



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOM HÜCRE HATTINDA
N-ASETİLGALAKTOZAMİN İLE KONJUGE
OLİGONÜKLEOTİT ARACILI ABCB1-MDR1 GEN İFADESİNİN
BASKILANMASININ İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

BURCU HASTÜRK
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. FATİH EREN
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2024



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOM HÜCRE HATTINDA
N-ASETİLGALAKTOZAMİN İLE KONJUGE
OLİGONÜKLEOTİT ARACILI ABCB1-MDR1 GEN İFADESİNİN
BASKILANMASININ İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

BURCU HASTÜRK
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. FATİH EREN
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2024



Sağlık Bilimleri
Enstitüsü

DOKTORA
TEZ ONAY FORMU

Doküman No: SBE-
DR-9f

İlk Yayın Tarihi:
18.01.2022

Revizyon Tarihi:
09.05.2022

Revizyon No: 01

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Program türü : Doktora

Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji ve Genetik

Tez Sahibi : Burcu HASTÜRK

Sınav Tarihi ve Saati : 28.08.2024 - 11:00

Tez Başlığı : Hepatosellüler Karsinom Hücre Hattında N-Asetilgalaktozamin ile Konjuge Oligonükleotit Aracılı ABCB1-MDR1 Gen İfadesinin Baskılanmasının İn Vitro Araştırılması

Bu çalışma, içerik ve kalite bakımından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ	Unvan, Adı-Soyadı (Kurum adı)	İmza
Danışman	Prof. Dr. Fatih EREN (Marmara Üniversitesi)	
Üye	Prof. Dr. Mustafa AKKİPRİK (Marmara Üniversitesi)	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Suna ÖZBAŞ (Marmara Üniversitesi)	
Üye	Doç. Dr. Timuçin AVŞAR (Bahçeşehir Üniversitesi)	
Üye	Doç. Dr. Ahmet ÖZAYDIN (İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa)	
Üye	Doç. Dr. Emrah YÜCESAN (İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa)	

ONAY

Bu tez, yukarıda isimleri bulunan jüri üyeleri tarafından "Marmara Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nuntarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Burcu HASTÜRK

TEŞEKKÜR

Doktora tezimde çalışmak istediğim konunun gerektirdiği her türlü imkânı sağlayan, bu zor süreçte bilgi ve tecrübesi ile bana destek olan ve yol gösteren, en önemlisi de, bilimsel yazarlık ve kuramsal bilim insanı düşünce şeklimi pekiştiren, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fatih EREN'e,

Lisansüstü eğitim aldığım Marmara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı ailesinde yer aldıkları için kıvanç duyduğum saygıdeğer hocalarım, Sayın Prof. Dr. Mustafa AKKİPRİK'e, Sayın Prof. Dr. Ahmet İlder GÜNEY'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Can ERZİK'e,

Yüksek lisans mezuniyet öncesinde tanışmaktan son derece mutlu olduğum ve doktora ortak ders kapsamında dersini aldığım için şanslı hissettiğim saygıdeğer hocam, Sayın Prof. Dr. Esra AKDENİZ'e,

Doktora Tez İzleme Komitesi'nde yer alan, laboratuvarına beni kabul ederek, tez öncesi ilk adımları atabilmeme vesile olan, Marmara Üniversitesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Suna ÖZBAŞ'a ve o yıllarda bölümde gösterdiği ilgiden dolayı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aysun ÇELİK SOYSAL'a,

Doktora Tez İzleme Komitesi'nde yer alan, laboratuvarında deneyleri gözlemlene fırsatı bulduğum, Bahçeşehir Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocam Sayın Doç. Dr. Timuçin AVŞAR'a ve sevgi-saygı çerçevesinde iletişim kurabildiğim, öğrencilerinden, Sayın Anwar'a ve Sayın Joudi'ye,

Doktora tezimdeki deneylerimi gerçekleştirebilmem için hücre hattı bağışında bulunan, Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN'e, Koç Üniversitesi KUTTAM Fakülte Üyesi Sayın Prof. Dr. Müjdat ZEYBEL'e ve Marmara Üniversitesi GEMHAM'a,

Deneylerimin bir bölümünü Marmara Üniversitesi GEMHAM laboratuvarında gerçekleştirebilme imkânını ve iznini veren, Sayın Prof. Dr. Betül YILMAZ'a, Sayın Öğr. Gör. Dr. Ali ŞAHİN'e, Sayın Öğr. Gör. Dr. Ayşe Mine YILMAZ GÖLER'e ve Sayın Erdal BOZOĞLU'na,

Laboratuvarlarından yararlandığım sürece gösterdikleri anlayış ve yardımları için Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki Sayın Doç. Dr. Ahmet Erdi SÖZEN'e, Sayın Yüksek Biyolog Betül GÜNGÖRDÜ'ye, Sayın Şenol YOLCU'ya ve bana kolaylık sağlayan tüm arkadaşlara,

Her türlü sorunumda yanlarına düşünmeden gidebilme huzurunu veren, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki, Sayın Dr. Ömer Faruk BAŞKAN'a, Sayın Abdülkadir KAHRAMAN'a, Sayın Yüksek Biyolog Serap SEVİL ŞAHİN'e ve sevdiğim arkadaşlara,

Bıraktığım doktora programında derslerini aldığım hocalarıma, özellikle verdiği ders ile katkılarını unutmayacağım, saygıdeğer hocam Sayın Dr. Faruk Berat AKÇEŞME'ye, ilk doktoramı bırakma kararı aldığım süreçte, tarafsız desteğini ve sevgisini hissettiğim, saygıdeğer hocam Sayın Dr. Ceyda HAYRETDAG'a ve lisans derslerimi aldığım saygıdeğer hocalarıma,

Tüm arkadaşlarıma ve dostlarıma, "ailurophile/felinophile" tanılı olarak tabii ki kedi aşklarına ve kıymetli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından "Hepatosellüler Karsinom Hücre Hattında N-asetilgalaktozamin İle Konjuge Oligonükleotit Aracılı ABCB1-MDR1 Gen İfadesinin Baskılanmasının İn Vitro Araştırılması" başlıklı ve TDK-2022-10587 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Doktora tezimin gerçekleşmesinde 222S261 numaralı proje ile destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Bu tezi sahipsiz hayvanlara ve İskenderun'uma atfediyorum.

KISALTMALAR LİSTESİ	i
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Hepatosellüler Karsinom	5
4.2. ATP Bağlayıcı Kaset (ABC) Taşıyıcıları	7
4.2.1. Hepatosellüler karsinomda ABCB1-MDR1	9
4.3. Antisens Oligonükleotitler	10
4.3.1. Modifiye antisens oligonükleotitler	12
4.4. N-Asetilgalaktozamin (GalNAc) Konjugatı	15
4.5. Transmembran Proteinleri	17
5. GEREÇ ve YÖNTEM	19
5.1. Gereç	19
5.1.1. Kullanılan kimyasallar, sarf maddeler ve çözeltiler	19
5.1.2. Kullanılan cihazlar ve bilgisayar programları	22
5.2. Yöntem	23
5.2.1. Antisens oligonükleotitlerin <i>in silico</i> tasarlanması	23
5.2.1.1. ABCB1 mRNA'sının hedef eksonları için ikincil ve üçüncül yapı tahmini	23
5.2.1.2. ABCB1 mRNA'sını hedefleyen ASO dizilerinin tasarlanması	23
5.2.1.3. ASO dizileri için katlanma serbest enerji tahmini	24
5.2.1.4. ASO dizileri için hibrit serbest enerji tahmini	24
5.2.1.5. ASO dizilerinin erime tahmini	24
5.2.1.6. ASO dizilerinin ikincil ve üçüncül yapı tahmini	25
5.2.1.7. ABCB1 mRNA'sının hedef eksonları ile ASO etkileşim tahmini	25
5.2.2. Hücre kültürü çalışmaları	25
5.2.2.1. GalNAc-ASO dizilerinin sentezi	25
5.2.2.2. HepG2 hücre hattı kültür koşulları	25
5.2.2.3. HepG2 hücrelerine GalNAc-ASO uygulaması	27
5.2.3. ABCB1-MDR1 ekspresyon belirleme çalışmaları	28
5.2.3.1. ABCB1-MDR1 gen ekspresyonunun qRT-PCR yöntemi ile incelenmesi	28
5.2.3.2. ABCB1-MDR1 protein ekspresyonunun western blot yöntemi ile incelenmesi	30
5.2.4. Hücre canlılığı çalışmaları	31
5.2.4.1. Tripan mavisi testi	31
5.2.4.2. MTT testi	31
5.2.4.3. Resazurin testi	32
5.2.5. İstatistiksel hesaplamalar	32

6. BULGULAR	33
6.1. <i>In Silico</i> Analiz Bulguları	33
6.1.1. ABCB1 mRNA hedef eksonları ikincil ve üçüncül yapı tahmin bulguları	33
6.1.2. ABCB1 mRNA eksonlarını hedefleyen ASO'lar.....	33
6.1.3. ASO'ların katlanma serbest enerji tahmin bulguları.....	33
6.1.4. ASO'ların hibrit serbest enerji tahmin bulguları.....	34
6.1.5. ASO'ların konsantrasyon ve ısı kapasitesi tahmin bulguları	34
6.1.6. ASO'ların üçüncül yapı tahmin bulguları	34
6.1.7. Hedef ABCB1 eksonları ile ASO'ların etkileşim tahmin bulguları.....	34
6.2. ABCB1-MDR1 Ekspresyon Bulguları	39
6.2.1. ABCB1-MDR1 gen ekspresyonu qRT-PCR bulguları	39
6.2.2. ABCB1-MDR1 protein ekspresyonu western blot bulguları	42
6.3. Hücre Canlılığı Bulguları	50
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	52
8. KAYNAKLAR	57
9. ÖZ GEÇMİŞ	71
10. BİLİMSEL FAALİYETLER	72

KISALTMALAR LİSTESİ

ABC	: ATP bağlayıcı kaset
ABCB1	: ATP bağlayıcı kaset alt ailesi B üyesi 1
ABCC1	: ATP bağlayıcı kaset alt ailesi C üyesi 1
ABCG2	: ATP bağlayıcı kaset alt ailesi G üyesi 2
ADCs	: Antikor-ilaç konjugatları
AFLD	: Alkole bağlı yağlı karaciğer hastalığı
AIM2	: Melanom 2'de yok
Anti-miR	: Anti-mikro RNA
AOCs	: Antikor-ON konjugatları
ASGP-Rs	: Asialoglikoprotein reseptörleri
ASGPs	: Asialoglikoproteinleri
ASOs	: Antisens oligonükleotitler
ATP1A1	: Sodyum/potasyum taşıyan ATPaz alt birimi alfa-1
BCA	: Bikinkoninik asit
BCRP	: Meme kanseri direnç proteini
cEt-BNA	: Etil bisiklik nükleik asit
CLCS	: Kolşisin duyarlılığı
CRD	: Ca ²⁺ bağımlı karbonhidrat tanıma alanı
ENA	: 2'-O,4'-C-etilen-köprülü nükleik asit
FBS	: Fetal sığır serumu
GalNAc	: N-asetilgalaktozamin
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
hATTR	: Kalıtsal transtiretin amiloidoz

HBV	: Hepatit B virüsü
HCC	: Hepatosellüler karsinom
HCV	: Hepatit C virüsü
HFE	: Hibrit serbest enerji
HHL	: İnsan hepatik lektin
IFN	: İnterferon
IM	: İntegral membran
IMPs	: İntegral membran proteinleri
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
Kanser-MDR	: Kanser çoklu ilaç direnci
LNA	: Kilitli nükleik asit
LNPs	: Lipit nanoparçacıklar
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
MDA-5	: Melanom farklılaşması ile ilişkili protein 5
MDR1	: Çoklu ilaç direnci protein 1
MetS	: Metabolik sendrom
MFE	: Minimum serbest enerji
MOE	: 2' O-metoksietil
MRP1	: Çoklu ilaç direnci ilişkili protein 1
MSDs	: Membran kapsayan domainleri
NAFLD	: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı
NASH	: Non-alkolik steatohepatit
NBDs	: Nükleotit-bağlama domainleri
NBFs	: Nükleotit-bağlama kıvrımları
NLRP3	: NLR ailesi pirin alanı 3

OAS-I	: 2'-5'-oligoadenilat sentetaz 1
ON	: Oligonükleotit
P-gp	: Permeabilite-glikoproteini 1
PGY1	: Permeabilite-glikoprotein Y1
PKR	: Protein kinaz R
PMO	: Fosforodiamidat morfolino oligonükleotit
PO	: Fosfodiester
PS/PTO	: Fosforotiyoat
PVDF	: Polivinil florür
qRT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RIG-I	: Retinoik asitle indüklenebilir gen I
RNAi	: Kısa interferaz RNA
RNaz-H	: Ribonükleaz H
ROS	: Reaktif oksijen türleri
siRNA	: Küçük interferans yapan RNA
TKİs	: Tirozin kinaz inhibitörleri
TLR	: Toll benzeri reseptör
TmConc	: Erime ısı konsantrasyonu
TmCp	: Erime ısı kapasitesi
TMDs	: Transmembran domainleri
TTR	: Transtiretin

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa Numarası
Şekil 1. ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarının sınıflandırması	8
Şekil 2. Antisens oligonükleotit dizi motifleri	13
Şekil 3. Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)-onaylı oligonükleotit terapötiklerinin kimyasal bileşenleri	14
Şekil 4. HepG2 hücrelerinin morfolojisi	26
Şekil 5. Hücre yoğunluğu %70-80'e ulaşan HepG2 hücrelerinin morfolojisi	27
Şekil 6. ASO1'in ABCB1 ekson 10 ile RNA-DNA etkileşim tahmini.....	35
Şekil 7. ASO2'nin ABCB1 ekson 17 ile RNA-DNA etkileşim tahmini.....	36
Şekil 8. ASO3'ün ABCB1 ekson 20 ile RNA-DNA etkileşim tahmini.....	37
Şekil 9. ASO'ların enerji, konsantrasyon ve ısı kapasitesi tahminleri.	39
Şekil 10. Relatif ABCB1-MDR1 gen ekspresyon analizi sonuçları	40
Şekil 11. BCA standart eğri grafiği	42
Şekil 12. GalNAc-ASO1 ve GalNAc-ASO2 tedavisi uygulanmış HepG2 hücrelerine ait ABCB1-MDR1 (130-180 kDa) ve ATP1A1 (100 kDa) western blot sonuçları (72. saat)	43
Şekil 13. GalNAc-ASO3, GalNAc-ASO4 tedavisi uygulanmış ve tedavi uygulanmamış HepG2 hücrelerine ait ABCB1-MDR1 (130-180 kDa) ve ATP1A1 (100 kDa) western blot sonuçları (72. saat)	47
Şekil 14. HepG2 hücrelerine uygulanan GalNAc-ASO4 konsantrasyonlarına ait MTT canlılık (%) analizi sonuçları	50
Şekil 15. HepG2 hücrelerine uygulanan GalNAc-ASO4 konsantrasyonlarına ait resazurin canlılık (%) analizi sonuçları	50

TABLO LİSTESİ

	Sayfa Numarası
Tablo 1. Antisens oligonükleotit dizi bilgileri	24
Tablo 2. Ters transkriptaz reaksiyon bileşenleri	29
Tablo 3. Ters transkriptaz reaksiyon koşulları.....	29
Tablo 4. qRT-PCR primer dizi bilgileri	29
Tablo 5. qRT-PCR reaksiyon bileşenleri	30
Tablo 6. qRT-PCR reaksiyon koşulları.....	30
Tablo 7. Antikor bilgileri	31
Tablo 8. GalNAc-ASO konsantrasyonlarına ait relatif ABCB1-MDR1 gen ekspresyonlarının karşılaştırması.....	41
Tablo 9. GalNAc-ASO1 tedavisi uygulanmış HepG2 hücrelerine ait ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot toplam bant hacmi	44
Tablo 10. GalNAc-ASO2 tedavisi uygulanmış HepG2 hücrelerine ait ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot toplam bant hacmi	45
Tablo 11. GalNAc-ASO3 tedavisi uygulanmış HepG2 hücrelerine ait ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot toplam bant hacmi	48
Tablo 12. GalNAc-ASO4 tedavisi uygulanmış HepG2 hücrelerine ait ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot toplam bant hacmi	48
Tablo 13. Tedavi uygulanmamış HepG2 hücrelerine ait ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot toplam bant hacmi	49
Tablo 14. GalNAc-ASO konsantrasyonlarına ait relatif ABCB1-MDR1 protein ekspresyonlarının karşılaştırması	49

1. ÖZET

Tezin başlığı: Hepatosellüler Karsinom Hücre Hattında N-asetilgalaktozamin ile Konjuge Oligonükleotit Aracılı ABCB1-MDR1 Gen İfadesinin Baskılanmasının İn Vitro Araştırılması

Öğrencinin Adı Soyadı: Burcu HASTÜRK

Danışmanın Adı Soyadı: Prof. Dr. Fatih EREN

Programın Adı: Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora Programı

Amaç: İleri evre hepatosellüler karsinom (HCC) tedavisinin önündeki engellerden birisi olarak kabul edilen kanser-çoklu ilaç direncinden (MDR), özellikle sorumlu tutulan ABCB1-MDR1 geninin aşırı ekspresyonunun N-asetilgalaktozamin (GalNAc) konjuge antisens oligonükleotitler (ASOs) ile baskılanması amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, ABCB1-MDR1 mRNA'sını hedefleyen üç (GalNAc-ASO1, GalNAc-ASO2, ve GalNAc-ASO3) ve bir negatif kontrol (GalNAc-ASO4) ASO dizileri tasarlandı. Tasarlanan ASO'ların inhibitör etkinliği hesaplamalı yöntemlerden faydalanarak değerlendirildi. ASO dizilerinin 5' ucuna GalNAc C3 fosforamit ligandı ve DNA omurgasına fosforotiyoat (PS/PTO) modifikasyonları eklendi. HepG2 hücrelerine farklı dozlarda GalNAc-ASO konjugatları uygulandı. GalNAc-ASO konjugatlarının inhibitör etkisini değerlendirmek için ABCB1-MDR1'in gen ekspresyonu ve protein düzeyi, sırasıyla, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ve western blot yöntemleri ile ölçüldü. GalNAc-ASO4 konsantrasyonlarının HepG2 üzerindeki hücre canlılık analizleri kolorimetrik (MTT) ve florometrik (resazurin) yöntemler ile değerlendirildi.

Bulgular: HepG2 hücrelerine uygulanan GalNAc-ASO4 konsantrasyonlarının (0,625 µM, 1,125 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM ve 20 µM), 144 saate kadar MTT ve resazurin testlerine göre hücre canlılığı üzerine sitotoksik etkisi bulunmamaktadır. HepG2 hücrelerinde, 20 µM GalNAc-ASO konsantrasyonlarının, tedavi edilmemiş kontrol grubuna göre 24, 48 ve 72 saat sonra ABCB1-MDR1 gen ekspresyonunu azaltan istatistiksel anlamlı etkisi bulunmaktadır. GalNAc-ASO konsantrasyonlarının, 72 saat sonra ABCB1-MDR1 protein ekspresyonunu istatistiksel olarak azalttığı western blot ile gösterilmiştir. GalNAc-ASO4'ün ise ABCB1-MDR1'in ekspresyonunu etkilemediği gösterilmiştir.

Sonuç: Hepatosit hücrelerindeki asialoglikoprotein reseptörlerine (ASGP-Rs) bağlanarak karaciğeri spesifik olarak hedefleyen GalNAc ligandı ile konjuge ASO'ların, hücrelere gimnotik iletimi sayesinde ABCB1-MDR1 genini inhibe ederek, anti-kanser tedavilerin etkisini arttırabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: ABCB1-MDR1, antisens oligonükleotitler, gimnozis, hepatosellüler karsinom, N-asetilgalaktozamin

2. SUMMARY

Title of Thesis: In vitro investigation of N-acetylgalactosamine conjugated oligonucleotide mediated suppression of ABCB1-MDR1 gene expression in hepatocellular carcinoma cell line

Student Name, Surname: Burcu HASTÜRK

Supervisor Name: Prof. Dr. Fatih EREN

Program Name: Medical Biology and Genetics PhD Program

Objective: The aim is to suppress the overexpression of the ABCB1-MDR1 gene, which is responsible for cancer-multidrug resistance (MDR), a significant challenge in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma (HCC), through the utilization of N-acetylgalactosamine (GalNAc)-conjugated antisense oligonucleotides (ASOs).

Materials and Methods: In this study, ASO sequences (GalNAc-ASO1, GalNAc-ASO2, and GalNAc-ASO3) were designed and evaluated for their inhibitory activity against ABCB1-MDR1 mRNA using computational methods. The ASO sequences were modified with a GalNAc C3 phosphoramidate ligand and phosphorothioate (PS/PTO) modifications to the DNA backbone at the 5' end. HepG2 cells were treated with varying doses of GalNAc-ASO conjugates, and the results were analyzed. To evaluate the inhibitory effect of GalNAc-ASO conjugates, the gene expression and protein levels of ABCB1-MDR1 were measured using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and western blot methods, respectively. The effect of different concentrations of a negative control (GalNAc-ASO4) on HepG2 cell viability was assessed using colorimetric (MTT) and fluorometric (resazurin) methods.

Results: The study found that treatment with GalNAc-ASO4 concentrations (0,625 μ M, 1,125 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, and 20 μ M) did not affect the cell viability of HepG2 for up to 144 hours, as determined by MTT and resazurin assays. However, in HepG2 cells, 20 μ M GalNAc-ASOs concentrations resulted in a decrease in ABCB1-MDR1 gene expression after 24, 48, and 72 hours compared to the untreated control group. Additionally, the study found that GalNAc-ASO concentrations decreased ABCB1-MDR1 protein expression after 72 hours, as determined by western blot analysis. GalNAc-ASO4 did not affect ABCB1-MDR1 expression.

Conclusion: By inhibiting the ABCB1-MDR1 gene through gimnotic delivery to cells, ASOs conjugated with the GalNAc ligand, which binds to asialoglycoprotein receptors (ASGP-Rs) in hepatocyte cells and specifically targets the liver, are considered to enhance the effectiveness of anti-cancer therapy.

Keywords: ABCB1-MDR1, antisense oligonucleotides, gymnosis, hepatocellular carcinoma, N-acetylgalactosamine

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Genetik ve çevresel etkenlere bağılı olarak, karaciğer hücreleri olan hepatositlerden, en yaygın görülen epitelyal kökenli ve kötü huylu primer tümörü olan hepatosellüler karsinom (HCC) gelişebilmektedir (Sukowati ve ark., 2024). Metabolik sendrom (MetS) ve non-alkolik steatohepatit (NASH) gibi karaciğer hasarı ve inflamasyona yol açan hastalıkların tetiklediği ya da yaygın olarak kronik viral hepatit enfeksiyonlarının yol açtığı primer karaciğer kanserinin en yaygın şekli HCC'dir (Llovet ve ark., 2021). Mevcut inflamasyondan kaynaklanan serbest radikallerin artışına bağılı olarak DNA hasarı ve kanser ilişkili mutasyonlar gelişebilmektedir (Kay ve ark., 2019). Sürekli karaciğer hasarı ise DNA onarım mekanizmalarının yetersiz kalması sonucu DNA hasarında artışa sebep olabilmektedir (Borude ve ark., 2018). Takipte olan karaciğer hastalarında, HCC'nin erken tanısı ile tedavi mümkün olsa da, genellikle hastalığın asemptomatik seyri veya agresif şekli nedeni ile ileri evre HCC görülmektedir ve HCC mortalitesi artmaktadır (Yang ve ark., 2019). HCC'de uygulanan farklı tedavi seçenekleri olmasına rağmen, kanserin sinsi ilerleyen yapısı nedeniyle hastaların geç tanı almaları, yaşam sürelerini kısaltmaktadır (Raza, 2014).

İleri evre HCC'nin sistematik tedavisinde, Sorafenib gibi tirozin kinaz inhibitörleri (TKİs) kullanılmaktadır (Cidón, 2017). İntrinsik ve ekstrinsik kanser çoklu ilaç direnci (kanseri-MDR), anti-kanser ilaçların hücreden dışarı pompalanmasına yol açan ilaç taşıyıcı sistemlerin aşırı ekspresyonu ile ilişkilendirilmektedir (Mansoori ve ark., 2017). Kanseri-MDR'si, HCC tedavisinin önündeki en önemli engellerden birisidir. Kanseri-MDR'sinin varlığı, kemoterapötik ajanların kanseri hücrelerindeki etkinliğini azaltmaktadır (Emran ve ark., 2022). Kanseri-MDR'sine yol açan en önemli araçlardan birisi, ATP bağlayıcı kaset alt ailesi B üyesi 1 (ABCB1) veya yaygın olarak bilinen ismiyle çoklu ilaç direnci proteini 1 (MDR1)'dir. ABCB1-MDR1 geni, anti-kanser ilaçlar gibi pek çok yabancı maddeyi dışarı pompalayan hücre zarındaki bir permeabilite-glikoproteini 1'i (P-gp) üretmektedir (Juvale ve ark., 2022). Bu protein, zararlı bileşiklerin hücrede birikmesini engellemek için savunma mekanizması olarak geliştiği düşünülen fizyolojik hayati öneme sahip ve geniş substrat spesifikliğı bulunan, ATP'ye bağılı bir akış pompasıdır (Badiee ve ark., 2023). Bu nedenle, ABCB1-MDR1 aşırı gen ekspresyonunun, anti-kanser ilaçlar ile kanseri tedavisine izin verecek şekilde kontrol altına alınabilmesi son derece önemlidir (Y. Wang ve ark., 2021).

Bugüne kadar özellikle kanseri tedavileri için kullanılan ABCB1-MDR1 inhibitörlerinin hiçbirisi, klinik öncesi çalışmaların aksine, klinik deneylerde istenilen başarıyı gösterememiştir

(Karthika ve ark., 2022). ABCB1-MDR1 geninin farklı sinyal yolları ile aktive olmaları, aşırı gen ekspresyonunu kontrol etmeyi zorlaştırmaktadır. Farmasötik ilaçlar, hidrofobik yapılarından dolayı, endojen toksinlere benzer şekilde hücre dışına çıkartılarak, etkinlikleri azaltılmaktadır. Özellikle, hepatomalardan türetilen tümör hücrelerinde, MDR ATPaz'ın aşırı ekspresyonu bu etkiyi artırarak, birçok anti-kanser tedaviye engel oluşturmaktadır (Ceballos ve ark., 2019). Bunun nedeni, ABCB1-MDR1'in geniş substrat spesifikliğine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. ABCB1-MDR1'in aşırı ekspresyonu, hücre içi ilaç birikimini azalttığı için kanser olgularında kanser-MDR'sinin ana mekanizmalarından birisi olarak kabul edilmektedir. Bu yüzden, ABCB1-MDR1 inhibitörlerinin çeşitli hastalıkları, özellikle kanseri tedavi edebileceği öne sürülmektedir (M. L. Chen ve ark., 2020).

Karaciğer hastalıklarının tedavisine yönelik yapılan çalışmalarda, N-asetilgalaktozamin (GalNAc) ligandının, hepatositlerdeki asialoglikoprotein reseptörlerine (ASGP-Rs) istekle bağlanarak, karaciğere etkili oligonükleotit (ON) iletimini sağladığı bildirilmiştir. Bunun üzerine, karaciğer hastalıklarına yönelik çeşitli GalNAc-ON terapötikleri geliştirilmiştir (Debacker ve ark., 2020).

