	<1
Grup E: siGLO (50 nM)	<1	<1	10	<1	5	<1
Grup F: Kontrol	<1	<1	<1	<1	3	<1

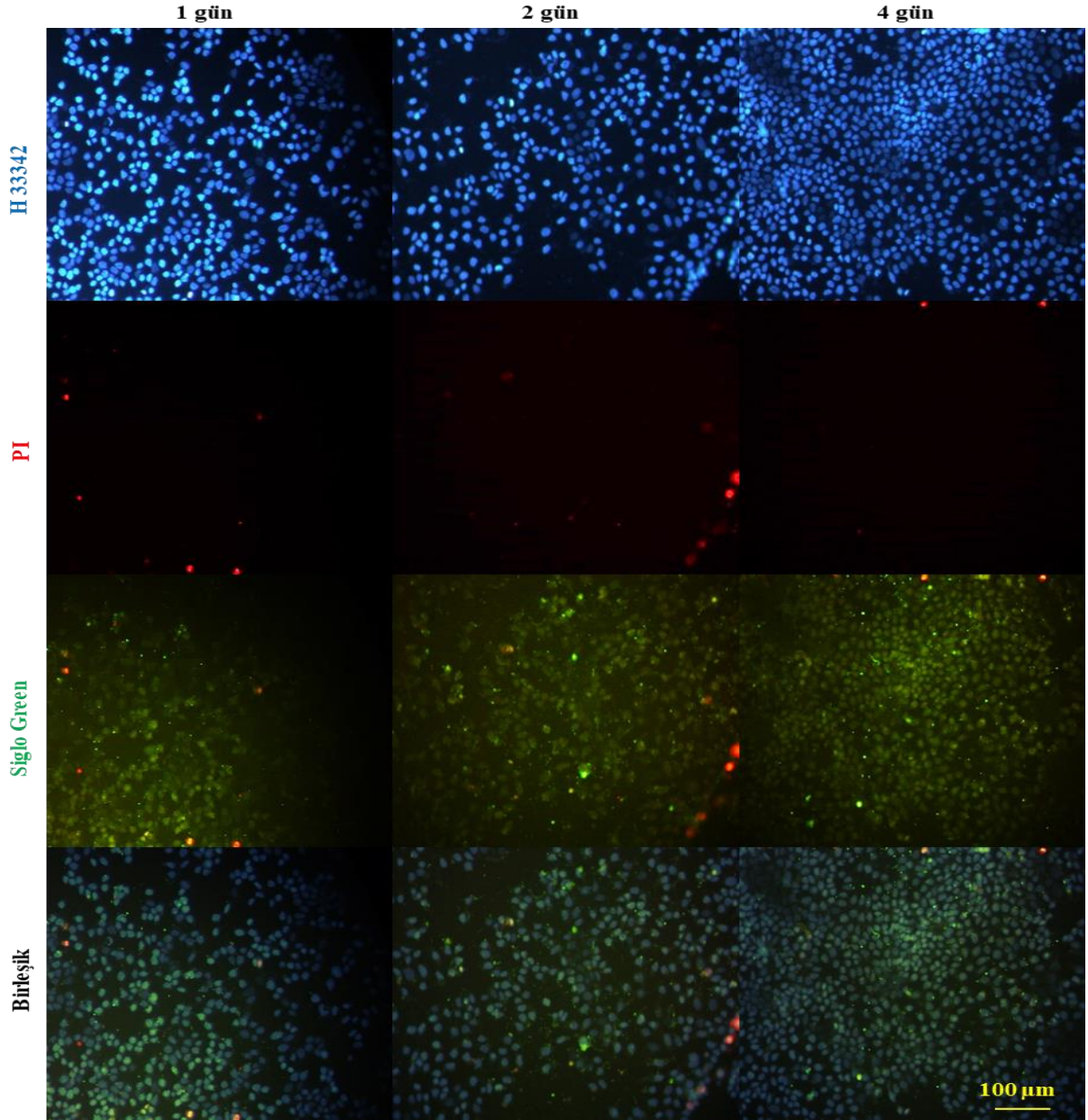
Floresan mikrografileri incelendiğinde (Şekil 3-8), ilk günde başarılı transfeksiyon (yeşil floresan ışımaya) gösteren grupları tespit etmek zordur. Ancak, Levan-AuNP derişimi artıkça yeşil floresanın şiddeti de artmaktadır. Özellikle, en yüksek derişimde Levan-AuNP içeren grubun 4. gün floresan ışımaya diğer gruplardan belirgin bir şekilde daha fazladır. Hiç Levan-AuNP içermeyen grupta ise transfeksiyon olması kullanılan siRNA molaritesinin yüksek olmasına bağlanabilir. Ayrıca, DNA, RNA ve anyonik yapıdaki diğer moleküllerin hücre yüzeyinde yer alan süpürücü reseptörlere bağlanabildiği ve hücre içine ulaşabildiği bildirilmiştir (Brodeur vd. 2008). Nanoparçacıkların hücre membranına çökelti halinde birikmesi de (Gemeinhart vd., 2005) elektrostatik temelli itici kuvvetlere karşı gelinerek hücre içine giriş yolunu reseptör aracılı olarak sağlayan önemli bir faktör olarak düşünülebilir. Daha önceki benzer bir çalışmamızda da levan kaplı altın nanoparçacıkların L929 fibroblastik hücre membranına çöktüğü ve özellikle hücrelerle etkileşime girerek endositoza uğradığı gösterilmiştir (Aktürk, 2020). AuNP'lerin canlı hücrelere girişindeki temel mekanizma endositozdur (Li vd., 2008; Shukla vd., 2005; Uboldi vd., 2009). siRNA kargosuyla yüklü AuNP'lerin hücre içine girdikten sonra endositik veziküllerde toplandığı ve belirli bir zamandan sonra endozomal kaçış yaparak siRNA moleküllerinin sitozole salındığı varsayılmaktadır (Cebrián vd., 2011). Floroforların özellikle perinükleer bölgedeki dağılımı (Şekil 3-8) Levan-AuNP-siRNA komplekslerinin endositik yollarla yoluyla hücreye alındığını göstermektedir (van Asbeck vd., 2013; El-Andaloussi vd., 2006; Chiu vd., 2004).



