

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DNA’NIN ARKEOZOMLARLA FORMÜLASYONU,
IN VITRO KARAKTERİZASYONU VE MEMELİ HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDE TAŞIYICI OLARAK KULLANILMASI**

Uzman Biyolog Azade ATTAR

**FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan**

DOKTORA TEZİ

Tez Savunma Tarihi : 30 Kasım 2010
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sevil YÜCEL (YTÜ)
İkinci Tez Danışmanı : Doç. Dr. Kadir TURAN (MÜ)
Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Ayşe OGAN (MÜ)
: Prof. Dr. İnci ARISAN (YTÜ)
: Prof. Dr. Ayşen YARAT (MÜ)
: Doç. Dr. Emine KARAKUŞ (YTÜ)

İSTANBUL, 2010

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	vi
KISALTMA LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
TEŞEKKÜR	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Lipozomlar	3
2.2 Lipozomların Yapısı ve Özellikleri	4
2.2.1 Lipozomlanmış Maddelerin Hücrelere Giriş Yolları	8
2.2.2 Lipozomların Sınıflandırılması	8
2.2.3 Maddelerin Lipozomlarda Tutulması ve Tutulmamış Maddelerin Uzaklaştırılması	10
2.2.4 Lipozomların Temel Sorunları	11
2.3 Halofilik Arkeler	11
2.3.1 <i>Halobacteriales</i> Ordosunun Özellikleri	15
2.3.2 Fizyolojileri	15
2.3.3 Halofilik Arkelerin Uygulama Alanları	16
2.4 Arkeal Tetraeter Bipolar Lipidler	17
2.4.1 Doğal Arkeal Tetraeter Lipidlerin Yapı ve Fonksiyonları	19
2.4.2 Doğal ve Sentetik Lipidlerin Biyoteknik Uygulamaları	21
2.4.2.1 Tetraeter Lipid Filmlerin Uygulama Alanları	21
2.4.2.2 Arkeal Lipozomların (Arkeozomlar) Uygulama Alanları	22
2.5 Gen Transfer Sistemleri	24
2.5.1 Mikroenjeksiyon	25
2.5.2 Partikül Bombardmanı – Gen Tabancası Metodu	26
2.5.3 Elektroporasyon	26
2.5.4 Sonoporasyon	27
2.5.5 Laser Işınması	28
2.5.6 Magnetofeksiyon	28
2.5.7 Lipozom Aracılı Gen Transferi	29
2.5.7.1 Katyonik Lipozomlar	29
2.5.7.2 Anyonik Lipozomlar	30
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	31
3.1 Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	31
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	31
3.1.2 Kullanılan Malzemeler	32
3.1.3 Kullanılan Kimyasal Sarf Malzemeler	33

3.1.4	Besiyerleri.....	35
3.1.5	Tampon ve Çözeltiler	35
3.1.6	Plazmitler.....	40
3.1.7	Standart DNAlar	40
3.1.8	Plazmit DNA'ların İzolasyonu ve Kontrol Edilmesinde Kullanılan Enzimler	40
3.1.9	Lipid Kaynağı Olarak Kullanılan Arkeler	41
3.1.10	Memeli Hücre Hatları	41
3.2	Metod.....	41
3.2.1	Halofilik Arkelerin Üretilmesi.....	41
3.2.2	Lipid Ekstraksiyonu.....	41
3.2.3	Arkeozomların Hazırlanması.....	42
3.2.4	Fosfolipid Standart Grafiğinin Hazırlanması ve Fosfolipid Tayini.....	42
3.2.5	Plazmit DNA'ların Çoğaltılması ve Saflaştırılması	43
3.2.5.1	Transformasyon için <i>E. coli</i> 'nin Kompetant Hale Getirilmesi.....	43
3.2.5.2	Transformasyon	43
3.2.5.3	Plazmitlerin Üretilmesi ve İzolasyonu.....	43
3.2.5.4	Plazmit DNA'nın Spektrofotometrik Yöntemle Analizi	44
3.2.5.5	Plazmit DNA'ların Agaroz Jel Elektforezi ile Kontrolü	44
3.2.6	Plazmit DNA'nın Arkeozomlara Yüklenmesi.....	45
3.2.7	Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektforez.....	45
3.2.8	Arkeozom Formülasyonlarının Zeta Potansiyellerinin ve Partikül Boyutlarının Ölçülmesi.....	45
3.2.9	Arkeozomların Transmisyon Elektron Mikroskobu ile Analizi	46
3.2.9.1	Gridlerin Formvar ile Kaplanması.....	46
3.2.9.2	Örneklerin Negatif Boyama Tekniği ile Hazırlanması	46
3.2.10	Arkeozomların Atomik Güç Mikroskobu ile Analizi.....	46
3.2.11	Memeli Hücrelerine Plazmit DNA Transfeksiyonu	47
3.2.12	Arkeozom/Plazmit DNA Transfeksiyonuna Ca^{2+} , Polibren, DOTAP ve Kitozan Etkileri	47
3.2.12.1	Ca^{2+} İyonlarının Arkeozomlarla Plazmit DNA Transfeksiyonuna Etkisi.....	48
3.2.12.2	Polibrenin Arkeozomlarla Plazmit DNA Transfeksiyonuna Etkisi.....	48
3.2.12.3	DOTAP'ın Arkeozomlarla Plazmit DNA Transfeksiyonuna Etkisi.....	49
3.2.12.4	Kitozanın Arkeozomlarla Plazmit DNA Transfeksiyonuna Etkisi.....	49
3.2.13	Transfeksiyon Sonuçlarının Analizleri	50
3.2.13.1	β -Galaktosidaz Standart Grafiğinin Hazırlanması ve Aktivite Tayini	50
3.2.13.2	Bradford Metodu ve BSA Standart Grafiğinin Hazırlanması	50
3.2.13.3	Arkeozomların <i>In Vitro</i> Transfeksiyon Etkinliklerinin Yeşil Floresan Proteini ile Saptanması.....	51
3.2.14	Mikroskobik inceleme	51
4	SONUÇLAR ve TARTIŞMA	52
4.1	Arkebakterilerden Lipid Ekstraksiyonu ve Kantitatif Tayinler	52
4.2	Çalışmada Kullanılan Plazmitlerin Saflık Kontrolleri.....	53
4.2.1	Plazmit DNA'ların Kalite ve Miktarlarının Spektrofotometrik Yöntemle Tayini	53
4.2.2	Plazmit DNA'ların Doğruluklarının Kontrolü.....	54
4.3	Protein Standart Grafiğinin Oluşturulması ve Protein Miktar Tayinleri	56
4.4	β -Galaktosidaz Standart Grafiğin Oluşturulması ve Aktivite Tayini	57
4.5	Arkeozomların Karakterizasyonu	58
4.5.1	Boş Arkeozomların Karakterizasyonu.....	59
4.5.1.1	Sudan III ile Boyanan Arkeozomların Işık Mikroskobu ile İncelenmesine ait Sonuçlar	59

4.5.1.2	Boş Arkeozomların Zeta Potansiyellerine ait Sonuçlar.....	60
4.5.1.3	Boş Arkeozomların TEM Analizine ait Sonuçlar.....	60
4.5.1.4	Arkeozomların AFM Analizine ait Sonuçlar.....	61
4.5.2	Arkeozomların Plazmit DNA ile Oluşturduğu Komplekslerin Karakterizasyonu	64
4.5.2.1	Arkeozom/Plazmit DNA Komplekslerinin Zeta Potansiyeli ve Boyut Dağılımı Analizine ait Sonuçlar.....	64
4.5.2.2	Arkeozom/Plazmit DNA Komplekslerinin TEM Analizine ait Sonuçlar	64
4.5.2.3	Plazmit DNA'nın AFM Analizine ait Sonuçlar.....	66
4.5.2.4	Arkeozom/Plazmit DNA Komplekslerinin AFM Analizine ait Sonuçlar	67
4.5.2.5	Arkeozom/Plazmit DNA Kompleksinin Boyut Analizine ait Sonuçlar	69
4.5.2.6	Arkeozom/Plazmit DNA Komplekslerinin Agaroz Jel Elektroforezine ait Sonuçlar	69
4.5.3	Arkeozomların Plazmit DNA'yı Enkapsüle Etmesine ait Karakterizasyon Çalışmaları.....	71
4.5.3.1	Arkeozomların Plazmit DNA'yı Enkapsüle Etmesine ait Zeta Potansiyeli Analizi Sonuçları	72
4.5.3.2	Arkeozomların Plazmit DNA'yı Enkapsüle Etmesine ait TEM Analizi Sonuçları.....	73
4.5.3.3	Arkeozomların Plazmit DNA'yı Enkapsüle Etmesine ait AFM Analizi Sonuçları.....	73
4.5.3.4	Arkeozomların Plazmit DNA'yı Enkapsüle Etmesine ait Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçları.....	75
4.5.4	Arkeozom ve DOTAP'ın Plazmit DNA ile Kompleks Oluşturmasına ait Sonuçlar	78
4.5.4.1	DOTAP'ın Plazmit DNA ile Kompleks Oluşturmasına ait TEM Analizi Sonuçları.....	78
4.5.4.2	DOTAP'ın Plazmit DNA ile Kompleks Oluşturmasına ait AFM Analizi Sonuçları.....	79
4.5.4.3	Arkeozom ve DOTAP'ın Plazmit DNA ile Kompleks Oluşturmasına ait Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçları.....	81
4.5.5	Arkeozom ve Polibrenin Plazmit DNA ile Kompleks Oluşturmasına ait Sonuçlar	82
4.5.5.1	Arkeozom ve Polibrenin Plazmit DNA ile Kompleks Oluşturmasına ait Zeta Potansiyeli Analizinin Sonuçları	82
4.5.5.2	Arkeozom ve Polibrenin Farklı Konsantrasyonlarının Plazmit DNA ile Kompleks Oluşturmasına ait Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçları.....	84
4.6	Arkeozomların <i>In Vitro</i> Transfeksiyon Etkinliklerinin Yeşil Floresan Proteini ile Saptanmasına Ait Sonuçlar	85
4.6.1	Boş Arkeozomların <i>In Vitro</i> Transfeksiyon Etkinlikleri	85
4.6.2	DOTAP'ın <i>In Vitro</i> Transfeksiyon Etkinliği	86
4.6.3	DOTAP'ın Arkeozomlarla Plazmit DNA Transfeksiyonuna Etkisi.....	87
4.6.4	Arkeozomların <i>In Vitro</i> Transfeksiyon Etkinliğinin Arttırılmasında Kalsiyumun Etkisi	89
4.6.5	Arkeozomların <i>In Vitro</i> Transfeksiyon Etkinliğinin Arttırılmasında Kitozanın Etkisi	91
4.7	Örneklerdeki β -Galaktosidaz Aktivitelerinin Saptanmasına Ait Sonuçlar.....	93
4.7.1	Boş Arkeozomlar Kullanılarak Elde Edilen β -Galaktosidaz Aktiviteleri.....	94
4.7.2	DOTAP ve Arkeozomlar Kullanılarak Elde Edilen β -Galaktosidaz Aktiviteleri..	95
4.7.3	Polibren ve Arkeozomlar Kullanılarak Elde Edilen β -Galaktosidaz Aktiviteleri .	96
4.7.4	Kitozan ve Arkeozomlar Kullanılarak Elde Edilen β -Galaktosidaz Aktiviteleri ..	97
4.7.5	Ca^{2+} İyonları ve Arkeozomlar Kullanılarak Elde Edilen β -Galaktosidaz	

	Aktiviteri.....	98
4.7.6	Li ⁺ İyonları ve Arkeozomlar Kullanılarak Elde Edilen β -Galaktosidaz Aktiviteri.....	100
KAYNAKLAR.....		106
ÖZGEÇMİŞ.....		121

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
g	gram
mg	miligram
L	litre
ml	mililitre
μ	mikro
μl	mikrolitre
M	Molar
nm	nanometre
U	Ünite

KISALTMA LİSTESİ

A	Absorbans
BSA	Bovin serum albumin
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
D'MEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Deoksiribonükleik asit
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoiloksi) propil]-N,N,N-trimethylamonyum metilsülfat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FCS	Fetal calf serum
HCl	Hidroklorik asit
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit
HF	Fluorik asit
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
K ₂ HPO ₄	di-potasyum fosfat
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
LB	Luria Bertani
LiCl	Lityum klorür
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat hepta-hidrat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksid
Na ₂ SO ₃	Sodyum sülfid
Na ₂ S ₂ O ₅	Sodyum meta-bisülfid
ONPG	orto-Nitrofenil-β-D-galaktopiranosid
PBS	Tamponlanmış fizyolojik tuzlu su
PEG	Polietilen glikol
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TCA	Tri-kloro asetik asit
UV	Ultra violet

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	Tek tabakalı bir lipozomun yapısı [1].	3
Şekil 2.2	Başlıca fosfolipid grupları ve bunların fiziksel ve kimyasal yapıları (Yurdakul ve Atav, 2007).	4
Şekil 2.3	Fosfatidilkolinin kimyasal yapısı.	4
Şekil 2.4	Sfingomiyelinin oluşumu ve kimyasal yapısı.	5
Şekil 2.5	Fosfolipidler arasındaki dikey ve yatay etkileşimler (Yurdakul ve Atav, 2007).	5
Şekil 2.6	Çift katlı fosfolipid tabakalarından lipozom ve hücre zarının oluşumu (Yurdakul ve Atav, 2007).	6
Şekil 2.7	Lipozomun üç boyutlu yapısı (Yurdakul ve Atav, 2007).	6
Şekil 2.8	Lipozomlanmış ilaçların hücrelere veriliş mekanizmaları [1].	8
Şekil 2.9	Tek (Monolayer) ve çok tabakalı (Multilayer) lipozom [2].	9
Şekil 2.10	Büyük çok tabakalı lipozom (a) ve çok küçük tek-iki tabakalı lipozom (b) [2].	9
Şekil 2.11	Ribozomal küçük alt birimde bulunan 16S ve 18S rRNA dizilerine göre oluşturulmuş filogenetik ağaç (Woese, 1999).	12
Şekil 2.12	Arkeal tetraeter lipid yapıları.	18
Şekil 3.1	Lipofast Basic enjeksiyon sistemi.	42
Şekil 4.1	Fosfolipid tayini için hazırlanan standart grafik.	52
Şekil 4.2	200 ile 325 nm dalga boyları arasında elde edilen DNA spektrumu.	54
Şekil 4.3	pEGFP-N1 ve pSV-β-Gal plazmitlerinin genetik haritaları.	55
Şekil 4.4	Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş (1- pSV-β-Gal, 2- pEGFP-N1) ya da enzimle işlem görmemiş (3- pSV-β-Gal, 4- pEGFP-N1) plazmitlerin elektroforez profilleri. Elektroforez işleminde %1'lik agaroz jel kullanıldı. Elektroforez işlemi 100 V sabit gerilimde 25 dakikada tamamlandı.	55
Şekil 4.5	BSA ile hazırlanan protein standart grafiği.	56
Şekil 4.6	4 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen β-Galaktosidaz standart grafiği.	58
Şekil 4.7	12 saat inkübasyon sonucu elde edilen β-Galaktosidaz standart grafiği.	58
Şekil 4.8	1 mg polar lipidin 1 ml Hepes tamponu (pH=7.4) ile hidrate edilmesi ile oluşturulan arkeozomların mikroskopik incelemesi.	59
Şekil 4.9	10 mg polar lipidin 1 ml Hepes tamponu (pH=7.4) ile hidrate edilmesi ile oluşturulan arkeozomların mikroskopik incelemesi.	59
Şekil 4.10	3 mg polar arkeal lipidin 1 ml HEPES tamponunda hidrate edilmesi ile hazırlanan arkeozomların TEM görüntüsü.	61
Şekil 4.11	Arkeozomların boyut analizine ilişkin TEM görüntüsü.	61
Şekil 4.12	Arkeozomların 4x4 µm'lik alan taranarak çekilen AFM görüntüsü.	62
Şekil 4.13	Arkeozomların 2x2 µm'lik alan taranarak çekilen AFM görüntüsü.	62
Şekil 4.14	3 mg arkeal polar lipid ile oluşturulan arkeozomların 4x4 µm'lik alanda alınan üç boyutlu AFM görüntüsü.	63
Şekil 4.15	3 mg arkeal polar lipid ile oluşturulan arkeozomların 2x2 µm'lik alanda alınan üç boyutlu AFM görüntüsü.	63
Şekil 4.16	pEGFP-N1 plazmit DNA ile kompleks oluşturan arkeozomların (10 µl arkeozom/µg DNA) TEM görüntüsü.	65
Şekil 4.17	pEGFP-N1 plazmit DNA ile kompleks oluşturan arkeozomların (10 µl arkeozom/µg DNA) TEM görüntüsü.	65
Şekil 4.18	pEGFP-N1 plazmit DNA'nın (8 µg/ml) 2x2 µm'lik alan taranarak alınan AFM görüntüsü.	66
Şekil 4.19	pEGFP-N1 plazmit DNA'nın (8 µg/ml) 1x1 µm'lik alan taranarak alınan AFM görüntüsü.	66