Bu çalışmada, ileri evre HCC hastalık profilini yansıtan HepG2 hücre hattında, ABCB1-MDR1 aşırı ekspresyonunun, hepatosit hedefli GalNAc-ASO konjugatlarıyla *in vitro* baskılanması araştırılmaktadır. Ek olarak, ilgilendiğimiz transmembran proteinlerinin (ABCB1 ve ATP1A1, sodyum/potasyum taşıyan ATPaz alt birimi alfa-1) ısı duyarlı proteinler olmasından dolayı, termal denatürasyon ve soğuk denatürasyon kavramları gündeme getirilerek, western blot deneyleri ile açıklanmaktadır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Hepatosellüler Karsinom

Hepatoblastom, anjiosarkom, hemanjiosarkom, intrahepatik kolanjiokarsinom ve HCC, primer karaciğer kanser türleridir (Dash ve ark., 2020). İçlerinden HCC, vakaların yaklaşık %75'ini oluşturmaktadır ve yetişkinlerdeki en yaygın şeklidir (Forner ve ark., 2012; Llovet ve ark., 2021; McGlynn ve ark., 2021; Asafo-Agyei & Samant, 2023). HCC, sıklıkla hepatit B virüsü (HBV) veya hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonlarının tetiklediği siroz gibi kronik karaciğer hastalıkları olan bireylerde ortaya çıkmaktadır (Davis ve ark., 2008; El-Serag, 2012). Viral hepatitlere bağlı olarak, konak karaciğerin hepatositlerine, vücudun kendi immün sisteminin saldırısı tetiklenmektedir (Cheng ve ark., 2017). İmmün yanıt ile aktive olmuş inflamatuvar hücreler, serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) açığa çıkmasına yol açmaktadır ve endojen kaynaklı DNA hasarı meydana gelmektedir (Nishida & Kudo, 2013). Sonuçta, kanser riskini arttıran gen mutasyonları, hepatokarsinogeneze yol açabilmektedir (Mason ve ark., 2021).

Viral hepatitler (HBV ve HCV), yağlı karaciğer hastalıkları (alkole bağlı yağlı karaciğer hastalığı, AFLD ve non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, NAFLD), metabolik hastalıklar (obezite ve tip 2 diyabet), bazı kalıtsal hastalıklar ve karsinojenler, HCC için önemli risk faktörleri olarak kabul edilmektedir (El-Serag & Rudolph, 2007; Tsoulfas, 2019). HCC'de, potansiyel patogenetik risk faktörleri arasında, mutajenik ve/veya karsinojenler özellikle tütün, alkol ve aflatoksin bulunmaktadır (Wogan, 1999; Petrick ve ark., 2018). Predispozan davranışsal faktörler nedeniyle HCC, erkeklerde kadınlara göre daha yaygındır (Wu ve ark., 2018). HCC için yaygın olmayan diğer risk faktörleri, Wilson hastalığı, primer biliyer kolanjitten kaynaklanan siroz, thorotrast maruziyeti, anabolik androjenik steroidler, tirozinemi, α 1-antitripsin eksikliği, porfiri kutanea tarda (porfiri), glikojen depo hastalığı ve hemokromatozdur (Motola-Kuba ve ark., 2006; Hardt ve ark., 2012; Balogh ve ark., 2016; Shiani ve ark., 2017).

Organ rezeksiyonu, kombine ilaç tedavileri ve transplantasyon protokolleri, HCC tanısı konan hastalar için potansiyel tedavilerdir. Tedavi ve prognoz, tümörün histolojik bulgularına, boyutuna, yayılımına, hastanın semptomlarına, hastanın tanı anındaki sağlık durumuna, yani evresine bağlıdır (Marrero ve ark., 2018).

Kanserin metastazı ve karaciğer fonksiyonu gözetilerek, tümörün tamamının çıkarılabildiği durumlarda cerrahi en etkili uygulamadır (Jarnagin ve ark., 2010). Transplantasyon,

immüneyi baskılayan ilaçların kullanımını gerektirdiği için karaciğer metastazının görülmediği durumlarda tercih edilmektedir (Obed ve ark., 2007). Ablasyon, arteriyel kateter bazlı tedavi, radyoterapi ve sistematik tedavi seçenekleri de bulunmaktadır (Numata & Wang, 2022). Ancak, asemptomatik durumlarda veya tümörün agresif formlarında hastaların geç tanılması, mortaliteyi arttırmaktadır (Yang & Roberts, 2010a). Bu nedenle, diğer kanser olgularında olduğu gibi erken teşhis için tümör belirteçleriyle karaciğer hastalarında rutin taramaların gerçekleştirilmesi oldukça önemlidir.

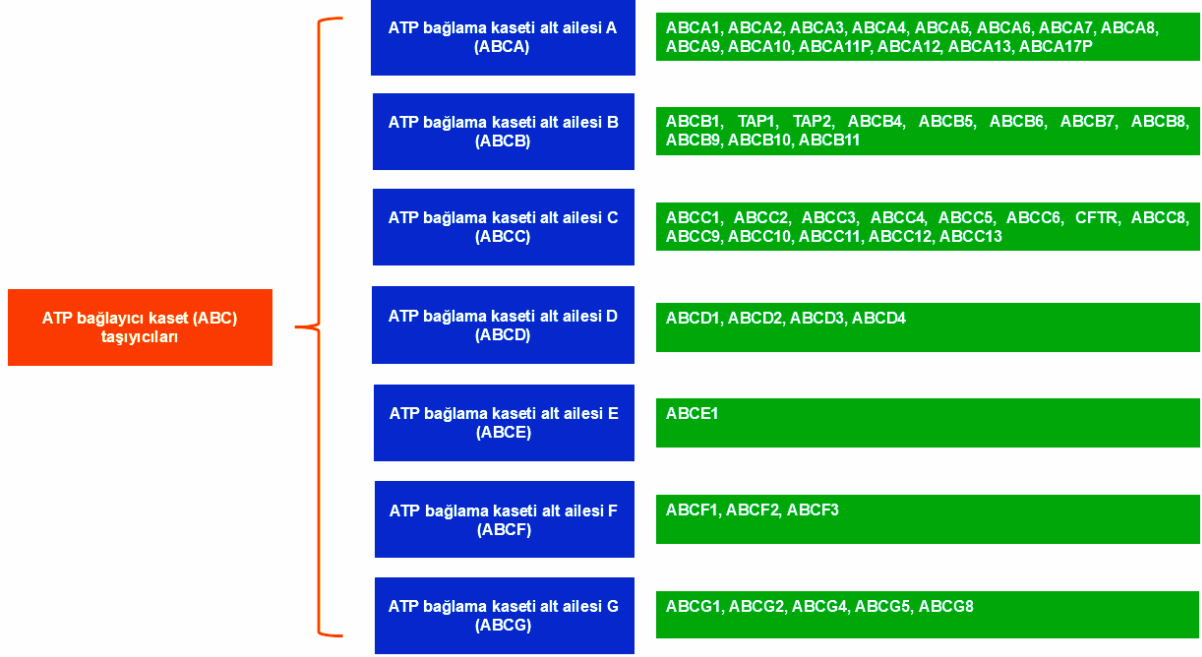
HCC insidansı, HBV enfeksiyonunun endemik olduğu ve vertikal bulaşma yoluyla edinen bireylerin sayısının giderek arttığı ülkelerde yükselmektedir (Nelson ve ark., 2016). Ülkemiz HBV enfeksiyonu açısından orta derecede endemik kabul edildiğinden, HCC vakalarının çoğunda, kronik HBV'den sekonder olarak geliştiği bilinmektedir (Akarca, 2008; Tabak ve ark., 2017). HBV ile enfekte bireyler, HCC tedavisini takiben en düşük sağkalım oranını sergilemektedir (Yang & Roberts, 2010b). Bu nedenle, HBV ve HCV'li hastaların düzenli olarak HCC açısından taramalarının yapılması ve kontrol altına alınması, hastalığın ilerlemesini önlemenin en etkili yoludur. Ayrıca, HCC'de daha düşük risk faktörleri olarak genetik bozukluklardan kaynaklanan, alfa 1-antitripsin eksikliği, hemokromatoz ve Wilson hastalığına yönelik toplum taraması protokollerinin oluşturulması gibi önleyici yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. HBV aşısıyla, HBV enfeksiyonundan ve kronik HBV-sirozu kaynaklı HCC gelişme riskinden büyük ölçüde korunmak mümkündür (Francica & Borzio, 2019).

Karaciğer kanseri, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin üçüncü en yaygın nedeni olarak bildirilmiştir (Sung ve ark., 2021; Rumgay ve ark., 2022). Erken evre HCC'li hastalarda, tümörün cerrahi rezeksiyonu veya karaciğer transplantasyonu ile %70'e yakını 5 yıl, ileri evre HCC'li hastaların sistemik tedavisi ile 1 yıldan az sağkalımları bulunmaktadır (Rao ve ark., 2021). İleri evre HCC'li bireylerde, sitotoksik ajanlarla sistemik kemoterapi (antrasiklinler, vinka alkaloidler, epipodofilotoksinler ve taksanlar vd.) ve TKİ'ler (sorafenib, lenvatinib, regorafenib ve cabozantinib vd.) ile hedefe yönelik tedavi, temel yaklaşımlardır (Chan & Bendayan, 2010; Duan ve ark., 2019). Ayrıca, birinci ve ikinci basamak terapötik ajanlar olarak bazı monoklonal antikolar (mAb), HCC tedavisi için onaylanmıştır (Psilopatis ve ark., 2023). Özellikle kanser tedavisi için mAb'lar ile sitotoksik ilaçların veya ON'lerin birleştirildiği sırasıyla antikor-ilaç konjugatları (ADCs) ve antikor-ON konjugatları (AOCs) ile hedefe yönelik yeni tedavi stratejileri geliştirilmektedir (Hamilton, 2015; Dovgan ve ark., 2019). Bununla birlikte, mAb'ların kullanımı mevcut ilaç kombinasyonlarının kullanımını ortadan kaldırmadığı için hâlen kanser-MDR'si önemli bir klinik engel olmaya devam etmektedir ve alternatif tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır (Lohitesh ve ark., 2018).

4.2. ATP Bağlayıcı Kaset (ABC) Taşıyıcıları

ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları, geniş, multi-fonksiyonel ve evrimsel olarak taksonomiğe yayılmış eski bir protein süper ailesi grubudur (Dean & Annilo, 2005; Vasiliou ve ark., 2008; Caygill & Dolan, 2023). İnsan ABC taşıyıcı ailesi filogenetik olarak yedi alt grup (ABCA-ABCG) ile sınıflandırılmaktadır ve toplam 51 üye içermektedir (HUGO Gene Nomenclature Committee) (Şekil 1).

ABC taşıyıcıları başlıca, iki domainden oluşmaktadır: Transmembran domainleri (TMDs) ve nükleotit-bağlama domainleri (NBDs) / nükleotit-bağlama kıvrımları (NBFs) olmak üzere iki homolog fonksiyonel birim (N- ve C- terminal) (Vasiliou ve ark., 2008; Wen & Tajkhorshid, 2011; Veiga-Matos ve ark., 2023). İntegral membran (IM) domaini ya da membran kapsayan domainleri (MSDs) olarak da bilinen TMDs, çift tabakalı membrana gömülü, membranı çok kez kateden, değişken sayıda olmakla birlikte, çoğunlukla her bir monomer 6 α -helix olacak şekilde toplam 12 transmembran alana sahiptir (Rees ve ark., 2009; Fukuda & Schuetz, 2012). Bu yapı, hücrel homeostazı sağlamak için taşınacak çeşitli substratları içine alarak plazma membranı boyunca geçişini kontrol edebilen translokasyon yolunu oluşturmaktadır (Linton & Higgins, 2006). TMDs, gen dizisi ve yapısı oldukça değişkendir. TMD'de, substrat bağlanmasını takiben hücre membranı boyunca substrat translokasyonu için gerekli olan konformasyonel değişiklikler, ATP hidroliz enerjisinden sağlanmaktadır (Zoghbi ve ark., 2017). ABC domaini olarak da bilinen NBDs, ATP bağlayıcı alanlardır. Bu nedenle, korunmuş gen dizisine sahiptir. NBDs, sitozolik bölgede konumlanan, hidrofobik yapıda, iki domainden oluşmaktadır (Rees ve ark., 2009). ABC taşıyıcılarında, çeşitli substratları membran boyunca konsantrasyon gradiyentinin tersi yönünde taşıyabilmek için ATP, sitozolik alt birimlere bağlanmaktadır ve ATP hidrolizi ile pompalama işlevi gerçekleştirilmektedir (Thomas & Tampé, 2020).



Şekil 1. ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarının sınıflandırması (HUGO Gen İsimlendirme Komitesi'nden uyarlandı.)

ABC taşıyıcı sistemleri, prokaryotlarda ve ökaryotlarda benzer fonksiyonları yerine getirmektedir. Prokaryotlarda, dışarıdan, hücrenin içerisine ve sitoplazmadan perioplazmik alana; ökaryotlarda ise hücreden dışarıya aktarım gerçekleştirmektedir (Al-Shawi, 2011). Çeşitli substrat tanıma yeteneğinde olan taşıyıcılar için hidrofobik vakum modeli kabul görmektedir (Cao ve ark., 2009). İnsanlarda ABC taşıyıcıları, gen polimorfizmlerine dayalı bazı kalıtsal ve kompleks hastalıklarla ilişkilidir. Ayrıca, gen ekspresyonundaki aşırı artışa bağlı olarak kanser-MDR'si ve antibiyotik-ilaç direnci ile ilişkilendirilmektedir (Lubelski ve ark., 2007). ABC sistemleri, belirli bir tipte ya da farklı tiplerde substratları taşıma özellikleriyle birbirlerinden ayrılmaktadır (Ter Beek ve ark., 2014). Ksenobiyotikleri taşıyan P-gp olarak da bilinen ABCB1 [önceki isimleri: PGY1 (permeabilite-glikoprotein Y1), MDR1 (çoklu ilaç direnci proteini 1), CLCS (kolşisin duyarlılığı)]; spesifik anyonik bileşikleri taşıyan ATP bağlayıcı kaset alt ailesi C üyesi 1 / ABCC1 kan grubu (ABCC1) [önceki isimi: MRP1 (çoklu ilaç direnci ilişkili protein 1)], hidrofobik ve polisiklik yapıdaki kimyasallara güçlü bir şekilde bağlanabilen, meme kanseri direnci proteini (BCRP) olarak da bilinen ATP bağlayıcı kaset alt ailesi G üyesi 2 / Junior kan grubu (ABCG2), kanser hücrelerinde anti-kanser ilaçların etkinliğini sınırlamaktadır (Mahadevan & List, 2004; Taylor ve ark., 2017; Heming ve ark., 2022). İçlerinden, ABCB1, moleküler yapısı en iyi karakterize edilen, geniş substrat spesifikliğine sahip ATP'ye bağlı akış pompasıdır (Dean ve ark., 2001).

4.2.1. Hepatosellüler karsinomda ABCB1-MDR1

İnsan ABCB1-MDR1 geni, kromozom 7'nin uzun kolunda lokalizedir (NC_000007.14). Promotörlerin alternatif olarak tercih edilmesine ve alternatif splayz mekanizmasına göre ekson sayısı (28-32) ve mRNA uzunluğu değişmektedir (Skinner ve ark., 2023). ABCB1-MDR1 proteini, türe ve hücre tipine bağlı olarak 130-180 kDa moleküler ağırlığındadır ve 10-15 kDa N-terminal glikozilasyonunu içermektedir (Salama ve ark., 2006). Glikozilasyon, übikütinasyon ve fosforilasyon, post-translasyonel modifikasyonlarıdır (Genecards). ABCB1-MDR1 proteini fizyolojik öneme sahip pek çok işlevi yerine getirmektedir. Hücre için zehir ya da ilaç gibi yabancı bileşikler dışarıya pompalayarak, organizmayı korumak üzere evrimleştiği düşünülen bir savunma mekanizmasını temsil etmektedir. ABCB1-MDR1 ekspresyonu yoluyla ksenobiyotikler, karaciğerden safra kanallarına; böbreklerden idrara ve bağırsaktan lümeneye taşınmaktadır. Böylelikle, zararlı bileşiklerin vücuttan atılmasını sağlamaktadır. Bu süreç, elektrokimyasal gradiente ters yönde gerçekleştiği için gerekli enerji, ABCB1-MDR1'in ATPaz aktivitesi sonucu ATP hidrolizi ile karşılanmaktadır (Veiga-Matos ve ark., 2023). Pankreas, plasenta, beyin (kan-beyin bariyeri), testisler (kan-testis bariyeri), eksprese edildiği diğer organlardır ve koruyucu bir bariyer olarak benzer işlevleri yerine getirmektedir (Kodan ve ark., 2020). Ancak, eksprese olduğu bazı hücrelerin kanserli tablolarında, aşırı gen ekspresyonu ile karakterize olan sitotoksik ilaçların hücreden dışarı atılımını gerçekleştirmektedir ve kanser-MDR'sinin mekanizmalarından birisini oluşturmaktadır (Wang ve ark., 2019). ABCB1-MDR1'in promotör bölgesinde, düşük frekansta polimorfizm görülmektedir (Hodges ve ark., 2011). Bu gendeki mutasyonlar, kolşisin direnci (Phenotype MIM number: 120080) ve iflamatuar bağırsak hastalığı 13 ile ilişkilendirilmiştir (Phenotype MIM number: 612244) (Omote ve ark., 2004; Ho ve ark., 2006).

Gen polimorfizmlerinden ziyade bazı kanser hücrelerinde, ABCB1-MDR1'in aşırı ekspresyonuna bağlı olarak hücre içi ilaç konsantrasyonunu azaltması ile bilinen kanser-MDR fenotipi, klinik açıdan önemlidir (Wolking ve ark., 2015; Engle & Kumar, 2022). Organizmayı potansiyel zararlı maddelerden koruyucu etkisinden dolayı azalmış ekspresyonu ise çeşitli patolojik hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (Ho ve ark., 2003; Van Assema & Van Berckel, 2016). Çeşitli transkripsiyon faktörleri (p53, YB-1 ve NF-KB vd.), ABCB1-MDR1 geninin promotör bölgelerine bağlanarak, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde etkilidir (Goldsmith ve ark., 1995; Bargou ve ark., 1997; Zhou & Kuo, 1997). Kanser hücrelerinde, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yollarından, klasik MAPK/ERK yoluyla pozitif; p38 MAPK yoluyla negatif; c-Jun N-terminal kinaz (JNK) yoluyla pozitif veya negatif düzenlenme sağlanmaktadır. PI3K/Akt ve Wnt/ β -katenin yolu ise pozitif transkripsiyonel düzenleyicilerdir

(Yang ve ark., 2001; Lim ve ark., 2008; Lü ve ark., 2012). ABCB1-MDR1'in proksimal promotördeki hipermetilasyonun indüklediği distal promotörün tercih edilmesi ile ABCB1-MDR1'de, ekspresyon artışı meydana gelmektedir (Skinner ve ark., 2023). Farmasötik ilaçlar, ABCB1-MDR1'in inhibitörleri (KEGG DG01622), substratları (KEGG DG01665) veya indükleyicileri (KEGG DG01893) gibi davranabilmektedir. Bu nedenle, ABCB1-MDR1'in substratları veya indükleyicileri olmayan bir anti-kanser ilacı ya da ABCB1-MDR1'i inhibe edebilen ilaçlarla kombine kanser tedavilerinin başarılı olabilmesi beklenmektedir (Lei ve ark., 2023). Ancak, hem sitotoksik ilaçların hücre zarına nüfuz etme gereksinimleri, hem de ABC taşıyıcı proteinlerin son derece geniş bir substrat tanıma modeline sahip olmaları, bu durumda uzak bir ihtimal gibi görünmektedir (Glavinas ve ark., 2004). Bunun yerine, anti-kanser ilaçların hücre dışına iletiminden sorumlu hedef ABCB1-MDR1'in, mRNA düzeyinde kontrol altına alınması ile mevcut anti-kanser ilaçların sitotoksik etki göstererek, kanserli hücreleri hedeflemesi alternatif bir tedavi olasılığı sunmaktadır. Kısa, kodlanmayan ON terapötikleri [antisens oligonükleotit (ASO); küçük interferans yapan RNA (siRNA) / kısa interferaz RNA (RNAi) / susturucu RNA; anti-mikro RNA (anti-miR)], genom ifadesini düzenleyebilme yetenekleri sayesinde, kanser-MDR fenomenini tersine çevirebilme potansiyeli sunabilecek, umut verici stratejiler arasında yer almaktadır (Cui ve ark., 2021; Emran ve ark., 2022).

4.3. Antisens Oligonükleotitler

ASO terapötikleri, hedef mRNA'ya bağlanabilmek için baz eşleşmesi prensibinden faydalanarak tasarlanmaktadır (Angrish & Khare, 2023). Eğer, hedef mRNA'nın nükleotit dizisi biliniyorsa, primer tasarımına benzer şekilde ON terapötikleri de tasarlanabilmektedir (Deleavey & Damha, 2012; Hendling & Barišić, 2019). ASO'lar, hedef mRNA ekspresyonunu farklı mekanizmalar ile değiştirebilmektedir. Pre-mRNA ile heterodupleks oluşturduktan sonra ribonükleaz H (RNaz H) aracılığı ile mRNA'yı degrade edebilmektedir. Ayrıca, ribozomun alt birimlerine bağlanmasını engelleyerek translasyonu durdurabilir (sterik bloklama) ya da ekson atlanması veya ekson eklenmesi ile doğru proteinin üretilmesini sağlayabilirler (splyaz modülasyonu) (Morcos, 2007; Watts & Corey, 2011; Chery, 2016).

ON'lerin, terapötik etkilerini gösterebilmeleri için, yabancı DNA/RNA'ların hücre içine girmesini önlemek üzere programlanmış, doğal savunma sistemlerini aşmaları gerekmektedir (Bishani & Chernolovskaya, 2021; Muslimov ve ark., 2023). RNAimmuno database, ON terapötiklerinin, hücrede oluşan dizi spesifik ve dizi spesifik olmayan etkileri hakkında araştırmacılara genel bilgi sağlamaktadır (RNAimmuno, 2024).

Yabancı DNA/RNA'lar, spesifik hücre sensörlerini aktive ederek, tip I interferon (IFN)'un indüklenmesine ve sitokinlerin salınmasına yol açabilmektedir. ON'ler organizmaya verildikleri zaman, sitoplazmik (retinoik asitle indüklenebilir gen I, RIG-I; melanom farklılaşması ile ilişkili protein 5, MDA-5; protein kinaz R, PKR; 2'-5'-oligoadenilat sentetaz 1, OAS-I vd.) ve endozomal (toll benzeri reseptör, TLR 3, 7, 8 vd.) spesifik hücrel sensörleri aktive etmektedir. Spesifik adaptör proteinler aracılığıyla, spesifik transkripsiyon faktörlerine sinyaller iletilmektedir. Ardından, tip I IFN ve pro-inflamatuvar sitokinler üretilmektedir. Başka sensörler (melanom 2'de yok, AIM2; NLR ailesi pirin alanı 3, NLRP3 vd.) tarafından yabancı DNA/RNA'nın tanınması ile piroptoz hücre ölümü tetiklenebilmektedir (RNAimmuno, 2024). Bir diğer önemli konu ise, ON terapötiklerinin hedef mRNA yıkımı sonucu oluşacak miRNA'ların, istenmeyen hedef dışı etkilere yol açabilme potansiyelidir (Olejniczak ve ark., 2009).

Yapılan çalışmalar, RNAi sürecinin primer hepatositlerde çoklu sinyal yollarıyla doğuştan gelen immün tepkilerini geliştirdiğini ortaya koymaktadır (Zhao ve ark., 2013; Zhao & Lu, 2017). ON terapötikleri, immünohistimülasyon aktivitelere sahip iki işlevli olarak tasarlanabilmektedir. Aslında, istenmeyen yan etkiler olarak pro-inflamatuvar sitokin oluşumuna yol açmadan, immünite uyarımı faydalıdır. Bu yüzden terapötik ON'lerin, istenilen gen üzerindeki etkileri dışında sinerjik bir etki olarak kanserleri ve viral enfeksiyonları tedavi eden yeni ajanlar olarak da kabul görmeleri kaçınılmazdır (Judge ve ark., 2005; Hu ve ark., 2020).

Günümüzde, farmasötik olarak uygun dozlarda, doğru hedeflenen, stabilite gösteren ve yarı ömrünü arttıran, güçlü farmakokinetik ve farmakodinamik özellikler barındıran, güvenli terapötik ON'ler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Küçük boyutları sayesinde hücrelere gimnotik iletim ile verimli bir şekilde girebilen ASO'ların dışında, RNA bazlı terapötiklerin büyük çoğunluğu (siRNA, CRISPR-Cas9 sgRNA vd.), yük ve/veya büyüklüklerinden dolayı ancak bir iletim ajanı ile hücrelere girebilmektedir (Dowdy, 2017; Kuespert ve ark., 2020). ASO'lar, 4-10 kDa'lık boyutu ve negatif yüklü fosfat içermeleri nedeniyle umut verici terapötik özelliklere sahiptirler (Angrish & Khare, 2023).

Ayrıca, ON terapötiklerinin, subkutan olarak üç veya altı ayda bir uygulanabildiği çalışma sonuçları bildirilmiştir (Roberts ve ark., 2020; Egli & Manoharan, 2023). Ancak, hücreler çıplak halde bulunan ON terapötiklerini kabul edemediklerinden dolayı birlikte gönderilecekleri ajanlara gereksinimleri bulunmaktadır. Çünkü, çıplak ON'ler, kanda RNaz'lar tarafından hızla parçalanırlar, böbrekler tarafından temizlenirler, karaciğer çöpçü reseptörleri tarafından emilirler ve doğuştan gelen immün sistemi aktive edebilirler (Springer & Dowdy,

2018). Bu nedenle, ON'lerin terapötik potansiyellerini gerçekleştirilebilmeleri için onları RNaz saldırılarından koruyacak, sentetik ve lipit nanoparçacıklar (LNPs), dinamik polikonjugatlar, eksozomlar ve N-asetilgalaktozamin (GalNAc) gibi konjuge sistemler ile maskeleyme ve sitoplazmaya endozomal kaçışı mümkün kılan formülasyonların, kanser-MDR'sine yol açan mekanizmalara ve metastatik kanser hücrelerine verimli ON iletimini kolaylaştırabileceği düşünülmektedir (Dowdy, 2017; Subhan ve ark., 2021). Karaciğer hastalıkları için GalNAc-ON konjugatları, büyük ölçüde artan genel yarı ömür, stabilite ve hedeflenme üstünlükleri dışında ON'lerden yaklaşık 5000 kat daha büyük olan LNP'lere karşı güçlü bir alternatif olarak görülmektedir (Springer & Dowdy, 2018).

4.3.1. Modifiye antisens oligonükleotitler

ASO'lar, nükleaz saldırılarına karşı direncin kazanılması, mRNA'ya bağlanma afinitesinin iyileştirilmesi ve istenmeyen immün stimülasyonun azaltılabilmesi için çeşitli şekillerde modifiye edilebilmektedir (Huang, 2017; Karaki ve ark., 2019). ASO'lar, sentetik olarak DNA, RNA ya da kimerik yapıda tasarlanabilmektedir (Karaki ve ark., 2019). ASO terapötikleri, sentezlenecek nükleotit zincirindeki omurga (PO, fosfodiester), şeker halkası (2'), nükleobaz ve terminal modifikasyonlar ile *in vitro* ve *in vivo* uygulamalardaki stabilite ve afinite gibi zorluklar için geliştirilmektedir (DeVos & Miller, 2013; Frazier, 2014). PO bağında bulunan nükleotitler arasındaki fosfat grubunun köprü oluşturmayan oksijen atomlarından birisinin, bir kükürt atomu ile değiştirilmesiyle elde edilen PTO gibi minimal düzeydeki omurga modifikasyonları, iyi tolere edilebilmektedir.