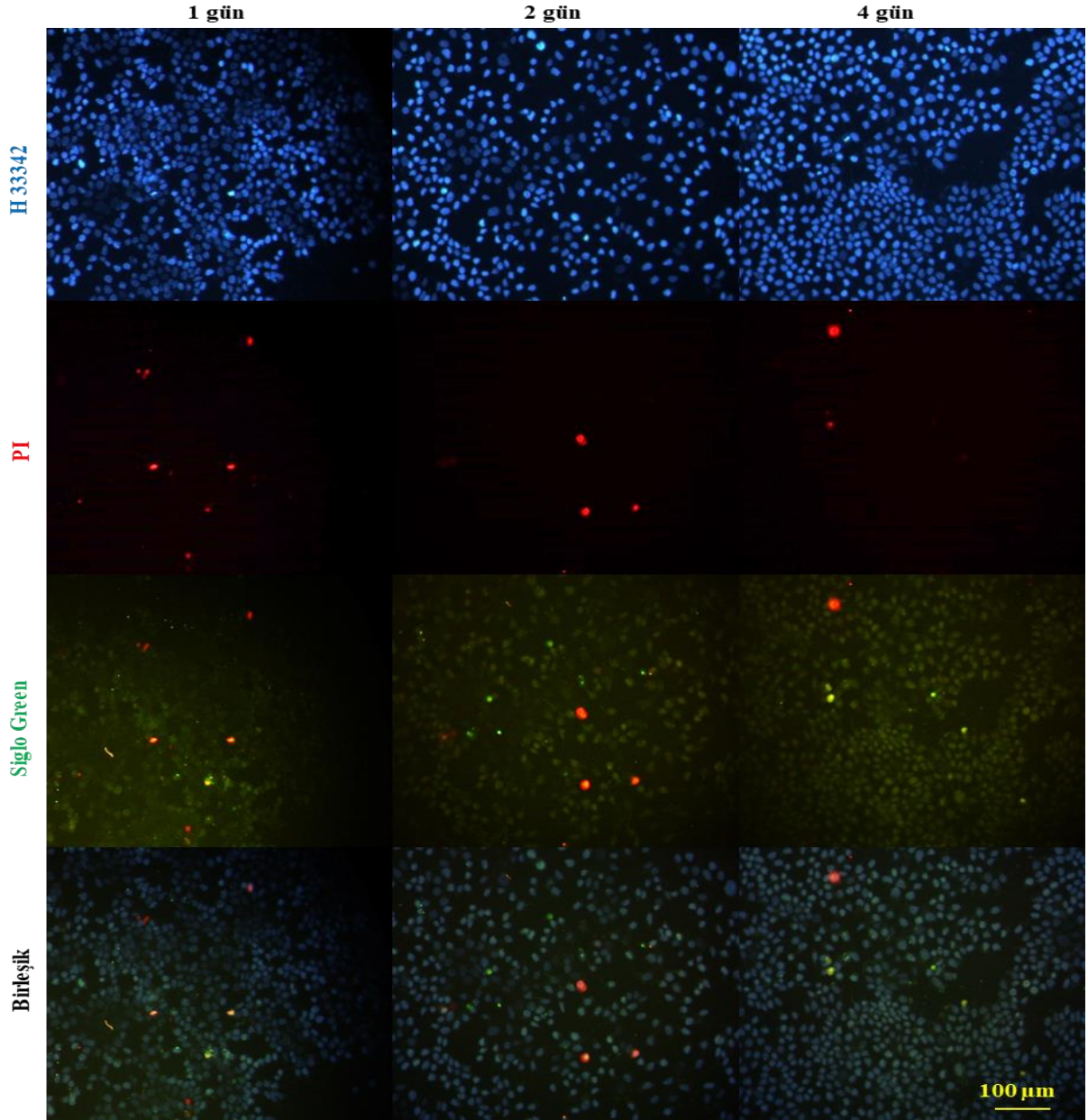
Şekil 3. Sabit molaritede (50 nM) siGLO Green transfeksiyon indikatörü ile Levan-AuNP'nin (Grup A: 0,9 mg.mL⁻¹) karıştırılması sonucu oluşturulmuş grubun floresan mikroskobu görüntüleri.