Şekil 4.20	pEGFP-N1 plazmit DNA ile kompleks oluşturan arkeozomların (10 µl arkeozom/µg DNA) AFM görüntüsü.....	67
Şekil 4.21	pEGFP-N1 plazmit DNA ile kompleks oluşturan arkeozomların (10 µl arkeozom/µg DNA) 2x2 µm’lik alan taranarak çekilen üç boyutlu AFM görüntüsü.....	67
Şekil 4.22	pEGFP-N1 plazmit DNA ile kompleks oluşturan arkeozomların (10 µl arkeozom/µg DNA) AFM görüntüsü.....	68
Şekil 4.23	pEGFP-N1 plazmit DNA ile kompleks oluşturan arkeozomların (10 µl arkeozom/µg DNA) 1x1µm’lik alanda tarandığı üç boyutlu AFM görüntüsü.	68
Şekil 4.24	Plazmit DNA ile arkeozom kompleksinin boyut analizine ait grafik ve değerler.	69
Şekil 4.25	Arkeozom / plazmit DNA komplekslerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	70
Şekil 4.26	Arkeozom / plazmit DNA komplekslerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	70
Şekil 4.27	Kompleks oluşumuna pH etkisini gösteren agaroz jel elektroforez resmi. Her kuyucukta 5 µl arkeozom ile 0.5 µg plazmit DNA’dan oluşan kompleks bulunmaktadır.	71
Şekil 4.28	Boyutlandırması yapılmamış arkeozom formülasyonlarına ait boyut dağılım grafiği.	72
Şekil 4.29	pEGFP-N1 plazmit DNA enkapsüle etmiş arkeozomların TEM görüntüsü.	73
Şekil 4.30	pEGFP-N1 plazmit DNA enkapsüle etmiş arkeozomların TEM görüntüsü.	73
Şekil 4.31	pEGFP-N1 plazmit DNA enkapsüle etmiş arkeozomların atomik güç mikroskopunda alınan görüntüsü.	74
Şekil 4.32	pEGFP-N1 plazmit DNA enkapsüle etmiş arkeozomların atomik güç mikroskopunda alınan üç boyutlu görüntüsü.	74
Şekil 4.33	500 nm’lik alanda taranan plazmit DNA enkapsüle etmiş arkeozom preparatının atomik güç mikroskobu ile çekilen mikrografi.....	75
Şekil 4.34	Arkeozomların plazmit DNA enkapsülasyonuna ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	76
Şekil 4.35	Arkeozomların DNA enkapsülasyonuna ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	77
Şekil 4.36	Arkeozomların DNA enkapsülasyonunun incelendiği agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	77
Şekil 4.37	DOTAP ile pEGFP-N1 plazmit DNA kompleksinin (6 µl/µg DNA) TEM görüntüsü.....	78
Şekil 4.38	pEGFP-N1 plazmit DNA ile kompleks oluşturan DOTAP’ın (6 µl lipozom/µg DNA) TEM görüntüsü.....	79
Şekil 4.39	DOTAP/pEGFP-N1 DNA’sının 1x1µm’lik alan taranarak alınan AFM görüntüsü.....	80
Şekil 4.40	DOTAP/pEGFP-N1 DNA’sının 2.5x2.5µm’lik alan taranarak alınan üç boyutlu AFM görüntüsü.....	80
Şekil 4.41	DOTAP/pEGFP-N1 DNA’sının 10x10µm’lik alan taranarak alınan üç boyutlu AFM görüntüsü.....	81
Şekil 4.42	DOTAP ile hazırlanan lipozomlar, boş arkeozomlar ve DOTAP/arkeozom formülasyonlarının elektroforez sonuçları.	81
Şekil 4.43	Çizelge 4.7’de verilen örneklerin şiddete bağlı boyut dağılımını gösteren grafik.	83
Şekil 4.44	Çeşitli miktarlardaki arkeozom ve polibrenin plazmit DNA ile kompleks oluşturmaya ait jel fotoğrafı.	84
Şekil 4.45	Çeşitli miktarlardaki arkeozom ve polibrenin plazmit DNA ile kompleks	

	oluşturmasına ait jel fotoğrafı.	85
Şekil 4.46	1 µg pEGFP-N1 DNA'ya karşılık 10 µl arkeozom kullanılarak oluşturulan komplekslerin transfeksiyonuna ait fotoğraf.	86
Şekil 4.47	0.5 µg pEGFP-N1 DNA'ya karşılık 5 µl DOTAP kullanılarak oluşturulan kompleksler ile gerçekleştirilen transfeksiyona ait fotoğraf.	86
Şekil 4.48	1 µg pEGFP-N1 DNA'ya karşılık 5 µl DOTAP kullanılarak oluşturulan kompleksler ile gerçekleştirilen transfeksiyona ait fotoğraf.	87
Şekil 4.49	0.5 µg pEGFP-N1 DNA ile 5 µl DOTAP kullanılarak gerçekleştirilen transfeksiyona ait fotoğraf.	88
Şekil 4.50	0.5 µg pEGFP-N1 DNA ile 5 µl arkeozom-DOTAP karışımı (1:1) kullanılarak gerçekleştirilen transfeksiyona ait fotoğraf.	88
Şekil 4.51	1 µg pEGFP-N1 DNA ile 10 µl DOTAP kullanılarak gerçekleştirilen transfeksiyona ait fotoğraf.	89
Şekil 4.52	1 µg pEGFP-N1 DNA ile 10 µl arkeozom-DOTAP karışımı (1:1) kullanılarak gerçekleştirilen transfeksiyona ait fotoğraf.	89
Şekil 4.53	Arkeozomlara 20 mM CaCl ₂ eklenmesiyle elde edilen transfeksiyona ait fotoğraf.	90
Şekil 4.54	Arkeozomlara 50 mM CaCl ₂ eklenmesiyle elde edilen transfeksiyona ait fotoğraf.	90
Şekil 4.55	Arkeozomlara 100 mM CaCl ₂ eklenmesiyle elde edilen transfeksiyona ait fotoğraf.	90
Şekil 4.56	Plazmit DNA'ya 100 mM CaCl ₂ eklenmesiyle elde edilen transfeksiyona ait fotoğraf.	91
Şekil 4.57	1 µg ve 2 µg kitozan ile 1 µg pEGFP-N1 plazmit DNA'sının oluşturduğu kompleksin transfeksiyon etkinliğini gösteren fotoğraflar.	91
Şekil 4.58	4 µg ve 8 µg kitozan ile 1 µg pEGFP-N1 plazmit DNA'sının oluşturduğu kompleksin transfeksiyon etkinliğini gösteren fotoğraflar.	92
Şekil 4.59	2 µg kitozan ile 10 µl arkeozomun 1 µg pEGFP-N1 plazmit DNA'sı ile oluşturduğu kompleksin transfeksiyon etkinliğini gösteren fotoğraf.	92
Şekil 4.60	8 µg kitozan ile 1 µg pEGFP-N1 plazmit DNA'sının 10 µl arkeozom ile oluşturduğu kompleksin transfeksiyon etkinliğini gösteren fotoğraf.	92
Şekil 4.61	Arkeozomlarla gerçekleştirilen <i>in vitro</i> transfeksiyon sonucunda elde edilen β-Galaktosidaz aktiviteleri.	94
Şekil 4.62	DOTAP kullanılan <i>in vitro</i> transfeksiyon ile arkeozom kullanılan <i>in vitro</i> transfeksiyon sonucunda elde edilen β-Galaktosidaz aktiviteleri.	95
Şekil 4.63	Plazmit DNA'nın polibren ile bağlanması sonucu elde edilen arkeozomal transfeksiyona ait β-Galaktosidaz aktiviteleri.	96
Şekil 4.64	Kitozanın arkeozomlarla yapılan <i>in vitro</i> transfeksiyon üzerindeki etkisini gösteren β-Galaktosidaz aktiviteleri.	97
Şekil 4.65	Kalsiyum ve arkeozom ile gerçekleştirilen <i>in vitro</i> transfeksiyonlara ait β-Galaktosidaz aktiviteleri.	98
Şekil 4.66	Kalsiyumun arkeozomal transfeksiyona etkisini gösteren β-Galaktosidaz aktiviteleri.	99
Şekil 4.67	Arkeozom ve lityumlu komplekslerin <i>in vitro</i> transfeksiyon etkinliğini gösteren β-Galaktosidaz aktiviteleri.	100

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1	<i>Halobacteriales</i> ordosuna ait cinsler ve türler (Tindall, 1992; Grant vd., 2001)	14
Çizelge 4.1	Fosfolipid tayini standart çözeltilerinin konsantrasyonları ve 680 nm'deki absorbans değerleri	52
Çizelge 4.2	Belirli konsantrasyonlarda BSA içeren örneklerin Bradford ayırıcı ile girdikleri reaksiyon sonucu 595 nm'de verdikleri absorbans değerleri.....	56
Çizelge 4.3	β -Galaktosidaz standart grafiği için hazırlanan sulandırım serileri ve reaksiyon sonrası 420 nm dalga boyunda ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerleri	57
Çizelge 4.4	Boş arkeozomlara ait zeta potansiyeli ve boyut büyüklüğü değerleri.	60
Çizelge 4.5	Arkeozom/plazmit DNA kompleksine ait boyut ve zeta değerleri.....	64
Çizelge 4.6	Plazmit DNA'nın arkeozomlar tarafından enkapsüle edilmesine ait zeta değerleri	72
Çizelge 4.7	Farklı konsantrasyonlardaki polibrenin ve polibrenle formüle edilen arkeozomların zeta potansiyeli ve boyut büyüklüğü değerleri	82

TEŞEKKÜR

Deneysel çalışmalarım sırasında yanımda olan, tüm bilgisini benimle paylaşan ve bana yol gösteren değerli hocam Doç. Dr. Kadir TURAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora çalışmamın gerçekleşmesini sağlayan ve çıktığım bu yolda bana büyük katkısı olan Prof. Dr. Huriye KUZU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum, kendisini saygıyla anıyorum. Artık aramızda olmasa da kendisini bilim adına attığımız her adımda bir kez daha hatırlayacağız.

Tez çalışmamın her aşamasında maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ayşe OGAN'a sonsuz teşekkürler ederim.

Güler yüzü ve pozitif enerjisiyle desteğini her zaman hissettiğim sevgili hocam Doç. Dr. Sevil YÜCEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Biyomühendislik bölümünde olmama vesile olan değerli hocam Prof. Dr. Mustafa AKDESTE'yi saygıyla anıyorum.

Deneylerimde kullandığım mikroorganizmayı bana sağladığı için Prof. Dr. Meral BİRBİR'e teşekkür ederim.

AFM görüntüleri için Arş. Gör. Yeliz BAŞARAN ELALMIŞ'a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde bana destek olan ve bu uğurda hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan biricik can yoldaşım, sevgili annem Dr. Aysel VARLIK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezi, rahmetli hocam Prof. Dr. Huriye KUZU'ya ve sevgili anneme armağan ediyorum.

ÖZET

DNA’NIN ARKEOZOMLARLA FORMÜLASYONU, *IN VITRO* KARAKTERİZASYONU VE MEMELİ HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE TAŞIYICI OLARAK KULLANILMASI

Bu çalışmada aşırı halofilik özelliğe sahip *Haloarcula hispanica*’dan ekstre edilen polar lipidler kullanılarak hazırlanan lipozomların (arkeozomlar) DNA moleküllerinin memeli hücrelerine verilmesinde taşıyıcı olarak potansiyeli araştırılmıştır. *H. hispanica* pastel portakal izolatu Birbir ve arkadaşları tarafından Tuzköy Tuz Madenlerinden izole edilmiştir (2004). *Haloarcula hispanica* büyük ölçekli steril Brown besiyerine ekilerek 40°C’de 120 dev/dak çalkalama hızında yaklaşık 30 gün boyunca üretilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler +4°C’de, 10 000 dev/dak hızda, 10 dakika santrifüj edilerek toplandı ve lipid izolasyonunda kullanıldı. Lipid ekstraksiyonunda kloroform/metanol/distile su (1:2:0.8, v/v) kullanıldı ve polar lipid fraksiyonu soğuk aseton ile çöktürülerek yapıldı. Elde edilen lipidler, rotary evaporatörde buharlaştırılarak evaporasyon balonu cidarında ince bir film haline getirildi. Lipid tabakası 10 mM HEPES tamponu (pH = 7.4) içerisinde hidrate edildi. Elde edilen arkeozomlar enjeksiyon sisteminden geçirilerek boyutlandırıldı ve +4°C’de saklandı. Plazmitler pEGFP-N1 (Clontech, ABD) ve pSV-β-Gal (Promega, ABD), *Escherichia coli* hücrelerinde çoğaltıldı. *E.coli* hücreleri Luria Bertani besiyerinde (pH = 7.0) hücre yoğunluğu ortalama 4×10^9 h/ml olacak şekilde üretilmiştir. Hücreler santrifüjle toplandı ve plazmit DNA, Peqlab MidiPrep Plazmit Kit kullanılarak saflaştırıldı. Plazmit DNA’ların arkeozomlara yüklenmesinde iki farklı yöntem izlendi: a) HEPES tamponu ile hidrate edilerek hazırlanan boş arkeozomlar belli oranlarda plazmit DNA ile karıştırılarak oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Plazmit DNA/arkeozom kompleksi oluşumu ve bağlanmamış plazmit DNA agaroz jel elektroforezi ile incelendi, b) Arkeal lipidler evaporasyon ile balon cidarında ince bir film haline getirildikten sonra hidrasyon aşamasında plazmit DNA ortama katıldı. Plazmit DNA’lar ve DNA enkapsüle etmiş arkeozomlar agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan arkeozomların zeta potansiyelleri ve partikül boyutları Zetasizer Nano ZS cihazında ölçüldü. Transfeksiyonda HEK293 (insan embriyonik böbrek) hücre hattı kullanıldı. HEK293 hücre hattı %10 fetal bovin serum içeren D’MEM besiyerinde 37°C %5 CO₂ inkübatöründe kültüre edildi. GFP (yeşil floresan proteini) ekspresyonu floresan mikroskopu ile incelendi. β-Galaktosidaz ekspresyonu, hücre lizatlarında β-Galaktosidaz aktivitesinin spektrofotometrik yöntemlerle ölçülmesi ile saptandı. Hazırlanan arkeozom örneklerinin morfolojik özellikleri tarayıcı prob mikroskopunun atomik güç modunda (AFM) ve transmisyon elektron mikroskopu (TEM) kullanılarak incelendi. pEGFP-N1 transfeksiyon çalışmaları arkeozomlu örneklerin çıplak DNA’dan daha fazla GFP ekspresyonu yapması ile sonuçlandı. Yine de, ticari transfeksiyon reaktifi ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyesi düşüktür. pSV-β-Gal plazmiti ile elde edilen sonuçlar da pEGFP-N1 ile paralellik gösterdi. Sonuç olarak, arkeozomların elektronegatif olması DNA’ya bağlanma potansiyelini dolayısıyla da *in vitro* transfeksiyon etkinliğini azaltmaktadır. Transfeksiyon etkinliğini arttırmak için DOTAP, polibren, kitozan ve Ca²⁺ iyonlarından yararlanılmıştır. Kalitatif incelemeler sonucunda arkeal lipidlerin DOTAP’ın *in vitro* transfeksiyon etkinliğini arttırdığı gözlenmiştir. Ca²⁺ iyonları ile yapılan çalışmada ise artan konsantrasyonda CaCl₂’nin arkeozomlar ile *in vitro* transfeksiyon etkinliğini belirgin düzeyde arttırdığı saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Haloarcula hispanica*, arkeozom, lipid ekstraksiyonu, plazmit, gen transferi, transfeksiyon.