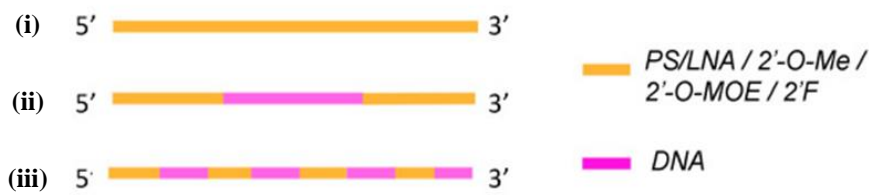
Bu modifikasyon, nükleazlara bağlı bozunmalara karşı direnç kazandırmaktadır. Böylelikle, yarı ömrünü büyük ölçüde arttırmaktadır ve stabiliteyi sağlamaktadır (Stein ve ark., 1988). Ancak, PTO modifikasyonu, hedef mRNA'ya bağlanma afinitesini azaltmaktadır (Roberts ve ark., 2020). Bu nedenle, ek modifikasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır. Yaygın olarak kullanılan, 2' O-metil (2'-OMe), 2' O-metoksietil (MOE), 2' O-floro gibi riboz şeker halkası modifikasyonları, spesifik olmayan protein bağlanmalarını azaltarak, hedefe iletilmelerini mümkün kılmaktadır (DeVos & Miller, 2013; Michel ve ark., 2020). Kilitli nükleik asit (LNA), etil bisiklik nükleik asit (cEt-BNA), 2',4'-kısıtlı 2'-O-etil (kısıtlı etil) ve 2'-O,4'-C-etilen-köprülü nükleik asit (ENA) şeker modifikasyonları, nükleaz stabilitesini ve mRNA afinitesini arttırmak için tercih edilmektedir.

ON'lerin erime sıcaklığını arttıran primidin metilasyonu (5-metilsitidin, 5-metilüridin vd.) ya da nükleobazı olmayan nükleotidler, nükleobaz modifikasyonlarına örnektir. 5' terminalin fosforilasyonu gibi terminal modifikasyonlar ise fosfatazlara karşı koruma sağlamaktadır.

Ayrıca, fosforodiamidat morfolino oligonükleotid (PMO)'de olduğu gibi riboz heterosiklini yerine morfolin halkası kullanılarak farklı bir kimyada üretilen çeşitli modifikasyonlardan da faydalanılmaktadır (Roberts ve ark., 2020).

Bu modifikasyonlar, üç farklı motifte kullanılmaktadır (Şekil 2).

- (i) Tüm-uzunluk Motifi: ASO dizisinde yer alan tüm nükleik asitlerin modifiye edilmesi.
- (ii) Gapmer Motifi: ASO dizisinde, sadece belirli bir sayıdaki nükleik aside monomerlerin eklenmesi ve arada "gap" denilen DNA alanının bırakılması.
- (iii) Mixmer Motifi: ASO dizisinde yer alan nükleik asitlerin "monomer-DNA-monomer-DNA-..." şeklinde devam eden tekrarlar şeklinde modifiye edilmesidir.



Şekil 2. Antisens oligonükleotit dizi motifleri (Dhuri ve ark., 2020'den uyarlandı.)

ASO tasarımlarında tercih edilen motiflere göre, mRNA iki şekilde protein üretimini azaltabilmektedir. Eğer gapmer motifi kullanılıyorsa (ii), ASO, hedef mRNA'ya bağlandıktan sonra sahip olduğu gap bölgesinden RNaz H aracılığı ile bölünmektedir. Böylelikle, RNA bölünmesi ya da parçalanması gerçekleşmektedir. Tüm dizi modifiye ASO (i) ve mixmer ASO (iii) motifleri, hedef mRNA ile hibrit oluşturduktan sonra ribozomun küçük alt birimine bağlanmasını engelleyerek sterik bloklama meydana gelmektedir. Böylece, translasyonu bloke ederek, hedef mRNA'nın susturulmasını sağlamaktadır.

(Reza ve ark., 2021). İlaç teknoloji şirketleri, farklı tasarımlarla ON ilaçları sentezlemektedir (Şekil 3).

Çoğunlukla, çıplak halde bulunan ON terapötiklerinin hücre zarından geçişleri zor olduğu için birlikte gönderilecekleri taşıyıcı ajanlara gereksinim duyulmaktadır. Ancak, tek zincirli ve küçük yapıda olan modifiye ASO'lar, transfeksiyon olmaksızın hücreye iletilebilmektedir. Bu iletim şekline gimnozis veya serbest alım denilmektedir (Soifer ve ark., 2011).

In vivo'da ON terapötiklerinin iletiminde, transfeksiyon prosedürleri olarak elektroporasyon veya transfeksiyon reaktiflerinin eklenmesi mümkün olmadığı için gimnotik iletim giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Ayrıca, *in vitro*'da, transfekte edilmesi zor veya tolere edilemeyen hücrelerde de oldukça faydalı bir alternatiftir (Qiagen, 2024). ASO'ların gimnozis ile aktarılması, ileride gerçekleştirilmesi planlanan *in vivo* deneylere geçişi kolaylaştıracak *in vitro* simülasyonu mümkün kılmaktadır.

4.4. N-Asetilgalaktozamin (GalNAc) Konjugatı

Hücre membranında yer alan proteinlerin önemli bir kısmı, hücre yüzey reseptörü olarak görev yapmaktadır. Memeli hepatositlerinin sinüzoidal yüzeyinde, yüksek oranda lektin yapısındaki ASGP-Rs bulunmaktadır. Transmembran bir protein olan ASGP-R'nin esas görevi, yapısından terminal sialik asitlerin çıkarılmasıyla oluşan terminal galaktoz veya GalNAc kalıntıları içeren serum glikoproteinlerini ve asialoglikoproteinleri (ASGPs) bağlayarak, dolaşımdan hızlıca temizlemektir. (Springer & Dowdy, 2018; Debacker ve ark., 2020). Bu reseptörün, dolaşımdaki hedef substratlarından GalNAc'lı ASGP'lilere olan afinitesi, galaktozlu ASGP'li ligandlara olan afinitesinden daha yüksek olduğu için hepatik iletimde GalNAc konjugatları bu reseptörlere, özgül ve spesifik olarak bağlanabilmektedir (Novogrodsky & Ashwell, 1977).

Hepatositlerin membran yüzeyinde çok miktarda ve spesifik olarak eksprese edilen ASGP-R, 48 kDa majör ASGP-R1 ve 40 kDa minör ASGP-R2 olmak üzere 2 alt birimden oluşmaktadır. Bu reseptörler, insan hepatik lektin (HHL) 1 ve 2 alt birimlerinden oluşmaktadır (Gupta, 2012). HHL1 ve 2 alt birimleri, bir sitozolik N-terminal alan, bir transmembran segmenti, bir sap alanı ve hücre dışına uzanan bir Ca^{2+} bağımlı karbonhidrat tanıma alanı (CRD) bulunan C-terminalini içermektedir. CRD'ye β -D galaktoz veya yüksek afiniteli GalNAc rezidüleri bağlanmaktadır (Roggenbuck ve ark., 2012).

GalNAc, insanda A kan grubunun antijenini oluşturan ve ASGP-R1'e yüksek afiniteyle bağlanan bir terminal karbonhidrattır (Marcus ve ark., 1964; Meier ve ark., 2000). Reseptör aktivasyonu, bağlanan ligand sayısı ile doğru orantılıdır. GalNAc konjugatlarının, $pH > 6$ ve Ca^{2+} varlığında ASGP-R'ye bağlanmasıyla klatrin bağımlı reseptör aracılı endositoz süreci başlamaktadır. Endozomal olgunlaşma esnasında, asidik ortamda GalNAc konjugatları ASGP-

R'den ayrılmaktadır ve GalNAc lizozomda yıkılmaktadır. Serbestleşen ASGP-R, hepatosit plazma membranına geri dönmektedir (Meier ve ark., 2000).

İnsan vücudundaki en büyük iç organ karaciğerdir ve %80'inden fazlası hepatositlerden oluşmaktadır. Detoksifikasyon, demir homeostazı, metabolizma, temel plazma proteinlerinin sentezi ve pıhtılaşma gibi hayati işlevleri yerine getirmektedir. Dolayısıyla, karaciğer hastalıklarının tedavisi için hepatositler hedeflenerek, seçici ve etkili hücre içi ON iletimine, GalNAc konjugatları ile bir çözüm üretilmektedir. Aynı zamanda, diğer doku tiplerini de kapsayan ON terapötikleri alanında yapılacak tüm çalışmalara yol göstermektedir (Springer & Dowdy, 2018). GalNAc-ON biyokonjugatları, reseptör aracılı endositoz ile ASGP-R ekspresyonunun olduğu belirli dokulara veya hücrelere, doğru hedeflenmeyi vadetmektedir.

2017 yılına ait bir çalışmada, GalNAc-siRNA konjugatının etkili *in vitro* veya *in vivo* alımı için minör reseptör alt ünitesi ASGP-R2'nin gerekli olmadığı ve ana alt ünite ASGP-R1'in yeterli olduğu bildirilmiştir (Tanowitz ve ark., 2017). Karaciğere ait çeşitli hücre hatlarında eksprese edilen ASGP-R, *in vitro* insan hepatoma hücre hatlarından HepG2'de 76.000, HepAD38'de 17.000 ASGP-R/hepatosit yoğunluk gösterirken; HuH-7, HuH-6 ve ayrıca, BNLCL2 ve HuH-5-2 gibi diğer türetilmiş hepatoma hücre hattı alt klonlarında ~3.000 ASGP-R/hepatosit gibi daha düşük bir yoğunlukta eksprese edilmektedir (D'Souza & Devarajan, 2015).

GalNAc ile konjuge edilmiş ON'ler, kltrin aracılı yol ile endositozu tetikleyen ASGP-R tarafından tanınarak, endozomal/lizozomal kaçış meydana gelmektedir. Pek çok araştırmada, GalNAc ile konjuge sistemler sayesinde, ASGP-R'nin aracılık ettiği alım ile karaciğere hedeflenerek ON terapötiklerinin gen susturmayı indüklediği gösterilmiştir (Rajeev ve ark., 2015).

Farklı GalNAc ligand tasarımları (mono-, di-, tri- veya tetra-GalNAc) geliştirilerek, ON'lerin hepatositlere iletilme etkinliği artırılabilir. Ayrıca GalNAc konjugatları, küçük moleküllerin (doksorubisin vd.) karaciğer hedefli iletimi için de kullanılabilir (Huang, 2017). Klinik öncesi farelerde yapılan bir araştırmada, GalNAc-siRNA konjugatları deri altından uygulanarak, insan karaciğerindeki anormal transtiretin (TTR) proteinlerinin üretimine yol açan TTR mRNA'sına müdahale ederek dolaşımdaki amiloid proteinlerinin seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Weingärtner ve ark., 2020).

Biyoteknolojik ilaç şirketleri, ON terapisinin geliştirilmesine yönelik çok sayıda klinik deneyi desteklemektedir. Çeşitli karaciğer hastalıkları için klinik deneyleri gerçekleştirilen GalNAc-ON çalışmaları bulunmaktadır (Lu ve ark., 2022). Günümüzde, Alnylam, Arrowhead, Dicerna, Ionis gibi biyoteknolojik ilaç şirketleri ON terapisinin geliştirilmesine yönelik çok sayıda klinik deneyi desteklemektedir. 2018 yılında Alnylam'ın Onpattro (patisiran) ilacı, kalıtsal transtiretin

amiloidoz (hATTR) tedavisi için FDA tarafından onaylanan ilk siRNA'dır. Ayrıca, Huntington ve Alzheimer hastalığı gibi merkezi sinir sistemi bozuklukları, göz ve karaciğer hastalıkları için tedaviler geliştirilmektedir (Hu ve ark., 2020).

Örneğin, Alnylam'ın, çok çeşitli hepatosit hedefli karaciğer hastalıkları için üç, faz III denemesi dahil olmak üzere klinik deneylere geçilen altı, GalNAc-siRNA konjugatı bulunmaktadır. Dicerna, daha yaygın olarak kullanılan üç değerlikli model yerine, dört-değerlikli tescilli bir GalNAc platformu geliştirmiştir (Springer & Dowdy, 2018). Yakın zamanda, Alnylam ve Ionis tarafından GalNAc-ON terapötiklerinin özellikle kronik hastalıkta ve geniş hasta popülasyonlarında kullanımları için subkutan uygulama yerine oral uygulama yoluyla verilebileceği yönündeki ilerleme duyurulmuştur (Debacker ve ark., 2020).

4.5. Transmembran Proteinleri

ABCB1 gibi membran proteinleri, birçok ilaç için hala ana hedeflerden birisidir (Yin & Flynn, 2016). Bu nedenle, membran proteinlerinin ekspresyon analizlerinin doğruluğu, daha fazla önem kazanmaktadır. İntegral membran proteinlerinin (IMPs) çoğunda, yapıya hidrofobiklik kazandıran bir transmembran α -sarmal bulunmaktadır (Stillwell, 2016). Hidrofobik sarmal, ısı kaynaklı protein agregasyonuna yol açtığı için western blot deneylerinde protein tespitini zorlaştırmaktadır (Miyano ve ark, 2021). Nükleer, sitoplazmik ve mitokondriyal proteinler ile karşılaştırıldığı zaman, moleküler yöntemlerle çalışılması en zor sınıfı, membran proteinleri oluşturmaktadır. Deney aşamalarında, proteinin stabilitesini ve işlevini korumak oldukça zordur (Parton ve ark., 2011). Proteinlerin katlanma-açılma kinetiğine bağlı uygun koşulların belirlenmesi, ulaşılması gereken altın standarttır (Romero-Romero ve ark., 2011). Bu nedenle, literatürdeki protein agregat eğilimi tahmin araçlarından, deneysel optimizasyon için de faydalanılmaktadır (Housmans ve ark., 2021).

SDS-PAGE ya da western blot deneylerinde, proteinlerin denatürasyonu için en az 60°C'lik bir ısı uygulanmasının gerekli olduğu bilgisi literatüre yerleşmiştir. Termal denatürasyonda, protein katlanmalarının (sekonder ve tersiyer yapı) açılması, polipeptitlerin ayrılması ve disülfit bağlarının kırılması gibi işlemler gerçekleşmektedir (Horscroft & Roy, 1997). Böylelikle, denatüre edici ajan olarak kullanılan SDS, proteinlerdeki hidrofobik bölgelere bağlanabilmektedir ve protein denatürasyonu tamamlanmaktadır (Winogradoff ve ark., 2020). Genellikle, başlangıç denatürasyon ısısı olarak 60°C'nin çok üzerinde olan, 95-100°C'lik ısılar, araştırmacılar tarafından benimsenmektedir. Bu durum, çoğunlukla, optimal denatürasyon ısısı olarak, 95-100°C (5'-10') gibi yüksek ısıların mutlak kabulüne ve kullanımına yönlendirmektedir. Alternatif olarak, 70°C'deki (2'-10') protein denatürasyonu da, bazı

kaynaklar tarafından önerilmektedir (Abcam, 2024; Bio-rad, 2024; Thermo Fisher Scientific, 2024). Bu ısının dayanağı, çok geçişli membran proteinleridir. Çünkü, bu proteinlerin, denatürasyon için kaynatıldıkları zaman toplanma eğiliminde oldukları bilinmektedir. Bu durum, proteinlerin SDS-PAGE jeline verimli bir şekilde girmelerine engel olabilmektedir (Abcam, 2024). Literatürde, ilgilenilen hedef IMP'lerin western blot analizine yönelik protein denatürasyon ısısı bilgisi kesinleştirilmemiş ise farklı ısı ve sürelerin değerlendirildiği bir denatürasyon testinin yapılması önerilmektedir (Bio-Techne, 2024). Tüm bu bilgiler, proteinlerin optimal denatürasyon ısılarındaki farklılığa dikkat çekmesi açısından da önemlidir.

Aslında proteinler, ele aldığımız konu kapsamında, ısıtılarak (termal denatürasyon) ya da soğutularak (soğuk denatürasyon) denatüre edilebilmektedir (Davidovic ve ark., 2008). Soğuk denatürasyon, tek-domain, multi-domain ve multimerik globüler proteinlerin, yeterince düşük ısılarda, polipeptit zincirinin açılması ile polar olmayan grupların suyla etkileşimini içeren termodinamik yasalara göre açıklanmaktadır (Privalov, 1990; Sanfelice & Temussi, 2016). Bu noktada önemli olan ise, hangi proteinin, hangi ısı koşullarına uygun denatüre olabildiğinin bilinmesidir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kullanılan kimyasallar, sarf maddeler ve çözeltiler

Kullanılan Malzemeler	
Kimyasallar ve Sarf Maddeler	Üretici Firmalar (Menşei)
cDNA Sentez Kiti (C03-01-25)	A.B.T. (Türkiye)
Primer Dizileri	Sentebiolab (Türkiye)
Amonyum Asetat (LB.TK.190611.01002)	Tekkim (Türkiye)
Asetik Asit (LB.TK.010030.01001)	
Borik Asit (LB.TK.020100.01002)	
Dimetil Sülfoksit (LB.TK.201790.01000)	
Edta-4Na (LB.TK.080212.01002)	
Etanol (LB.TK.200655.02501)	
Gliserin (LB.TK.070190.01001)	
Glisin (LB.TK.930135.01002)	
Hidroklorik Asit (LB.TK.080231.01001)	
İzopropil Alkol (LB.TK.090250.01001)	
Metanol (LB.TK.120320.02501)	
Potasyum Klorür (LB.TK.150440.01002)	
Sodyum Klorür (LB.TK.170540.01002)	
Tri- Sodyum Sitrat Dihidrat (LB.TK.920091.01002)	
Antisens Oligonükleotit Dizileri	Eurogentec (Almanya)
RNA İzolasyon Kiti (R2053)	ZymoResearch (Almanya)
RIPA Tamponu (3924401)	Serva Electrophoresis (Almanya)
Protein Belirteci 180 kDa (RM19001)	Abclonal (Almanya)
2-Merkaptoethanol (LB.M.805740.0250)	Merck (Almanya)
TEMED (M110732.0100)	

Sığır Serum Albümin (D1712)	Santa Cruz Biotechnology (Almanya)
Hücre Kültürü Flaskları (sc-200262 / sc-200263)	
Şırınga Filtre (LB.IS.094.07.003)	Isolab (Almanya)
Pipet Uçları (I.005.01.001, I.005.01.002, I.005.01.003)	
PCR Tüpleri (I.123.01.002)	
Mikrosantrifüj Tüpleri (S.078.03.002)	
Dulbecco's PBS (10X) (PBS-10XA)	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-LPA / HPA)	Capricorn Scientific (Almanya)
Fetal Bovine Serum (FBS-11B)	
Penisilin/Streptomisin (100X) (PS-B)	
Tripsin-EDTA (%0,25) (TRY-3B)	
Sodyum Dodesil Sülfat (800-100 EG)	Wisent Multicell (Kanada)
Tris (600-127 EG)	
96-kuyulu PCR Plaka (PP-96-HS-LC480)	Labselect (Kanada)
Bis-akrilamid (A2214)	Biomatik (Kanada)
Bromfenol Mavisi (A2223)	
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (A3338)	
Tween 20 (A4031)	
Tripan Mavisi Solüsyonu (03-102-1B)	Biological Industries (İsrail)
Akrilamid (LB.SA.A3553)	Sigma-Aldrich (ABD)
Resazurin (R7017)	
Sekonder Antikor (7074P2)	Cell Signaling Technology (ABD)
MDR1/ABCB1 Primer Antikor (13342S)	
Na,K-ATPaz α 1 Primer Antikor (23565S)	
Proteaz/Fosfataz İnhibitör Kokteyli (5872)	
ECL Kiti (6883P3)	
Primer Dizileri	Synbio Technologies (ABD)
Amonyum Persülfat (17874)	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Bikinkoninik Asit Protein Tahlil Kiti (23225)	

Poliviniliden Diflorür Transfer Membranı (88520)		
Yağsız Süt Tozu (LP0033B)		
SYBR Kiti (1725271)	Bio-Rad (ABD)	
Hücre Kültürü Plakaları (703001, 712001, 702001, 748001, 701001)	Nest (Çin)	
Kriyojenik Viyaller (606101)		
Kullanılan Çözeltiler		
Çözeltiler	Protokoller	
10X Tris Borik Asit EDTA (TBE)	Cold Spring Harbor	
10X Tris-Glisin Transfer Tamponu	Thermo Fisher Scientific	
MTT Stok Solüsyonu (12 mM)	Cold Spring Harbor	
0,5 M Tris-HCl, pH 6.8 (100 mL)	Thermo Fisher Scientific	
1 M Tris-HCl, pH 7.6 (100 mL)		
%1.0 Bromofenol Mavisi (10 mL)		
%10 Sodyum Dodesil Sülfat (10 mL)		
10X Tris Tampon Salin (TBS)		
10X Tris-Glisin SDS Yürütme Tamponu		
2X Tris-Glisin SDS Örnek Tamponu (Laemmli Tamponu)		
%5 Sığır Serum Albumin (BSA)		
%5 Yağsız Süt Tozu		
%50 Akrilamid/BIS (29:1)		
Amonyum Persülfat		
Ayırma Jel Tamponu (1M Tris-HCl, pH 8.8)		
İstifleme Jel Tamponu (0,375M Tris HCl, pH 6.8)		
Tris-tampon Salin ile Tween 20 (TBST)		
2X Laemmli Tamponu		
Resazurin Stok Solüsyonu (0,15 mg/ml)		(Sharma ve ark., 2019)

5.1.2. Kullanılan cihazlar ve bilgisayar programları

Kullanılan Cihazlar	
Cihazlar	Üretici Firmalar (Menşei)
Buz Dolabı	Arçelik (Türkiye)
Derin Dondurucu (-20°C)	Gorenje (Slovenya)
Ultra Derin Dondurucu (-80°C)	New Brunswick Scientific (ABD)
Kriyojenik Dondurucu (-150°C)	Sanyo (Japonya)
Vertikal Laminar Flow Kabin (Class-II)	NuAire (Birleşik Krallık)
Mikro 120 Santrifüj	Hettich (Almanya)
TProfessional Termal Döngü Cihazı	Biometra (Almanya)
Mini-Protean Tetra Cell Sistemi	Bio-Rad (ABD)
Standart Güç Cihazı	Biometra (Almanya)
Jel Elektroferez Sistemi	Bio-Rad (ABD)
Vortex	IKA (Türkiye)
Manyetik Karıştırıcı	Elektro-Mag (Türkiye)
Hassas Terazı	Mettler Toledo (İsviçre)
UV Transilluminator Cihazı	Vilber Lourmat (Fransa)
Etüv	Heraeus (Almanya)
Mini Orbital Karıştırıcı	Stuart (ABD)
LightCycler 480 Instrument II Cihazı	Roche Diagnostics (Almanya)
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Culter (ABD)
ChemiDoc Görüntüleme Sistemleri	Bio-Rad (ABD)
Microplate Spektrofotometre	Agilent Technologies (ABD)
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore (Almanya)
Enspire Mikroplaka Okuyucu	Perkin Elmer (ABD)
Inverted Mikroskop	Zeiss (Almanya)
CO ₂ İnkübatörü	Sanyo (Japonya)
Vertikal Laminar Flow Kabin (Class-II)	Thermo Fisher Scientific (ABD)

PH Metre	Hanna (İtalya)
Otoklav	Sanyo (Japonya)
320 R Masaüstü Soğutmalı Santrifüj	Hettich (Almanya)
Ultrasonik Cihazı	UltraSonic LLC (ABD)
Kırık Buz Makinesi	Scotsman (ABD)
Kullanılan Bilgisayar Programları	
Bilgisayar Programları	Üretici Firmalar (Menşei)
Prism 9.3.0	GraphPad (ABD)
Image Lab Version 6.1	Bio-Rad (ABD)
LightCycler 480 Instrument II	Roche Diagnostics (Almanya)
Infinity - Gel Documentation Imaging	Vilber Lourmat (Fransa)

5.2. Yöntem

5.2.1. Antisens oligonükleotitlerin *in silico* tasarlanması

5.2.1.1. ABCB1 mRNA'sının hedef eksonları için ikincil ve üçüncül yapı tahmini

İnsan ABCB1 geni transkript varyant 1 mRNA'sının (NM_001348945.2), ekson 10, ekson 17 ve ekson 20 nükleotit dizileri GenBank'tan (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) FASTA formatında elde edildi. ABCB1 geni transkript varyant 1 (5586 bp) mRNA'sına ait ekson 10 (192 bp), ekson 17 (204 bp) ve ekson 20 (177 bp) nükleotit dizilerinin 2D yapı tahmini RNAfold sunucusu (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) kullanılarak gerçekleştirildi. RNA enerji parametresi (Turner model, 2004) seçilerek analiz edildi. Vienna formatında, minimum serbest enerji (MFE) ve termodinamik istatistiksel uyum tahmin sonuçları elde edildi. Ekson 10, ekson 17 ve ekson 20'nin FASTA dizileri ve 2D yapı bilgileri kullanılarak, 3dRNA/DNA sunucusu (<http://biophy.hust.edu.cn/3dRNA>) aracılığı ile 3D yapılarının, fizik ve biyoinformatik temelli metotlar ile tahmini yapıldı ve PDB dosyaları elde edildi.

5.2.1.2. ABCB1 mRNA'sını hedefleyen ASO dizilerinin tasarlanması

İnsan ABCB1 geni transcript variant 1 mRNA'sını (NM_001348945.2) hedefleyen ASO dizileri, siRNA Wizard aracı (<https://www.invivogen.com/sirnazizard/>) kullanılarak elde edildi. %GC içeriği 30-55 aralığında filtrelenerek, 20-mer hedef diziler listelendi. Aday ASO

dizileri için Oligonucleotide Properties Calculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) kullanılarak saç tokası ve dimer analizi yapıldı. Aday ASO'ların, NCBI Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) ile ABCB1'in tüm transkript varyantlarını kapsadığı kontrol edildi. İnsan genomu için off-target validasyonu yapıldı (<http://crdd.osdd.net/servers/aspsirna/asptar.php>). İçlerinden 3 ASO dizisi (ASO1, ASO2 ve ASO3) seçildi. siRNA Wizard aracı ile ASO1'den bir negatif kontrol dizisi (ASO4) oluşturuldu. ASO dizilerine ait bilgiler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Antisens oligonükleotit dizi bilgileri

ASO No.	Anlamli zincir (5' -> 3')	Karşı anlamli zincir (3' -> 5')	Başlangıç	%GC
GalNAc-ASO1	GCTATAATGCGACAGGAGAT	CGATATTACGCTGTCCTCTA	977	45.00
GalNAc-ASO2	GCCACCACGATAGCTGAAAA	CGGTGGTGCTATCGACTTTT	1958	50.00
GalNAc-ASO3	GGAGTGTCCTGGATCACAA	CCTCACAGGCACCTAGTGTT	2526	55.00
GalNAc-ASO4	GGCATTAGGCAAGTCAATAG	CTATTGACTTGCCTAATGCC		45.00

5.2.1.3. ASO dizileri için katlanma serbest enerji tahmini

MaxExpect sunucusu
(<https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/MaxExpect/MaxExpect.html>)
kullanılarak DNA-ASO'ların (3'-5'), katlanma serbest enerjileri tahmin edildi.

5.2.1.4. ASO dizileri için hibrit serbest enerji tahmini

DuplexFold sunucusu
(<https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/DuplexFold/DuplexFold.html>)
kullanılarak ASO dizilerinin (ASO1, ASO2 ve ASO3) hibrit serbest enerjileri (HFE) tahmin edildi.

5.2.1.5. ASO dizilerinin erime tahmini

DINAMelt sunucusu (<http://www.unafold.org/hybrid2.php>), homodimer simülasyonları uygulaması ile ASO dizilerinin (ASO1, ASO2 ve ASO3) erime ısısı konsantrasyonu (TmConc) ve erime ısısı kapasitesi (TmCp) grafikleri oluşturuldu.