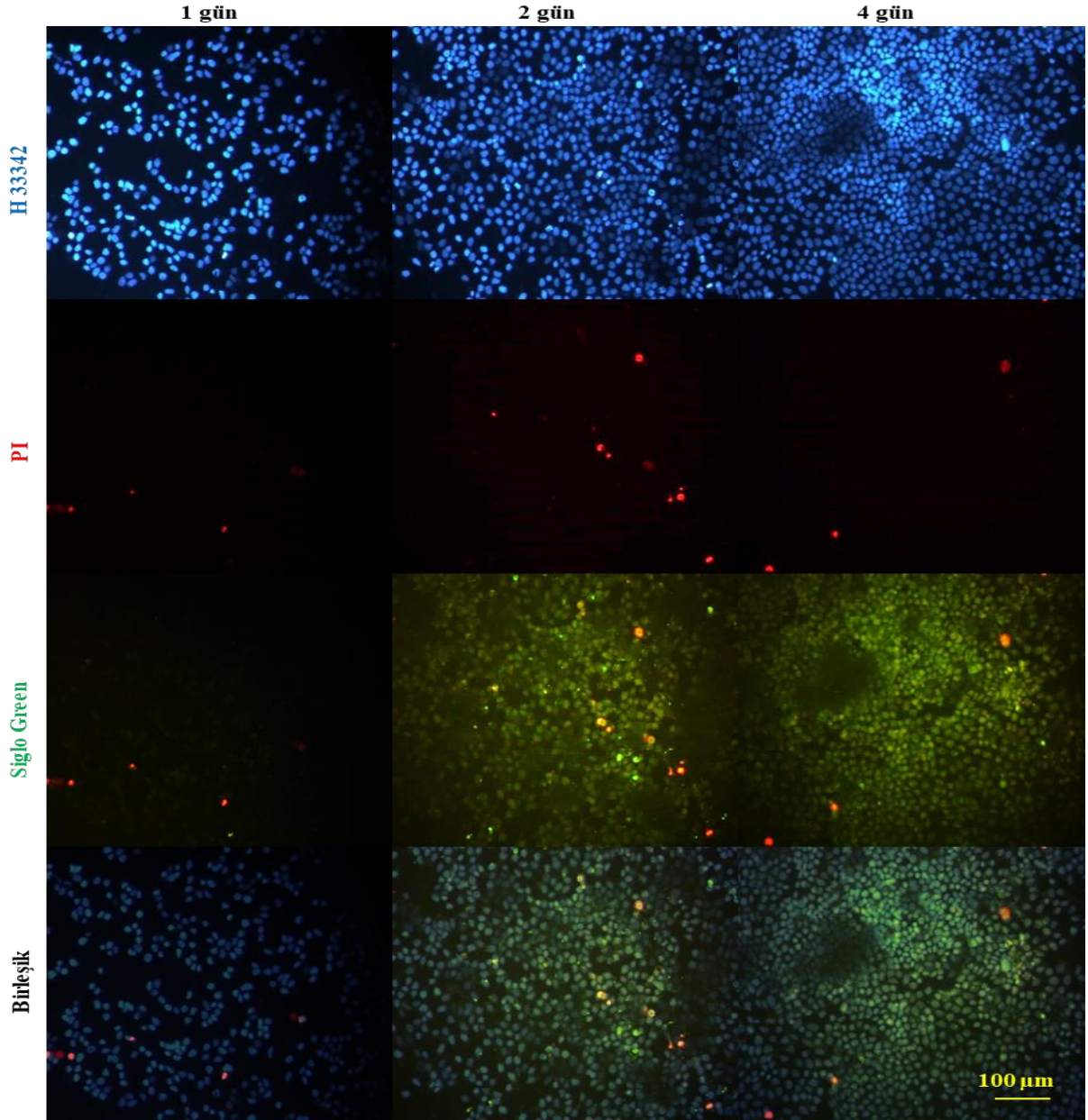
Şekil 4. Sabit molaritede (50 nM) siGLO Green transfeksiyon indikatörü ile Levan-AuNP'nin (Grup B: 0,45 mg.mL⁻¹) karıştırılması sonucu oluşturulmuş grubun floresan mikroskobu görüntüleri.