ABSTRACT

FORMULATION AND *IN VITRO* CHARACTERIZATION OF DNA WITH ARCHAESOMES AND ITS UTILIZATION AS DNA CARRIER TO MAMMALIAN CELL CULTURES

This study investigates the DNA delivery potential of archaeosomes prepared from *Haloarcula hispanica* to mammalian cells. The archaeal lipids were extracted from extremely halophilic archaea *Haloarcula hispanica* isolated from Tuzköy Salt Mine by Birbir *et al.* (2004). *Haloarcula hispanica* cells were grown aerobically at 40°C, pH 7.5, for 30 days in Brown medium containing 18% NaCl. All cultures were harvested by centrifugation and stored at -20°C as cell pastes. Lipids were extracted using methanol/chloroform/water (2:1:0.8, v/v), and total polar lipid fraction collected by cold acetone precipitation. Polar lipids were dried by rotary evaporatory and the dry lipid film obtained was hydrated in 10 mM HEPES buffer, pH 7.4. Archaeosomes were sized by injection systems and stored in +4°C. Two types of plasmid vectors were used: pEGFP-N1 (Clontech, USA) and pSV-β-Gal (Promega, USA). Archaeosome/plasmid DNA complexes were formed by adding plasmid DNA to various concentrations of hydrated archaeal lipid fractions by vortexing and incubating at room temperature for 20 minutes. DNA encapsulated archaeosomes were prepared by the addition of plasmid DNA during the hydration process of archaeal lipid film. Archaeosome/plasmid DNA formation and unbound DNA were monitored by agarose gel electrophoresis. The surface charge density of archaeosomes was measured by Zeta-Sizer. The archaeosomes were found to be electronegative by the zeta potential analysis. Human embryonic kidney (HEK293) cell line was used for the transient transfection experiments. The DNA transfection efficiency was measured by β-Galactosidase assay or monitored with fluorescence microscope. Archaeosome formulations were visualized by atomic force microscope (AFM) and transmission electron microscope (TEM). The pEGFP-N1 transfection studies resulted in higher GFP expression in archaeosome samples than naked DNA. However, the expression level is considerably low when compared to conventional transfection reagents. The results are parallel with samples prepared with pSV-β-Gal plasmid. As a conclusion, the electronegativity of archaeosomes lowers the DNA binding potential and so the *in vitro* transfection efficiency. To improve the DNA delivery capacity of archaeosomes, electropositive molecules such as DOTAP, polibren, chitosan and Ca²⁺ ions were used. Observations showed that archaeal lipids improve *in vitro* transfection efficiency of DOTAP. Also, the results indicated that increasing concentrations of CaCl₂ improved *in vitro* archaeosomal transfection efficiency in a prominent manner.

Keywords: *Haloarcula hispanica*, archaeosome, lipid extraction, plasmid, gene transfer, transfection.

1. GİRİŞ

Lipozomlarla ilgili ilk çalışma Bangham ve arkadaşları (1964) tarafından yapılmıştır. Sadece hücre membranına model oluşturmak üzere başlatılan bu çalışmalar lipozomların etkin madde taşıyıcısı olarak kullanılabileceğinin anlaşılması ile yoğunlaşmıştır. Günümüzde birçok aktif madde farklı özelliklerde lipozomlarla formüle edilmekte ve tedavide kullanılmaktadır. Arkeozomların tek başına antijen teslim ettiği ve dendritik hücre aktivitesini değiştirdiği tespit edilmiştir (Benvegna vd., 2004). Antikor tarafından sağlanan (Th1/Th2) immün reaksiyonlarını desteklerler. Arkeozomların, konvansiyonel lipozomlara göre daha kararlı olduğu bildirilmiştir (Krishnan, 2000). Etkin maddenin terapötik etkisini arttırabilirler (Allen, 2000). Arkeozomların diğer kolloidal sistemlere göre üstünlükleri vardır. Arkeozomlar, vücudun yapı taşı olan fosfolipidlerden oluştukları için biyolojik olarak yıkılırlar, immünojenik ve toksik etki göstermezler. Küçük dozları bile terapötik etki sağlayabilir, etkin maddeyi enzimatik etkilerden korurlar, yarılanma ömrü kısa olan maddelerin yarılanma ömrünü uzatırlar, suda ve yağda çözünen etkin maddeleri taşıyabilirler ve DNA veya RNA gibi makromolekülleri hedef bölgeye götürebilirler. Dolayısı ile lipozom preparatları geleceğin ilaç taşıyıcı ve gen transfer sistemleri olarak özellikle gelişen gen teknolojisi ile gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Gen tedavisi çalışmalarında karşılaşılan en önemli sorun olan DNA moleküllerinin hedef hücrelere ulaştırılması, bu alanda çalışan tüm araştırmacıları etkili bir yol bulmaya yönlendirmiştir. Arkeozomlar yukarıda bahsedilen özelliklerinden ötürü DNA transferinde umut vaat etmektedirler.

Bu çalışmada halofilik özelliğe sahip *Haloarcula hispanica*'dan ekstre edilen polar lipidler ile hazırlanan lipozomların (arkeozomlar) DNA moleküllerinin memeli hücrelerine verilmesinde taşıyıcı olarak potansiyeli incelenmiştir. Bu amaçla:

- I) pEGFP-N1 ve pSV- β -Gal plazmit DNA'lar üretildi ve saflaştırıldı.
- II) *Haloarcula hispanica* kültürü büyük ölçekli olarak yapıldı ve total lipidler ekstre edildi.
- III) Polar lipidler soğuk aseton çöktürmesi ile total lipid fraksiyonundan ayrıldı.
- IV) Plazmit DNA'nın arkeozomlarla formülasyonu gerçekleştirildi.
- V) Arkeozomların *in vitro* kontrolleri agaroz jel elektroforezi, Zeta-Sizer, AFM ve TEM cihazları kullanılarak incelendi.
- VI) *In vitro* transfeksiyon sonuçları kullanılan plazmite göre iki farklı şekilde

değerlendirildi. pEGFP-N1 plazmitinin kullanıldığı deneylerde sonuçlar, floresan mikroskop altında GFP proteinin ekspresyonu izlenerek değerlendirildi. pSV- β -Gal plazmitinin kullanıldığı deneylerde ise, transfekte hücrelerden hazırlanan lizatta, β -Galaktosidaz enzim aktivitesi spektrofotometrik yöntemler ile kantitatif olarak belirlendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Lipozomlar

Lipozomlar katmanlı fosfolipidlerin bileşimiyle meydana gelen çok küçük (nanometre boyutunda) sulu faz içeren küreciklerdir. Lipozomların yapısı genel olarak Şekil 2.1’de görülmektedir.



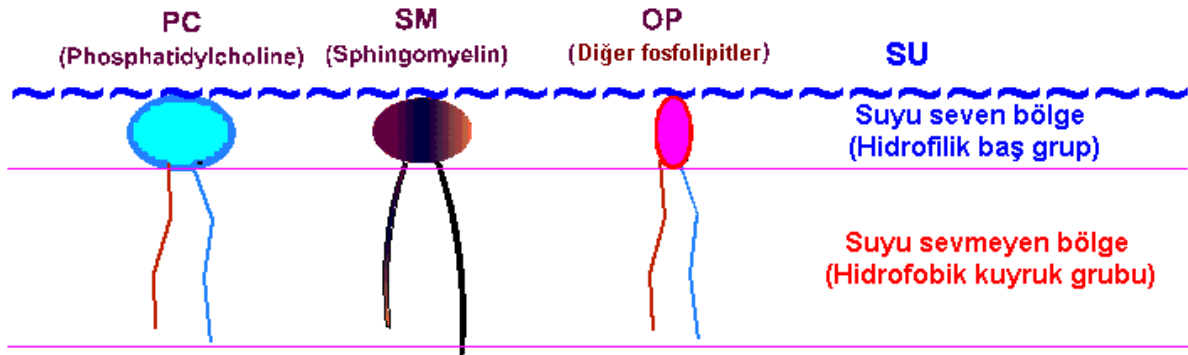
Şekil 2.1 Tek tabakalı bir lipozomun yapısı [1].

Lipozomlar, temel olarak aktif maddelerin etkinliğini arttıracak ve istenmeyen toksik özelliklerini azaltacak şekilde, çok seçici olarak maddelerin taşınmasında kullanılmaktadır. Diğer durumlarda, lipozomlar etkinin uzatılmasında, adsorbsiyonun geliştirilmesinde veya basitçe aktif maddelerin stabilize edilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca gen transferinde ve çeşitli teşhis ve endüstriyel uygulamalarda yararlı olmaktadır. Boyutları ve fizikokimyasal özellikleri, bu yapıların kapsüllenmiş ürünü serbest bırakarak doku içine değişik yollarla penetrasyon ve difüzyonuna yol açmaktadır [1].

Lipozomlar son yıllarda tıbbın pek çok uygulama alanında ilgi odağı haline gelmiştir. Lipozomların akışkanlığı, geçirgenliği ve moleküler organizasyonu gibi özellikleri üzerine yoğunlaşmış olan fizikokimyasal çalışmalar, doğal membranların yapısal elementi olarak çift katlı lipid tabakalarının önemini ortaya koymaktadır. Hücre biyolojisinde lipozom-hücre etkileşimleri, füzyon ve adhezyon gibi fizyolojik proseslere bir model teşkil etmektedir. Buna ek olarak, hücre-hücre füzyonunu geliştirmek, membranların fosfolipid ve kolesterol içeriğini değiştirmek ve normal olarak suda çözünebilen, fakat hücre içine geçişi zor moleküllerin transferinde kullanılabilir. Ayrıca klinik araştırmalarda insülin, çeşitli enzimler ve anti tümör ilaçlar gibi çeşitli terapötik ilaçların farmakolojik kapsülleri olarak da kullanılmaktadır (Coral, 2000).

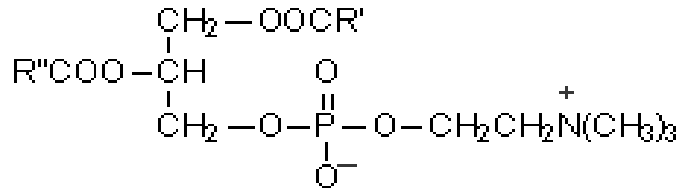
2.2 Lipozomların Yapısı ve Özellikleri

Lipozomların yapısını anlamak için öncelikle lipid ve fosfolipidin ne olduğunu kısaca açıklamak gerekmektedir. Lipidler, yağ ve vakslar gibi canlı organizmalarda meydana gelen bir grup kimyasal bileşik olup, sudaki çözünürlükleri oldukça düşüktür. Fosfolipidler ise, fosfat grubu içeren bir tür özel lipid olarak tanımlanabilir. Fosfolipidler lipozomların ve hücre zarının yapıtaşlarıdır. Lipidler genellikle hidrofob ve apolar bir yapıya sahiptirler. Bu nedenle su ile karışmazlar. Fakat fosfolipidlerin fosfat grubu hidrofil ve polar yapıya sahip olduğundan, bunlar suyla karıştırılabilmektedir. Şekil 2.2’de belli başlı fosfolipid grupları ve bunların fiziksel ve kimyasal yapıları gösterilmektedir.



Şekil 2.2 Başlıca fosfolipid grupları ve bunların fiziksel ve kimyasal yapıları (Yurdakul ve Atav, 2007).

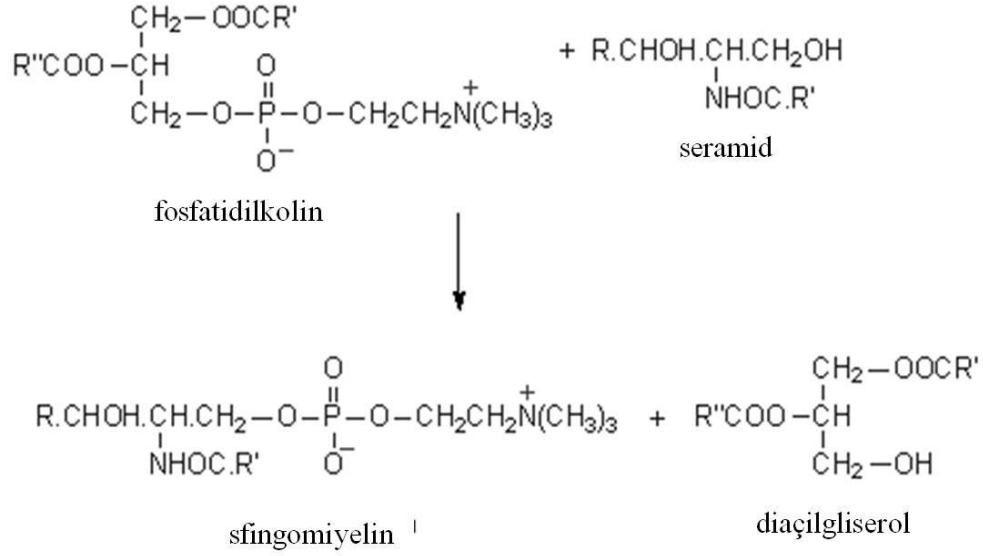
Fosfatidilkolin (lesitin), hayvan ve bitkilerde sıkça rastlanan fosfolipid olup, toplamın %50’si kadarını oluşturmaktadır. Fosfatidilkolin iki katlı (bilayer) membranların temel yapı taşıdır. Özellikle plazma zarının dış yaprakçığının büyük bir kısmını teşkil etmektedir. Fosfatidilkolin aynı zamanda plazmadaki temel fosfolipid olup, lipoproteinlerin önemli bir bileşenidir. Bakteriyel zarlarda ise daha az miktarda (bakteri türlerinin muhtemelen %10’ununda) bulunmaktadır. Bunlar kuvvetli asidik ortamdan kuvvetli bazik ortama kadar değişen pH aralığında amfoter veya nötr karakterde olan fosfolipidlerdir (Yurdakul ve Atav, 2007).