5.2.1.6. ASO dizilerinin ikincil yapı ve üçüncül yapı tahmini

RNAfold sunucusu (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) aracılığı ile DNA parametresi (Matthews model, 2004) seçilerek, tek zincirli DNA-ASO dizilerinin (ASO1, ASO2 ve ASO3) ikincil yapıları tahmin edildi. RNAfold sunucusu ile belirlenen DNA-ASO (3'-5')'ların ikincil yapı bilgileri ve FASTA dizileri kullanılarak, 3dRNA/DNA sunucusu (<http://biophy.hust.edu.cn/3dRNA>) ile ASO dizilerinin (ASO1, ASO2 ve ASO3) üçüncül yapı tahmini yapıldı ve PDB dosyaları elde edildi.

5.2.1.7. ABCB1 mRNA'sının hedef eksonları ile ASO etkileşim tahmini

İnsan ABCB1 geni transcript variant 1 mRNA'sına (NM_001348945.2) ait ekson 10 (192 bp), ekson 17 (204 bp) ve ekson 20 (177 bp) nükleotit dizileri ile ASO'ların üçüncül yapı tahmininden elde edilen PDB dosyaları kullanılarak, HNADOCK sunucusu (<http://huanglab.phys.hust.edu.cn/hnadock/>) ile RNA-DNA kompleks yapı modellemesi için nükleik asit moleküler yerleştirme (docking) gerçekleştirildi.

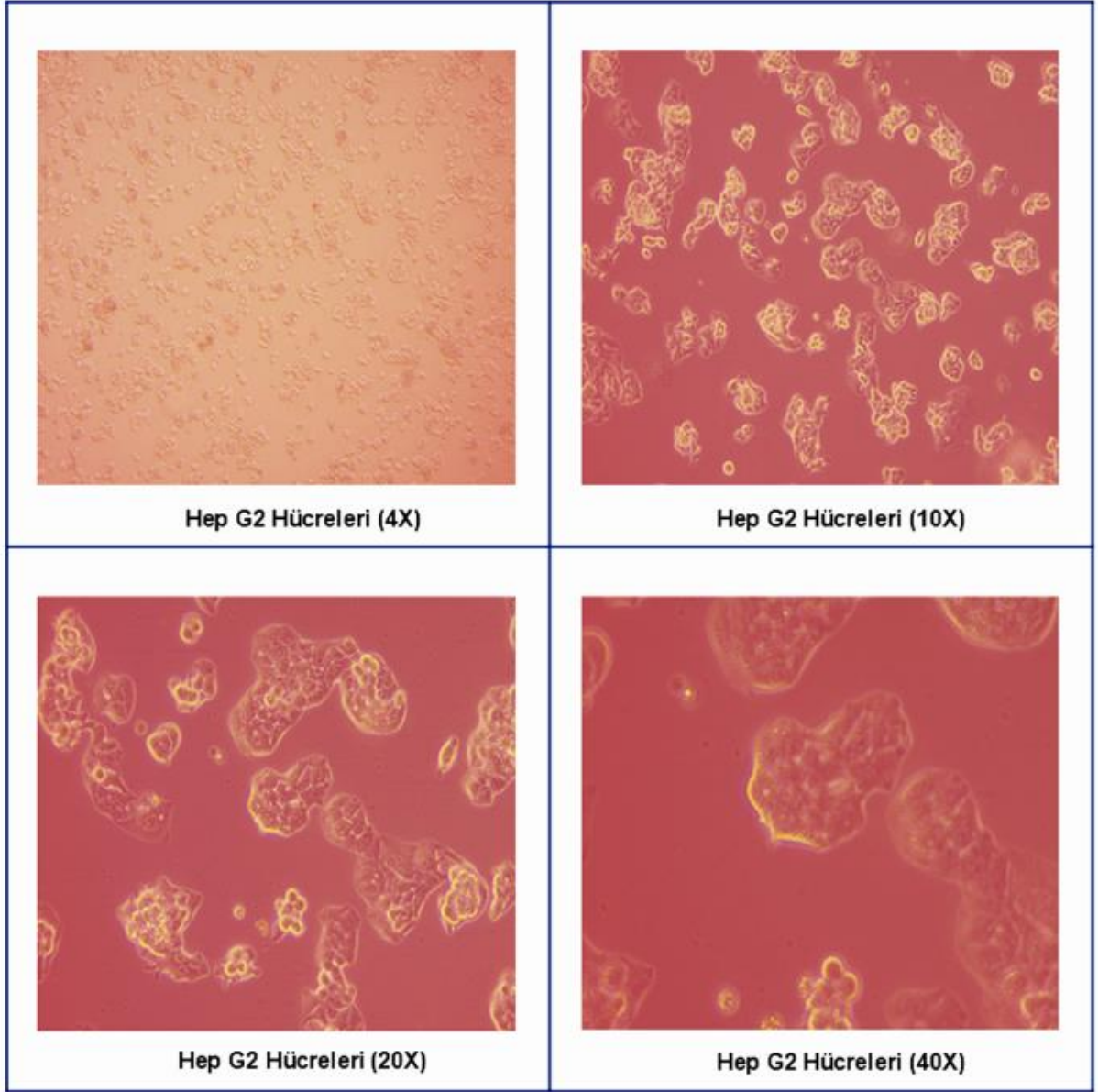
5.2.2. Hücre kültürü çalışmaları

5.2.2.1. GalNAc-ASO dizilerinin sentezi

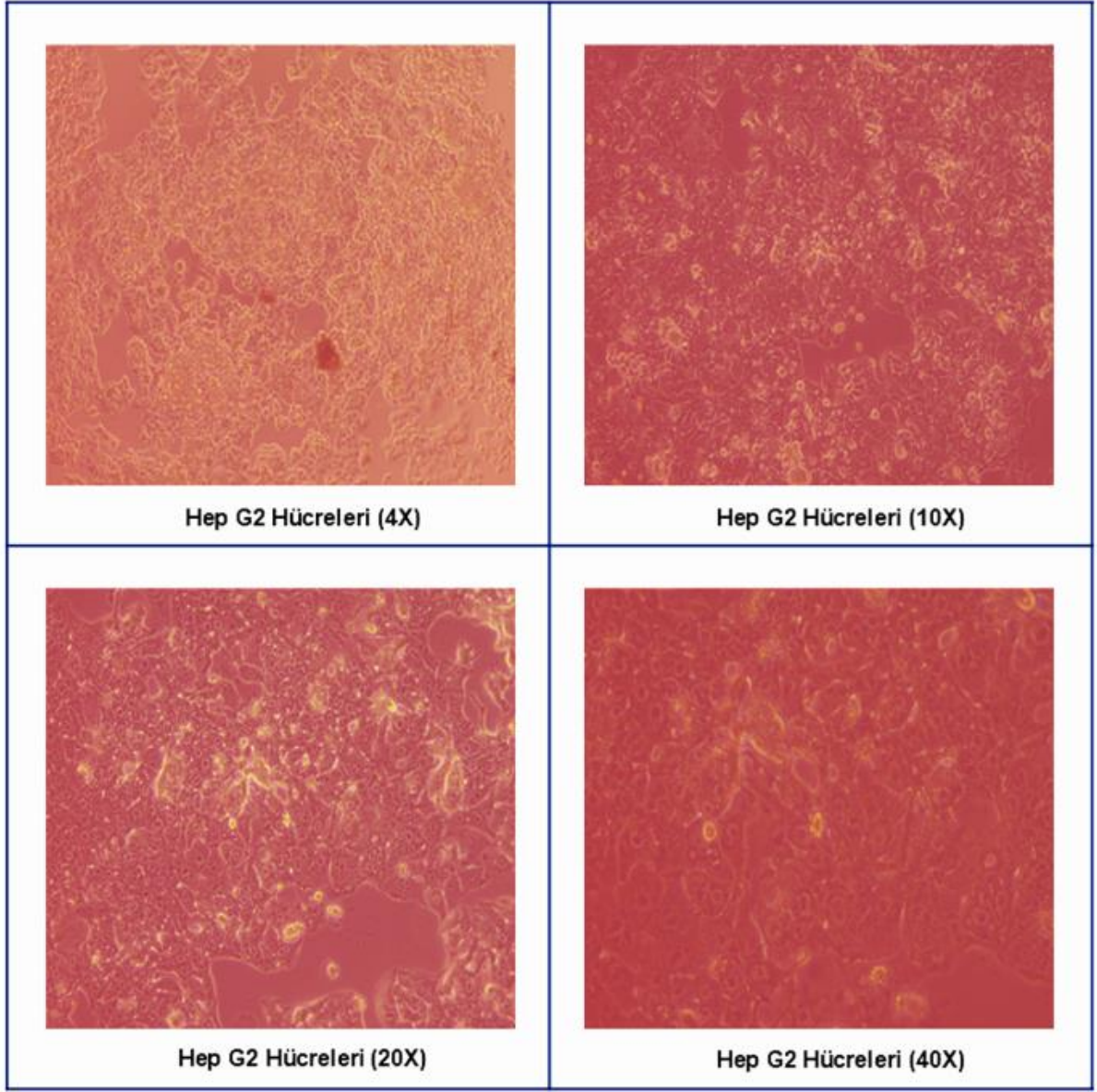
Hedef ABCB1 ekspresyonunun inhibisyonunu sağlamak için tasarladığımız ASO dizilerinin 5' ucuna GalNAc C3 fosforamit karbonhidrat ligandı (Glen Research, ABD) katı fazda eklenerek ticari firma tarafından sentezlendi (Eurogentech, Almanya). ASO dizileri için PTO omurga modifikasyonu tercih edildi. GalNAc ile konjuge PTO-DNA-ASO'lar, HPLC saflaştırma ile 1000 nmol sentez ölçeğinde ve liyofilize halde temin edildi. GalNAc-ASO'lardan, stok çözeltiler hazırlandı ve -20°C'de saklandı.

5.2.2.2. HepG2 hücre hattı kültür koşulları

Bu çalışmada kullanılan, HepG2 (ATCC HB-8065) hücre hattı viyali, Marmara Üniversitesi Genetik ve Metabolik Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi (GEMHAM)'nden temin edildi. Deneylere geçmeden önce, hücrelerin morfolojisi incelendi ve kontaminasyon açısından değerlendirildi. Hücreler, %10 ısı ile inaktif edilmiş fetal sığır serumu (FBS), %1 esansiyel olmayan amino asitler, %1 sodyum piruvat, %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin ile desteklenmiş düşük ve yüksek glikozlu DMEM, hacimce yarı yarıya (1:1) karıştırılarak kültürlendi (1 atmosfer basınç altında, %98 nem, %5CO₂ ve 37°C). Flasklar, her gün inverted mikroskopta incelenerek (Şekil 4), hücre yoğunluğu %70-80'e (Şekil 5) ulaştığında pasajlandı. Hücreler, -150°C'de (%90 FBS + %10 DMSO) stoklandı.



Şekil 4. HepG2 hücrelerinin morfolojisi (Ters mikroskop, Zeiss)



Şekil 5. Hücre yoğunluğu %70-80'e ulaşan HepG2 hücrelerinin morfolojisi (Ters mikroskop, Zeiss)

5.2.2.3. HepG2 hücrelerine GalNAc-ASO uygulaması

HepG2 hücreleri, 12-kuyulu plaklara ekildikten 24 saat sonra GalNAc-ASO uygulamaları (2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M) gerçekleştirildi. Belirlenen nihai konsantrasyonları verecek ara stoklar oluşturulduktan sonra, GalNAc-ASO'lar, herhangi bir transfeksiyon reaktifi olmadan, hücrelere doğrudan, gimnotik iletim (serbest alım) ile verildi. GalNAc-ASO uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra, ABCB1-MDR1 gen ekspresyonunu belirlemek için RNA izolasyonu ve 72 saat sonra protein izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA ve protein örnekleri, sırasıyla, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ve western blot deneylerinde kullanıldı. HepG2 hücrelerine daha geniş bir aralıkta GalNAc-ASO4 konsantrasyonları (0,625

μM , 1,125 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM ve 20 μM) uygulanarak, 144 saate kadar MTT ve resazurin hücre canlılık deneyleri gerçekleştirildi.

5.2.3. ABCB1-MDR1 ekspresyon belirleme çalışmaları

5.2.3.1. ABCB1-MDR1 gen ekspresyonunun qRT-PCR yöntemi ile incelenmesi

HepG2 hücreleri, 12-kuyulu plaklara ekildikten 24 saat sonra GalNAc-ASO tedavileri uygulandı (2,5 μM , 5 μM , 10 μM ve 20 μM). 24, 48 ve 72 saat sonra hücreler, trizol ile doğrudan toplandı. Hücrelerden, spin-kolon temelli yöntem ile kit talimatnamesine uygun olarak (Direct-zol RNA Microprep Kits, Zymo Research) total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA örneklerinin kantifikasyonu, mikropilaka spektrofotometresi (Biotek Epoch) ile belirlendi. Tüm örneklerin başlangıç konsantrasyonları eşitlenerek, total RNA'dan rastgele primerler kullanılarak kit talimatnamesine (cDNA Synthesis Kit with RNaz Inh., High Capacity, A.B.T.) göre cDNA'lar sentezlendi (TProfessional Therocycler, Biometra) (Tablo 2 ve Tablo 3). Hedef genlerin mRNA ekspresyonu, primerler (Tablo 4) ile SYBR green kiti (SsoAdvanced Univ SYBR Grn Suprmix, Bio-Rad) kullanılarak, qRT-PCR deneyi (Tablo 5 ve Tablo 6) gerçekleştirildi (LightCycler 480 Instrument II, Roche). Amplifikasyondan sonra "Absolute quantification/2nd Derivative Max" analizi ile CT'ler belirlendi ve "Tm calling" analizi ile erime eğrisi analizi yapıldı. Ayrıca, qRT-PCR ürünleri, %2'lik agaroz jel elektroforezde yürütülerek kontaminasyon ve bağlanma açısından değerlendirildi. ABCB1 mRNA ekspresyonu, karşılaştırmalı CT ($2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ [$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Hedef gen (ABCB1)}} - \text{Ct}_{\text{Referans gen (GAPDH)}}$]) yöntemi kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar, referans gen ekspresyonu ile (GAPDH, Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) normalize edildi.

Tablo 2. Ters transkriptaz reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	1X
10X reaksiyon tamponu	2 µl
dNTP karışımı (2,5 mM)	1 µl
Rastgele hekzamer (50 µM)	2 µl
Ters transkriptaz (200 U/µl)	1 µl
RNaz inhibitörü	0,5 µl
RNaz içermeyen su	3,5 µl
RNA örneği	10 µl
Toplam reaksiyon hacmi	20 µl

Tablo 3. Ters transkriptaz reaksiyon koşulları*

Ters Transkriptaz Adımları	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Adım 1	25	10'	1
Adım 2	37	120'	1
Adım 3	85	5'	1
Adım 4	4	∞	1

*Biometra TProfessional ısı döngü cihazı

Tablo 4. qRT-PCR primer dizi bilgileri

Gen İsmi	İleri Primer Dizisi (5'→3')	Geri Primer Dizisi (5'→3')
ABCB1	TCCATGCTCAGACAGGATGTGA	TCATTGGCGAGCCTGGTAGT
GAPDH	ACCATCTTCCAGGAGCGAGAT	GGGCAGAGATGATGACCCTTTT

Tablo 5. qRT-PCR reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	1X
SYBR green supermix (2X)	5 µl
İleri ve geri primerler (10 µM)	0,5 µl
cDNA örneği (200 nmol)	x µl
Nükleaz-içermeyen su	4,5 - x µl
Toplam reaksiyon hacmi	10 µl

Tablo 6. qRT-PCR reaksiyon koşulları*

qRT-PCR Adımları	Denatürasyon	Bağlanma
İlk Döngü	95°C - 30''	-
40 ^d	95°C - 10''	60°C - 10''
Soğutma	4°C - ∞	
Erime Eğrisi Analizi	Standart	

*Roche LightCycler 480 Instrument II qRT-PCR cihazı

5.2.3.2. ABCB1-MDR1 protein ekspresyonunun western blot yöntemi ile incelenmesi

HepG2 hücreleri, 12-kuyulu plaklara ekildikten 24 saat sonra GalNAc-ASO tedavileri uygulandı (2,5 µM, 5 µM, 10 µM ve 20 µM). 72 saat sonra hücrelerden, liziz tamponu (RIPA + proteaz/fosfataz inhibitörü) ile kit talimatnamesine göre total protein izolasyonu gerçekleştirildi (RIPA buffer, SERVA; 100X Protease Inhibitor Cocktail, Cell Signaling). Örnekler, porsiyonlanarak -80°C'de saklandı. Bikinkoninik asit (BCA) deney kit (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) prosedürü ile protein konsantrasyonları belirlendi ve standart eğri grafiği çizilerek, konsantrasyonlar 20 µg olarak eşitlendi. Protein örneklerine, 2X Laemmli tamponu eklenerek, ddH₂O ile toplam 10 µl'ye tamamlandı ve +4°C'de (60') denatüre edildi. Denatüre protein örnekleri ve protein belirteci (180 kDa), %4-8 SDS-PAGE mini jelle (1mm) yüklenerek, önce 50V (5'), sonra 130-150V'da 60' içerisinde ayrıştırıldı. Proteinler, jelden, metanol ile aktifleştirilmiş polivinil florür (PVDF) membrana (Pierce, PVDF Transfer Membran, 0,2 µm, Thermo Fisher Scientific), 100V'de (60') ıslak transfer gerçekleştirildi (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad). Membran, ddH₂O ile yıkandı (4x5). Membran, %5 yağsız süt tozu (TBS-t) ile oda sıcaklığında bloklandı (60'). Membranlar, protein

belirtecine göre 130-180 (ABCB1) ve 100 (ATP1A1) kDa'yı kapsayacak şekilde kesildi. Membranlar, primer antikor ile oda sıcaklığında çalkalandı (180'). Membranlar, TBS-t ile çalkalandı (3x10). Membranlar, oda sıcaklığında sekonder antikor ile çalkalandı (60'). Membranlar, TBS-t ile (3x5) ve TBS ile (2x5) çalkalandı. Protein bantları, ECL reaktifi (SignalFire, Cell Signaling) kullanılarak, görüntülendi (ChemiDoc Imaging Systems, Bio-Rad). Protein kantitasyonu, Image Lab Version 6.1 yazılımı aracılığı ile gerçekleştirildi (Bio-Rad). Sonuçlar, referans gen ekspresyonu (ATP1A1) ile normalize edildi. Bu çalışmada kullanılan antikorlar Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Antikor bilgileri

Antikor İsimleri	Dilüsyon	Katalog Numaraları
ABCB1-MDR1	1:1000	13342 (Cell Signaling Technology)
Na,K-ATPaz α 1 (ATP1A1)	1:1000	23565 (Cell Signaling Technology)
Anti-tavşan IgG, HRP-bağlı Antikor	1:3000	6883 (Cell Signaling Technology)

5.2.4. Hücre canlılığı çalışmaları

5.2.4.1. Tripan mavisi testi

Besiyeri içerisindeki hücre süspansiyonu ve tripan mavisi (%0,1), hacimce 1:1 oranında karıştırılıp, hemositometreye yüklendi. Maviye boyanmış (ölü) ve boyanmamış (canlı) hücreler, ışık mikroskopunun 10X objektifi kullanılarak sayıldı. 1 ml besiyeri ortamında kaç milyon hücre olduğu hesaplandı ve hücre ekimi gerçekleştirildi.

5.2.4.2. MTT testi

144 saate kadar 96-kuyulu plaklara 100 μ l besiyeri içerisinde 5000 hücre 3 tekrarlı olacak şekilde ekildi. Ayrıca, kontrol ve blank kuyuları oluşturuldu. 24 saat sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve nihai GalNAc-ASO4 konsantrasyonları (0,625 μ M, 1,125 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) olacak şekilde hücrelere verildi. 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat sonra 10 μ l/kuyu MTT stok solüsyonu eklendi. 37°C'de inkübe edildi. 2 saat sonra kuyularda formazan kristallerinin oluşumu gözlemlendikten sonra besiyeri uzaklaştırıldı. Kuyulara, 100 μ l/kuyu MTT çözücü (DMSO) eklendi. 96-kuyulu plaka, 5' çalkalandıktan sonra OD570 nm'de absorbansları ölçüldü (Perkin Elmer, EnSpire Multiplate Plate Okuyucu). Aşağıdaki formüle göre hücre sitotoksitesi hesaplandı.

$$\text{Sitotoksosite (\%)} = (100 \times (\text{kontrol} - \text{örnek}) / \text{kontrol})$$

5.2.4.3. Resazurin testi

144 saate kadar opak 96-kuyulu plaklara 100 µl besiyeri içerisinde 5000 hücre 3 tekrarlı olacak şekilde ekildi. Ayrıca, kontrol ve blank kuyuları oluşturuldu. 24 saat sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve nihai GalNAc-ASO4 konsantrasyonları (0,625 µM, 1,125 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM ve 20 µM) olacak şekilde hücrelere verildi. 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat sonra 20 µl/kuyu resazurin stok solüsyonu eklendi. 37°C’de inkübe edildi. 2 saat sonra, $\lambda_{\text{eksitasyon}} = 530 - 570$ (560 nm) ve $\lambda_{\text{emisyon}} = 580 - 620$ (590) nm’de floresan okuma gerçekleştirildi (Perkin Elmer, EnSpire Multiplate Plate Okuyucu). Aşağıdaki formüle göre hücre sitotoksitesi hesaplandı.

$$\text{Sitotoksite (\%)} = (100 \times (\text{kontrol} - \text{örnek}) / \text{kontrol})$$

5.2.5. İstatistiksel hesaplamalar

Niceliksel verilerin, ortalama ve standart sapma değerleri hesaplandı. Çoklu karşılaştırma testleri tek yönlü varyans analizi veya iki yönlü varyans analizi kullanılarak analiz edildi. Tüm istatistiksel analizler, Graphpad Prism 9.3.0 programı ile gerçekleştirildi (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). P değeri .05’ten küçük ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. *In Silico* Analiz Bulguları

6.1.1. ABCB1 mRNA hedef eksonları ikincil ve üçüncül yapı tahmin bulguları

İnsan ABCB1 mRNA'sı transcript variant 1 (5586 bp)'e ait ekson 10 (192 bp, Şekil 6a), ekson 17 (204 bp, Şekil 7a) ve ekson 20 (177 bp, Şekil 8a)'nin 2D (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) ve 3D (<http://biophy.hust.edu.cn/3dRNA>) yapıları tahmin edilmiştir. MFE tahmin sonucuna göre ekson 10'un, -42 kcal/mol MFE'ye sahip, nokta parantez gösteriminde optimal ikincil yapısı Şekil 6b ve Şekil 6c'de gösterilmiştir. Termodinamik uyum tahmin sonucuna göre serbest enerjisi -45,96 kcal/mol'dür. MFE yapısının frekansı %0,16'dır. Ekson 10'un -23,50 kcal/mol MFE'ye sahip nokta parantez gösterimindeki sentroid ikincil yapısı Şekil 6d'de gösterilmiştir. MFE tahmin sonucuna göre ekson 17'nin, -48,80 kcal/mol MFE'ye sahip, nokta parantez gösteriminde optimal ikincil yapısı Şekil 7b ve Şekil 7c'de gösterilmiştir. Termodinamik uyum tahmin sonucuna göre serbest enerjisi -52,22 kcal/mol'dür. MFE yapısının frekansı %0,39'dur. Ekson 17'nin -33,50 kcal/mol MFE'ye sahip nokta parantez gösterimindeki sentroid ikincil yapısı Şekil 7d'de gösterilmiştir. MFE tahmin sonucuna göre ekson 20'nin, -29,30 kcal/mol MFE'ye sahip, nokta parantez gösteriminde optimal ikincil yapısı Şekil 8b ve Şekil 8c'de gösterilmiştir. Termodinamik uyum tahmin sonucuna göre serbest enerjisi enerjisi -32,13 kcal/mol'dür. MFE yapısının frekansı %1,01'dir. Ekson 20'nin -14,50 kcal/mol MFE'ye sahip nokta parantez gösterimindeki sentroid ikincil yapısı Şekil 8d'de gösterilmiştir. Eksonların FASTA ve 2D bilgileri kullanılarak, optimize protokol ile 3D yapısı için 5'er model elde edilmiştir. İçlerinden en düşük skora sahip olan model en iyisi olarak belirtildiği için tercih edilmiştir. Ekson 10 için 26,6358 skorlu model (Şekil 6g); ekson 17 için 26,4863 skorlu model (Şekil 7g); ekson 20 için 26,6531 skorlu model (Şekil 8g) seçilmiştir.

6.1.2. ABCB1 mRNA eksonlarını hedefleyen ASO'lar

İnsan ABCB1 mRNA transcript variant 1 (5586 bp)'i hedefleyen ASO'lar listelendi (<https://www.invivogen.com/sirawizard/>). İçlerinden, ekson 10 (192 bp)'u hedefleyen ASO1; ekson 17 (204 bp)'yi hedefleyen ASO2 ve ekson 20 (177 bp)'yi hedefleyen ASO3 ve negatif kontrol ASO4 dizileri değerlendirildi (Tablo 1).

6.1.3. ASO'ların katlanma serbest enerji tahmin bulguları

ASO'ların katlanma serbest enerjileri elde edildi (<https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/MaxExpect/MaxExpect.html>).

ASO1'in 1,6 (Şekil 9a), ASO2'nin 1,4 (Şekil 9e) ve ASO3'ün 1,3 (Şekil 9i) katlanma serbest enerji değerlerine göre ikincil yapıları tahmin edildi. ASO1, en yüksek katlanma serbest enerjisine sahip olduğu için en iyi ASO adayı olarak belirlendi. Katlanma serbest enerjilerine göre en iyi ASO adayı sıralaması: ASO1>ASO2>ASO3'tür.

6.1.4. ASO'ların hibrit serbest enerji tahmin bulguları

ASO'ların, HFE tahmin sonuçları elde edildi (<https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/DuplexFold/DuplexFold.html>).

ASO1'in -24,5 (Şekil 9b), ASO2'nin -26,2 (Şekil 9f) ve ASO3'ün -26,6 (Şekil 9j) HFE konformasyonuna göre katlanmaları tahmin edildi. İçlerinden ASO1 en yüksek HFE'ye sahip olduğu için en iyi ASO adayı olarak belirlendi. HFE'ye göre en iyi ASO adayı sıralaması: ASO1>ASO2>ASO3'tür.