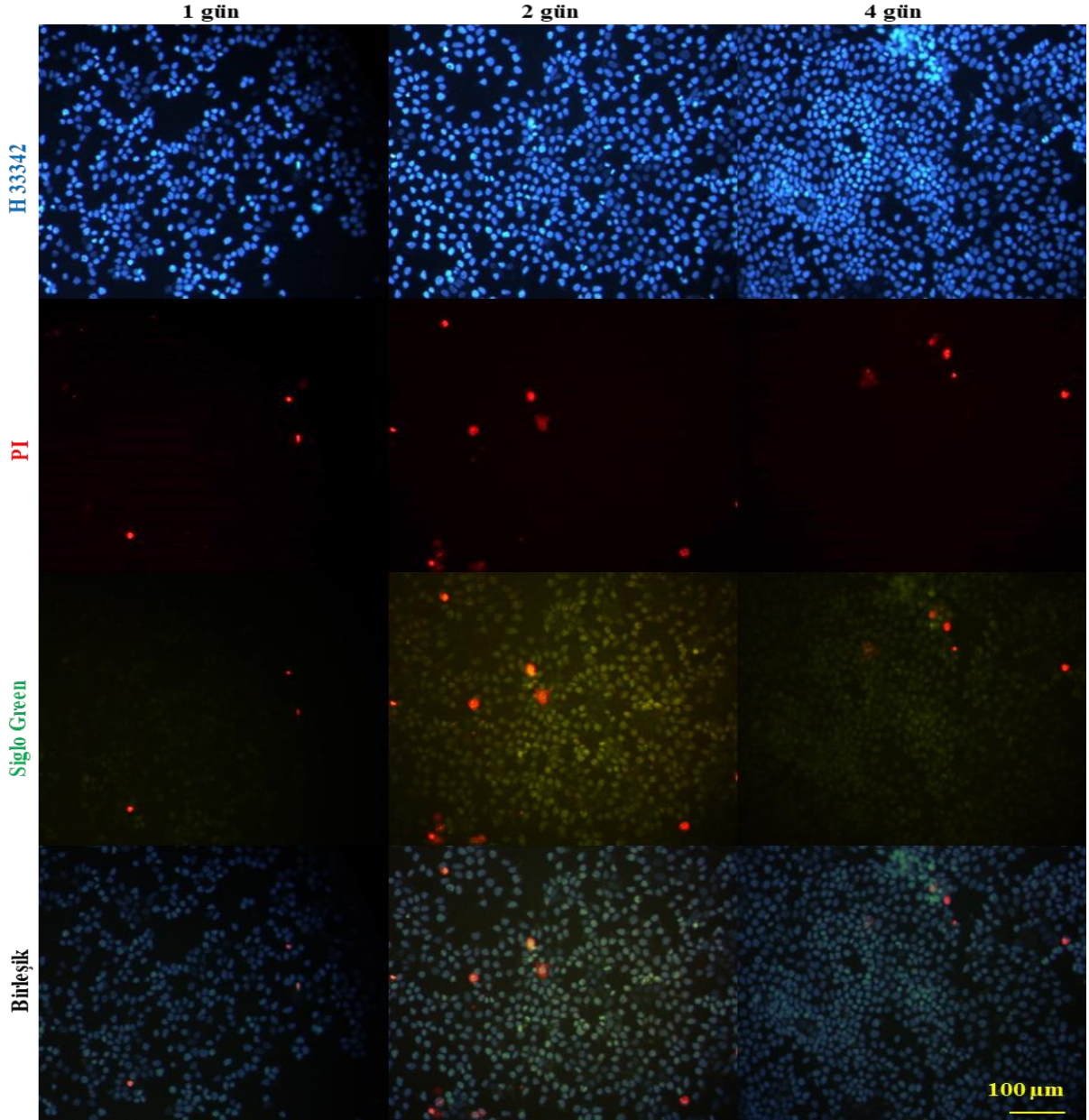
Şekil 5. Sabit molaritede (50 nM) siGLO Green transfeksiyon indikatörü ile Levan-AuNP'nin (Grup C: 0,225 mg.mL⁻¹) karıştırılması sonucu oluşturulmuş grubun floresan mikroskobu görüntüleri.



Şekil 6. Sabit molaritede (50 nM) siGLO Green transfeksiyon indikatörü ile Levan-AuNP'nin (Grup D: 0,1125 mg.mL⁻¹) karıştırılması sonucu oluşturulmuş grubun floresan mikroskobu görüntüleri.