Şekil 2.3 Fosfatidilkolinin kimyasal yapısı.

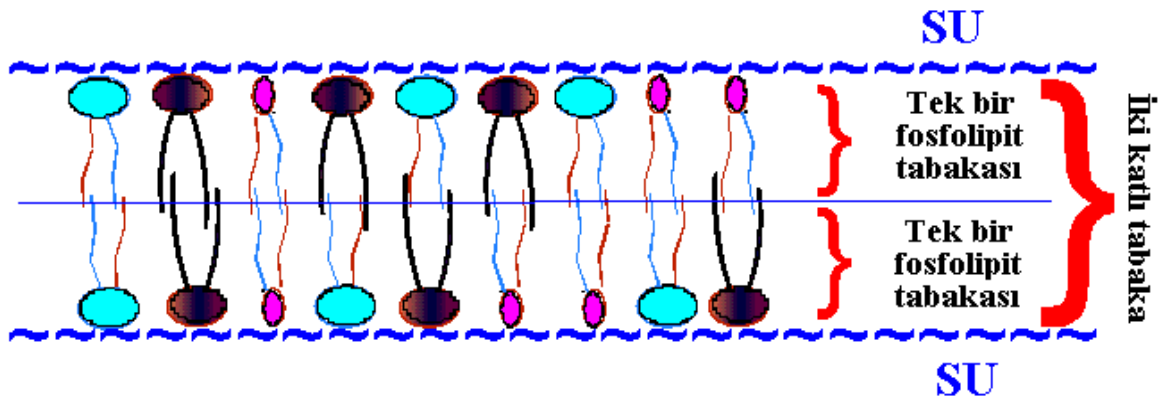
Sfingomiyelin, pozisyon 1’e eklenmiş fosforilkolin parçası ile seramid biriminden oluşmaktadır. Buradan sfingolipidin’in fosfatidilkolinin benzeri olduğu ortaya çıkmaktadır. Sfingomiyelin, hayvan hücresinin zarında sıkça rastlanan bir bileşiktir ve sfingolipid en fazla

miktarda burada bulunmaktadır. Gerçekte, belirli dokulardaki lipidlerin %50 kadarını kapsayabilmektedir ve bu nedenle fosfatidilkolinden daha az miktarda bulunmaktadır (Yurdakul ve Atav, 2007).



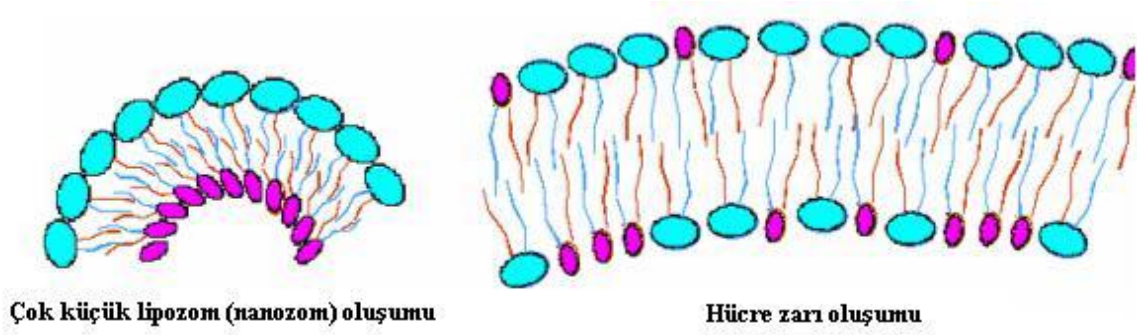
Şekil 2.4 Sfinomiyelinin oluşumu ve kimyasal yapısı.

Fosfolipidler su içerisine eklendiğinde, hidrofilik bölgeleri suya doğru ve hidrofobik bölgeleri sudan uzaklaşacak şekilde kendilerini düzene sokarlar. Fosfolipidlere özgü bu eş zamanlı hidrofilik/hidrofobik yapıya sahip olmaları, bunların su içerisinde çift tabakalı gibi yapılanma özelliğinin temel nedenidir. Fosfolipid ve su molekülleri arasındaki çekme ve itme kuvvetleri, fosfolipidlerin kendi aralarında çift tabakalı (bilayer) gibi organize olmasını sağlamaktadır. Bu durum Şekil 2.5'te açık bir şekilde görülmektedir (Yurdakul ve Atav, 2007).



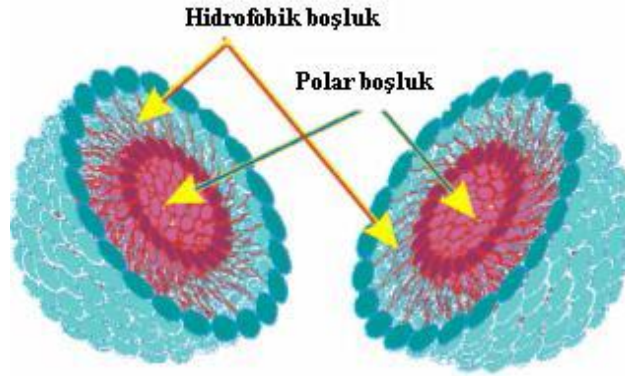
Şekil 2.5 Fosfolipidler arasındaki dikey ve yatay etkileşimler (Yurdakul ve Atav, 2007).

Bu çift katlı fosfolipid tabakaları, lipozom ve hücre zarının çekirdek yapısını oluşturmaktadır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Çift katlı fosfolipid tabakalarından lipozom ve hücre zarının oluşumu (Yurdakul ve Atav, 2007).

Lipozomların üç boyutlu yapısı bir topa benzemektedir. İç yapılarının görülebilmesi için Şekil 2.7’de bu top ikiye bölünmüştür.



Şekil 2.7 Lipozomun üç boyutlu yapısı (Yurdakul ve Atav, 2007).

Şekil 2.7’den görülebileceği üzere lipozomlar hem hidrofilik polar hem de hidrofob apolar boşluklar içermektedir. Bu sayede suda çözünebilir maddeleri polar boşluklarında, yağda çözünebilir maddeleri ise hidrofobik boşluklarında kapsülleyerek bunlar için bir taşıyıcı vazifesi görebilmektedirler. Lipozomlar içlerindeki özel boşluklarda suda çözünen maddeleri yağda çözünen maddelere göre daha iyi bir şekilde kapsülleyebilmekte ve taşıyabilmektedirler (Yurdakul ve Atav, 2007).

Lipozomlar gerek sentetik gerekse doğal fosfolipidlere kolesterol ilave edilerek oluşturulmaktadır. Formülasyonlar daha çok tarihi sebeplerden veya doğal membran kompozisyonlarına olan benzerlik (analoji) sebebiyle tercih edilegelmiştir. Lipozomların hazırlanmasında en çok fosfatidilkolin (Lesitin) kullanılmaktadır (Coral, 2000).

Her fosfolipid türü bir jel-sıvı geçiş sıcaklığı (T_c) ile karakterize edilmektedir. Bu sıcaklığın altında yağ asidi zincirleri hemen hemen bir kristal düzlemindedir. Bu sıcaklığın üzerinde ise zincirler daha sıvı bir fazdadır. Zincirin erimesi ile birlikte çift tabakanın kalınlığı azalmakta

ve her bir molekül başına düşen alan artmaktadır. Bu değişiklikler X-ışını diffraksiyonu, nükleer manyetik rezonans, elektron spin rezonans, differansiyel scanning kalorimetrisi ve floresans depolarizasyonu gibi çeşitli fiziksel tekniklerle araştırılmıştır. Genel olarak Tc değeri zincir boyu azaltılarak, ana zincirlerin doyurulmamasıyla, büyük yan gruplarla ve asıl zincirin dallanma göstermesi gibi durumlarla azaltılabilir. Polar bağ grupları da geçiş sıcaklığını etkiler, fakat ana zincirler kadar etkili olmaz. Doğal fosfolipidler (örneğin yumurta fosfatidilkolini), doymuş ve doymamış ana zincirlerin bir kompleksini içerir ve düşük sıcaklık geçişlerinin geniş oluşu ile karakterize edilir. Küçük unilamellar veziküller genellikle daha düşük ve daha geniş geçiş sıcaklıkları göstermektedir (Yurdakul ve Atav, 2007).

Farklı lipozomal formülasyonların özellikleri;

- hazırlama teknikleri
- lipid yapısı
- yük
- etken maddeler

tarafından belirlenmektedir. Tüm bu parametrelerin elde edilen lipozomal ürünün davranışı üstünde önemli etkisi vardır. Hücre ile lipozom arasındaki moleküler etkileşim kadar boyut da, en etkili hedefe ulaşmada göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin çok özel bir amaca ulaşabilmek, lipozomların yüzeyine monoklonlu antikorların bağlanmasıyla mümkün olmuştur [1].

Fosfolipidlerin hücreler üzerine olan etkileri ile ilgili araştırmaların başlangıcı 1900'li yıllara dayanmasına rağmen, sadece yeni yapılan bazı çalışmalar lipozomal yapılarla hücrelerin etkileşimi açısından bir takım açıklamalarda bulunabilmiştir. Bu gibi etkileşimlerin mekanizmaları ancak 1970'li yıllarda hücre biyolojisi ve tıp alanında lipozom uygulamalarının odağı haline gelmiştir (Coral, 2000). Günümüzde lipozomların hücrelerle farklı yollarla etkileşime girebildiği bilinmektedir. Bunlar; füzyon, adsorpsiyon, endositoz ve fagositoz şeklinde sıralanabilir. Lipozom ve hücre tipine bağlı olarak bunlardan biri ya da diğer etkileşimler meydana gelebilmektedir. Lipozomla hücreler arasındaki etkileşimlerin, büyük ölçüde lipozomların yapısı ve bileşimine bağlı olduğu bulunmuştur (Yurdakul ve Atav, 2007).

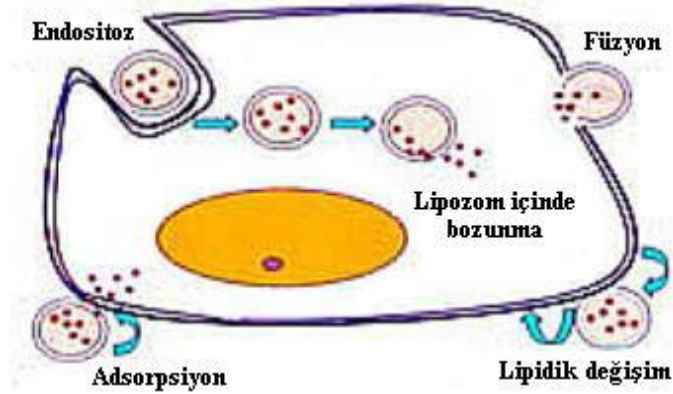
2.2.1 Lipozomlanmış Maddelerin Hücrelere Giriş Yolları

Lipozomlanmış maddelerin hücrelere verilışı başlıca üç yolla olur (Gürsoy vd., 1989; Scherphof, 1991):

Endositoz: Hücredeki lizozomun lipozomu parçalaması sonucu madde salınır. Fizyolojik pH'da endozom membranı ile füzyon yaparak birleşirler ve içlerindeki maddeleri sitoplazmaya salarlar. Endositozun bir diğer şekli reseptör aracılığı ile olan endositozdur. Spesifik bir hücre için hedeflendirici molekül içeren lipozom, bu hücredeki reseptörler tarafından tutulunca içeriğini ekstraselüler olarak salar ve etkin madde plazma membranından difüze olarak etkisini gösterir (Sharma ve Sharma, 1997).

Füzyon: Lipozomun lipid tabakası ile hücre membranının eriyerek birleşmesidir. Tek tabakalı lipozom, hücre membranı ile füzyon yapınca sulu fazda çözünmüş maddeler hücre sitoplazmasına geçer. Çok tabakalı lipozomlar, hücre membranı ile füzyon yapınca birleşen tabakanın altındaki alınır ve hücre organelleri tarafından parçalandıktan sonra etkin madde serbest hale geçer. Ancak *in vivo* koşullarda bu mekanizma çok yaygın değildir.

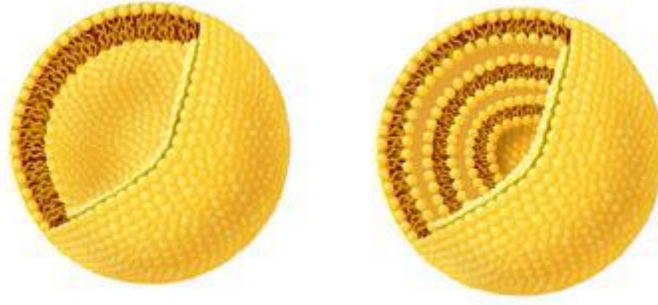
Adsorpsiyon: Önce lipozom hücre membranına adsorbe olur ve lipozomdan difüze olan maddeler hücre membranını geçerek içeri girerler.



Şekil 2.8 Lipozomlanmış ilaçların hücrelere verilış mekanizmaları [1].

2.2.2 Lipozomların Sınıflandırılması

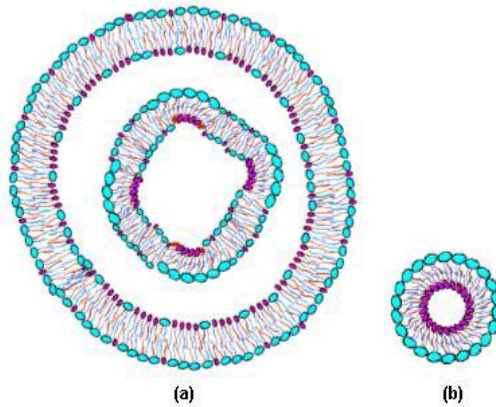
Lipozomlar boyutlarına göre küçük (Small) ve büyük (Large) olarak, katman sayılarına göre tek tabakalı (Monolayer), iki tabakalı (Bilayer) ve çok tabakalı (Multilayer) olarak sınıflandırılmaktadır. Her bir sınıf kendine has potansiyel uygulama alanına sahiptir. Örneğin eczacılıkta daha çok tek katmanlı lipozomlar (40-250 nm) tercih edilmektedir. Farklı lipozom çeşitlerini elde etmek için farklı hazırlık teknikleri ve lipidik bileşimler kullanılmaktadır.



Şekil 2.9 Tek (Monolayer) ve çok tabakalı (Multilayer) lipozom [2].