6.1.5. ASO'ların konsantrasyon ve ısı kapasitesi tahmin bulguları

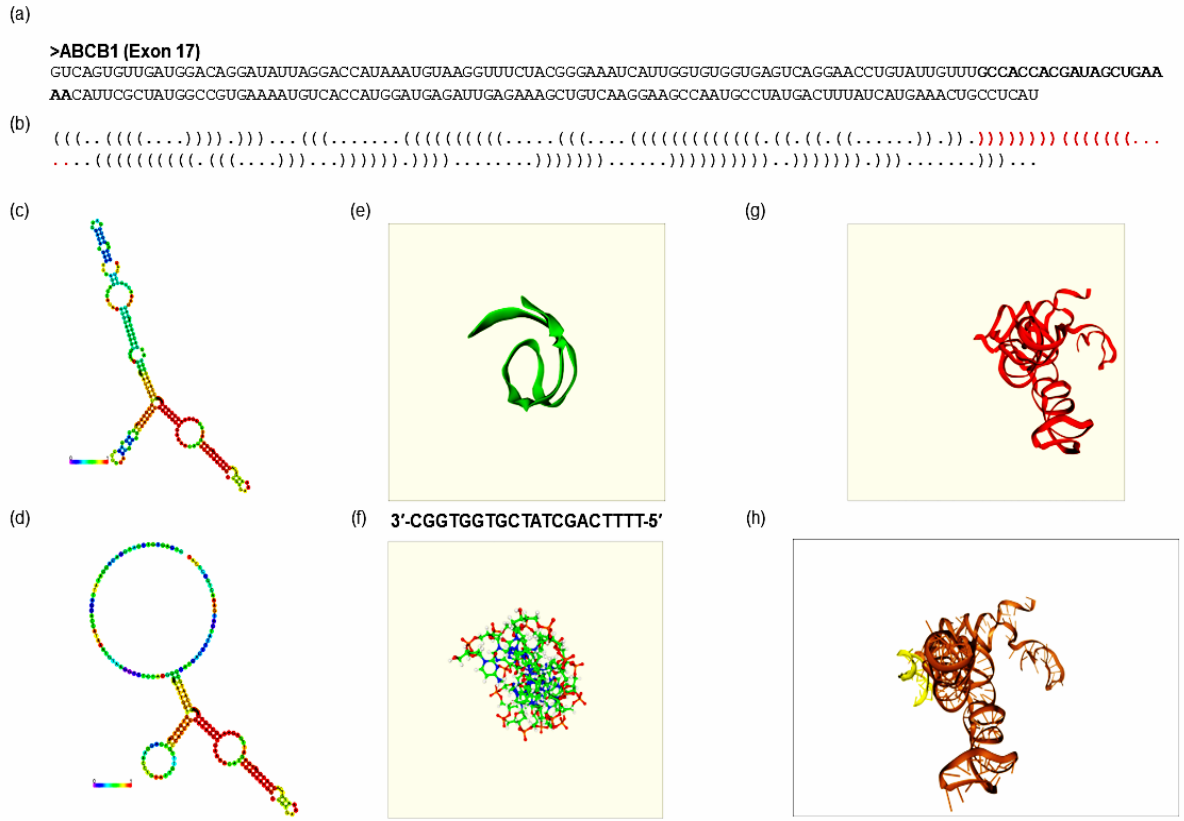
ASO'ların, TmConc ve TmCp grafikleri, DINAMelt server (<http://www.unafold.org/hybrid2.php>) kullanılarak homodimer simülasyonları uygulaması ile elde edildi. ASO1 için 36,5 TmConc ve 35,2 TmCp değerleri elde edildi (Şekil 9c ve Şekil 9d). ASO2 için 50,5 TmConc ve 41,5 TmCp değerleri elde edildi (Şekil 9g ve Şekil 9h). ASO3 için 65,7 TmConc ve 54,9 değerleri elde edildi (Şekil 9k ve Şekil 9l). İçlerinden ASO3, en yüksek TmConc ve TmCp değerlerine sahip olduğu için en kararlı ASO adayı olarak değerlendirildi. Tm değerlerine göre en kararlı ASO adayı sıralaması: ASO3>ASO2>ASO1'dir.

6.1.6. ASO'ların üçüncül yapı tahmin bulguları

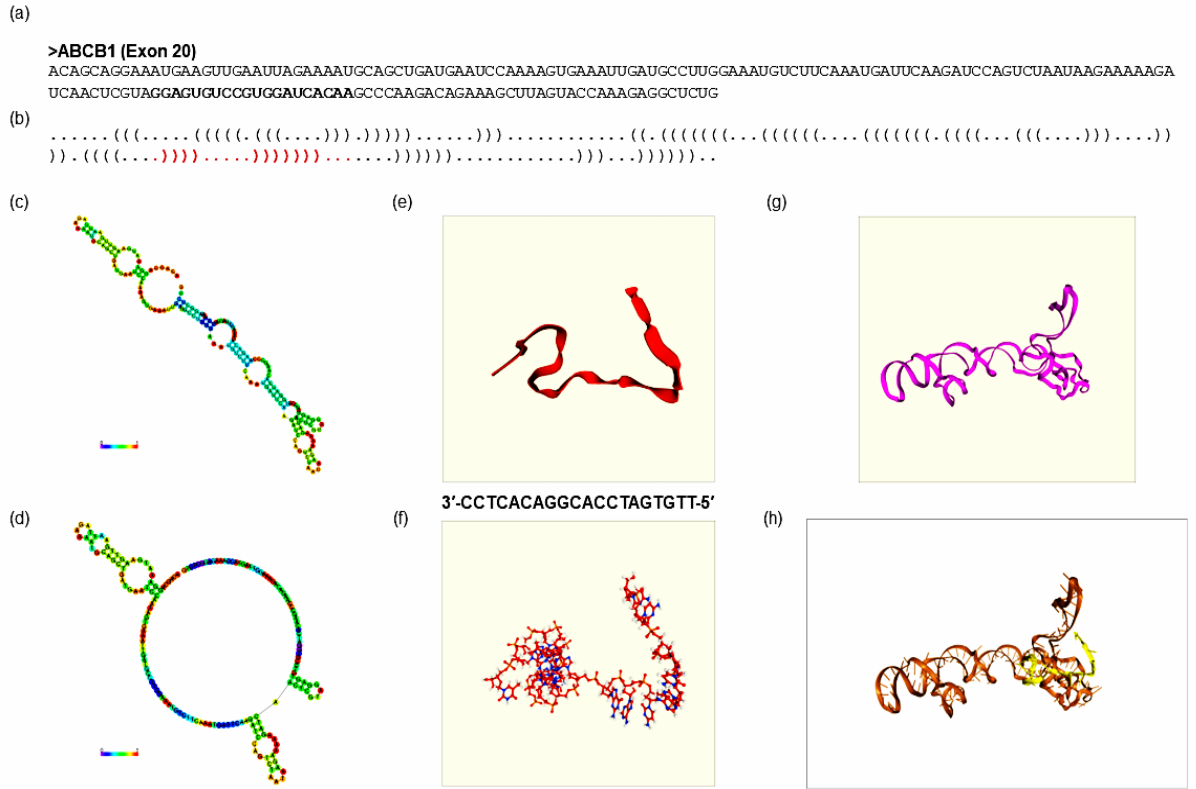
ASO'ların üçüncül yapılarına ait modeller ve skorlar elde edildi (<http://biophy.hust.edu.cn/3dRNA>). Yapılan tahminler içerisinde en düşük skora sahip olan ASO 3D modeli tercih edildi. ASO1 için 11,2472 skorlu model (Şekil 6e ve Şekil 6f), ASO2 için 6,37399 skorlu model (Şekil 7e ve Şekil 7f) ve ASO3 için 18,596 skorlu model (Şekil 8e ve Şekil 8f) seçildi.

6.1.7. Hedef ABCB1 eksonları ile ASO'ların etkileşim tahmin bulguları

Ekson 10 (192 bp) ile ASO1'in, ekson 17 (204 bp) ile ASO2'nin ve ekson 20 (177 bp) ile ASO3'ün RNA-DNA etkileşimlerine ait modeller elde edildi (<http://huanglab.phys.hust.edu.cn/hnadock/>). Ekson 10 (192 bp) ile ASO1'in RNA-DNA etkileşim sonucuna göre docking enerji skoru -228,62 ve ligand rmsd değeri 235,61'dir (Şekil

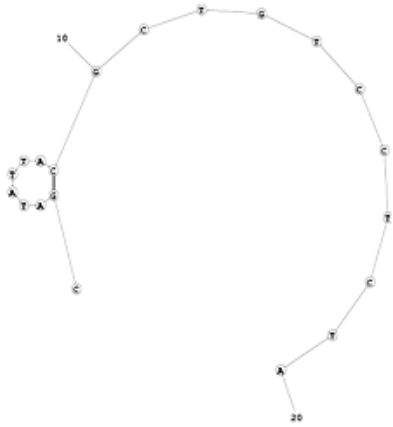


Şekil 7. ASO2'nin ABCB1 ekson 17 ile RNA-DNA etkileşim tahmini. (a) ABCB1-ekson 17'nin FASTA dizisi (NCBI, NM_001348945.2). (b) ABCB1-ekson 17'nin nokta parantez gösteriminde minimum serbest enerji tahmini (Vienna formatı, RNAfold web sunucusu). Nokta parantez gösterimindeki bir nokta, eşleşmeyen bir konumu temsil ederken, bir eşleşme, parantezler ile gösterilmektedir. (c) ABCB1-ekson 17'nin MFE ikincil yapısı (-48,80 kcal/mol, RNAfold web sunucusu). (d) ABCB1-ekson 17'nin sentroid ikincil yapısı (-33,50 kcal/mol, RNAfold web sunucusu). (e, f) ASO2'nin tersiyer yapı tahmini (Skor: 6,37399, 3dRNA/DNA web sunucusu) (g) ABCB1-ekson 17'nin tersiyer yapı tahmini (Skor: 26,4863, 3dRNA/DNA web sunucusu). (h) ABCB1-ekson 17'nin ASO2 ile RNA-DNA etkileşim tahmini (Docking skoru: -121,49, Ligand rmsd: 169,90, HNADOCK sunucusu).

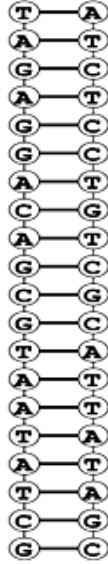


Şekil 8. ASO3'ün ABCB1 ekson 20 ile RNA-DNA etkileşim tahmini. (a) ABCB1-ekson 20'nin FASTA dizisi (NCBI, NM_001348945.2). (b) ABCB1-ekson 20'nin nokta parantez gösteriminde minimum serbest enerji tahmini (Viyana formatı, RNAfold web sunucusu). Nokta parantez gösterimindeki bir nokta, eşleşmeyen bir konumu temsil ederken, bir eşleşme, parantezler ile gösterilmektedir. (c) ABCB1-ekson 20'nin MFE ikincil yapısı (-29,30 kcal/mol, RNAfold web sunucusu). (d) ABCB1-ekson 20'nin sentroid ikincil yapısı (-14,50 kcal/mol, RNAfold web sunucusu). (e, f) ASO3'ün tersiyer yapı tahmini (Skor: 18,596, 3dRNA/DNA web sunucusu) (g) ABCB1-ekson 20'nin tersiyer yapı tahmini (Skor: 26,6531, 3dRNA/DNA web sunucusu). (h) ASO3'ün ABCB1-ekson 20 ile RNA-DNA etkileşim tahmini (Docking skoru: -260,03, Ligand rmsd: 355,38, HNADOCK sunucusu).

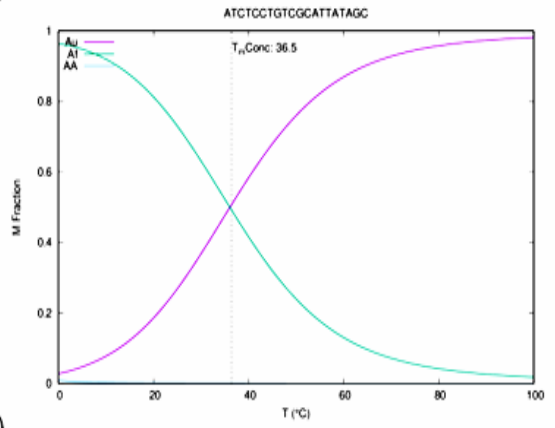
(a)



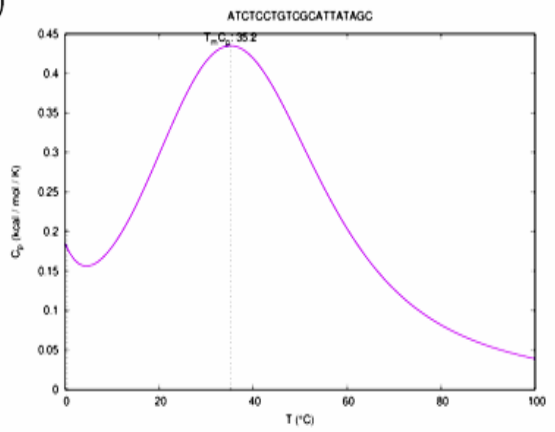
(b)



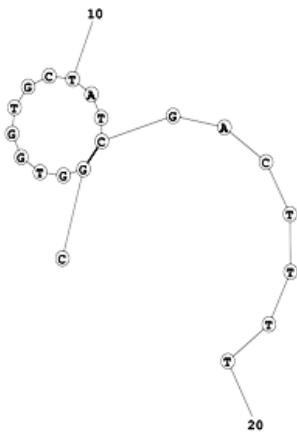
(c)



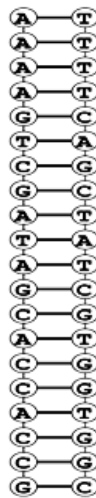
(d)



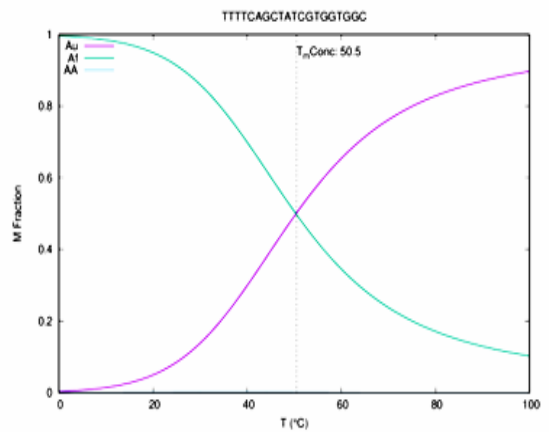
(e)



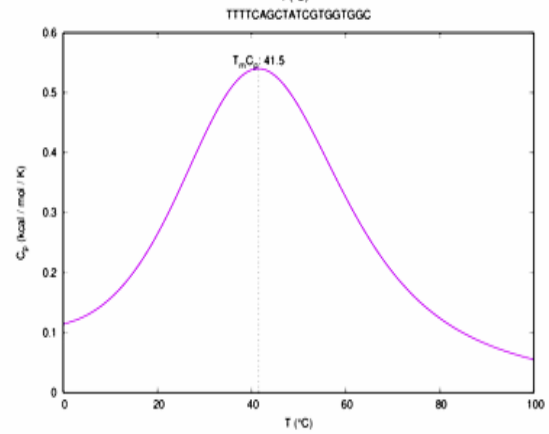
(f)

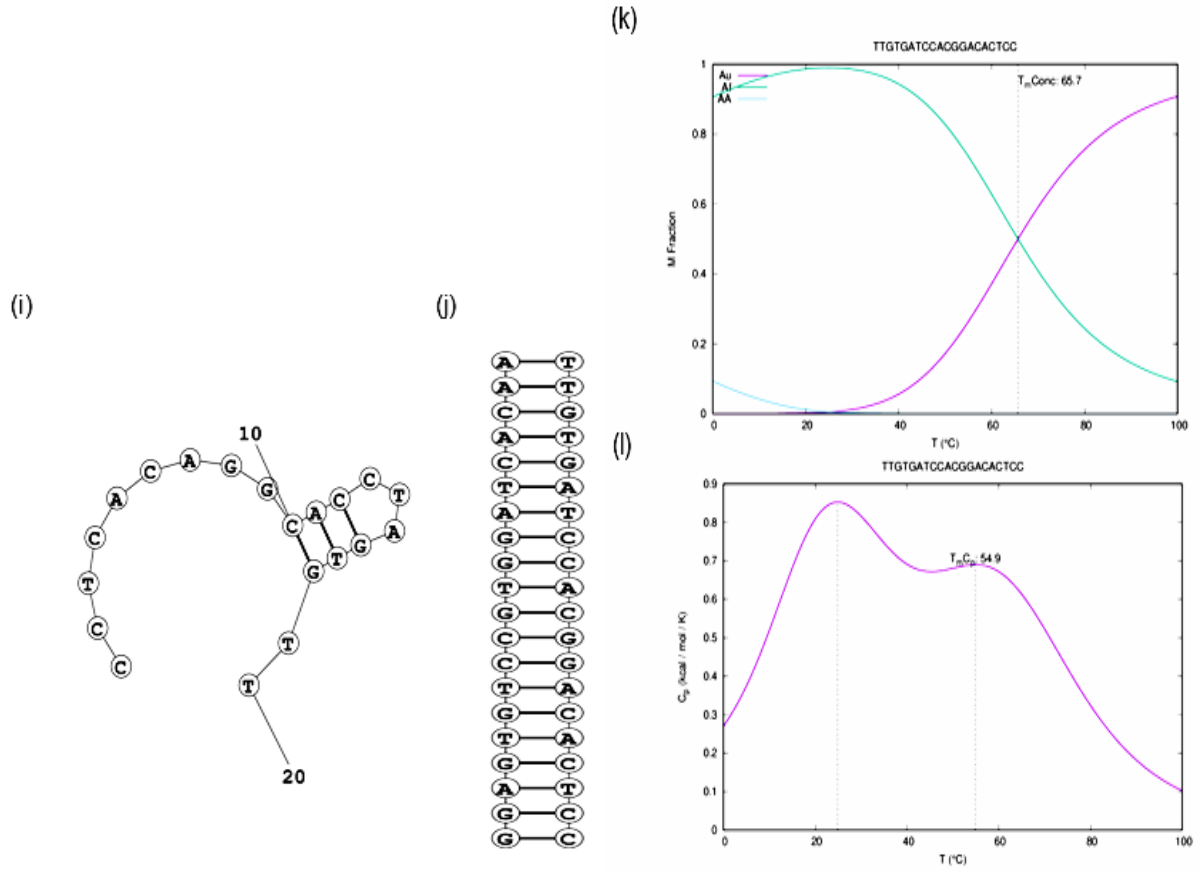


(g)



(h)





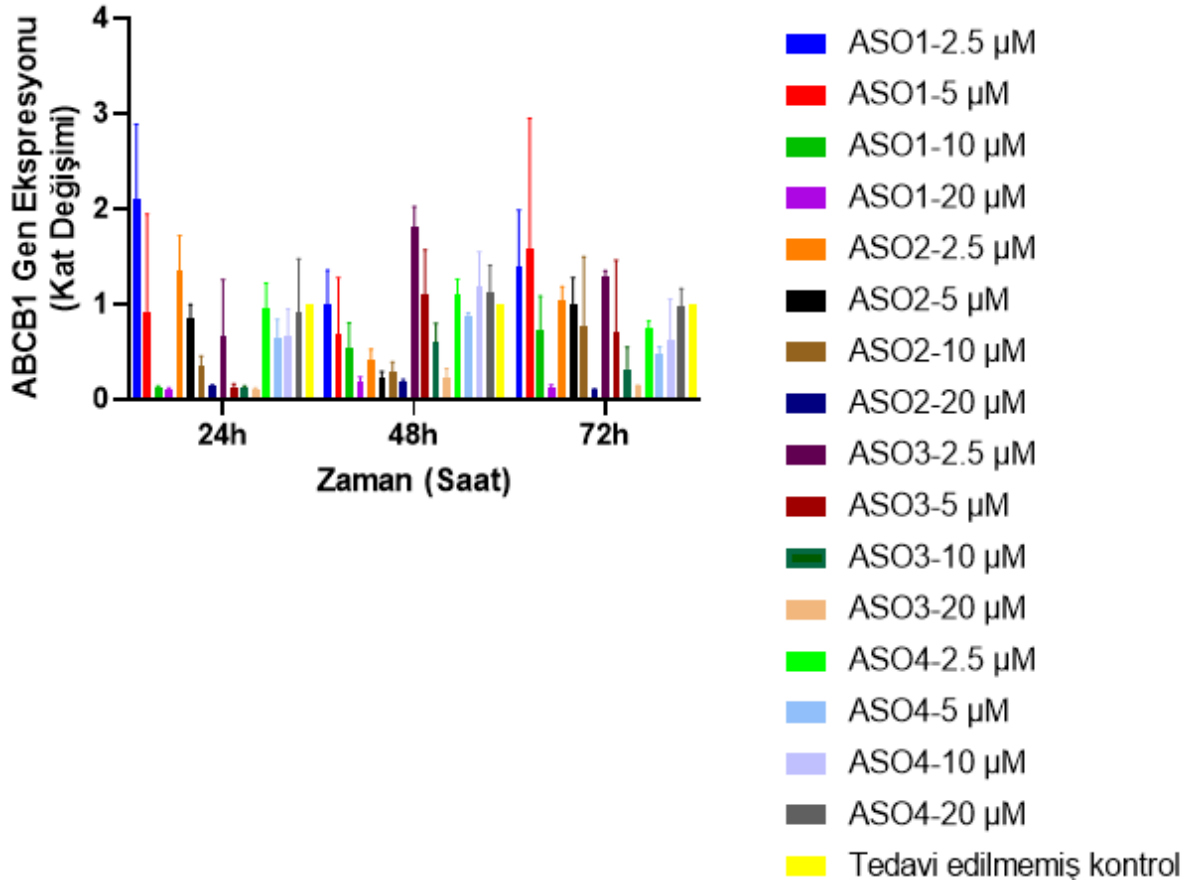
Şekil 9. ASO'ların enerji, konsantrasyon ve ısı kapasitesi tahminleri. (a) ASO1'in katlanma serbest enerjisi (1,6). (b) ASO1'in hibrit serbest enerjisi (-24,5). (c, d) ASO1 konsantrasyon (TmConc: 36,5) ve ısı kapasitesi (TmCp: 35,2) grafikleri. (e) ASO2'nin (1,4) katlanma serbest enerjisi. (f) ASO2'nin hibrit serbest enerjisi (-26,2). (g, h) ASO2 konsantrasyon (TmConc: 50,5) ve ısı kapasitesi (TmCp: 41,5) grafikleri. (i) ASO3'ün (1,3) katlanma serbest enerjisi. (j) ASO3'ün hibrit serbest enerjisi (-26,6). (k, l) ASO3 konsantrasyon (TmConc: 65,7) ve ısı kapasitesi (TmCp: 54,9) grafikleri.

6.2. ABCB1-MDR1 Ekspresyon Bulguları

6.2.1. ABCB1-MDR1 gen ekspresyonu qRT-PCR bulguları

HepG2 hücrelerine, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M konsantrasyonlarında GalNAc-ASO (GalNAc-ASO1, GalNAc-ASO2 ve GalNAc-ASO3) ve negatif kontrol (GalNAc-ASO4) uygulanmıştır. 24, 48 ve 72 saat sonra hedef ABCB1-MDR1 geninin relatif ekspresyonuna ait qRT-PCR sonucu paylaşılmıştır (Şekil 10 ve Tablo 8). HepG2 hücrelerinde tedavi edilmemiş gruplara göre GalNAc-ASO1, GalNAc-ASO2 ve GalNAc-ASO3'ün, 24, 48 ve 72 saat için 20 μ M konsantrasyonu ABCB1-MDR1 gen ekspresyonunu azaltmıştır. GalNAc-ASO1 10 μ M, GalNAc-ASO3 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonları için istatistiksel anlamlı sonuçlar sadece 24 saat sonra elde edilebilmiştir (Tablo 8).

Hep G2
(İnsan Hepatosellüler Karsinom)



Şekil 10. Relatif ABCB1-MDR1 gen ekspresyon analizi sonuçları (2,5 µM, 5 µM, 10 µM ve 20 µM konsantrasyonlarında GalNAc-ASO (GalNAc-ASO1, GalNAc-ASO2 ve GalNAc-ASO3) ve negatif kontrol (GalNAc-ASO4) uygulanan (24, 48 ve 72 saat) HepG2 hücrelerinde, ABCB1-MDR1 gen ekspresyonu, GAPDH ile normalize edildi. İki yönlü varyans analizi ile değerlendirildi. GraphPad Prism 9.3.0. *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001).

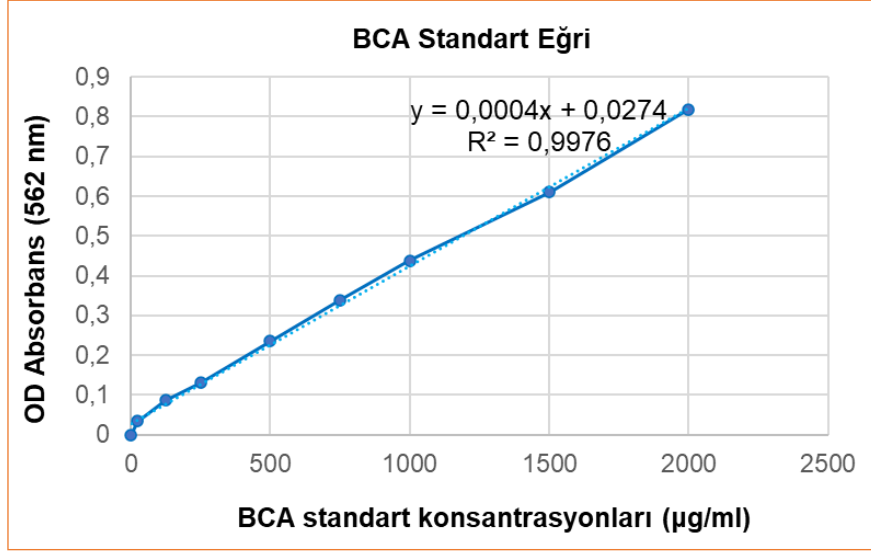
Tablo 8. GalNAc-ASO konsantrasyonlarına ait relatif ABCB1-MDR1 gen ekspresyonlarının karşılaştırması

GraphPad Prism: Relatif ABCB1-MDR1 gen ekspresyonu				
<i>Dunnett'in Çoklu Karşılaştırmalar Testi</i>	<i>Ortalama Fark</i>	<i>%95 Güven Aralığı</i>	<i>Özet</i>	<i>Düzeltilmiş P Değeri</i>
24h				
Kontrol - ASO1-10 µM	0,8825	0,3947 - 1,370	*	0,0273
Kontrol - ASO1-20 µM	0,8920	0,6259 - 1,158	*	0,0158
Kontrol - ASO2-20 µM	0,8665	0,4969 - 1,236	*	0,0212
Kontrol - ASO3-5 µM	0,8795	0,007324 - 1,752	*	0,0496
Kontrol - ASO3-10 µM	0,8785	0,4794 - 1,278	*	0,0224
Kontrol - ASO3-20 µM	0,8900	0,7422 - 1,038	**	0,0069
48h				
Kontrol - ASO2-20 µM	0,8170	0,2553 - 1,379	*	0,0345
72h				
Kontrol - ASO1-20 µM	0,8760	0,3143 - 1,438	*	0,0320
Kontrol - ASO2-20 µM	0,9070	0,5227 - 1,291	*	0,0211
Kontrol - ASO3-20 µM	0,8630	0,6265 - 1,100	*	0,0144

2,5 µM, 5 µM, 10 µM ve 20 µM konsantrasyonlarında GalNAc-ASO (GalNAc-ASO1, GalNAc-ASO2 ve GalNAc-ASO3) ve negatif kontrol (GalNAc-ASO4) uygulanan (24, 48 ve 72 saat) HepG2 hücrelerinde, ABCB1-MDR1 gen ekspresyonu, GAPDH ile normalize edildi. İki yönlü varyans analizi ile değerlendirildi. GraphPad Prism 9.3.0. *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001).