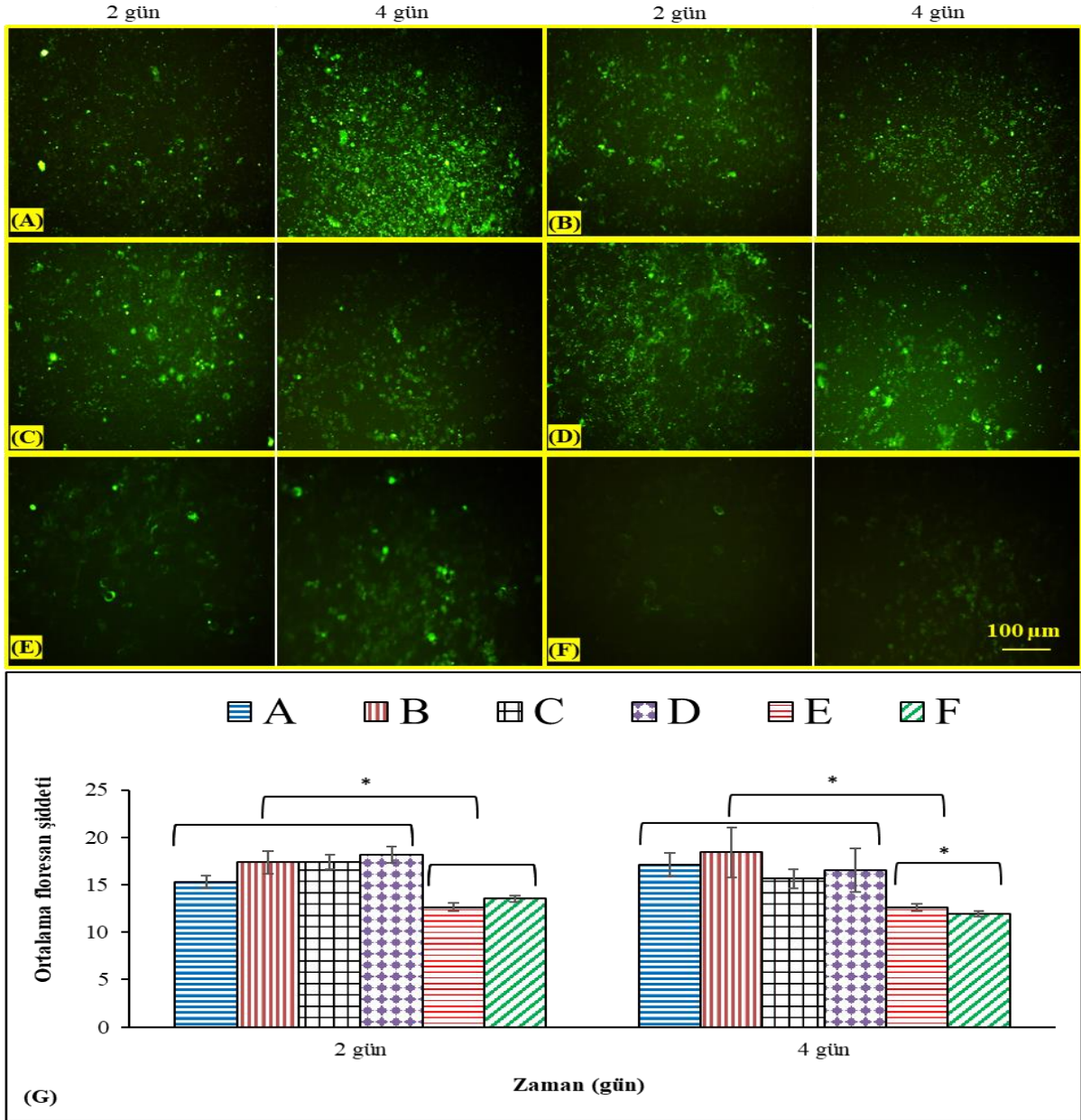


Şekil 7. Sadece sabit molaritede (50 nM) siGLO Green transfeksiyon indikatörü içeren grubun (Grup E: Levan-AuNP yok) floresan mikroskobu görüntüleri.



Şekil 8. Ne SiGLO Green transfeksiyon indikatörü ne de Levan-AuNP içermeyen grubun (Grup F: Kontrol Grubu) floresan mikroskobu görüntüleri.