Büyük, çok tabakalı lipozomlar gerçekte lipozom içinde lipozom olarak tanımlanabilir. Bunların dar kan damarlarına veya deri içerisine penetrasyon kabiliyetleri sınırlıdır. Lipozomların iç tabakalarına hapsedilen materyallerin ulaşılabilirliği ve serbest bırakılabilirliği ortadan kalkmaktadır. Büyük lipozomların eldesi kolaydır. Sadece fosfolipidin su içerisinde çalkalanması yeterlidir. Bu lipozomlar çok sınırlı bir fonksiyona sahiptirler ve genellikle en yaygın olarak gıda ürünlerinde bulunan ticari lesitinden yapılırlar.

Tek ve iki tabakalı lipozomlar, büyük lipozomlardan bazı temel özellikler bakımından farklılık göstermektedir. Bunlar mümkün olan en yüksek kaliteye sahip bileşenlerden oluşmakta ve özel tekniklere göre üretilmektedir. Nanozomlar ticari lesitinden daha kaliteli materyallerden elde edilmektedir. Nanozom eldesinde kullanılan madde oldukça yüksek oranda fosfatidilkolin (PC) içermektedir. Çok küçük, tek-iki tabakalı lipozomların (nanozomlar) üretilmesi çok zordur, bu nedenle özel yöntemler kullanılmaktadır. Nanozomun eldesi, büyük ve çok tabakalı lipozomlara ultrasonik enerji uygulanmasını gerektirmektedir. Bu yöntem çok uzun ve son derece dikkat isteyen bir tekniktir. Ayrıca küçük partiler halinde yapılmaktadır. Nanozomlar enjeksiyon yoluyla kolaylıkla küçük kan damarlarına ve lokal aplikasyonlarla deri içerisine penetre olabilmektedir. Şekil 2.10'da küçük ve büyük lipozomlar arasındaki bazı yapısal farklılıklar görülmektedir.



Şekil 2.10 Büyük çok tabakalı lipozom (a) ve çok küçük tek-iki tabakalı lipozom (b) [2].

Lipozomlar tabaka sayısına göre sınıflandırılabilir;

- Multilamellar Veziküller (MLV): Multilamellar veziküllerde (MLV) iki tabaka arasındaki boşluklar, birbirine yaslanmış lameller arasındaki itici hidrasyon kuvvetleri ile Van der Waals ve elektrostatik çekim kuvvetleri arasındaki dengenin bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır.
- Küçük Unilamellar Veziküller (SUV): Küçük unilamellar veziküller, çapları yaklaşık 200-500 angström olan veziküllerdir. Sıvı kompartmanı sadece bir çift lipid tabakası tarafından kuşatılmıştır. SUV'ler büyüklüklerine ek olarak, çeşitli özellikleri bakımından da farklılıklar göstermektedir.
- Büyük Unilamellar Veziküller (LUV): Bu tip veziküllerin çapları yaklaşık 600 angströmden bir kaç mikrona kadar değişiklik göstermektedir.

2.2.3 Maddelerin Lipozomlarda Tutulması ve Tutulmamış Maddelerin Uzaklaştırılması

Maddelerin lipozomlarda tutulabilmesi için genel olarak iki yöntem kullanılır:

1. Lipozomların hazırlanması sırasında etkin madde ilavesi
2. Boş lipozomlara etkin madde yüklemesi

Lipozomların hazırlanması sırasında etkin madde ilavesi: Genel olarak maddeler lipozomların hazırlanması sırasında formülasyona katılırlar. Bu yöntemde hidrofilik maddeler sulu fazda, lipofilik maddeler ise lipidlerin çözündürüldüğü organik fazda çözündürülürler. Bir lipozom formülünde sadece hidrofilik veya lipofilik madde bulunabileceği gibi her iki tip etkin madde birlikte yani aynı lipozomda tutulabilir. Hidrofilik etken madde sulu fazda, lipofilik etken madde ise lipid fazda tutulur (Kut, 2000).

Boş lipozomlara etkin madde yüklenmesi: Bu yöntemde önce boş lipozomlar hazırlanır ve bu boş lipozomlar etkin madde çözeltisi ile karıştırılır. Sonra değişik işlemler uygulanarak etkin madde lipozomlara yüklenir. Bu işlemlerden biri dondurup-çözme işlemidir. (Fresta vd.,1995; Bochot vd., 1998). Boş lipozomlara etkin madde yüklemek için uygulanan bir diğer işlem, “aktif yükleme” veya “uzaktan yükleme” veya “kademeli pH’da yükleme” olarak isimlendirilir. Bu yüklemenin sadece hidrofilik etkin maddelere uygulanabileceği bildirilmiştir. Boş lipozomun iki tarafındaki yani dış ortam ve lipozomun iç fazı arasındaki pH farkından yararlanılarak madde yüklenir. Bu işlem sırasında lipozomlar belli bir pH ve sıcaklıktaki etkin madde çözeltisi ile belli bir süre bekletilir. Sonra bağlanmamış etkin madde

uzaklaştırılır (Sharma ve Sharma, 1997).

Lipozomlar hazırlandıktan sonra çözeltide kalan tutulmamış maddeyi ortamdan uzaklaştırmak için bazı yöntemler kullanılır. Bunlar, diyaliz yöntemi, çeşitli Sephadex ve Sepharose jeller kullanılarak jel filtrasyon, yüksek devirde ultrasantrifüj ve iyon değiştirici reçinelerin kullanılmasıdır. Tam bir temizleme için aynı işlemi birkaç kere tekrarlamak veya iki değişik işlem uygulamak gerekebilir (Gürsoy vd.,1989; Vemuri ve Rhodes,1995).

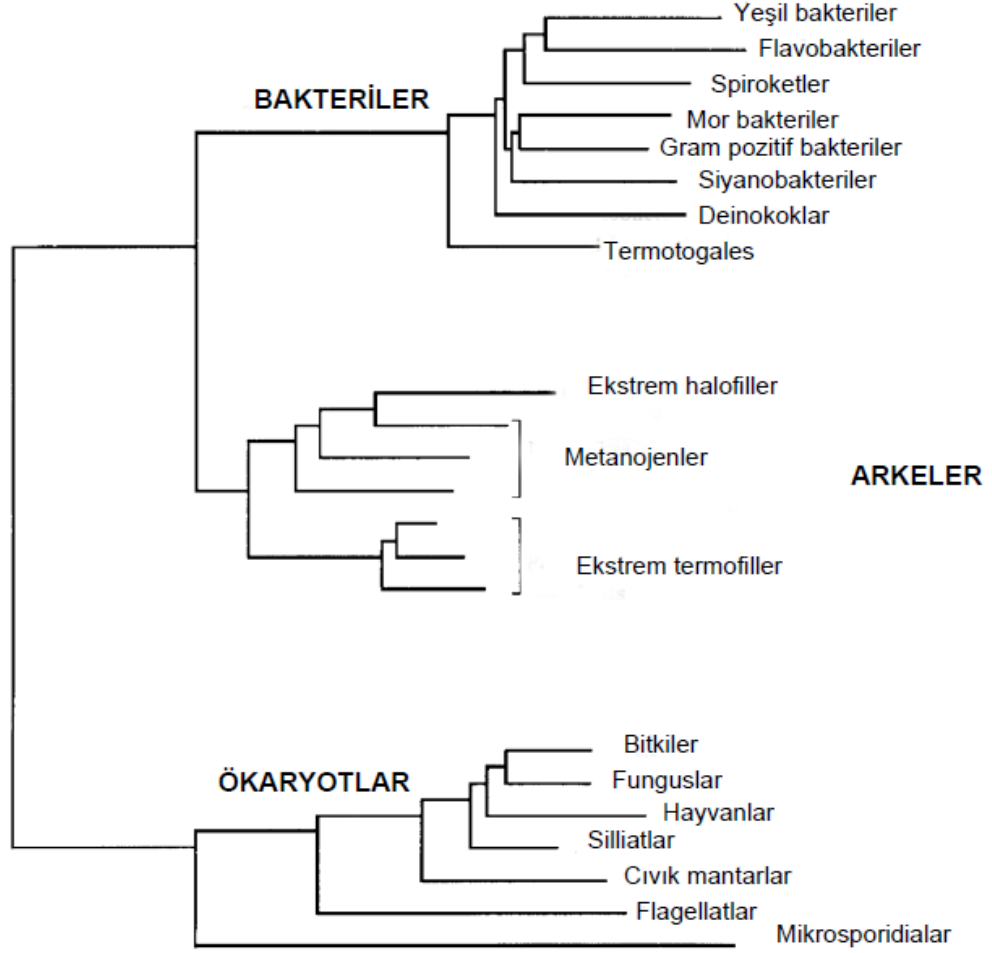
2.2.4 Lipozomların Temel Sorunları

Lipozomların fiziksel ve kimyasal stabilite sorunu dolayısıyla raf ömrü kısadır. Fiziksel dayanıksızlık, lipozomdan madde sızmasına ayrıca agregat oluşmasına neden olabilir. Kimyasal dayanıksızlık, lipidlerin çifte bağının oksidasyonundan veya ester bağının hidrolizinden olabilir. Bazı stabilite sorunlarının lipozomları liyofilize ederek saklandığında önlenebileceği bildirilmiştir (Van Winden ve Cromellin, 1999). Sterilite bir diğer önemli sorundur. Fosfolipidler ısıya ve diğer sterilizasyon yöntemlerine radyasyon/kimyasal sterilizasyon maddelerine hassastır. En uygun sterilizasyon yöntemi aseptik ortamda filtrasyon ile sterilizasyondur. Hazırlanan lipozomlar 0.22 µm por büyüklüğünde membranlardan geçirilerek steril edilebilir. Ancak bu yöntem büyük lipozomlara uygulanamaz ve virüslerden arındıramaz (Sharma ve Sharma, 1997).

Bütün bu sorunlara rağmen lipozomların diğer koloidal sistemlere göre üstünlükleri vardır. Yapılarında polimer olmaması onları vazgeçilmez kılmaktadır. Diğer lipid sistemlerinde de lipozomlardaki sorunlar tam çözümlenememiştir. Dolayısıyla lipozom preparatları geleceğin ilaç taşıyıcı sistemleri olarak özellikle gelişen gen teknolojisinde önem taşımaktadır (Gürsoy, 2002).

2.3 Halofilik Arkeler

1930'lu yıllarda Edward Chatton, tüm canlıları evrimsel gelişmişlik düzeyleri, benzerlikleri ve hücre morfolojileri yönünden prokaryot ve ökaryot olmak üzere iki gruba ayırmıştır. İlerleyen zaman içerisinde ribozomal RNA dizi analizlerini kapsayan moleküler tekniklerin de kullanılmaya başlanması ile hücresel yaşamın üç ayrı dalda evrimleştiği kabul edilmiş ve yaşamın üçüncü formu olan Arkebakteriler 1970'lerin sonunda tanımlanmıştır. Böylece canlılar prokaryotik olan Bakteri ve Arkelerle Ökaryotlar olmak üzere 3 domaine ayrılmıştır.



Şekil 2.11 Ribozomal küçük alt birimde bulunan 16S ve 18S rRNA dizilerine göre oluşturulmuş filogenetik ağaç (Woese, 1999).

Canlılıkları için minimum 1,5 M NaCl'ye gereksinim duyan ve tuzlalar, yüksek tuzlu topraklar, deniz ve tuz gölleri gibi doğal ortamların yanısıra tuzlanmış ürünlerden de izole edilebilen halofilik arkeler; çubuktan üçgene, kareye kadar değişen hücre morfolojilerine ve katalaz ve oksidaz aktivitelerine sahip, aerobik, Gram (-), kemoorganotrofik karakterdedirler. Ayrıca bu organizmalar, dış proton pompası olan bakteriodopsin ve iç klor pompası olan halorodopsin pigmentlerini içermeleriyle de diğer canlılardan farklılık gösterirler.

Halobacteriales ordosunun aşırı halofilik arkeleri organik maddelerin parçalanması ve petrolün bioremediasyonu dahil olmak üzere elektronik, gıda, tıp ve birçok biyokimyasal ve biyofiziksel çalışmalarda biyoteknolojik potansiyele ve uygulamalara sahiptirler (Özcan, 2004).

Halobacteriaceae familyasına ait cins ve türlerin teşhisi ve sınıflandırılması; hücre morfolojisi, üreme özellikleri, spesifik polar lipidlerin analizine dayanan kemotaksonomik çalışmalar ve nükleik asit dizi verileri gibi özellikleri kapsayan polifazik bir yaklaşıma göre

yapılmaktadır (Oren vd., 1997, Oren, 2001). Halofilik arkelerin taksonomik sıralaması aşağıdaki gibidir (Brenner vd., 2001, Grant vd., 2001):

Domain..... *Archaea*

Filum II..... *Euryarchaeota*

Sınıf III *Halobacteria*

Ordo I..... *Halobacteriales*

Familya I..... *Halobacteriaceae*

Halobacteriales ordosu içerisinde günümüze kadar tanımlanmış 18 cins ve 51 tür bulunmaktadır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 *Halobacteriales* ordosuna ait cinsler ve türler (Tindall, 1992; Grant vd., 2001)

FAMİLYA	CİNS	TÜR
<i>Halobacteriaceae</i>	<i>Halobacterium</i> ^T	<i>Halobacterium salinarum</i> ^T
		<i>Haloarcula vallismortis</i> ^T
	<i>Haloarcula</i>	<i>Haloarcula marismortui</i>
		<i>Haloarcula hispanica</i>
		<i>Haloarcula japonica</i>
		<i>Haloarcula argentinensis</i>
		<i>Haloarcula quadrata</i>
		<i>Haloarcula californiae</i>
		<i>Haloarcula sinaiensis</i>
		<i>Haloarcula aidinensis</i>
		<i>Halobaculum gomorrense</i> ^T
		<i>Halococcus morrhuae</i> ^T
	<i>Halococcus</i>	<i>Halococcus saccharolyticus</i>
		<i>Halococcus salifodinae</i>
	<i>Haloferax</i>	<i>Halococcus dombrowskii</i>
		<i>Haloferax volcanii</i> ^T
		<i>Haloferax denitrificans</i>
		<i>Haloferax gibbonsii</i>
		<i>Haloferax mediterranei</i>
		<i>Haloferax alicantei</i>
		<i>Haloferax lucentensis</i>
		<i>Haloferax alexandrinus</i>
		<i>Halogeometricum borinquense</i> ^T
		<i>Halorubrum saccharovororum</i> ^T
	<i>Halorubrum</i>	<i>Halorubrum coriense</i>
		<i>Halorubrum distributum</i>
		<i>Halorubrum lacusprofundi</i>
		<i>Halorubrum sodomense</i>
		<i>Halorubrum trapanicum</i>
		<i>Halorubrum vacuolatum</i>
		<i>Halorubrum tebenquichense</i>
		<i>Halorubrum terrestre</i>
		<i>Haloterrigena turkmenica</i> ^T
		<i>Haloterrigena thermotolerans</i>
	<i>Natrialba</i>	<i>Natrialba asiatica</i> ^T
		<i>Natrialba magadii</i>
		<i>Natrialba taiwanensis</i>
		<i>Natrialba aegyptiaca</i>
	<i>Halosimplex</i>	<i>Halosimplex caribadense</i> ^T
	<i>Halomicrobium</i>	<i>Halomicrobium mukohataei</i> ^T
	<i>Halorhabdus</i>	<i>Halorhabdus utahensis</i> ^T
	<i>Halobioforma</i>	<i>Halobioforma haloterrestriis</i> ^T
	<i>Natrinema</i>	<i>Natrinema pellirubrum</i> ^T
		<i>Natrinema pallidum</i>
	<i>Natronobacterium</i>	<i>Natronobacterium gregoryi</i> ^T
	<i>Natronococcus</i>	<i>Natronococcus occultus</i> ^T
		<i>Natronococcus amylolyticus</i>
	<i>Natronomonas</i>	<i>Natronomonas pharaonis</i> ^T
	<i>Natronorubrum</i>	<i>Natronorubrum bangense</i> ^T
		<i>Natronorubrum tibetense</i>