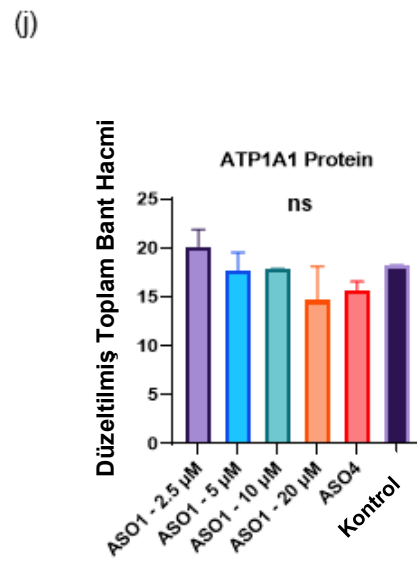
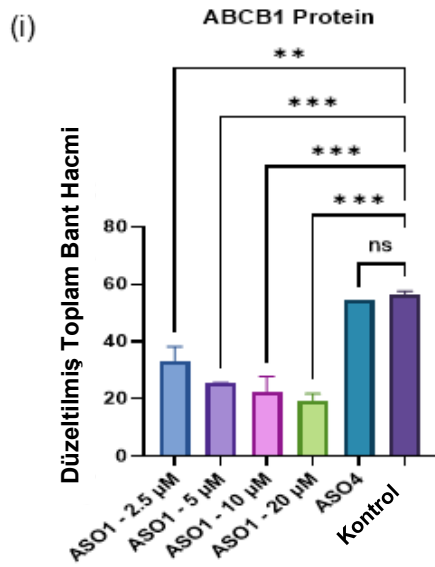
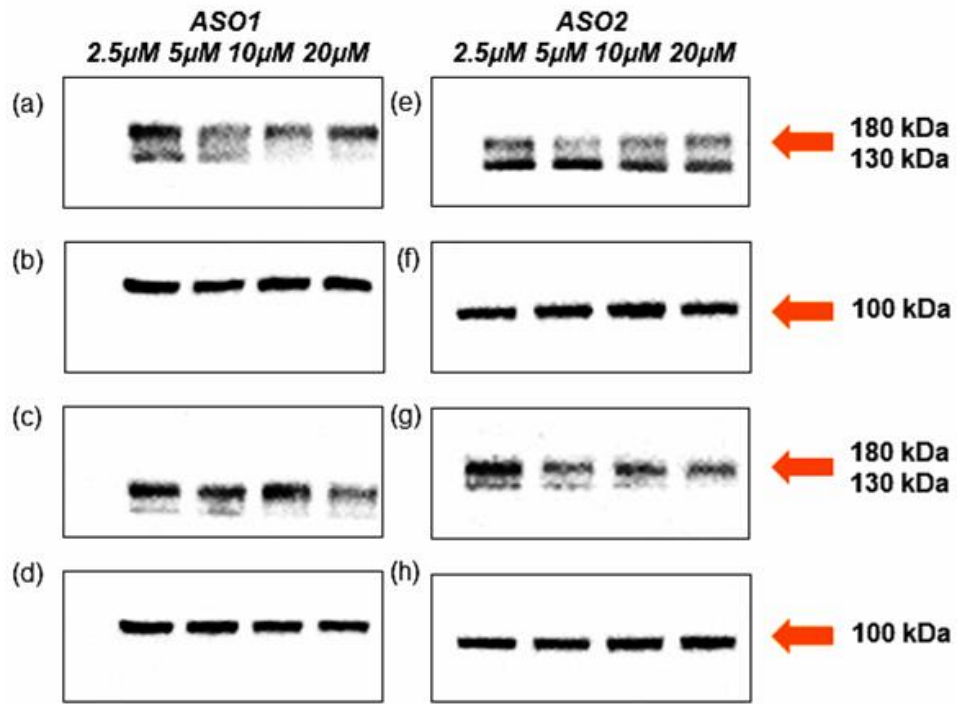
6.2.2. ABCB1-MDR1 protein ekspresyonu western blot bulguları

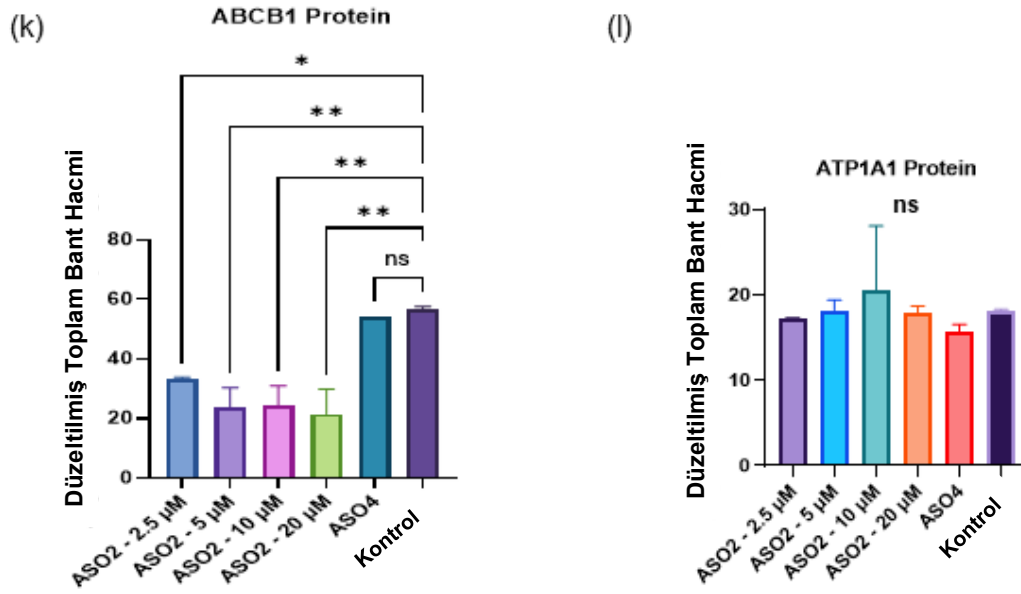
HepG2 hücrelerine ait total protein miktarı, BCA testi ile değerlendirildi (Şekil 11).



Şekil 11. BCA standart eğri grafiği

HepG2 hücreleri belirtildiği gibi (2,5 µM, 5 µM, 10 µM ve 20 µM) farklı GalNac-ASO (GalNac-ASO1, GalNac-ASO2 ve GalNac-ASO3) ve GalNac-ASO4 (negatif kontrol) konsantrasyonları uygulanmıştır. Hedef ABCB1 ve referans ATP1A1 proteinlerinin 72 saat sonraki western blot bant sonuçları Şekil 12a-1, Tablo 9 ve Tablo 10; Şekil 13a-p, Tablo 11, Tablo 12 ve Tablo 13'de sunulmuştur. GalNac-ASO1, GalNac-ASO2 ve GalNac-ASO3 (2,5 µM hariç) ile tedavi edilen HepG2 hücrelerinde, ABCB1'in toplam bant hacmi tedavi edilmeyen gruba kıyasla azalmıştır. Ayrıca, referans protein ATP1A1'in toplam bant hacminde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. GalNac-ASO4, ABCB1 ve ATP1A1'in toplam bant hacmini önemli ölçüde değiştirmemiştir. Sonuçlar, GalNac-ASO1'in tüm konsantrasyonlarında, relatif ABCB1 protein ekspresyonunu azalttığını göstermektedir. Benzer şekilde, GalNac-ASO2, relatif ABCB1'in protein ekspresyonunu 2,5 µM hariç tüm konsantrasyonlarda azaltmıştır. GalNac-ASO3'ün 10 µM konsantrasyonunda, relatif ABCB1'in protein ekspresyonunu da azaltmıştır. GalNac-ASO4'ün relatif ABCB1 protein ekspresyonu üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır (Şekil 13r ve Tablo 14).





Şekil 12. GalNAc-ASO1 ve GalNAc-ASO2 tedavisi uygulanmış HepG2 hücrelerine ait ABCB1-MDR1 (130-180 kDa) ve ATP1A1 (100 kDa) western blot sonuçları (72. saat). (a, c, e, g) ABCB1-MDR1 proteinine ait western blot bant görüntüleri (ChemiDoc MP, Bio-Rad). (b, d, f, h) ATP1A1 proteinine ait western blot bant görüntüleri (ChemiDoc MP, Bio-Rad). (i, j, k, l) ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot bantları analizinin GalNAc-ASO konsantrasyonlarına göre karşılaştırması (Tek yönlü varyans analizi, GraphPad Prism 9.3.0. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

Tablo 9. GalNAc-ASO1 tedavisi uygulanmış HepG2 hücrelerine ait ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot toplam bant hacmi

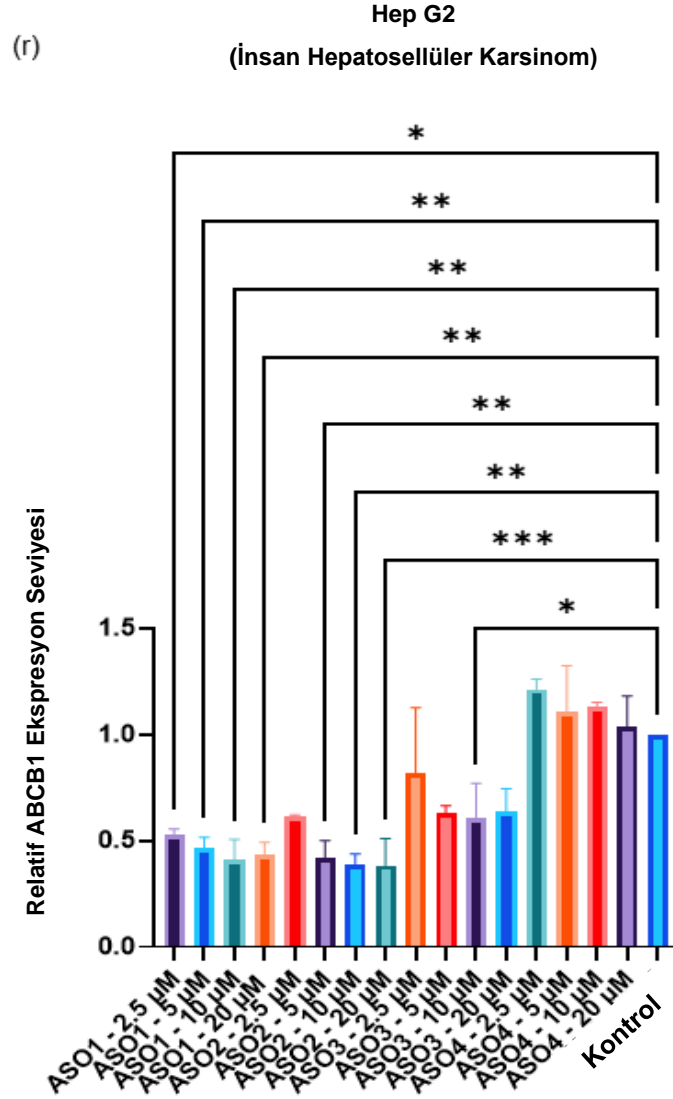
ChemiDoc MP - Image Lab 6.1: Düzeltilmiş Toplam Bant Hacmi (Yoğunluk)				
Kuyular / Membranlar	Kuyu 1 (2,5 μM ASO1)	Kuyu 2 (5 μM ASO1)	Kuyu 3 (10 μM ASO1)	Kuyu 4 (20 μM ASO1)
a. ABCB1	36,813	25,578	18,948	21,169
b. ATP1A1	21,422	16,277	17,803	17,127
c. ABCB1	29,907	25,066	26,327	17,842
d. ATP1A1	18,940	19,003	17,889	12,177
a + c Ortalama (SS)	33,360 (4,883)	25,322 (0,362)	22,638 (5,218)	19,506 (2,353)
b + d Ortalama (SS)	20,181 (1,755)	17,640 (1,928)	17,846 (0,061)	14,652 (3,500)

Image Lab (Version 6.1, Bio-Rad) program ile analiz edildi. ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot bantları analizinin GalNAc-ASO1 konsantrasyonlarına göre karşılaştırması (Tek yönlü varyans analizi, GraphPad Prism 9.3.0. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

Tablo 10. GalNAc-ASO2 tedavisi uygulanmış HepG2 hücrelerine ait ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot toplam bant hacmi

ChemiDoc MP - Image Lab 6.1: Düzeltilmiş Toplam Bant Hacmi (Yoğunluk)				
<i>Kuyular / Membranlar</i>	<i>Kuyu 1 (2,5 μM ASO2)</i>	<i>Kuyu 2 (5 μM ASO2)</i>	<i>Kuyu 3 (10 μM ASO2)</i>	<i>Kuyu 4 (20 μM ASO2)</i>
a. ABCB1	33,703	28,454	29,096	27,402
b. ATP1A1	17,322	19,074	25,912	18,476
c. ABCB1	32,639	19,325	19,913	15,650
d. ATP1A1	17,261	17,388	15,282	17,278
a + c Ortalama (SS)	33,171 (0,7524)	23,890 (6,4558)	24,505 (6,4933)	21,526 (8,3097)
b + d Ortalama (SS)	17,291 (0,0431)	18,231 (1,1924)	20,597 (7,5162)	17,877 (0,8471)

Image Lab (Version 6.1, Bio-Rad) program ile analiz edildi. ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot bantları analizinin GalNAc-ASO2 konsantrasyonlarına göre karşılaştırması (Tek yönlü varyans analizi, GraphPad Prism 9.3.0. *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001).



Şekil 13. GalNac-ASO3, GalNac-ASO4 tedavisi uygulanmış ve tedavi uygulanmamış HepG2 hücrelerine ait ABCB1-MDR1 (130-180 kDa) ve ATP1A1 (100 kDa) western blot sonuçları (72. saat). (a, c, e, g, i, k) ABCB1-MDR1 proteinine ait western blot bant görüntüleri (ChemiDoc MP, Bio-Rad). (b, d, f, h, j, l) ATP1A1 proteinine ait western blot bant görüntüleri (ChemiDoc MP, Bio-Rad). (m, n, o, p) ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot bantları analizinin GalNac-ASO konsantrasyonlarına göre karşılaştırılması (Tek yönlü varyans analizi, GraphPad Prism 9.3.0. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$). (r) GalNac-ASO konsantrasyonlarına ait relatif ABCB1-MDR1 protein ekspresyonlarının karşılaştırılması (Western blot analizinde ABCB1-MDR1 protein düzeyi, ATP1A1 proteini ile normalize edildi (Tek yönlü varyans analizi, GraphPad Prism 9.3.0. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$). (s, t, v) ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot bantları analizi (Image Lab Version 6.1, Bio-Rad).

Tablo 11. GalNAc-ASO3 tedavisi uygulanmış HepG2 hücrelerine ait ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot toplam bant hacmi

ChemiDoc MP - Image Lab 6.1: Düzeltilmiş Toplam Bant Hacmi (Yoğunluk)				
<i>Kuyular / Membranlar</i>	<i>Kuyu 1 (2,5 µM ASO3)</i>	<i>Kuyu 2 (5 µM ASO3)</i>	<i>Kuyu 3 (10 µM ASO3)</i>	<i>Kuyu 4 (20 µM ASO3)</i>
a. ABCB1	34,853	34,684	34,323	32,544
b. ATP1A1	18,352	16,891	15,151	14,563
c. ABCB1	42,169	22,611	23,239	26,430
d. ATP1A1	13,200	12,081	15,465	15,401
a + c Ortalama (SS)	38,511 (5,173)	28,647 (8,537)	28,781 (7,838)	29,487 (4,323)
b + d Ortalama (SS)	15,776 (3,643)	14,486 (3,402)	15,308 (0,222)	14,982 (0,593)

Image Lab (Version 6.1, Bio-Rad) program ile analiz edildi. ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot bantları analizinin GalNAc-ASO3 konsantrasyonlarına göre karşılaştırması (Tek yönlü varyans analizi, GraphPad Prism 9.3.0. *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001).

Tablo 12. GalNAc-ASO4 tedavisi uygulanmış HepG2 hücrelerine ait ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot toplam bant hacmi

ChemiDoc MP - Image Lab 6.1: Düzeltilmiş Toplam Bant Hacmi (Yoğunluk)				
<i>Kuyular / Membranlar</i>	<i>Kuyu 1 (2,5 µM ASO4)</i>	<i>Kuyu 2 (5 µM ASO4)</i>	<i>Kuyu 3 (10 µM ASO4)</i>	<i>Kuyu 4 (20 µM ASO4)</i>
a. ABCB1	61,980	59,664	48,141	47,494
b. ATP1A1	15,857	19,931	13,404	16,145
c. ABCB1	62,049	48,219	56,582	50,362
d. ATP1A1	17,091	12,408	16,444	14,336
a + c Ortalama (SS)	62,014 (0,048)	53,942 (8,093)	52,361 (5,969)	48,928 (2,028)
b + d Ortalama (SS)	16,474 (0,873)	16,170 (5,320)	14,924 (2,149)	15,241 (1,279)

Image Lab (Version 6.1, Bio-Rad) program ile analiz edildi. ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot bantları analizinin GalNAc-ASO4 konsantrasyonlarına göre karşılaştırması (Tek yönlü varyans analizi, GraphPad Prism 9.3.0. *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001).

Tablo 13. Tedavi uygulanmamış HepG2 hücrelerine ait ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot toplam bant hacmi

ChemiDoc MP - Image Lab 6.1: Düzeltilmiş Toplam Bant Hacmi (Yoğunluk)					
Kuyular / Membranlar	Kuyu 1 (Kontrol)	Kuyu 2 (Kontrol)	Kuyu 3 (Kontrol)	Kuyu 4 (Kontrol)	Ortalama (SS)
a. ABCB1	62,980	58,774	61,043	55,160	59,489 (3,359)
b. ATP1A1	18,003	17,781	19,029	17,201	18,003 (0,763)
c. ABCB1	57,381	61,659	47,840	47,450	53,583 (7,077)
d. ATP1A1	18,205	19,085	18,496	17,610	18,349 (0,614)
a + c	60,181	60,216	54,442	51,305	56,536 (4,419)
b + d	18,104	18,433	18,763	17,405	18,176 (0,580)

Image Lab (Version 6.1, Bio-Rad) program ile analiz edildi. ABCB1-MDR1 ve ATP1A1 western blot bantları analizinin negatif kontrol karşılaştırması (Tek yönlü varyans analizi, GraphPad Prism 9.3.0. *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001).

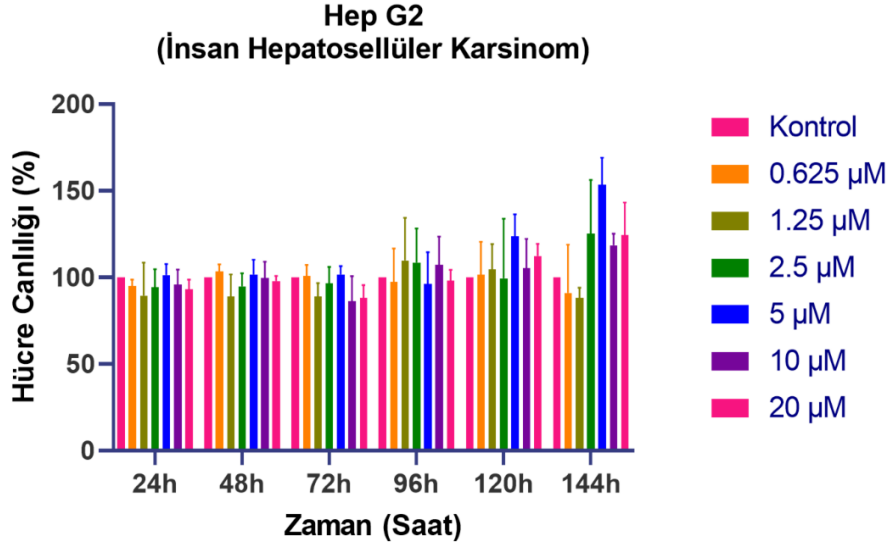
Tablo 14. GalNAc-ASO konsantrasyonlarına ait relatif ABCB1-MDR1 protein ekspresyonlarının karşılaştırması

GraphPad Prism: ABCB1-MDR1 tek yönlü varyans analizi				
Dunnett'in Çoklu Karşılaştırmalar Testi	Ortalama Fark	%95 Güven Aralıkları	Özet	Düzeltilmiş P Değeri
Kontrol - ASO1 - 2,5 µM	0,47	0,08642 - 0,8536	*	0,0118
Kontrol - ASO1 - 5 µM	0,5355	0,1519 - 0,9191	**	0,0039
Kontrol - ASO1 - 10 µM	0,5920	0,2084 - 0,9756	**	0,0015
Kontrol - ASO1 - 20 µM	0,5655	0,1819 - 0,9491	**	0,0023
Kontrol - ASO2 - 5 µM	0,5820	0,1984 - 0,9656	**	0,0018
Kontrol - ASO2 - 10 µM	0,6095	0,2259 - 0,9931	**	0,0011
Kontrol - ASO2 - 20 µM	0,6165	0,2329 - 1,000	***	0,0010
Kontrol - ASO3 - 10 µM	0,3955	0,01192 - 0,7791	*	0,0412

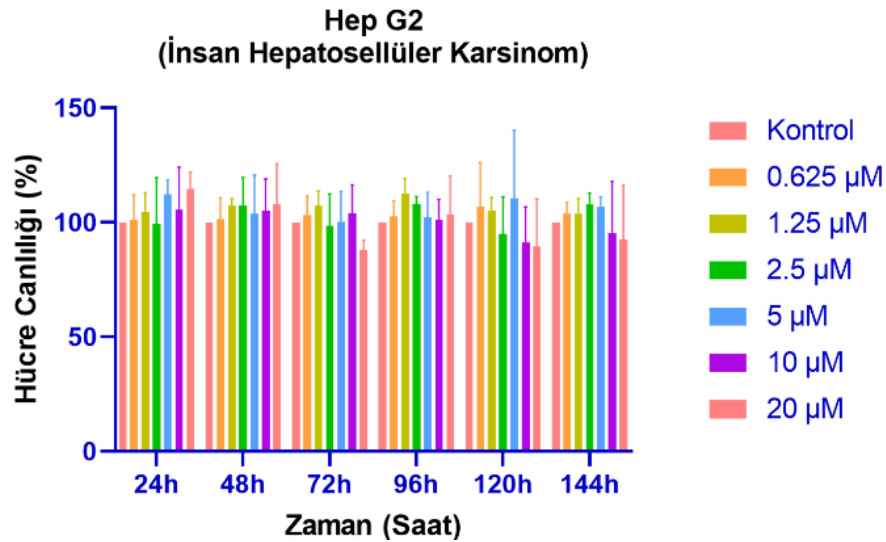
2,5 µM, 5 µM, 10 µM ve 20 µM konsantrasyonlarında GalNAc-ASO (GalNAc-ASO1, GalNAc-ASO2 ve GalNAc-ASO3) ve negatif kontrol (GalNAc-ASO4) uygulanan (24, 48 ve 72 saat) HepG2 hücrelerinde, ABCB1-MDR1 protein ekspresyonu, ATP1A1 ile normalize edildi. İki yönlü varyans analizi ile değerlendirildi. GraphPad Prism 9.3.0. *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001).

6.3. Hücre Canlılığı Bulguları

HepG2 hücrelerine, negatif kontrolün (GalNAc-ASO4) artan konsantrasyonları (0,625 μ M, 1,125 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M) uygulanmıştır. 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saatlerine ait MTT (Şekil 14) ve resazurin (Şekil 15) hücre canlılık analizine göre GalNAc-ASO4 sitotoksik etki göstermemektedir.



Şekil 14. HepG2 hücrelerine uygulanan GalNAc-ASO4 konsantrasyonlarına ait MTT canlılık (%) analizi sonuçları (Kontrol grubu %100 olarak kabul edildi ve tedavi sonrası (24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat), GalNAc-ASO4 konsantrasyonlarının hücre canlılığına olan etkisi iki yönlü varyans analizi ile değerlendirildi, GraphPad Prism 9.3.0. $P > 0.05$, p değeri anlamlı değildir).



Şekil 15. HepG2 hücrelerine uygulanan GalNAc-ASO4 konsantrasyonlarına ait resazurin canlılık (%) analizi sonuçları (Kontrol grubu %100 olarak kabul edildi ve tedavi sonrası (24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat), GalNAc-ASO4 konsantrasyonlarının hücre canlılığına olan etkisi

iki yönlü varyans analizi ile değerlendirildi, GraphPad Prism 9.3.0. $P > 0.05$, p değeri anlamlı değildir).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, ABCB1 inhibitörü olarak tasarlanan GalNAc-konjuge PTO-ASO'ların HepG2 hücrelerindeki etkinliği araştırılmıştır. *In silico* analiz ile seçilen GalNAc-ASO konjugatları HepG2 hücrelerine herhangi bir taşıyıcı sistem kullanılmadan gimnotik iletim ile uygulanmış ve ABCB1 ekspresyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Bu çalışmada, FDA onaylı birinci nesil antiviral ilaç fomivirsen'deki (21 nt) PTO-DNA-ASO (20 nt) motifi kullanılmıştır (Roush, 1997). Birinci nesil ASO'lar, PO bağlı ON'lere kıyasla nükleaz bozunmasına karşı daha dirençlidir. PTO-ASO'lar albümin gibi serum proteinlerine güçlü bir şekilde bağlanmaktadır. Böylelikle, böbrek klirensini azaltmaktadır ve daha uzun süre *in vivo* dolaşımı sağlamaktadır (Batista-Duharte; Dhuri ve ark., 2020). Bununla birlikte, nispeten düşük afinite, sınırlı özgüllük gibi spesifik olmayan etkileri ve *in vitro* yüksek konsantrasyona bağlı toksik etkileri *in vivo* yararlı terapötik etkilerini sınırlamaktadır (Yoo, 2004; Krieg, 2019).

Stein ve ark. (2009) tarafından geliştirilen gimnozis yöntemine göre, hücrelerde ASO alımı bir taşıyıcı sistem gerektirmemektedir. Modifiye ASO'lar, hücrelere uygulanan düşük ilaç konsantrasyonlarına benzer şekilde, 2D veya 3D modellerde adherent veya süspansede halindeki hücrelerin hedeflenen şekilde susturulmasını sağlamaktadır. Ayrıca araştırmacılar, ASO aracılı susturmanın, uygun prosedürler izlendiğinde çok az toksisite ile veya hiç toksisite olmadan yaklaşık 240 gün boyunca sürdürülebileceğini bildirmiştir (Stein ve ark., 2009).

González-Barriga ve ark. (2017), mikroskopik analiz yoluyla PTO omurgalı ASO'ların gimnozisi teşvik ettiğini göstermiştir. Gimnotik alımına klatrin aracılık ederek endozomal-lizozomal birikime yol açmaktadır. Gimnotik iletim yoluyla hücrelere iletilen ASO'ların nükleer RNA hedeflerinin ekspresyonunu etkili bir şekilde modüle ettiği bildirilmiştir (González-Barriga ve ark., 2017). PTO omurgalı ASO'ların hücreler tarafından gimnotik alımının, disülfid değişimi ile yönlendirilen hücre yüzey proteinlerine bağlanması ile gerçekleşen bir olgu olduğu bilinmektedir (Laurent ve ark., 2021; Weidner ve ark., 2023). ASO'lardaki tüm fosfat bağlarının en az %75'inin, hücresel alımın gerçekleşmesi için bir PTO omurgası gerektirdiği bildirilmiştir (Souleimanian ve ark., 2012; Hillebrand ve ark., 2019).

Weidner ve ark. (2023), tüm dizi modifikasyonu, omurga kimyası ve konjugasyon stratejilerini kullanarak antimiR'lerin, 2D ve 3D epitel hücre kültürlerinde gimnotik alımdaki etkinliği gösterilmiştir.

Ancak Soifer ve ark. (2011), modifiye edilmemiş PTO omurgalı ASO'ların, taşıyıcı bir araç kullanılmadığı sürece *in vitro* uygulamalarda inaktif olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle,

çalışmamızda PTO-DNA-ASO'ların 5' ucuna bir GalNAc C3 fosforamit ligandı ekleyerek PTO-DNA-ASO'ları hepatosit hücrelerine spesifik hale getirdik. ASO'ların hepatosit hücrelerine hızlı alımından faydalandık.

ASO terapötiklerinin afinitesini ve stabilitesini arttırmaya yönelik biyoteknolojik stratejiler, hücrelerde gimnotik iletim ve gimnozisin öneminin artmasına yol açmıştır (Anwar ve ark., 2023). Gimnotik iletimin etkinliği, ASO'ların küçük boyutlarından kaynaklanan avantajlarına ek olarak 3' ve/veya 5' uçlarında, nükleobazlarda, şeker halkasında ve omurga seviyesinde yapılan modifikasyonlar ile garanti altına alınmaktadır (Blenke ve ark., 2020). Gimnotik iletim, transfeksiyon prosedürlerinin uygulanabilir olmadığı durumlarda özellikle yararlıdır. Ek olarak, salin içinde verilebilen PTO-ASO'lar, lipidler gibi diğer formülasyonların ek toksik etkilerinden kaçınmak için *in vivo* olarak avantajlıdır (Gagnon & Corey, 2019). Hillebrand ve ark. (2019), modifiye ASO'ların gimnotik iletim yoluyla HIV-1 mRNA'sının degradasyonunu göstermiştir. Hillebrand ve ark. (2019), gimnozisin yoluyla hücrelere verilen LNA-ASO'ların, transfeksiyon reaktifleri yoluyla verilen siRNA'lar ile aynı sitoplazmik dağılımı sergilediğini bildirmiştir. ASO'ların gimnozisin ile aktarılması, gelecekteki *in vivo* deneylere geçişi kolaylaştıracak *in vitro* simülasyonlara aracılık etmektedir.