PI boyası, siGLO Green transfeksiyon indikatörünü görüntülemek için kullanılan floresan filtresinde de yeşil ışımaya yaptığı için transfeksiyon değerlendirmesi bu üçlü floresan boyamasında çok verimli olmamıştır. Bu sebeple apoptoz, nekroz boyalarının kullanılmadığı gruplarda (yalnızca siGLO Green transfeksiyon indikatörü olan) transfeksiyon değerlendirmesi 2 ve 4 günlük inkübasyon süreleri sonunda tekrarlanmıştır (Şekil 9). Buradaki görüntüler Levan-AuNP'nin transfeksiyon ajanı olarak başarılı olduğunun kanıtıdır. Levan-AuNP olmayınca da yine resöptör aracılı transfeksiyon gerçekleşmiş ancak, diğer gruplara (Levan-AuNP içeren) kıyasla çok az düzeydedir. Bu kıyaslamayı sayısal olarak yapabilmek için ImageJ programında floresan şiddeti ölçülmüş ("Mean gray value" ölçümü) ve istatistiksel açıdan anlamlı farklar bulunmuştur. Levan-AuNP gruplarındaki değerler, sadece siGLO ve boş kontrolden istatistiksel açıdan daha yüksek çıkmakla beraber kendi aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır. Levan-AuNP gruplarında, yoğun bir yeşil ışımaya, özellikle parçalı bir şekilde gerçekleşmiştir. siGLO'nun bu noktalı deseni, özellikle nükleli ve sitoplazma boyunca dağılmış bir halde olması, endositik bir hücre alımı ve aynı zamanda gelişmiş bir endozomal kaçışa işaret etmektedir (Schiroli vd., 2019).



Şekil 9. Sabit molaritede (50 nM) siGLO Green transfeksiyon indikatörü ile farklı derişimlerde Levan-AuNP'nin karıştırılması sonucu oluşturulmuş grupların (A: 0,9 mg.mL⁻¹, B: 0,45 mg.mL⁻¹, C: 0,225 mg.mL⁻¹, D: 0,1125 mg.mL⁻¹, E: 0 mg.mL⁻¹), siGLO Green transfeksiyon indikatörü ve Levan-AuNP içermeyen grubun (F) floresan mikroskobu görüntüleri ve gruplar arasında ortalama floresan şiddet değeri kıyaslaması (G). *: ikili gruplar arasında istatistiksel fark (p < 0,05).

4. Sonuç

Bu çalışmada gerçekleştirilen analizler göstermiştir ki sentezlenen levan polisakariti kaplı altın nanoparçacıklar, siRNA moleküllerinin hücre içine alınmasına yardımcı olmaktadır ve transfeksiyon ajanı olma potansiyeli vardır. Sentezlenen anyonik yapıdaki Levan-AuNP, hücre membranını başarılı bir şekilde geçmiş ve siRNA (siGLO Green) transfekte olmuştur. Ancak, %48'lik kompleksleşme oranını daha da artırmak için literatürdeki çalışmalara benzer şekilde, negatif yüklü siRNA ile pozitif yüklü altın nanoparçacıkları elektrostatik olarak etkileştirmek etkili bir strateji olabilir. Bu sebeple, gelecek araştırma planımızda, kullanılan levan molekülün katyonik bir polimerle (örn; polietilenimin, spermin, spermidin vb.) modifiye edilmesi vardır. Ayrıca, siGLO Green ışması hücrelerde tespit edilse de bunun hücre içinde takibi (TEM ile hücre içi trafik çalışması) ile hangi aşamalarda ve yollardan hücre nükleusuna ulaştığı bulunmalı, transfeksiyon verimi hesabı (akış sitometrisi ile) ve gen susturma ya da gen ekspresyonu (RT-PCR ve westernblot) gibi analizler de yapılmalıdır. Bu belirtilen mantık doğrultusunda hedefli siRNA sekansları alınmış (Sense Sequence: 5'-GAAACCAACUGUUAGUGUAdTdT-3'; Anti-sense Sequence: 5'-UACACUGACAGUUGGUUCdTdT-3') ve gelecek deney planlaması yapılmaya başlanmıştır.