^T= Familyanın cins tipi veya Cinsin tür tipi

2.3.1 *Halobacteriales* Ordosunun Özellikleri

Halobacteriales ordosu çubuk, kok, düz pleomorfik hücrelerden, kusursuz düz, kare hücrelere (Oren vd., 1996; Oren, 1999) hatta üçgen ve trapezoid (Takashina vd., 1990; Horikoshi vd., 1993) şekilli hücrelere kadar çeşitli morfolojik tipler içermektedir. Hareketsiz veya demet şeklindeki flagellumları ile aktif haldedirler. Gram negatif veya pozitif olarak boyanabilmektedirler (Dussault, 1955; Grant vd., 2001). Aerobik olup, oksidaz ve katalaz aktiviteleri pozitif bazı suşlar nitrat varlığında ya da bakteriyorodopsin yardımıyla anaerobik olarak üreyebilmektedirler. Üremeleri için en az 1,5 M NaCl'ye ihtiyaç duymakta olup suşların çoğunluğu 3,5-4,5 M NaCl konsantrasyonunda en iyi üreme göstermektedir (Oren, 2000). Pek çok suşun koloni rengi, içerdikleri C₅₀ ve C₄₀ karotenoidlerinden dolayı kırmızı ve tonlarındadır. Optimum üreme sıcaklıkları 35-50°C arasındadır. Kemoorganotroftirler, karbon kaynağı olarak karbonhidratları veya amino asitleri kullanırlar. Kompleks ortamlarda üremelerine rağmen bazı türler tek karbon kaynağı içeren inorganik ortamlarda üreyebilmektedirler (Grant vd., 2001). Fitanyl (C₂₀) veya sesterpanil (C₂₅) yan zincirleri olan di-izoprenoid gliserol eter türevli polar lipidleri mevcuttur (Kates, 1993). Ordo üyelerinin DNA'ları genellikle bir majör ve bir minör komponent içermektedir. Minör komponent total DNA'nın %10-30'nu oluşturmaktadır. DNA'nın %mol G+C oranı majör komponentte 59-71 ve minör komponentte 51-59 arasındadır (Pfeifer vd., 1988; Gutierrez vd., 1986).

2.3.2 Fizyolojileri

Halofilik arkeler aerobik heterotrofik prokaryotlar olup karbon kaynaklarının aerobik yıkımı, glioksilat döngüsü ve sitokrom zinciri içeren elektron transport sistemi kombinasyonu ile trikarboksilik asit döngüsü temelinde gerçekleşmektedir. Embden Meyerhof metabolik yolu, hekzokinaz ve fosfofruktokinaz aktivitelerinin düşüklüğü ve tuzla güçlü bir şekilde inhibe edilmeleri nedeniyle *Halobacteriaceae*'de işlevsel değildir (Rawal vd., 1988). Bunun yerine muhtemelen glukozun yıkımı, fosforilasyon aşamasının atlandığı bir modifiye Entner-Doudoroff metabolik yol ile gerçekleştirilmektedir. Aminoasitler, şekerler ve organik asitler gibi basit bileşiklere ek olarak bazı polimerik maddeler de halofilik arkeler tarafından yıkılabilmektedir. *Halobacteriales*'in birçok türü proteaz, lipaz, DNaz ve amilaz gibi ekzoenzimleri de üretmektedir (Izotova vd., 1983; Kushner, 1985; Johnsen vd., 2001; Oren, 2001). Tuza doymuş ortamlarda oksijen çözünürlüğünün az olmasından dolayı halofilik arkelerin çoğu anaerobik olarak üreme yeteneğine sahip olup bu amaçla fumarat, trimetilamin N-oksit (TMAO), dimetilsülfoksit veya nitrat gibi alternatif elektron alıcıları, arjinin fermentasyonu veya bakteriyorodopsin kullanırlar (Hartmann vd., 1980; Mancinelli ve

Hochstein, 1986; Oren ve Trüper, 1990; Oren, 1991; Ruepp ve Soppa, 1996; Oren ve Litchfield, 1999; Goo vd., 2003).

2.3.3 Halofilik Arkelerin Uygulama Alanları

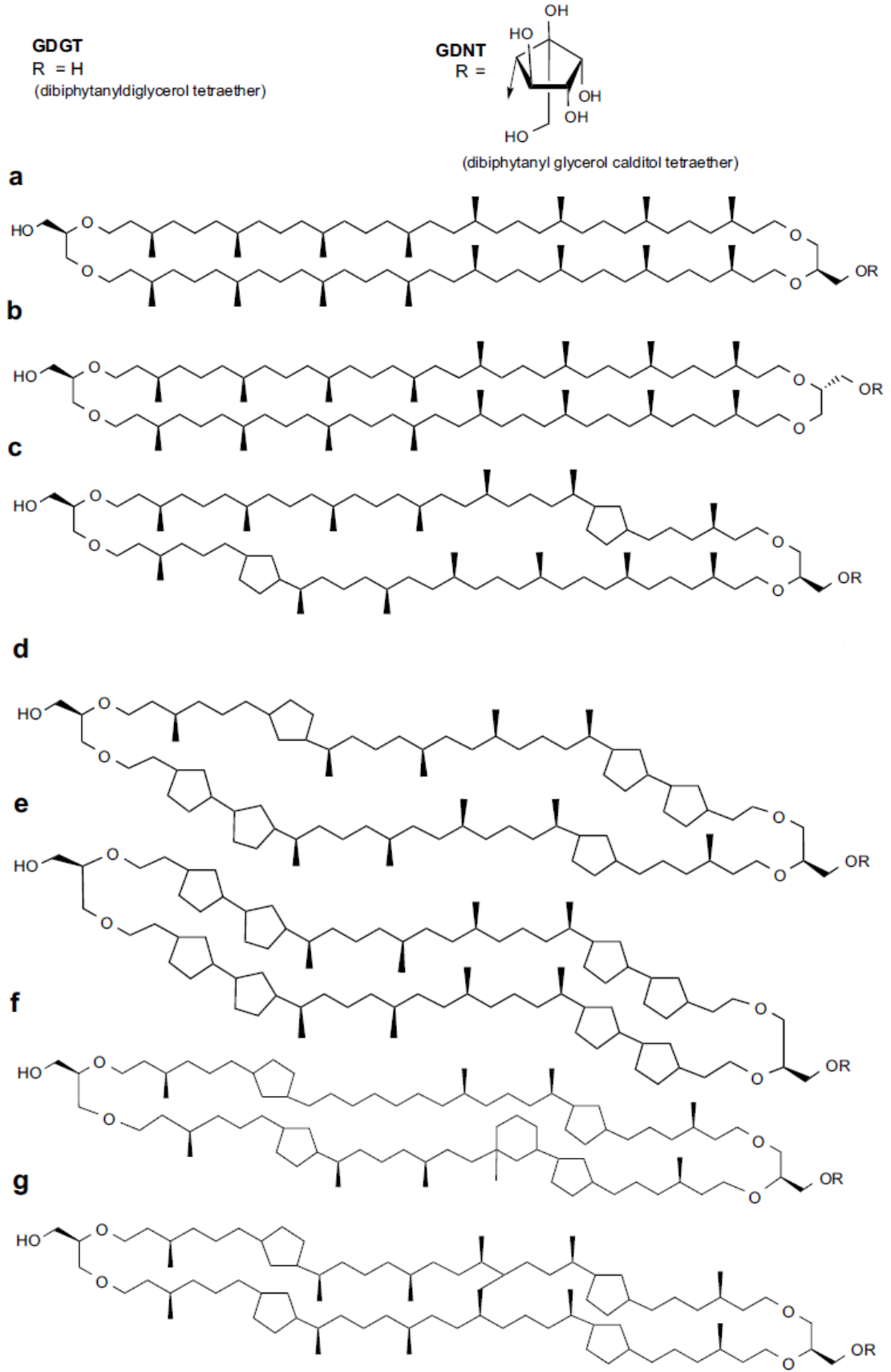
Potansiyel biyoteknolojik uygulamalara sahip olan kırmızı halofilik arkelerin, tuzla-kristalizasyon göllerinde solar ısınmayı ve evaporasyonu arttırarak tuz üretiminin arttırılmasında kullanılabilecekleri ileri sürülmüştür (Jones vd., 1981; Grant vd., 1998; Litchfield, 2002). Bakteriyorodpsinin, güneş ışığından elektrik üretimi, deniz suyundan tuz giderimi, kimyasal ve biyolojik sensörlerde kullanılması gibi alanlarda da potansiyel olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Kushner, 1985; Hough ve Danson, 1989; Margesin ve Schinner, 2001).

Ayrıca *Haloferax* ve *Haloarcula* cinslerine ait bazı türlerin, ürettikleri ekzopolisakkarit yoluyla vizkozite stabilizasyonunda, jelleştirme ajanı ve emülsifiyer olarak ve petrolün mikrobiyolojik geri kazanımını arttırmak için kullanılabilecekleri belirtilmiştir (Ventosa ve Nieto, 1995; Parolis vd., 1996; Margesin ve Schinner, 2001). Bazı halofilik arkelerin poli- β -hidroksi alkonat (PHA) ürettikleri belirtilmiştir (Lillo ve Rodriguez-Valera, 1990; Hezayen vd., 2000). Lipaz enzimine dirençli olmaları nedeniyle gliserol dieter lipidlerin besin katkı maddesi olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Post ve Collins, 1982). İlaç ve kozmetiklerin yapısında kullanılan lipozomların yapımında halofilik arkelerin esterazlara karşı yüksek bir kimyasal stabiliteye sahip olan eter bağlı lipidler kullanılmaktadır. Amilaz, amiloglukozidaz, proteaz ve lipaz gibi yüksek tuzlulukta işlevsel olan ekzoenzimleri, yüksek tuz konsantrasyonunda makromoleküllerin yıkımı ile ilgili biyoteknolojik proseslerde kullanılabirler (Chaga vd., 1993; Ventosa ve Nieto, 1995; Margesin ve Schinner, 2001).

Düşük su aktivitesine adapte olan halofilik enzimlerin, endüstriyel organik sentezlerdeki yüksek özgülükleri, stereoözgülükleri ve etkinliklerinden dolayı önemleri artmaktadır (Hough ve Danson, 1989; Danson ve Hough, 1997; Sellek ve Chaudhuri, 1999). Diğer yandan hidrokarbonları parçalama yeteneğine sahip halofilik arkeler, petrol kazalarında dökülen petrolün bioremediasyonunda kullanılabirler (Bertrand vd., 1990; Emerson vd., 1994). İnsektisit, lindan, DDT veya triklorofenoller gibi halojenli organik bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarında üreyebilen halofilik arkelerin patentli proseslerde de kullanıldığı belirtilmiştir (Margesin ve Schinner, 2001).

2.4 Arkeal Tetraeter Bipolar Lipidler

1977 yılında canlı sistemleri için yeni bir taksonomi olan *Archaea* domaininin keşfi ender ekolojik nişlerin bulunduğu yepyeni bir mikroorganizma sınıfının açığa çıkmasını sağladı. Bunlara örnek olarak yüksek sıcaklık (Termofiller ve Hipertermofiller), düşük sıcaklık (Kriyofiller), asidik ortam (Asidofiller ve Termoasidofiller), anaerobik atmosfer (Metanojenler) ve yüksek salinite (Halofiller) verilebilir (Woese ve Fox, 1977). Bir takım filojenik bulgular bilim adamlarına *Archaea*'nın canlılığın erken evrelerinde anahtar rol oynadığını düşündürmektedir (Forterre vd., 1992). *Archaea* ile ilgili olarak en çok sorulan soru, ekstrem koşullarda hayatta kalma ve çoğalma yeteneğinden sorumlu moleküler adaptasyonun kaynağıdır. Aslında bu organizmalar, biyolojik sistemlerini her tip çevresel koşula adapte etmek için bir takım yöntemler geliştirmiştir. G – C baz çifti oranını artırarak DNA/RNA yapısının modülasyonu, süperkatlanma (supercoiling) ve katyonik proteinlerle birleşme gibi stratejiler, arkeal nükleik asitlerin yüksek sıcaklıklarda yapısını ve sağlamlığını korumasını sağlar (Daniel, 2000). Dahası, bazı amino asitlerin yer değiştirmesi protein stabilizasyonunda önemli bir etkiye sahiptir. Aslında, asidofiliklerin proteinleri yüzeylerinde az miktarda asidik amino asit taşır. Bu, düşük yük yoğunluğuna yol açar. Böylelikle düşük pH'larda proteinler arasındaki elektrostatik çekimin engellendiği düşünülmektedir (Adams ve Kelly, 1995). *Archaea*'yı ökaryotik hücrelerden ve bakterilerden ayıran başka bir özellik ise temel membran lipidlerinin kimyasal yapısının eşsizliğidir. Arkeal lipidler, metil grupları içeren dallanmış zincirlerden oluşur. Bu metil grupları, konvansiyonel mezofilik lipidlerin aksine gliserole 2-pozisyonundan eter bağıyla bağlıdır. Termoasidofilik ve metanojenik türlerde alışılmamış bipolar tetraeter lipidler mevcuttur (Graether ve Arigoni, 1995). Tetraeter tipi lipidler genellikle iki gliserol iskeletini birleştiren iki membran mesafesinde alkil zincirinden meydana gelir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 Arkeal tetraeter lipid yapıları.

(a–b) dibifitanil digliserol (gliserol kalditol) tetraeter, (c–e) dibifitanil digliserol (glycerol

kalditol) tetraeterlerindeki internal siklizasyon (siklopentan halkaları), (f) dibifitanil digliserol tetraeterlerindeki internal siklizasyon (dört siklopentan halkası ve bir sikloheksan halkası), (g) dibifitanil digliserol tetraeterlerindeki dört siklopentan halkası içeren H-biçimli lipid yapısı (Gambacorta vd., 1995'ten modifiye).

Bu atipik bipolar lipidler, organizmanın büyüme koşullarına göre membran organizasyonu ve özelliklerinin optimizasyonu ile *Archaea*'nın ekstrem habitatlara adaptasyonunda çok önemli bir rol oynar. Membran akışkanlığı, transport fonksiyonları, hücre içi çözelti konsantrasyonları, kemiozmatik gradientler ve membran proteini stabilitesi, bu lipidlerin fonksiyonlarına örnektir. Membran içi arkeal lipidlerin yapı ve fonksiyonlarının eşsizliği, biyoteknolojik uygulamalarda sentetik analog veya doğal lipid olarak kullanılabilmeleri açısından ilgi çekmektedir.