Deneyleri gerçekleştirmeden önce, tasarladığımız ASO'ların etkinliğini karşılaştırmak için hesaplamalı yöntemlerden yararlandık (Madanagopal ve ark., 2022; Uttarkar ve ark., 2022, Al-Madhagi, 2023; Chen & Ho, 2023). ASO'ların başarısını artırmak için geliştirilen *in silico* protokollerin yönergelerini izleyerek moleküler docking simülasyonları gerçekleştirdik (Uttarkar ve ark., 2022). Sonuç olarak, *in silico* koşullar altında ASO1'in en etkili ve ASO3'ün en kararlı olduğunu belirledik. Ekson hedeflemesi açısından, sırasıyla, ASO3, ASO1 ve ASO2 başarılı olmuştur. En yüksek katlanma serbest enerjisine sahip olan dizi en etkili dizidir (Madanagopal ve ark., 2022). ASO1, diğer moleküllere kıyasla daha yüksek katlanma serbest enerjisi nedeniyle en iyi aday olarak seçilmiştir. Benzer şekilde en yüksek HFE'ye sahip olan dizi en etkili dizidir. ASO1, daha yüksek HFE'ye sahip olduğu için en iyi aday olduğu düşünülmektedir. Katlanma serbest enerji tahmini ve HFE tahmininden elde edilen sonuçlar, uyumludur. ASO'ların Tm'si genellikle TmConc ve TmCp değerleri kullanılarak tahmin edilmektedir. Daha yüksek Tm değerleri genel olarak hem *in vitro* hem de *in vivo*'da artan etkinliğe karşılık gelmektedir (Madanagopal ve ark., 2022). Yüksek TmConc ve TmCp değerlerine dayanarak, ASO3 en kararlı ASO adayı olarak görülmektedir. Ayrıca, ekson 20'nin ASO3 ile, ekson 10'un ASO1 ile ve ekson 17'nin ASO2 ile moleküler docking enerji skorları sırasıyla daha yüksektir. 2D yapı tahminlerine göre, ekson 17, 20 ve 10'un sırasıyla ASO2, ASO3 ve ASO1 ile hibridizasyon için daha erişilebilir olduğu belirlenmiştir.

ABCB1 mRNA hedefi ile ASO'lar arasındaki etkileşim, 3000 nt'nin üzerindeki dizilerin analizine izin vermeyen nükleik asit 3D yapı tahmin sunucularındaki sınırlamalar nedeniyle tahmin edilememektedir (Wang ve ark., 2023). Bu nedenle, ASO'ların etkinliği eksonların 3D yapıları kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu protokollerin ve hesaplamalı yöntemlerin geliştirilecek yönleri olsa da, terapötik ASO'ların seçimini ve başarısını arttırmak için yeni bir fırsat sunmaktadır.

Klinik çalışmalar, ABCB1 ekspresyonunda 1,5-2 kat artışın kanser-MDR fenotipinin göstergesi olduğunu belirtmektedir. Markov ve ark. (2020), ON'ler tarafından ABCB1 ekspresyonunda %50'lik bir azalmanın hücrelerde vinblastin duyarlılığını geri kazanmak için yeterli olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, çalışmamızda, ABCB1'in hücredeki hayati fizyolojik rolü nedeniyle GalNAc modifiye PTO-ASO'ları kullanmayı seçtik. Bu ASO'lar, diğer hücrelerdeki ekspresyonları etkilemeden hepatositlerin ASGP-R'lerine spesifik olarak bağlanma özgülüğüne ve isteğine sahiptir.

Soifer ve ark. (2011) çalışmalarında, adherent HeLa hücreleri 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda LNA-modifiye ASO ile tedavi edilmiş ve 3. ve 6. günlerde Bcl-2 mRNA ve protein ekspresyonunun inhibisyonu ile sonuçlanmıştır. Çalışmamızda, HepG2 hücrelerinde, 24 saat sonra GalNAc-ASO1'in 10 μ M ve 20 μ M, GalNAc-ASO2'nin 20 μ M ve GalNAc-ASO3'ün ise 5 μ M, 10 μ M ve 20 μ M için ABCB1-MDR1 gen ekspresyonu azalmıştır ve istatistiksel olarak anlamlıdır. 48 saat sonra sadece GalNAc-ASO2'nin 20 μ M için ABCB1-MDR1 gen ekspresyonunu azalttığı, istatistiksel anlamlı sonuç elde edilmiştir. 72 saat sonra ise GalNAc-ASO1, GalNAc-ASO2 ve GalNAc-ASO3'ün 20 μ M konsantrasyonları, ABCB1-MDR1 gen ekspresyonunu azaltmıştır ve istatistiksel olarak anlamlıdır. Tüm GalNAc-ASO'lar için 20 μ M konsantrasyonlar, ABCB1-MDR1 gen ekspresyonunu baskılamak için uygun dozdur. Ardından, bu konsantrasyonların 72 saat sonra ABCB1-MDR1 protein ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Konsantrasyon arttıkça ABCB1-MDR1 protein ekspresyonu azalmaktadır.

HepG2 hücrelerinde, GalNAc-ASO1'in 2,5-20 μ M'ye kadar, GalNAc-ASO2'nin 5-20 μ M'ye kadar ve GalNAc-ASO3'ün ise 10 μ M için ABCB1-MDR1 protein ekspresyonu azalmıştır ve istatistiksel olarak anlamlıdır. Bununla birlikte, 20 μ M GalNAc-ASO3 konsantrasyonunda protein ekspresyonu için istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Ancak, GalNAc-ASO3 için 10 μ M konsantrasyonunda protein ekspresyonunu azaltan istatistiksel anlamlı sonuçlar elde edildiği için 20 μ M konsantrasyona yönelik ek deneylere ihtiyaç bulunmaktadır. Gen ekspresyonu sonuçları ile uyumlu olarak protein ekspresyonu için de 20 μ M'lik konsantrasyon, ABCB1-MDR1 protein ekspresyonunu baskılamak için uygun doz

olarak kabul edilebilir. Uygulanan tüm konsantrasyonlar için, GalNAc-ASO4 negatif kontrolün, hem ABCB1 protein ekspresyonu, hem de sitotoksisite üzerinde olumsuz bir etkisi olmamıştır.

Farmasötik ilaçlar ana etki mekanizmaları dışında, ksenobiyotik metabolizmasında yer alan ABCB1 taşıyıcısının inhibitörleri, substratları veya indükleyicileri olarak etki edebilirler (Yu ve ark., 2017). Anti-kanser ilaçları, ABCB1'in proksimal promotörün hipermetilasyonunu indükleyerek distal promotörü için bir tercihe yol açmaktadır. Sonuç olarak, ABCB1'in ekspresyonu kanser hücrelerinde artmaktadır. Anti-kanser ilaçlar ve DNA hipometilasyon ajanları ile kombine tedavi, hücreyi anti-kanser ilaçlara karşı yeniden duyarlı hale getirebilmektedir (Skinner ve ark., 2023). Bu nedenle, ABCB1'i mRNA düzeyinde inhibe edebilen ilaçlarla kombine anti-kanser ilaçların ileri evre HCC tedavisinde başarılı olması beklenmektedir.

ON'lerin gastrointestinal sistemden etkilenmeden, intraperitoneal veya intravenöz yerine oral yolla verilmesi için çeşitli stratejiler geliştirilmektedir (Chan & Bendayan, 2010; Søgaaard et al., 2021; Afrin et al., 2023). Ionis Pharmaceuticals (2002), bir ASO molekülünü, permeasyon artırıcı olarak kullanılan sodyum kaprat bazlı bir tablet ile birlikte ilk kez tek doz olarak insanlara oral yoldan uygulamış ve plazma biyoyararlanımını test etmiştir (Tillman ve ark., 2008). Alnylam Pharmaceuticals (2019), farelere oral gavaj (3 mg/kg) yoluyla 3 doz GalNAc-konjuge siRNA uygulanmasının, yaklaşık 40 gün boyunca hedef mRNA'nın yaklaşık %90 oranında azalması ile sonuçlandığını bildirmiştir (BioSpace, 2019; Søgaaard ve ark., 2021). Ionis Pharmaceuticals ve AstraZeneca (2021), GalNAc ile konjuge edilmiş ON ve sodyum kaprat tabletini oral yoldan insan olmayan primatlara uygulamıştır (Søgaaard ve ark., 2021). Gelecekte, GalNAc-ASO terapötiklerinin oral uygulamada biyoyararlanımının artması beklenmektedir.

Bu çalışmada, PTO-GalNAc-ASO'ların hücre canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirdik. Ancak, maliyet kısıtlamaları nedeniyle, hepatoksisiteyi azaltabilecek ek modifikasyonlar ASO dizilerine dahil edilememiştir. Ek olarak, ASO dizilerinin 3' veya 5' uçları floresan olarak etiketlenememiştir ve hücrelerdeki gimnotik iletimi mikroskopik olarak gösterilememiştir. Çalışmanın, protein ekspresyonunun, yalnızca western blot deneyleri ile gösterilmesi, tek bir hücre hattının kullanılması, 2D çalışma ile sınırlandırılması, TKİ'ler ile kombine etkilerini değerlendirilememesi ve anti-kanser ilaç direnci ile ilişkili olabilecek diğer ABC taşıyıcı üyelerin hariç tutulması gibi çeşitli sınırlamaları bulunmaktadır. Bununla birlikte ön sonuçlar, GalNAc-ASO konjugatlarının HCC'de ABCB1'i inhibe etme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

İleride, biriken anlamlı sonuçlar ile hepatosit hedefli GalNAc-ASO konjugatlarının, anti-kanser ilaçların etkilerini arttıran ve ileri evre HCC'li bireylerde sağkalım oranlarını iyileştirebilecek kombine tedavi seçenekleri için potansiyel ABCB1 inhibitör adayları olarak kabul edilebileceği düşünülmektedir. ABCB1'i hedefleyen GalNAc-ASO konjugatlarının anti-kanser ilaçlar ile terapötik etkisini 3D hücre modellerinde ve *in vivo* olarak göstermek için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. KAYNAKLAR

- Afrin, H., Bai, R. G., Kumar, R., Ahmad, S. S., Agarwal, S. K., & Nurunnabi, M. (2023). Oral delivery of RNAi for cancer therapy. *Cancer Metastasis Reviews*, 42(3), 699–724. <https://doi.org/10.1007/s10555-023-10099-x>
- Akarca US. (2008). Chronic hepatitis B. A guideline to diagnosis, approach, management, and follow-up 2007. Turkish association for the study of liver. *Turk J Gastroenterol*, 19(4):207-30. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19119479/>
- Al-Madhagi, H. A. (2023). Design of siRNAs against immune-implicated atherosclerosis genes: computational study. *turkish Computational and Theoretical Chemistry: (Online)*, 8(2), 12–18. <https://doi.org/10.33435/tcandtc.1246320>
- Al-Shawi, M. K. (2011). Catalytic and transport cycles of ABC exporters. *Essays in Biochemistry*, 50, 63–83. <https://doi.org/10.1042/bse0500063>
- Angrish, N., & Khare, G. (2023). Antisense oligonucleotide based therapeutics and its applications against bacterial infections. *Medicine in Drug Discovery*, 20, 100166. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2023.100166>
- Anwar, S., Mir, F., & Yokota, T. (2023). Enhancing the effectiveness of oligonucleotide therapeutics using cell-penetrating peptide conjugation, chemical modification, and carrier-based delivery strategies. *Pharmaceutics*, 15(4), 1130. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041130>
- Asafo-Agyei, K. O., & Samant, H. (2023). Hepatocellular carcinoma. *StatPearls - NCBI Bookshelf*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559177/>
- Badiee, S. A., Isu, U., Khodadadi, E., & Moradi, M. (2023). The alternating access mechanism in mammalian multidrug resistance transporters and their bacterial homologs. *Membranes*, 13(6), 568. <https://doi.org/10.3390/membranes13060568>
- Balogh, J., Victor, D. W., Asham, E. H., Burroughs, S. G., Boktour, M., Saharia, A., Li, X., Ghobrial, R. M., & Monsour, H. P. (2016). Hepatocellular carcinoma: a review. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, Volume 3, 41–53. <https://doi.org/10.2147/jhc.s61146>
- Bargou, R. C., Jürchott, K., Wagener, C., Bergmann, S., Metzner, S., Bommert, K., Mapara, M. Y., Winzer, K., Dietel, M., Dörken, B., & Royer, H. (1997). Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nature Medicine*, 3(4), 447–450. <https://doi.org/10.1038/nm0497-447>
- Batista-Duharte, A., Sendra, L., Herrero, M., Téllez-Martínez, D., Carlos, I., & Aliño, S. (2020). Progress in the use of antisense oligonucleotides for vaccine improvement. *Biomolecules*, 10(2), 316. <https://doi.org/10.3390/biom10020316>
- BioSpace (2019). Alnylam announces progress with RNAi therapeutics platform, including oral route of administration and cns and ocular delivery. *BioSpace*. <https://www.biospace.com/article/releases/alnylam-announces-progress-with-rnai-therapeutics-platform-including-oral-route-of-administration-and-cns-and-ocular-delivery/>

- Bishani, A., & Chernolovskaya, E. L. (2021). Activation of innate immunity by therapeutic nucleic acids. *International Journal of Molecular Sciences (Online)*, 22(24), 13360. <https://doi.org/10.3390/ijms222413360>
- Blenke, E. O., Mahakena, S., Fens, M. H., Van Den Dikkenberg, J., Hilbrant, M., & Mastrobattista, E. (2020). Impact of chemistry and nanoformulation parameters on cellular uptake and airway distribution of RNA oligonucleotides. *Journal of Controlled Release*, 317, 154–165. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.11.025>
- Borude, P., Bhushan, B., & Apte, U. (2018). DNA damage response regulates initiation of liver regeneration following acetaminophen overdose. *Gene Expression*, 18(2), 115–123. <https://doi.org/10.3727/105221618x15205260749346>
- Cao, M. D., Crouzy, S., Kim, M., Becchi, M., Cafiso, D. S., Di Pietro, A., & Jault, J. (2009). Probing the conformation of the resting state of a bacterial multidrug ABC transporter, BmrA, by a site-directed spin labeling approach. *Protein Science*, 18(7), 1507–1520. <https://doi.org/10.1002/pro.141>
- Caygill, S., & Dolan, L. (2023). ATP binding cassette transporters and uridine diphosphate glycosyltransferases are ancient protein families that evolved roles in herbicide resistance through exaptation. *PLOS ONE*, 18(9), e0287356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0287356>
- Ceballos, M. P., Rigalli, J. P., Ceré, L. I., Semeñiuk, M. B., Catania, V. A., & Ruiz, M. L. (2019). ABC transporters: regulation and association with multidrug resistance in hepatocellular carcinoma and colorectal carcinoma. *Current Medicinal Chemistry*, 26(7), 1224–1250. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180105103637>
- Chan, G., & Bendayan, R. (2010). Molecular and functional characterization of P-glycoprotein in vitro. In *Methods in molecular biology* (pp. 313–336). <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-938-3>
- Chen, E., & Ho, E. S. (2023). In-silico study of antisense oligonucleotide antibiotics. *PeerJ*, 11, e16343. <https://doi.org/10.7717/peerj.16343>
- Chen, M. L., Sun, A., Cao, W., Eliason, A., Mendez, K. M., Getzler, A. J., Tsuda, S., Diao, H., Mukori, C., Bruno, N. E., Kim, S. Y., Pipkin, M. E., Koralov, S. B., & Sundrud, M. S. (2020). Physiological expression and function of the MDR1 transporter in cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 217(5). <https://doi.org/10.1084/jem.20191388>
- Cheng, X., Xia, Y., Serti, E., Block, P., Chung, M., Chayama, K., Rehmann, B., & Liang, T. J. (2017). Hepatitis B virus evades innate immunity of hepatocytes but activates cytokine production by macrophages. *Hepatology*, 66(6), 1779–1793. <https://doi.org/10.1002/hep.29348>
- Chery, J. (2016). RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoc Journal*, 4(7). <https://doi.org/10.14304/surya.jpr.v4n7.5>
- Cidón, E. U. (2017). Systemic treatment of hepatocellular carcinoma: past, present and future. *World Journal of Hepatology*, 9(18), 797. <https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i18.797>

- Cui, H., Zhu, X., Li, S., Wang, P., & Fang, J. (2021). Liver-targeted delivery of oligonucleotides with N-acetylgalactosamine conjugation. *ACS Omega*, 6(25), 16259–16265. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01755>
- D'Souza, A., & Devarajan, P. V. (2015). Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting — strategies and applications. *Journal of Controlled Release*, 203, 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.022>
- Dash, S., Aydın, Y., Widmer, K. E., & Nayak, L. (2020). Hepatocellular carcinoma mechanisms associated with chronic hcv infection and the impact of direct-acting antiviral treatment. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, Volume 7, 45–76. <https://doi.org/10.2147/jhc.s221187>
- Davidovic, M., Mattea, C., Qvist, J., & Halle, B. (2008). Protein cold denaturation as seen from the solvent. *Journal of the American Chemical Society*, 131(3), 1025–1036. <https://doi.org/10.1021/ja8056419>
- Davis, G. L., Dempster, J., Meler, J. D., Orr, D., Walberg, M. W., Brown, B. D., Berger, B. D., O'Connor, J., & Goldstein, R. M. (2008). Hepatocellular carcinoma: management of an increasingly common problem. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 21(3), 266–280. <https://doi.org/10.1080/08998280.2008.11928410>
- Dean, M., & Annilo, T. (2005). Evolution Of The Atp-Binding Cassette (ABC) Transporter superfamily in vertebrates. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 6(1), 123–142. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.6.080604.162122>
- Dean, M., Rzhetsky, A., & Allikmets, R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, 11(7), 1156–1166. <https://doi.org/10.1101/gr.184901>
- Debacker, A. J., Voutila, J., Catley, M. C., Blakey, D. C., & Habib, N. (2020). Delivery of oligonucleotides to the liver with galnac: from research to registered therapeutic drug. *Molecular Therapy*, 28(8), 1759–1771. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.06.015>
- Deleavey, G. F., & Damha, M. J. (2012). Designing chemically modified oligonucleotides for targeted gene silencing. *Chemistry & Biology*, 19(8), 937–954. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.07.011>
- DeVos, S. L., & Miller, T. M. (2013). Antisense oligonucleotides: treating neurodegeneration at the level of RNA. *Neurotherapeutics*, 10(3), 486–497. <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0194-5>
- Dhuri, K., Bechtold, C., Quijano, E., Phạm, H., Gupta, A., Vikram, A., & Bahal, R. (2020). Antisense oligonucleotides: an emerging area in drug discovery and development. *Journal of Clinical Medicine*, 9(6), 2004. <https://doi.org/10.3390/jcm9062004>
- Dovgan, I., Koniev, O., Kolodych, S., & Wagner, A. (2019). Antibody–oligonucleotide conjugates as therapeutic, imaging, and detection agents. *Bioconjugate Chemistry*, 30(10), 2483–2501. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00306>
- Dowdy, S. F. (2017). Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. *Nature Biotechnology*, 35(3), 222–229. <https://doi.org/10.1038/nbt.3802>

- Duan, B., Huang, C., Bai, J., Zhang, Y. L., Wang, X., Yang, J., & Li, J. (2019). Multidrug resistance in hepatocellular carcinoma. *In Codon Publications eBooks* (pp. 141–158). <https://doi.org/10.15586/hepatocellularcarcinoma.2019.ch8>
- Egli, M., & Manoharan, M. (2023). Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics. *Nucleic Acids Research*, 51(6), 2529–2573. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad067>
- El-Serag, H. B. (2012). Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 142(6), 1264–1273.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.061>
- El-Serag, H. B., & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), 2557–2576. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.061>
- Emran, T. B., Shahriar, A., Mahmud, A. R., Rahman, T., Abir, M. H., Siddiquee, M. F.-. R., Ahmed, H., Rahman, N., Nainu, F., Wahyudin, E., Mitra, S., Dhama, K., Habibullah, M. M., Haque, S., Islam, A., & Hassan, M. M. (2022). Multidrug resistance in cancer: understanding molecular mechanisms, immunoprevention and therapeutic approaches. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.891652>
- Engle, K., & Kumar, G. (2022). Cancer multidrug-resistance reversal by ABCB1 inhibition: a recent update. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 239, 114542. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114542>
- Fazil, M. H. U. T., Ong, S. T., Chalasani, M. L. S., Low, J. H., Kizhakeyil, A., Mamidi, A., Lim, C. F. H., Wright, G. D., Lakshminarayanan, R., Kelleher, D., & Verma, N. K. (2016). GapmeR cellular internalization by macropinocytosis induces sequence-specific gene silencing in human primary T-cells. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep37721>
- Fornier, A., Llovet, J. M., & Bruix, J. (2012). Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, 379(9822), 1245–1255. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)61347-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(11)61347-0)
- Francica, G., & Borzio, M. (2019). Status of, and strategies for improving, adherence to HCC screening and surveillance. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, Volume 6, 131–141. <https://doi.org/10.2147/jhc.s159269>
- Frazier, K. S. (2014). Antisense oligonucleotide therapies. *Toxicologic Pathology*, 43(1), 78–89. <https://doi.org/10.1177/0192623314551840>
- Fukuda, Y., & Schuetz, J. D. (2012). ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance. *Biochemical Pharmacology*, 83(8), 1073–1083. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.12.042>
- Gagnon, K. T., & Corey, D. R. (2019). Guidelines for experiments using antisense oligonucleotides and double-stranded RNAs. *Nucleic Acid Therapeutics*, 29(3), 116–122. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0772>
- Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J., & Sarkadi, B. (2004). The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Current Drug Delivery*, 1(1), 27–42. <https://doi.org/10.2174/1567201043480036>
- Goldsmith, M. E., Gudas, J. M., Schneider, E., & Cowan, K. H. (1995). Wild type p53 stimulates expression from the human multidrug resistance promoter in a p53-negative

- cell line. *Journal of Biological Chemistry*, 270(4), 1894–1898. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.4.1894>
- González-Barriga, A., Nillessen, B., Kranzen, J., Van Kessel, I. D., Croes, H., Aguilera, B., De Visser, P. C., Datson, N. A., Mulders, S. a. M., Van Deutekom, J., Wieringa, B., & Wansink, D. G. (2017). Intracellular distribution and nuclear activity of antisense oligonucleotides after unassisted uptake in myoblasts and differentiated myotubes in vitro. *Nucleic Acid Therapeutics*, 27(3), 144–158. <https://doi.org/10.1089/nat.2016.0641>
- Gupta, G. (2012). *Animal lectins: form, function and clinical applications*. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1065-2>
- Hamilton, G. S. (2015). Antibody-drug conjugates for cancer therapy: the technological and regulatory challenges of developing drug-biologic hybrids. *Biologicals*, 43(5), 318–332. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2015.05.006>
- Hardt, A., Stippel, D. L., Odenthal, M., Hölscher, A. H., Dienes, H., & Drebber, U. (2012). Development of hepatocellular carcinoma associated with anabolic androgenic steroid abuse in a young bodybuilder: a case report. *Case Reports in Pathology*, 2012, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2012/195607>
- Heming, C. P., Muriithi, W., Macharia, L. W., Filho, P. N., Moura-Neto, V., & Aran, V. (2022). P-glycoprotein and cancer: what do we currently know? *Heliyon*, 8(10), e11171. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11171>
- Hendling, M., & Barišić, I. (2019). In-silico design of DNA oligonucleotides: challenges and approaches. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 1056–1065. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.07.008>
- Hillebrand, F., Ostermann, P. N., Müller, L., Degrandi, D., Erkelenz, S., Widera, M., Pfeffer, K., & Schaal, H. (2019). Gymnotic delivery of LNA mixmers targeting viral SREs induces HIV-1 mRNA degradation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1088. <https://doi.org/10.3390/ijms20051088>
- Ho, G., Fm, M., & Satsangi, J. (2003). Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease? *Gut*, 52(5), 759–766. <https://doi.org/10.1136/gut.52.5.759>
- Ho, G., Soranzo, N., Nimmo, E. R., Tenesa, A., Goldstein, D. B., & Satsangi, J. (2006). ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach. *Human Molecular Genetics*, 15(5), 797–805. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi494>
- Hodges, L. C., Markova, S., Chinn, L. W., Gow, J. M., Kroetz, D. L., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Very important pharmacogene summary. *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(3), 152–161. <https://doi.org/10.1097/fpc.0b013e3283385a1c>
- Horscroft, N., & Roy, P. (1997). Thermal denaturation of proteins for SDS-PAGE analysis by microwave irradiation. *BioTechniques*, 22(2), 224–226. <https://doi.org/10.2144/97222bm05>
- Housmans, J. A., Wu, G., Schymkowitz, J., & Rousseau, F. (2021). A guide to studying protein aggregation. *FEBS Journal*, 290(3), 554–583. <https://doi.org/10.1111/febs.16312>

- Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y., & Lü, X. (2020). Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x>
- Huang, Y. (2017). Preclinical and clinical advances of GALNAC-decorated nucleic acid therapeutics. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 6, 116–132. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2016.12.003>
- Jarnagin, W. R., Chapman, W. C., Curley, S. A., D'Angelica, M. I., Rosen, C. B., Dixon, E., & Nagorney, D. M. (2010). Surgical treatment of hepatocellular carcinoma: expert consensus statement. *HPB*, 12(5), 302–310. <https://doi.org/10.1111/j.1477-2574.2010.00182.x>
- Judge, A. D., Sood, V., Shaw, J. R., Fang, D., McClintock, K., & MacLachlan, I. (2005). Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nature Biotechnology*, 23(4), 457–462. <https://doi.org/10.1038/nbt1081>
- Juvale, I. I. A., Hamid, A. a. A., Halim, K. B. A., & Has, A. T. C. (2022). P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease. *Heliyon*, 8(6), e09777. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09777>
- Karaki, S., Paris, C., & Rocchi, P. (2019). Antisense oligonucleotides, a novel developing targeting therapy. In *IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82105>
- Karthika, C., Sureshkumar, R., Zehravi, M., Akter, R., Ali, F., Ramproshad, S., Mondal, B., Tagde, P., Ahmed, Z., Khan, F., Rahman, M. H., & Cavalu, S. (2022). Multidrug resistance of cancer cells and the vital role of P-Glycoprotein. *Life*, 12(6), 897. <https://doi.org/10.3390/life12060897>
- Kay, J. E., Thadhani, E., Samson, L. D., & Engelward, B. P. (2019). Inflammation-induced DNA damage, mutations and cancer. *DNA Repair*, 83, 102673. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102673>
- Kodan, A., Futamata, R., Kimura, Y., Kioka, N., Nakatsu, T., Kato, H., & Ueda, K. (2020). ABCB1/MDR1/P-gp employs an ATP-dependent twist-and-squeeze mechanism to export hydrophobic drugs. *FEBS Letters*, 595(6), 707–716. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14018>
- Krieg, A. M. (2019). Mind the gap! *Nature Biotechnology*, 37(6), 622–623. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0141-z>
- Krishnamurthy, S., Gilot, D., Ahn, S. B., Lam, V., Shin, J., Guillemin, G. J., & Heng, B. (2021). Involvement of kynurenine pathway in hepatocellular carcinoma. *Cancers*, 13(20), 5180. <https://doi.org/10.3390/cancers13205180>
- Kuespert, S., Heydn, R., Peters, S., Wirkert, E., Meyer, A., Siebörger, M., Johannesen, S., Aigner, L., Bogdahn, U., & Bruun, T. (2020). Antisense oligonucleotide in LNA-Gapmer design targeting TGFBR2—A key single gene target for safe and effective inhibition of TGFB signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1952. <https://doi.org/10.3390/ijms21061952>
- Laurent, Q., Martinent, R., Moreau, D., Winssinger, N., Sakai, N., & Matile, S. (2021). Oligonucleotide phosphorothioates enter cells by thiol-mediated uptake. *Angewandte*