Referanslar

- Akturk, O. (2020). Colloidal stability and biological activity evaluation of microbial exopolysaccharide levan-capped gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 192, 111061.
- Akturk, O., Erdemli, O., Cagdas Tunalı, B. (2019). Gold nanocomposites for biomedical applications. *Materials for Biomedical Engineering: Bioactive materials, properties, and applications*. Valentina Grumezescu, Alexandru Mihai Grumezescu (eds),. Netherlands: Elsevier, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818431-8.00015-5>, 485-526.
- Akturk, O., Gün Gök, Z., Das, T. M., Erdemli, O. (2018). Synthesis and characterization of sericin-capped gold nanoparticles. *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 33, 675–684.
- Akturk, O., Gün Gök, Z., Erdemli, O., Yigitoglu, M. (2019). One-pot facile synthesis of silk sericin-capped gold nanoparticles by UVC radiation: Investigation of stability, biocompatibility, and antibacterial activity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107, 2667-2679.
- Alireza, S., Marie, S. J., Saeed, M., Hadi, R. N., Zahra, N., Sadat, H. E., Ingo, B., Javad, M. S., Heiko, L. (2019). Development and Clinical Translation of Approved Gene Therapy Products for Genetic Disorders. *Frontiers in Genetics*, 10, 868.
- Bailly, A. L., Correard, F., Popov, A., Tselikov, G., Chaspoul, F., Appay, R., Al-Kattan, A., Kabashin, A.V., Braguer, D., Esteve, M. A. (2019). In vivo evaluation of safety, biodistribution and pharmacokinetics of laser-synthesized gold nanoparticles. *Sci Rep*, 9, 12890.
- Brodeur, M. R., Brissette, L., Falstraalt, L., Luangrath, V., Moreau, R. (2008). Scavenger receptor of class B expressed by osteoblastic cells are implicated in the uptake of cholesteryl ester and estradiol from LDL and HDL3. *J Bone Miner Res*, 23, 326–37.
- Cebrián, V., Martín-Saavedra, F., Yagüe, C., Arruebo, M., Santamaría, J., Vilaboa, N. (2011). Size-dependent transfection efficiency of PEI-coated gold nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 7(10), 3645-3655.
- Chang, K. L., Higuchi, Y., Kawakami, S., Yamashita, F., Hashida, M. (2011). Development of lysine-histidine dendron modified chitosan for improving transfection efficiency in HEK293 cells. *J Control Release*, 156(2), 195-202.
- Chiu, Y. L., Ali, A., Chu, C. Y., Cao, H., Rana, T. M. (2004). Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells. *Chem. Biol.*, 11, 1165–1175.
- Ding, Y., Jiang, Z., Saha, K., Kim, C. S., Kim, S. T., Landis, R. F., Rotello, V. M. (2014). Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Molecular Therapy*, 22(6), 1075-1083.
- El-Andaloussi, S., Johansson, H. J., Lundberg, P., Langel, U. (2006). Induction of splice correction by cell-penetrating peptide nucleic acids. *J. Gene Med.*, 8, 1262–1273.
- Ferreira, D., Fontinha, D., Martins, C., Pires, D., Fernandes, A. R., Baptista, P. V. (2020). Gold Nanoparticles for Vectorization of Nucleic Acids for Cancer Therapeutics. *Molecules*, 25(15), 3489.
- Gemeinhart, R. A., Luo, D., Saltzman, W. M. (2005). Cellular Fate of a Modular DNA Delivery System Mediated by Silica Nanoparticles. *Biotechnol Prog*, 21, 532–7.
- Godbey, W. T., Mikos, A. G. (2001). Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes. *J Control Release*, 72, 115–25.
- Goodman, C. M., McCusker, C. D., Yilmaz, T., Rotello, V. M. (2004). Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chem*, 15, 897–900.
- Hardee, C. L., Arévalo-Soliz, L. M., Hornstein, B. D. (2017). Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy. *Genes*, 8(2), 65.
- Kamaruzman, N. I., Tiash, S., Ashaie, M., Chowdhury, E. H. (2018). siRNAs Targeting Growth Factor Receptor and Anti-Apoptotic Genes Synergistically Kill Breast Cancer Cells through Inhibition of MAPK and PI-3 Kinase Pathways. *Biomedicines*, 6(3), 73.
- Khan, W., Hosseinkhani, H., Ickowicz, D., Hong, P. D., Yu, D. S., Dom, A. J. (2012). Polysaccharide gene transfection agents. *Acta Biomaterialia*, 8(12), 4224-4232.
- Kim, S. J., Baeb, P. K., Chung, B. H. (2015). Self-assembled levan nanoparticles for targeted breast cancer imaging. *Chemical Communications*, 51, 107-110.