2.4.1 Doğal Arkeal Tetraeter Lipidlerin Yapı ve Fonksiyonları

Metanojenlerde, termofillerde, termoasidofillerde, kriyofillerde bulunan arkeal tetraeter lipid yapısı iki tip lipid iskeleti ile karakterize edilir. Birincisi gliserol-dialkil-gliserol-tetraeterler (GDGT) olup iki bifitanil eter zincirinin bir gliserol ünitesinin her iki ucuna bağlanmasıyla oluşur (Benvegnu vd., 2008). İkincisi ise gliserol-dialkil-nonitol-tetraeterler (GDNT) adını alır ve bir polihidroksillenmiş siklopentanik kalditol grubun lipidin bir ucuna bağlanmasıyla oluşur. Bazı *Archaea*'larda, dibifitanil digliserol tetraeter lipid iskeletlerinin türevleri belirlenmiştir. Arkeal tetraeter lipid yapılarındaki önemli varyasyonlara verilebilecek örnekler:

- Çevresel sıcaklığın artmasıyla birlikte termoasidofilik lipidlerin siklopentan halkalarının oranının artması (her bifitanil zincirinde dört pentasiklik halkaya kadar) (De Rosa vd., 1986),
- Düşük sıcaklıklarda yaşayan *Archaea*'lardan izole edilen lipidlerde sikloheksan halkasının bulunması,
- Derin denizlerin hidrotermal menfezlerinde yaşayan bazı termoasidofilik türlerde bulunan H-biçimli tetraeterlerdeki izoprenoid zincirinin merkezindeki kovalent çapraz bağın varlığı.

Bu bipolar bileşikler genellikle hidrofobik iskeletin karşılıklı uçlarında simetrik olmayan lipid yapılarına öncülük eden iki farklı polar uç grup taşır. *Archaea*, polar lipid sınıflarının birçok çeşidini içerir: fosfolipidler, glikolipidler, fosfoglikolipidler, süfolipidler ve aminolipidler.

Sahip olduğu bu geniş yelpaze nedeniyle uç gruplarının karakteristikleri hakkındaki çok özel bilgi organizmayı tanımlamaya yardımcı olacaktır. Aminolipidler, metanojenlerde oldukça yaygındır fakat termofillerde hiç bulunmaz. Görülüyor ki, sık rastlanmayan karbonhidratlar – β -D-galaktofuranosil üniteleri (Gambacorta, 1995) metanojenlerde bulunur; ama asidik pH'a duyarlı beş üyeli halkalar termoasidofilik *Archaea*'da tümüyle eksiktir.

Archaea'da bulunan az rastlanır tetraeter lipid yapıları akla “Bu lipidler nasıl biyosentez edildi?” ve “Bu organizmaların membranında nasıl bir fonksiyonları var?” sorularını getiriyor. Bu makrosiklik lipidlerin biyosentezinin: (I) bifitanil oluşturmak üzere redüksiyon ile iki geranil-geranil kalıntısının uç uca birleşmesi, (II) beş veya altı üyeli siklik bifitanilleri oluşturmak üzere redüksiyon ile bağlı geranil-geranil rezidüleri arasında siklizasyon (halkalaşma) ile ilerlediğine inanılmaktadır (De Rosa, 1986). Monomerik öncülün geranil-geranil grubunun izopropilen terminalinin, hidrofobik uçta C-C bağ oluşumu için önemli olduğu bulunmuştur. Allilik metil grubunda bulunan, radikal tetikleyiciyi içeren bir mekanizma bu C-C bağ oluşumundan sorumlu bulunmuştur (Eguchi, 2003). *Archaea*'da bulunan polar lipidler üzerine yapılan çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışma genel sentez metabolik yolunu çözdü (Koga ve Morii, 2007). Buna rağmen, arkeal lipidlerin birçok biyosentez mekanizması araştırılmamış ve biyosentezde görev alan birçok enzim karakterize edilmemiştir.

Geniş çeşitlilikteki tetraeter lipid yapısı *Archaea*'ya zorlu çevresel şartlarda membran fonksiyonlarını koruyabilme avantajı sağlar. Geniş bir pH aralığında, eter bağları ester bağlarından daha kararlıdır ve dallanmış metil grupları hem kristalleşmenin (çevresel sıcaklıkta sıvı kristal fazındaki membran lipidleri) hem de membran geçirgenliğinin azalmasına (yan metil gruplarının sterik engeli) yardımcı olur. Alkil zincirlerinin yan dallara ayrılması oksidatif bozunmaya karşı kararlılığı artırır. Gliserol iskeletinin az rastlanır stereokimyası diğer organizmalar tarafından ortama salınan fosfolipazların saldırısına dayanıklılığı artırır, böylelikle organizma için yaşamsal değeri vurgular (Jacquemet vd., 2009). Tetraeter lipidlerin daha spesifik fonksiyonları da vardır:

- 1) Tetraeter yapısının standart çift tabakalı (bilayer) modelin dışında tek tabakalı membran organizasyonu oluşturmak için membranın iç kısmından dış kısmına doğru yayıldığı düşünülür (Gliozzi, 1983). Böylece lipid tabakanın ortasında bir kovalent bağ oluşur; her bipolar tetraeter molekül gerilir ve enlemesine genişler. Bu tek tabakalı organizasyon özellikle termofillerin, metanojenlerin ve termoasidofillerin yüksek büyüme sıcaklığında membranı rigidleştirir (Kates, 1991).

- 2) Lipidlerin transmembran kısmındaki siklik yapılara (5 üyeli halkalar) ilaveler termoadaptif sebeplere dayanır. Bu durum membran yoğunluğunun artmasına membran sızılığının azalmasına yol açar (Benvegnu, 2008).
- 3) H-şekilli tetraeterlerin alkil zincirleri arasındaki kovalent bağ, hücreleri tek tabakalı membranın dayanıklılığını pekiştirerek yüksek sıcaklıklarda membran lizisine karşı korur.

Metanojenik ve termoasidofilik lipidlerin glikozil polar uç gruplarının büyük kısmı, interglikozil uç grup hidrojen bağı ile membran yapısını daha kararlı hale getirebilir. Membranın konveks yüzündeki büyük şeker uçlarının varlığı, asimetrik bir oryantasyon oluşturarak tek tabakalı organizasyonu basite indirger.

2.4.2 Doğal ve Sentetik Lipidlerin Biyoteknik Uygulamaları

Orijinalliklerinden dolayı, doğal ve sentetik *Archaea* lipidler tıbbi, biyolojik ve biyoteknolojik uygulamalar için ümit vaad eden araçlardır. Bu alanlardaki ilgi, tetraeter lipidlerin kendiliğinden bir araya gelme (self-assembly) özelliği nedeniyle lipid filmler veya lipozomlar gibi supramoleküler yapılar üzerinde yoğunlaşmıştır.

2.4.2.1 Tetraeter Lipid Filmlerin Uygulama Alanları

Membran davranışını daha iyi anlamak ve nanoteknolojideki potansiyel uygulamalar için, tek tabakalı lipid filmler, diğer adıyla siyah membranlar arkeal tetraeterlerden hazırlanmaktadır. Az rastlanır arkeal bipolar yapıya rağmen bu amfifillere hava/su yüzeyinde film oluşumu için Langmuir-Blodgett tekniği uygulanabilir. Buna rağmen, lipid ekstraksiyon metodlarının değişkenliği ve tek tabaka hazırlanması açısından belirgin bir model oluşturmak zordur (De rosa, 1996). Bu çalışmalar geniş konformasyona adapte olmuş molekülleri veya U-şekilli iki polar uca sahip molekülleri modellemeye sebep olmuştur (Maccioni vd., 1995). Teknolojik metodların gelişimi, arkeal lipidlerden uzun süre kararlı halde kalabilen (Dante vd., 1995), ayırt edici özellikleri olan (Gliozzi vd., 1982) ve düşük geçirgenliğe sahip (Gliozzi vd., 2002) yüksek organizasyonlu filmleri üretilebilir kılmıştır.

Katı bir desteğin üzerinde oluşturulan film, yüzey özelliklerini değiştirmek ve yeni biyomimetik materyaller geliştirmekte kolaylık sağlar. Örneğin, Rothe ve arkadaşları (Muller vd., 2006) biyolojik uygulamalarda filtrasyon karakterini değiştirmek için nanoporlu alüminyum oksit membranları doğal tetraeterlerden oluşan ultraince filmlerle kaplamıştır.

Arkeal lipid özellikleri sayesinde kaplı membranlar düşük geçirgenlikte olup kolay sterilize edilebilmektedir.

İnce film tabakanın diğer bir uygulama alanı ise biyosensör tasarımıdır (Meister ve Blume, 2007). α -uç gruplar, lipidin katı bir yüzeye kimyasal olarak bağlanmasında kullanılabilir. Burada hidrofobik gövde bariyer görevi yapar. İkinci uç grup çevre ile temasta olduğundan çözeltilerin moleküler tanımlamasını yapar (Fuhrhop ve Wang, 2004). Bu yolla çift tabakalı lipid membranların stabilite problemi ortadan kalkmış olur. Dahası, arkeal lipidler protein-lipid, peptid-lipid etkileşimlerinde yeni yapısal olasılıklar sunar ve biyomolekülerin immobilizasyonu için doğal bir ortam sağlar (De Rosa vd., 1994). Farklı biyolojik moleküller, biyolojik olarak aktif sistemler oluşturmak üzere monolayerlara gömülebilir veya adsorbe edilebilir. Valinomisin, iyi tanımlanmış doğal bir peptid antibiyotiktir ve arkeal film üzerine çöken fonksiyonel moleküllere bir örnektir. Valinomisin filmleri zamanla kararsız hale gelir. Berzina ve arkadaşları (1995) yarısentetik arkeal tetraeterlerin baryum tuzlarını koruyucu tabaka olarak kullandı. Sonuçları kanıtlamıştır ki, film üzerinde yer alan valinomisin molekülleri ile potasyum iyonlarının seçici etkileşimi potasyum iyonu sensörü etkileşimi yapmıştır. Dahası, tek tabakalı membranın kalınlığı iki valinomisin molekülünün maksimum uzunluğuna indirildiğinde geçirgenlik mekanizması taşıyıcı davranıştan (bir taraftan diğer tarafa) kanal davranışına (membrana fiske olmuş) geçer. Bu durum ikili geçirgenlikteki por oluşumundan kaynaklanmaktadır (Gliozzi vd., 1996).

2.4.2.2 Arkeal Lipozomların (Arkeozomlar) Uygulama Alanları

Arkeozomlar, *Archaea*'da bulunan doğal lipidler veya bunların sentetik türevlerinden oluşan lipozomlardır ve arkeal lipidlerin eşsiz yapısal özelliklerine sahiptirler (De Rosa vd., 1996; Sprott, 1992). Arkeozomların lipid membranları bipolar, monopolar arkeal lipidlerden veya ticari fosfolipidlerden yapılabilir; tek tabakalı, çift tabakalı veya tek ve çift tabakaların kombinasyonu şeklinde olabilir. Arkeal tetraeterlerin membrana yayılma özellikleri vezikül membrana sağlamlık kazandırır. Bu sayede arkeozomlar, ticari lipozomlardan daha kararlı ve daha az geçirgen olurlar. Ticari lipozomların kararlılıklarını artırabilmek için %33 oranında kolesterole ihtiyaç duyulur (Szoka ve Papahadjopoulos, 1980; Lichtenberg ve Barenholz, 1988). Fiziksel kısıtlamalara rağmen, kompleks bir polar uç ile birleşen (monosubstituted) bipolar lipidler membran füzyonuna imkan sağlar. Aksi halde, bisubstituted moleküllerden oluşan veziküller ortama az miktarda monopolar lipid eklenmezse kaynaşamazlar (Relini vd., 1996).

Arkeal lipid formülasyonlarının oldukça yüksek kararlılıkta oksidatif stres, yüksek sıcaklık, alkali pH, fosfolipaz aktivitesi, safra tuzları ve serum ortamında bulunabildiği gösterilmiştir (Benvegnu, 2005; Brard vd., 2007; Patel vd., 2000; Patel ve Sprott, 1999). Arkeal lipid özellikleri sayesinde arkeozomlar her sıcaklıkta oluşturulabilmektedir, böylece termal olarak kararsız bileşikleri enkapsüle etmeyi sağlar. Hava/oksijen varlığında bozunmadan hazırlanabilir ve saklanabilirler (Patel ve Sprott, 1999; Patel vd., 1999). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar arkeozomların güvenli olduğunu, farelerde toksisite göstermediğini ispatlamıştır (Patel ve Sprott, 1999; Omri vd., 2003). Arkeozomların biyoyumluluğu ve yüksek kararlılıkları üretim aşamasında ve aşı, ilaç, gen aktarımı gibi biyoteknolojik uygulamalarda avantaj sağlar.

Lipofeksiyonun keşfi ile çeşitli lipid-DNA kompleksleri, DOPE veya kolesterol gibi nötral ko-lipidler ve katyonik lipidler ile hazırlanarak transfeksiyon işlemine kullanılmıştır (Zhang vd., 2004). Fakat bunların klinik gen terapisi çalışmalarındaki kullanımı tatmin edici boyutta değildir (Barenholz, 2001). Arkeozomlar, yüksek derecede fiziksel rijitliğe ve kimyasal/enzimatik stabiliteye sahip olduğundan (Omri vd., 2003) viral olmayan gen aktarımı için yepyeni bir yaklaşım sunarlar. Saf doğal arkeal lipidlerin bulunması zor olduğundan arkeal membrandakine benzer makrosiklik tetraeterlerin sentezi artmıştır. Sentetik arkeal lipidlerin ağız yoluyla alındığında bile ilaç salınım sistemlerinin kararlılığını artırdığı gösterilmiştir (Jacquemet vd., 2009). Dahası, bu lipidler *in vitro* gen aktarımında yardımcı rol üstlenirler (DOPE ve kolesterol ile karşılaştırıldığında (Benvegnu vd., 2005; Brard vd., 2007; Sreenivasa Rao vd., 2001)). Etkin bir *in vivo* transfeksiyon elde etmek için vektörler kararlılıklarını hem yüksek miktarda kolesterol ile bir araya gelerek ve/veya lipoleks yüzeyini polietilenglikol (PEG) ile kaplayarak hem de ligand tanımlamasıyla etkili hücre hedeflemesi yaparak arttırırlar (Sreenivasa Rao vd., 2001; Wasungu ve Hoekstra, 2006). Aslında bu stabilize edici etkileri ve hedefleme yeteneğini birleştirerek *in vivo* transfeksiyon için yeni nesil arkeozomlar üretilmesi umut vaad etmektedir. Bu amaçla bir PEG zinciri (10 üniteli etilenglikol) içeren arkeal lipid analogları bir folik asit grubu eklenerek hazırlanmıştır (Laine vd., 2008). İlk *in vitro* transfeksiyon çalışmaları, bu folat eklenmiş PEGlenmiş arkeal lipidlerle gerçekleştirilmiş ve ligand-reseptör etkileşimlerini aydınlatmak için kullanılmıştır.