- Lei, Z., Tian, Q., Teng, Q., Wurlpel, J. N., Zeng, L., Pan, Y., & Chen, Z. (2023). Understanding and targeting resistance mechanisms in cancer. *MedComm*, 4(3). <https://doi.org/10.1002/mco2.265>
- Lim, J. C., Kania, K., Wijesuriya, H. C., Chawla, S., Sethi, J., Pułaski, Ł., Romero, I. A., Couraud, P. O., Weksler, B. B., Hladky, S. B., & Barrand, M. A. (2008). Activation of -catenin signalling by GSK-3 inhibition increases P-glycoprotein expression in brain endothelial cells. *Journal of Neurochemistry*, 106(4), 1855–1865. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05537.x>
- Linton, K. J., & Higgins, C. F. (2006). Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 453(5), 555–567. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0126-x>
- Llovet, J. M., Kelley, R. K., Villanueva, A., Singal, A. G., Pikarsky, E., Roayaie, S., Lencioni, R., Koike, K., Zucman-Rossi, J., & Finn, R. S. (2021). Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>
- Lohitesh, K., Chowdhury, R., & Mukherjee, S. (2018). Resistance a major hindrance to chemotherapy in hepatocellular carcinoma: an insight. *Cancer Cell International*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0538-7>
- Lu, F., Hou, Y., Song, Y., & Yuan, Z. (2012). TFPI-2 downregulates multidrug resistance protein in 5-FU-resistant human hepatocellular carcinoma BEL-7402/5-FU cells. *The Anatomical Record*, 296(1), 56–63. <https://doi.org/10.1002/ar.22611>
- Lu, K., Fan, Q., & Zou, X. (2022). Antisense oligonucleotide is a promising intervention for liver diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1061842>
- Lubelski, J., Konings, W. N., & Driessen, A. J. M. (2007). Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 463–476. <https://doi.org/10.1128/mmmbr.00001-07>
- Madanagopal, P., Muthukumar, H., & Thiruvengadam, K. (2022). Computational study and design of effective siRNAs to silence structural proteins associated genes of Indian SARS-CoV-2 strains. *Computational Biology and Chemistry*, 98, 107687. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2022.107687>
- Mahadevan, D., & List, A. F. (2004). Targeting the multidrug resistance-1 transporter in AML: molecular regulation and therapeutic strategies. *Blood*, 104(7), 1940–1951. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2490>
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., & Baradaran, B. (2017). The different mechanisms of cancer drug resistance: a brief review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(3), 339–348. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.041>
- Marcus, D. M., Kabat, E. A., & Schiffman, G. (1964). Immunochemical studies on blood groups. xxxi. destruction of blood group a activity by an enzyme from clostridium tertium which deacetylates n-acetylgalactosamine in intact blood group substances*. *Biochemistry*, 3(3), 437–443. <https://doi.org/10.1021/bi00891a023>

- Markov, O. V., Filatov, A., Kupryushkin, M. S., Chernikov, I. V., Patutina, O., Strunov, A., Chernolovskaya, E. L., Vlassov, V. V., Pyshnyi, D. V., & Zenkova, M. A. (2020). Transport oligonucleotides—a novel system for intracellular delivery of antisense therapeutics. *Molecules*, 25(16), 3663. <https://doi.org/10.3390/molecules25163663>
- Marrero, J. A., Kulik, L., Sirlin, C. B., Zhu, A. X., Finn, R. S., Abécassis, M., Roberts, L. R., & Heimbach, J. K. (2018). Diagnosis, staging, and management of hepatocellular carcinoma: 2018 practice guidance by the american association for the study of liver diseases. *Hepatology*, 68(2), 723–750. <https://doi.org/10.1002/hep.29913>
- Mason, W. S., Jilbert, A. R., & Litwin, S. (2021). Hepatitis B virus DNA integration and clonal expansion of hepatocytes in the chronically infected liver. *Viruses*, 13(2), 210. <https://doi.org/10.3390/v13020210>
- McGlynn, K. A., Petrick, J. L., & El-Serag, H. B. (2020). Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 73(S1), 4–13. <https://doi.org/10.1002/hep.31288>
- Meier, M., Bider, M., Malashkevich, V., Spiess, M., & Burkhard, P. (2000). Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of the H1 subunit of the asialoglycoprotein receptor. *Journal of Molecular Biology*, 300(4), 857–865. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3853>
- Michel, B. Y., Dziuba, D., Benhida, R., Demchenko, A. P., & Burger, A. (2020). Probing of nucleic acid structures, dynamics, and interactions with environment-sensitive fluorescent labels. *Frontiers in Chemistry*, 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00112>
- Miyano, K., Okamoto, S., Kajikawa, M., Kawai, C., Kanagawa, T., Tominaga S., Yamauchi, A., Kuribayashi, F. (2021). The efficient detection of membrane protein with immunoblotting: lessons from cold-temperature denaturation. *Kawasaki Medical Journal*, 47,13-19. <https://doi.org/10.11482/KMJ-E202147013>
- Morcos, P. A. (2007). Achieving targeted and quantifiable alteration of mRNA splicing with morpholino oligos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(2), 521–527. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.172>
- Motola-Kuba, D., Zamora-Valdés, D., Uribe, M., & Méndez-Sánchez, N. (2006). Hepatocellular carcinoma. An overview. *Annals of Hepatology*, 5(1), 16–24. [https://doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)32034-4](https://doi.org/10.1016/s1665-2681(19)32034-4)
- Muslimov, A. R., Tereshchenko, V., Shevyrev, D., Rogova, A., Lepik, K. V., Reshetnikov, V., & Ivanov, R. (2023). The dual role of the innate immune system in the effectiveness of mRNA therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19), 14820. <https://doi.org/10.3390/ijms241914820>
- Nelson, N. P., Easterbrook, P., & McMahon, B. J. (2016). Epidemiology of hepatitis B virus infection and impact of vaccination on disease. *Clinics in Liver Disease*, 20(4), 607–628. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.06.006>
- Nishida, N., & Kudo, M. (2013). Oxidative stress and epigenetic instability in human hepatocarcinogenesis. *Digestive Diseases*, 31(5–6), 447–453. <https://doi.org/10.1159/000355243>
- Novogrodsky, A., & Ashwell, G. (1977). Lymphocyte mitogenesis induced by a mammalian liver protein that specifically binds desialylated glycoproteins. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 74(2), 676–678.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.676>

- Numata, K., & Wang, F. (2022). New developments in ablation therapy for hepatocellular carcinoma: combination with systemic therapy and radiotherapy. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, 11(5), 766–769. <https://doi.org/10.21037/hbsn-22-363>
- Obed, A., Tsui, T. Y., Schnitzbauer, A. A., Obed, M., Schlitt, H. J., Becker, H., & Lorf, T. (2007). Liver transplantation as curative approach for advanced hepatocellular carcinoma: is it justified? *Langenbeck's Archives of Surgery*, 393(2), 141–147. <https://doi.org/10.1007/s00423-007-0250-x>
- Olejniczak, M., Galka, P., & Krzyżosiak, W. J. (2009). Sequence-non-specific effects of RNA interference triggers and microRNA regulators. *Nucleic Acids Research*, 38(1), 1–16. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp829>
- Omote, H., Figler, R. A., Polar, M. K., & Al-Shawi, M. K. (2004). Improved energy coupling of human P-glycoprotein by the glycine 185 to valine mutation. *Biochemistry*, 43(13), 3917–3928. <https://doi.org/10.1021/bi0353651>
- Parton, D. L., Klingelhoefer, J. W., & Sansom, M. S. P. (2011). Aggregation of model membrane proteins, modulated by hydrophobic mismatch, membrane curvature, and protein class. *Biophysical Journal*, 101(3), 691–699. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.06.048>
- Petrick, J. L., Campbell, P. T., Koshiol, J., Thistle, J. E., Andreotti, G., Freeman, L. E. B., Buring, J. E., Chan, A. T., Chong, D. Q., Doody, M. M., Gapstur, S. M., Gaziano, J. M., Giovannucci, E., Graubard, B. I., Lee, I., Liao, L. M., Linet, M. S., Palmer, J. R., Poynter, J. N., . . . McGlynn, K. A. (2018). Tobacco, alcohol use and risk of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: the liver cancer pooling project. *British Journal of Cancer*, 118(7), 1005–1012. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0007-z>
- Privalov, P. L. (1990). Cold denaturation of protein. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 25(4), 281–306. <https://doi.org/10.3109/10409239009090612>
- Psilopatis, I., Damaskos, C., Garmpi, A., Sarantis, P., Koustas, E., Antoniou, E., Dimitroulis, D., Kouraklis, G., Karamouzis, M. V., Vrettou, K., Μαρίνος, Γ., Kontzoglou, K., & Garmpis, N. (2023). FDA-approved monoclonal antibodies for unresectable hepatocellular carcinoma: what do we know so far? *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2685. <https://doi.org/10.3390/ijms24032685>
- Qiagen. (2024). AntiSense LNA GapMeRS handbook - Qiagen. <https://www.qiagen.com/dk/resources/resourcedetail?id=21372dc0-b345-4af1-8b00-b196068041a4&lang=en>
- Rajeev, K. G., Nair, J. K., Jayaraman, M., Charissé, K., Taneja, N., O'Shea, J., Willoughby, J. L. S., Yucius, K., Nguyen, T., Shulga-Morskaya, S., Milstein, S., Liebow, A., Querbes, W., Borodovsky, A., Fitzgerald, K., Maier, M. A., & Manoharan, M. (2015). Hepatocyte-specific delivery of siRNAs conjugated to novel non-nucleosidic trivalent N-acetylgalactosamine elicits robust gene silencing in vivo. *ChemBioChem*, 16(6), 903–908. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500023>

- Rao, A. G., Rich, N. E., Marrero, J. A., Yopp, A. C., & Singal, A. G. (2021). Diagnostic and therapeutic delays in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 19(9), 1063–1071. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2020.7689>
- Raza, A. (2014). Hepatocellular carcinoma review: Current treatment, and evidence-based medicine. *World Journal of Gastroenterology*, 20(15), 4115. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i15.4115>
- Rees, D. C., Johnson, E. F., & Lewinson, O. (2009). ABC transporters: the power to change. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(3), 218–227. <https://doi.org/10.1038/nrm2646>
- Reza, M. S., Mim, F., Quader, M. R., Khan, M. Z. I., Hossain, M. S., Uddin, K. R., Akter, S., Rahman, S., Roy, S., & Rumman, M. A. (2021). The possibility of nucleic acids to act as anti-viral therapeutic agents—a review. *Open Journal of Medical Microbiology*, 11(03), 198–248. <https://doi.org/10.4236/ojmm.2021.113015>
- Roberts, T. C., Langer, R., & Wood, M. (2020). Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nature Reviews Drug Discover*, 19(10), 673–694. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0075-7>
- Roggenbuck, D., Mytilinaiou, M., Лапин, С. В., Reinhold, D., & Conrad, K. (2012). Asialoglycoprotein receptor (ASGPR): a peculiar target of liver-specific autoimmunity. *Autoimmunity Highlights*, 3(3), 119–125. <https://doi.org/10.1007/s13317-012-0041-4>
- Romero-Romero, M. L., Inglés-Prieto, Á., Ibarra-Molero, B., & Sanchez-Ruiz, J. M. (2011). Highly anomalous energetics of protein cold denaturation linked to folding-unfolding kinetics. *PLOS ONE*, 6(7), e23050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023050>
- Roush, W. (1997). Antisense aims for a renaissance. *Science*, 276(5316), 1192–1193. <https://doi.org/10.1126/science.276.5316.1192>
- Rumgay, H., Arnold, M., Ferlay, J., Lesi, O., Cabasag, C. J., Vignat, J., Laversanne, M., McGlynn, K. A., & Soerjomataram, I. (2022). Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040. *Journal of Hepatology*, 77(6), 1598–1606. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.08.021>
- Salama, N. N., Yang, Z., Bui, T., & Ho, R. J. Y. (2006). MDR1 haplotypes significantly minimize intracellular uptake and transcellular P-gp substrate transport in recombinant LLC-PK1 cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(10), 2293–2308. <https://doi.org/10.1002/jps.20717>
- Sanfelice, D., & Temussi, P. A. (2016). Cold denaturation as a tool to measure protein stability. *Biophysical Chemistry*, 208, 4–8. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2015.05.007>
- Sharma, N., Arya, G., Kumari, R., Gupta, N., & Nimesh, S. (2019). Evaluation of anticancer activity of silver nanoparticles on the A549 human lung carcinoma cell lines through alamar blue assay. *Bio-protocol*, 9(1). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3131>
- Shiani, A., Narayanan, S., Peña, L., & Friedman, M. (2017). The role of diagnosis and treatment of underlying liver disease for the prognosis of primary liver cancer. *Cancer Control*, 24(3), 107327481772924. <https://doi.org/10.1177/1073274817729240>

- Skinner, K. T., Palkar, A. M., & Hong, A. L. (2023). Genetics of ABCB1 in cancer. *Cancers*, 15(17), 4236. <https://doi.org/10.3390/cancers15174236>
- Søgaard, P. P., Lind, M., Christiansen, C. R., Petersson, K., Clauss, A., & Caffarel–Salvador, E. (2021). Future perspectives of oral delivery of next generation therapies for treatment of skin diseases. *Pharmaceutics*, 13(10), 1722. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101722>
- Soifer, H. S., Koch, T., Lai, J. C., Hansen, B. R., Hoeg, A., Oerum, H., & Stein, C. A. (2011). Silencing of gene expression by gymnotic delivery of antisense oligonucleotides. *In Methods in Molecular Biology* (pp. 333–346). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-424-7_25
- Souleimanian, N. E., Deleavey, G. F., Soifer, H. S., Wang, S., Tiemann, K., Damha, M. J., & Stein, C. A. (2012). Antisense 2'-deoxy, 2-fluoroarabino nucleic acid (2'F-ANA) oligonucleotides: in vitro gymnotic silencers of gene expression whose potency is enhanced by fatty acids. *Molecular Therapy — Nucleic Acids*, 1, e43. <https://doi.org/10.1038/mtna.2012.35>
- Springer, A. D., & Dowdy, S. F. (2018). GalNAC-siRNA conjugates: leading the way for delivery of RNAi therapeutics. *Nucleic Acid Therapeutics*, 28(3), 109–118. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0736>
- Stein, C. A., Hansen, J., Lai, J. C., Wu, S. J., Voskresenskiy, A. M., Høg, A., Worm, J., Hedtjärn, M., Souleimanian, N. E., Miller, P. S., Soifer, H. S., Castanotto, D., Benimetskaya, L., Ørum, H., & Koch, T. (2009). Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. *Nucleic Acids Research*, 38(1), e3. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp841>
- Stein, C. A., Subasinghe, C., Shinozuka, K., & Cohen, J. S. (1988). Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Research*, 16(8), 3209–3221. <https://doi.org/10.1093/nar/16.8.3209>
- Stillwell, W. (2016). Membrane proteins. *In Elsevier eBooks* (pp. 89–110). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63772-7.00006-3>
- Subhan, A., Attia, S., & Torchilin, V. P. (2021). Advances in siRNA delivery strategies for the treatment of MDR cancer. *Life Sciences*, 274, 119337. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119337>
- Sukowati, C., El-Khobar, K. E., Jasirwan, C. O. M., Kurniawan, J., & Gani, R. A. (2024). Stemness markers in hepatocellular carcinoma of Eastern vs. Western population: Etiology matters? *Annals of Hepatology*, 29(1), 101153. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2023.101153>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA a Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tabak, F., Yurdaydın, C., Kaymakoğlu, S., Akarsu, M., Akinci, E. G., Akkız, H., Alkım, C., Cekin, A. H., Cuvalcı, N. O., Demir, K., Değertekin, B., Dökmetaş, İ., Ersöz, G., Hızıl, K., Kandemir, F. O., Önlü, Y., Sonsuz, A., Şenates, E., Tosun, S., . . . Group, V. H. G. S. (2017). Diagnosis, management and treatment of hepatitis B virus infection: Turkey

- 2017 clinical practice guidelines. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 28(2), 73–83. <https://doi.org/10.5152/tjg.2017.19>
- Tanowitz, M., Hettrick, L., Revenko, A. S., Kinberger, G. A., Prakash, T. P., & Seth, P. P. (2017). Asialoglycoprotein receptor 1 mediates productive uptake of N-acetylgalactosamine-conjugated and unconjugated phosphorothioate antisense oligonucleotides into liver hepatocytes. *Nucleic Acids Research*, 45(21), 12388–12400. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx960>
- Taylor, N. M. I., Manolaridis, I., Jackson, S. M., Kowal, J., Stahlberg, H., & Locher, K. P. (2017). Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature*, 546(7659), 504–509. <https://doi.org/10.1038/nature22345>
- Ter Beek, J., Guskov, A., & Slotboom, D. J. (2014). Structural diversity of ABC transporters. *The Journal of General Physiology*, 143(4), 419–435. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411164>
- Thomas, C., & Tampé, R. (2020). Structural and mechanistic principles of ABC transporters. *Annual Review of Biochemistry*, 89(1), 605–636. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011520-105201>
- Tillman, L., Geary, R. S., & Hardee, G. E. (2008). Oral delivery of antisense oligonucleotides in man. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(1), 225–236. <https://doi.org/10.1002/jps.21084>
- Tsoufas, G. (2019). Hepatocellular carcinoma and metabolic syndrome: the times are changing and so should we. *World Journal of Gastroenterology*, 25(29), 3842–3848. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i29.3842>
- Uttarkar A., Babu M., Niranjana V. (2022). Protocol for in-silico design, docking and molecular dynamic simulation of antisense oligonucleotides. *protocols.io*. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.ewov1nr4ogr2/v1>
- Van Assema, D. M. E., & Van Berckel, B. N. (2016). Blood-brain barrier abc-transporter p-glycoprotein in alzheimer's disease: still a suspect? *Current Pharmaceutical Design*, 22(38), 5808–5816. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160804094544>
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2008). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics*, 3(3), 281. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-3-281>
- Veiga-Matos, J., Morales, A. I., Prieto, M., Remião, F., & Silva, R. (2023). Study models of drug–drug interactions involving p-glycoprotein: the potential benefit of p-glycoprotein modulation at the kidney and intestinal levels. *Molecules*, 28(22), 7532. <https://doi.org/10.3390/molecules28227532>
- Wang, X., Yu, S., Lou, E., Tan, Y., & Tan, Z. (2023). RNA 3D structure prediction: progress and perspective. *Molecules*, 28(14), 5532. <https://doi.org/10.3390/molecules28145532>
- Wang, X., Zhang, H., & Chen, X. (2019). Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.10>
- Wang, Y., Xiang, D., Wang, T., Zhang, Y., Pham, C., Zhou, S., Jiang, G., Hou, Y., Zhu, Y., Han, Y., Qiao, L., Tran, P. H. L., & Duan, W. (2021). The inhibition of ABCB1/MDR1

- or ABCG2/BCRP enables doxorubicin to eliminate liver cancer stem cells. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89931-9>
- Watts, J. K., & Corey, D. R. (2011). Silencing disease genes in the laboratory and the clinic. *The Journal of Pathology*, 226(2), 365–379. <https://doi.org/10.1002/path.2993>
- Weidner, J., Kołosionek, E., Holmila, R., Ax, E., Garreau, M., Gnerlich, F., Olsson, H., Czechtizky, W., Vollmer, S., & Rydzik, A. M. (2023). Gymnotic uptake of AntimiRs alter microRNA-34a levels in 2D and 3D epithelial cell culture. *Molecular Therapy — Nucleic Acids*, 33, 898–907. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.08.014>
- Weingärtner, A., Bethge, L., Weiss, L., Sternberger, M., & Lindholm, M. W. (2020). Less is more: novel hepatocyte-targeted siRNA conjugates for treatment of liver-related disorders. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 21, 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.05.026>
- Wen, P., & Tajkhorshid, E. (2011). Conformational coupling of the nucleotide-binding and the transmembrane domains in ABC transporters. *Biophysical Journal*, 101(3), 680–690. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.06.031>
- Winogradoff, D., John, S., & Aksimentiev, A. (2020). Protein unfolding by SDS: the microscopic mechanisms and the properties of the SDS-protein assembly. *Nanoscale*, 12(9), 5422–5434. <https://doi.org/10.1039/c9nr09135a>
- Wogan, G. N. (1999). Aflatoxin as a human carcinogen. *Hepatology*, 30(2), 573–575. <https://doi.org/10.1002/hep.510300231>
- Wolking, S., Schaeffeler, E., Lerche, H., Schwab, M., & Nies, A. T. (2015). Impact of genetic polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on drug disposition and potential clinical implications: update of the literature. *Clinical Pharmacokinetics*, 54(7), 709–735. <https://doi.org/10.1007/s40262-015-0267-1>
- Wu, E., Wong, L. L., Hernandez, B. Y., Ji, J., Wang, J., Kwee, S. A., & Kalathil, S. (2018). Gender differences in hepatocellular cancer: disparities in nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis and liver transplantation. *Hepatoma Research*, 4(10), 66. <https://doi.org/10.20517/2394-5079.2018.87>
- Yang J. M., Vassil, A. D., Hait, W. N. (2001). Activation of phospholipase C induces the expression of the multidrug resistance (MDR1) gene through the Raf-MAPK pathway. *Mol Pharmacol*, 60(4):674-80. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11562428/>
- Yang, J. D., & Roberts, L. R. (2010a). Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma. *Infectious Disease Clinics of North America*, 24(4), 899–919. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.07.004>
- Yang, J. D., & Roberts, L. R. (2010b). Hepatocellular carcinoma: a global view. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 7(8), 448–458. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.100>
- Yang, J. D., Hainaut, P., Gores, G. J., Amadou, A., Plymoth, A., & Roberts, L. R. (2019). A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16(10), 589–604. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0186-y>

- Yin, H., & Flynn, A. D. (2016). Drugging membrane protein interactions. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 18(1), 51–76. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-092115-025322>
- Yoo, B. (2004). 2'-O-methyl-modified phosphorothioate antisense oligonucleotides have reduced non-specific effects in vitro. *Nucleic Acids Research*, 32(6), 2008–2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh516>
- Yu, A., Choi, Y. H., & Tu, M. J. (2020). RNA drugs and RNA targets for small molecules: principles, progress, and challenges. *Pharmacological Reviews*, 72(4), 862–898. <https://doi.org/10.1124/pr.120.019554>
- Yu, J., Zhou, Z., Tay-Sontheimer, J., Levy, R. H., & Ragueneau-Majlessi, I. (2017). Intestinal drug interactions mediated by OATPs: a systematic review of preclinical and clinical findings. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(9), 2312–2325. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.004>
- Zhao, M., & Lu, M. (2017). RNA interference-induced innate immunity, off-target effect, or immune adjuvant? *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00331>
- Zhao, M., Zhang, X., Wu, J., Pei, R., Xu, Y., Yang, D., Roggendorf, M., & Lu, M. (2013). RNAi induces innate immunity through multiple cellular signaling pathways. *PLOS ONE*, 8(5), e64708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064708>
- Zhou, G., & Kuo, M. T. (1997). NF- κ B-mediated induction of *mdr1b* expression by insulin in rat hepatoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(24), 15174–15183. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.24.15174>
- Zoghbi, M. E., Mok, L., Swartz, D. J., Singh, A., Fendley, G. A., Urbatsch, I. L., & Altenberg, G. A. (2017). Substrate-induced conformational changes in the nucleotide-binding domains of lipid bilayer-associated P-glycoprotein during ATP hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 292(50), 20412–20424. <https://doi.org/10.1074/jbc.m117.814186>

9. ÖZ GEÇMİŞ

Adı	Burcu	Soyadı	Hastürk
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu			
E-posta			

Eğitim Düzeyi

Görevi	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1		
2		
3		

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*

Yabancı Dil Sınav Notu#

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

10. BİLİMSEL FAALİYETLER

Makale

Hasturk, B., Avsar, T., Ozbas, S., Karademir Yilmaz, B., & Eren, F. (2024). N-acetylgalactosamine-conjugated antisense oligonucleotides designed as inhibitors of ABCB1: coping with multidrug resistance in hepatocellular carcinoma. *Molecular Biology*, <https://doi.org/10.1134/S0026893324060050>

Hasturk, B., & Eren, F. (2024). A therapeutic approach for the hepatitis C virus: in silico design of an antisense oligonucleotide-based candidate capsid inhibitor. *Virus Genes*, 60, 446-454. <https://doi.org/10.1007/s11262-024-02088-1>

Hasturk, B., Yilmaz, Y., & Eren, F. (2019). Potential clinical variants detected in mitochondrial DNA D-loop hypervariable region I of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hormones (Athens)*, 18(4):463-475. <https://doi.org/10.1007/s42000-019-00137-1>

Bildiri

Hasturk, B., Avsar, T., Ozbas, S., Karademir Yilmaz, B., & Eren, F. (2023, December 16-17). *An alternative approach for the treatment of hepatocellular carcinoma: development of an antisense oligonucleotide as a candidate ABCB1-MDR1 inhibitor* [Poster presentation]. 18. UBAK, Ankara, Türkiye.

Hasturk, B., Yilmaz, Y., & Eren, F. (2017, May 25-27). *Mitochondrial DNA control region nucleotide variations in non-alcoholic steatohepatitis* [Abstract presentation]. European Biotechnology Congress, Dubrovnik, Croatia. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.648>

Hasturk, B., Yilmaz, Y., & Eren, F. (2017, October 20-24). *Preliminary evidence of an association between mtDNA D-loop polymorphisms and the clinicopathological features of nonalcoholic steatohepatitis* [Poster presentation]. 68th Annual Meeting of the American-Association-for-the-Study-of-Liver-Diseases (AASLD) / Liver Meeting, Washington, DC.

Eren, F., Balcilar, H., Yilmaz, D., Toker, T., Yilmaz, Y., & Hasturk, B. (2017, October 20-24). *Nonalcoholic steatohepatitis: modulation of histological phenotype by the missense Thr174Met (rs4762) polymorphism of the angiotensinogen (AGT) gene* [Poster presentation]. 68th Annual Meeting of the American-Association-for-the-Study-of-Liver-Diseases (AASLD) / Liver Meeting, Washington, DC.

Proje

Hastürk, B., & Eren, F. Non-alkolik steatohepatit’de mitokondriyal DNA kontrol bölgesi nükleotit varyasyonları ve olası haplotiplerin hastalığın patogeneziyle ilişkisi. Marmara

Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (SAG-C-YLP-131016-0439), 2016-2017.

Hastürk, B., & Eren, F. Hepatosellüler karsinom hücre hattında n-asetilgalaktozamin ile konjuge oligonükleotit aracılı ABCB1-MDR1 gen ifadesinin baskılanmasının in vitro araştırılması. Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (TDK-2022-10587), 2022-2024.

Hastürk, B., Avsar, T., Karademir Yılmaz, B., & Eren, F. Hepatosellüler karsinom hücre hatlarında n-asetilgalaktozamin ile konjuge oligonükleotit aracılı ABCB1-MDR1 gen ifadesinin baskılanmasının in vitro araştırılması. TÜBİTAK 1002-B Acil Destek Modülü (SBAG- 222S261), 2022-2024.

Hastürk, B., Obakan Yerlikaya, P., Avsar, T., Sozen, A. E., Karademir Yılmaz, B., & Eren, F. Karbonhidrat konjuge sistemler ile yeni nesil antisens oligonükleotit temelli hedef abc taşıyıcı inhibitörü tasarlanması ve etkinliğinin anti-kanser ilaç dirençli hepatosellüler karsinom ve glioblastom hücre modellerinde araştırılması. Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Araştırma Üniversiteleri Destek Programı-2023- 10837), 2023-2025.