- Koşarsoy Ağçeli, G., Cihangir, N. (2020). Nano-sized biopolymer levan: Its antimicrobial, anti-biofilm and anti-cancer effects. *Carbohydrate Research*, 494, 108068.
- Krzysztoń, R., Woschée, D., Reiser, A., Schwake, G., Strey, H. H., Rädler, J.O. (2019). Single-cell kinetics of siRNA-mediated mRNA degradation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 21, 102077.
- Kumar, S., Diwan, A., Singh, P., Gulati, S., Choudhary, D., Mongia, A., Shuklaa, S., Gupta, A. (2019). Functionalized gold nanostructures: promising gene delivery vehicles in cancer treatment. *RSC Adv.*, 9, 23894-23907.
- Li, P., Li, D., Zhang, L., Li, G., Wang, E. (2008). Cationic lipid bilayer coated gold nanoparticles-mediated transfection of mammalian cells. *Biomaterials*, 29, 3617–24.
- Li, W., Wang, G., Liang, W., Kang, K., Guo, K., Zhang, Y. (2014). Integrin $\beta 3$ Is Required in Infection and Proliferation of Classical Swine Fever Virus. *PLoS ONE*, 9(10), e110911.
- Maciel, J. C., Andrad, P. L., Neri, D. F. M., Carvalho, Jr. L. B., Cardoso, C. A., Calazans, G. M. T., Aguiar, J. A., Silva, M. P. C. (2012). Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization. *J Magn Magn Mater*, 324, 1312–1316.
- Melamed, J. R., Riley, R. S., Valcourt, D. M., Billingsley, M. M., Kreuzberger, N. L., Day, E. S. (2017). Quantification of siRNA Duplexes Bound to Gold Nanoparticle Surfaces. *Biomedical Nanotechnology. Methods in Molecular Biology*, vol 1570, Petrosko S., Day E. (eds), Humana Press, New York, NY., 1-15.
- Naharuddin, N. Z. A., Sadrolhosseini, A. R., Abu Bakar, M. H., Tamchek, N., Mahdi, M. A. (2020). Laser ablation synthesis of gold nanoparticles in tetrahydrofuran. *Opt. Mater. Express*, 10, 323-331.
- Okoampah, E., Mao, Y., Yang, S., Sun, S., Zhou, C. (2020). Gold nanoparticles–biomembrane interactions: From fundamental to simulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 196, 111312.
- Queiroz, E. A. I. F., Fortes, Z. B., Cunha, M. A. A., Kazak Sarilmiser, H., Dekker, A. M. B., Toksoy Öner, E., Dekker, R. F. H., Khaper, N. (2017). Levan promotes antiproliferative and pro-apoptotic effects in MCF-7 breast cancer cells mediated by oxidative stress. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 565-570.
- Rao, R. C., Zacks, D. N. (2014). Cell and gene therapy, *Cell-Based Therapy for Retinal Degenerative Disease*. vol 53, Casaroli-Marano RP, Zarbin MA (eds), Dev. Ophthalmol. Basel, Karger, doi: 10.1159/000357376.
- Remant Bahadur, K. C., Landry, B., Montazeri Aliabadi, H., Lavasanifar, A., Uludag, H. (2011). Lipid substitution on low molecular weight (0.6–2.0 kDa) polyethylenimine leads to a higher zeta potential of plasmid DNA and enhances transgene expression. *Acta Biomater*, 7(5), 2209-17, 2011.
- Roesler, S., Koch, F., Schmehl, T., Weissmann, N., Seeger, W., Gessler, T., Kissel, T. (2011). Amphiphilic, low molecular weight poly(ethylene imine) derivatives with enhanced stability for efficient pulmonary gene delivery. *Gene Med*, 13, 123–33.
- Sajid, M. I., Moazzam, M., Kato, S., Cho, K. Y., Tiwari, R. K. (2020). Overcoming Barriers for siRNA Therapeutics: From Bench to Bedside. *Pharmaceuticals*, 13(10), 294.
- Schioli, D., Gómara, M. J., Maurizi, E., Atkinson, S. D., Mairs, L., Christie, K. A., Cobice, D. F., McCrudden, C. M., Nesbit, M.A., Haro, I., Moore, T. (2019). Effective In Vivo Topical Delivery of siRNA and Gene Silencing in Intact Corneal Epithelium Using a Modified Cell-Penetrating Peptide, *Molecular Therapy Nucleic Acids*. 17, 891-906.
- Sezer, A. D., Kazak, H., Toksoy Öner, E., Akbuğa, J. (2011). Levan-based nanocarrier system for peptide and protein drug delivery: Optimization and influence of experimental parameters on the nanoparticle characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 358-363.
- Sezer, A. D., Kazak Sarılmışer, H., Rayaman, E., Çevikbaş, A., Toksoy Öner, E., Akbuğa, J. (2017). Development and characterization of vancomycin-loaded levan-based microparticulate system for drug delivery. *Pharm Dev Technol*, 22(5), 627-634.
- Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R. R., Sastry, M. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir*, 21, 10644–54.
- Srikanth, R., Sundhar Reddy C. H. S. S., Siddhartha, G., Ramaiah, M. J., Uppuluri, K. B. (2015). Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate Polymers*, 120, 102-114.

Sylvestre, J. P., Poulin, S., Kabashin, A. V., Sacher, E., Meunier, M., Luong, J. H. T. (2004). Surface chemistry of gold nanoparticles produced by laser ablation in aqueous media. *J. Phys. Chem. B*, 108, 16864–16869.

Uboldi, C., Bonacchi, D., Lorenzi, G., Hermanns, M. I., Pohl, C., Baldi, G., Unger, R. E., Kirkpatrick, C. J. (2009). Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. *Particle and Fibre Toxicology*, 6, 18–30.

van Asbeck A. H., Beyerle, A., McNeill, H., Bovee-Geurts, P. H., Lindberg, S., Verdurmen, W. P., Hällbrink, M., Langel, U., Heidenreich, O., Brock, R. (2013). Molecular parameters of siRNA-cell penetrating peptide nanocomplexes for efficient cellular delivery. *ACS Nano*, 7, 3797-3807.

Xue, H. Y., Liu, S., Wong, H. L. (2014). Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine. *Nanomedicine*, 9(2), 295-312.