Mononükleer fagositik sistemin hücreleri, lipozom ve arkeozomların doğal hedefi olduğundan (Wassef ve Alving, 1987; Moghimi ve Patel, 1992; Tolson vd., 1996), taşıyıcı sistem olarak antijenlerin taşınmasında veya immün sistemin uyarılmasında adjuvant olarak kullanılmaları uygundur. Fagositik hücreler tarafından sindirilen arkeozomlar, ester lipidlerinden oluşan

lipozomlardan birkaç kat daha fazladır (Tolson vd., 1996) ve birçok ticari lipozomdan farklı olarak diğer immünostimulantların taşınımına yardım etmesine ihtiyaç duymazlar (Krishnan vd., 2000). Örneğin, sıçan modellerinde antijen enkapsüle etmiş arkeozomların ortama verilmesi antikor cevabı oluşturur. Oluşan antikor cevabı, oldukça toksik olmasına rağmen çok etkili olan Freund's complete adjuvantının oluşturduğu cevapla kıyaslanabilir miktardadır (Sprott vd., 1997; Krishnan vd., 2000). Arkeozomlar potansiyel olarak humoral ve hücrel immüniteyi yükselten ve hafıza cevabını artıran adjuvantlardır (Krishnan vd., 2000). Farelerdeki toksisite çalışmaları arkeal lipozomların oral ve intravenöz uygulamalarında güvenli bir profil çizdiğini göstermiştir (Omri vd., 2003; Krishnan vd., 2000; Freisleben vd., 1995). Arkeozom adjuvantların etkinliği sıçan modellerindeki kanser ve enfeksiyonlarla sınırlıdır (Krishnan vd., 2000; Krishnan ve Sprott, 2008; Patel ve Wangxue, 2005; Krishnan vd., 2003). Arkeozomlar hücre içi enfeksiyonlarda ve kansere karşı korumada istenilen miktarda ve kalitede immün cevabı indükleyebilmektedir (Krishnan vd., 2000; Patel ve Wangxue, 2005).

2.5 Gen Transfer Sistemleri

Moleküler biyolojideki gelişmeler ve insan genomunun sekanslanması ile gen terapisi genetik hastalıkların tedavisinde çok büyük bir önem kazanmıştır. Bu yeni terapi, mutasyona uğramış veya eksik olan genlerin yerine hedef hücrelere sağlıklı kopyaları vermek, ekspresyonu normal proteine yönlendirmek, doğru hücrel fonksiyonları restore etmek gibi amaçlar güder. Yeterli hedefleme yeteneği ve etkili transfeksiyon etkinliği olan güvenli gen terapi vektörlerinin geliştirilmesiyle bu yöntem insanlar üzerinde uygulanabilecektir (Mehier-Humbert ve Guy, 2005).

İdeal bir gen aktarım vektörü şu karakteristiklere sahip olmalıdır:

- (i) Hedef hücreye spesifiklik,
- (ii) Metabolik parçalanmaya ve immün sistem saldırılarına karşı direnç,
- (iii) Güvenlik, örneğin minimal yan etkiler,
- (iv) Terapötik geni ihtiyaç duyulan süre boyunca belirli seviyede ekspres etme yeteneği.

Genel olarak, gen aktarım metodları iki kategoriye ayrılabilir:

1. Biyolojik vektörler ile
2. Kimyasal veya fiziksel yöntemler ile

İlk metod enfeksiyon olarak adlandırılan viral-aracılı prosesleri ifade eder. En çok kullanılan vektörler klinik çalışmalarda denenmiş olan retroviruslar ve adenoviruslardır. Bazı avantajlarının yanı sıra, viral toksisite, konak immün cevabı ve hazırlanmasındaki zorluklar gibi istenmeyen birçok yan etkileri de vardır (Chuah vd., 2003; Gallo-Penn vd., 2001). Viral olmayan gen transferi hücrelerin kimyasal veya fiziksel yoldan muamelesidir. Kimyasal metodlarda DNA ile çeşitli polikasyonlar (polipleksler) veya katyonik lipidler (lipopleksler) arasında kompleks oluşumu gerçekleşir. Teknik olarak bu yaklaşım spesifik immün cevabı uyarmaz ve ölçek büyütme kolaydır. Buna karşın, etkinliği ve hedefleme potansiyeli zayıftır.

En basit ve güvenilir fiziksel / mekanik yaklaşım sistemik kana veya lokal dokulara herhangi bir taşıyıcı olmaksızın çıplak DNA enjeksiyonudur. Fakat mononükleer fagositik sistem ve nükleazların hızlı degradasyonu nedeniyle çıplak DNA enjeksiyonundan sonra ekspresyon seviyesi ve tedavi edilebilir doku alanı oldukça kısıtlıdır (Lechardeur vd., 1999; Houk vd., 1999). Sonuç olarak, gen aktarım etkinliğini artırmak için yoğunlaşan ilgi diğer fiziksel manipulasyonlara dönmüştür. Bu metodlar, gen aktarım etkinliğinde önem taşıyan enjeksiyonlara DNA'nın etkili seyreltilmesi, hedef bölgeye ulaşabilme, hücreye ve nükleusa girme gibi çeşitli bariyerlerden atlatma yeteneğine sahip elementleri içermelidir.

2.5.1 Mikroenjeksiyon

İster sitoplazmayı ister nükleusu hedeflesin, DNA'yı hücre içine sokmanın en direk yolu mikroenjeksiyondur. Tek bir hücreye uygulanan bu mikrooperasyon prosedüründe cam bir iğne (mikrokapiler pipet), mikropipetin hareketini kontrol etmek için bir mikromanipulator ve bir mikroenjektör kullanılır. Hidrostatik basınçla mikropipete çekilmiş olan genetik materyali içeren sıvı püskürtülür. Enjeksiyonlar, mikroskop aracılığıyla gözlemlenir.

Bu teknik ilk olarak 1980 yılında başarıyla uygulanmıştır. Capecchi (1980), DNA'yı kültüre edilmiş memeli hücrelerinin hem nükleusuna hem de sitoplazmasına mikroenjekte etmiştir. Çıplak DNA'nın direk olarak nükleusa mikroenjeksiyonu, sitoplazmik degradasyonu önler; böylece intra-sitoplazmik enjeksiyondan daha yüksek gen ekspresyonu sağlanır. Gordon ve arkadaşları, fertilize fare oositlerinin pronükleilerine plazmit DNA mikroenjeksiyonu ile transgenik fare üretmiştir (Gordon vd., 1980; Gordon ve Ruddle, 1983) ve günümüzde bu yaklaşım transgenik hayvan üretiminde (fare (Auerbach, 2004), minyatür domuz (Uchida vd., 2001) ve sığır (Hoffman vd., 2004)) en çok uygulanan metoddur.

Mikroenjeksiyon basit olmasına karşın uygulaması zor bir metoddur. DNA'nın pronükleer enjeksiyonu çok etkili ve bir o kadar da zahmetli bir prosedürdür. Bir enjeksiyonun tek bir

hücreyi kapsadığı düşünüldüğünde her seferinde birkaç yüz hücreyi transfekte etmek için ne kadar uygulama gerektiği anlaşılabacaktır. Gen transfer prosesinin basitleştirilmesi ve etkinliğinin artırılması için diğer fiziksel teknikler keşfedilmiştir.

2.5.2 Partikül Bombardmanı – Gen Tabancası Metodu

Gen aracılı partikül bombardmanı, diğer adıyla gen tabancası metodunun ardında yatan düşünce hızlandırılmış bir partikül taşıyıcıyla hedef hücrelere çıplak DNA yollamaktır. Teknik ilk olarak 1987’de bitki hücrelerindeki transgen ekspresyonunun zorluğunun üstesinden gelmek için kullanılmıştır (Klein vd., 1987). 1990’larda ise memeli hücreleri ve canlı dokulara kadar genişlemiştir (Yang vd., 1990; Williams vd., 1991).

Biyolistik (biyoloji ve balistiğin birleşimi) aktarım, hedef hücrelere yeterli hızda ağır metal partiküllerini sürüklemeye yöntemini kullanır. İvme, yüksek elektrik voltajı veya helyum deşarjı ile sağlanır. Partiküllerin toksik veya reaktif olmaması, hedef hücrenin çapından küçük (çoğunlukla 1-1.5 μm) olması gereklidir. Çıplak DNA, bu mikropartiküllerin üzerine çöktürülüp hücre içinde port-bombardman ile serbest bırakılır. Metodun orijinalinde, DNA ile kaplanmış tungsten partiküllerini plazma membranına sokmak ve gen ekspresyonu sağlamak için gunpowder ivme sistemi kullanılır (Klein vd., 1987). Farklı tipte araçlar geliştirilmiştir; bunlardan en çok kullanılanı altın küreciklerdir.

Bu teknolojinin en yaygın olarak uygulandığı durum, deriyi hedef alan genetik immünizasyondur (Wang vd., 2004; Eisenbraun vd., 1993). Gen tabancası metodu, primer olarak en etkili DNA immünizasyonunun gerçekleştiği (Loehr vd., 2000) epidermis üzerine DNA kaplı kürecikleri sürükler (Eisenbraun vd., 1993; Lu vd., 1996). Bu yaklaşım genetik aşılama, immünomodülasyon ve kanser tedavisinde intihar gen terapisi için kullanılmaktadır (Lin vd., 2000).

Bu tekniğin etkinliği, partiküllere yüklenen DNA miktarı, partikül büyüklüğü ve aktarımın zamanlaması gibi çeşitli parametrelere bağlıdır. Buna ilaveten, DNA kaplı küreciklerin dağılımı gen tabancası ile uygulanan ivmenin iyi ayarlanmasına bağlıdır (Uchida vd., 2002). Alınacak cevap, taşınan DNA kaplı küreciklerin sayısına ve partiküllerin plazmit ile kaplanma seviyesine bağlıdır (Eisenbraun vd., 1993).

2.5.3 Elektroporasyon

DNA’yı hücre içine sokmak için sıkça kullanılan fiziksel araç elektrik alandır. Elektroporasyon olarak bilinen bu teknik, hücre membranını elektrik akımına maruz bırakarak

geçici, bölgesel destabilizasyona sebep olur. Bu düzensizlik sırasında hücre membranı dış kaynaklı moleküllere geçirgen hale gelir. Bu geçirgenliğin oluşması için kritik, eşik değeri bir seviyede elektrik akım uygulanması gereklidir. Bu akım bir hücre süspansiyonu için 1 V (Chang, 1992; Gehl, 2003) iken akımın genişliği ve membranın kompozisyonu gibi etkenlerle değişiklik gösterir. Gen transferinin elektroporasyon ile gerçekleşebileceği bundan 20 yıl önce Neumann ve arkadaşları tarafından fare lyma hücreleri kullanılarak ispatlanmıştır (Neumann vd., 1982). *In vivo* gen transferi 1990'ların başında başlamış ve 1996'ya kadar geniş biçimde araştırılmıştır (Heller vd., 1996; Nishi vd., 1996).

Hücre membranın geçirgenliğindeki bu geçici artışın elektrik alan tarafından indüklenen porların oluşumu sonucunda gerçekleştiğine inanılmaktadır. Kırmızı kan hücrelerinde oluşan porlar freeze-fracture elektron mikroskopisi ile incelendiğinde büyüklüklerinin 20 ila 120 nm olduğu görülmüştür (Chang, 1992).

Elektroporasyonu etkileyen faktörler fiziksel (akımın süresi ve gücü) ve biyolojik (DNA konsantrasyonu ve konformasyonu, hücre büyüklüğü) olabilir (Gehl, 2003; Andreason ve Evans, 1988). Her hücre tipi için optimal elektroporasyonu sağlayacak koşullar farklıdır. Farklı büyüklükteki moleküller için farklı elektroporasyon koşulları gereklidir. Küçük anti-kanser ilaçlarının aktarımında kısa akım (100 μ s) ve yüksek güçte elektrik alan (> 700 V/cm) en iyi sonucu verirken gen transferi için uzun akım (20-60 ms) ve düşük güçte elektrik alan (100-200 V/cm) tercih edilir (Rabussay vd., 2003). Akım süresi uzadıkça oluşan porların büyüklüğünün ve açık kalma süresinin de arttığı düşünülmektedir.

2.5.4 Sonoporasyon

Ultrason uygulamasıyla hücre geçirgenliğinin artırılmasıdır. Ultrason geniş bir yelpazede dalga formuna ve sıklığına sahiptir, fakat en yoğun ilgi megahertz sıklığındaki sinusoidal problemlerle uygulanan sonoporasyon üzerinde toplanmıştır. Daha düşük sıklıktaki dalgalar (örneğin 20 kHz) hücre lizisi ve parçalanması için kullanılırken daha yüksek yoğunluktaki şok dalgaları böbrek taşı kırma da kullanılır.

Sonoporasyonda rol oynayan mekanizmanın akustik kaviteasyon olduğu düşünülmektedir. Kaviteasyon, mekanik düzensizliğe ve aktif baloncukların yığılmasına sebep olur ve enerji çıkışı bitişik hücre membranlarının geçirgenliğini artırır. Bu alandaki ilk gen aktarım çalışmaları 1990'ların ortalarında bildirilmiştir (Kim vd., 1996; Tata vd., 1997; Bao vd., 1997). Ultrason aracılı gen transferini etkileyen faktörler: transformatör, akustik basınç ve akım süresidir.

2.5.5 Laser Işıması

Gücü bir akım jeneratörü ile kontrol edilen bir laser kaynağı (örneğin neodimiyum-yttrium-aluminyum garnet (Nd:YAG) (Tao vd., 1987), argon iyonu (Palumbo vd., 1996), holmiyum (Sagi vd., 2003), titanyum safir (Zeira vd., 2003)) ile hedef hücrelere laser atışı yapma esasına dayanır. Laser ışını genellikle bir lens aracılığıyla hedef hücrelere odaklanır. Hücre membranının geçirgenliği, lokal termal bir etkiyle ışın şokunun olduğu bölgede modifiye olur. Bu düzensizlik, besiyeri ortamında mevcut olan bir genin hücre içine transfer olması için yeterlidir. Etkisi, besiyeri ortamı ile sitoplazma arasındaki ozmatik basınç farkına bağlıdır (Palumbo vd., 1996). Laser ışımalarının hücre membranında geçici porlar oluşturduğuna dair raporlar bildirilmiştir; bunlar oldukça büyük (yaklaşık 2 μm çapında), fakat çok kısa bir zamanda kapanan türdendir.

Laser kaynağının fiziksel büyüklüğü ve yüksek maliyeti nedeniyle günümüzde laser ışımı ile gen aktarımı yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bu metodla yapılan ilk gen aktarım çalışmaları ilk olarak 1980'lerde bildirilmiş (Tao vd., 1987; Kurata vd., 1986). Son olarak da, femto-second infrared laser kullanılarak yapılan *in vivo* gen transferi uygulanmıştır (Zeira vd., 2003). Bu yöntemin transfeksiyon etkinliği, enerji seviyesi, akım sayısı ve akım süresi gibi bir takım parametrelere bağlıdır.

2.5.6 Magnetofeksiyon

Magnetofeksiyon, gen vektörlerinin hücrelere girişini artıran yeni bir metoddur (Scherer vd., 2002). Manyetik nanopartikülleri DNA ile ve hatta transfeksiyon reaktifi ile bir araya getirme fikriyle ortaya çıkmıştır. Kullanılan nanopartiküller polimer kaplı biyolojik olarak bozunabilir demir oksitten yapılır. Bunların gen vektörleri ile bağlanması, tuz ile indüklenmiş koloidal çöktürme ile gerçekleşir. Manyetik partiküller, oluşturulan dış kaynaklı bir manyetik alanın etkisiyle hedef hücrelere yoğunlaşır. Bu teknolojinin genetik materyalin hedef hücre yüzeyine hatta içine aktarılmasına olanak sağladığı çevresel dokulardaki manyetik partiküllerin ekstravazasyonu (damardan fışkıрма) gösterilerek ispatlanmıştır (Gupta ve Hung, 1993; Goodwin vd., 2001). Sebebi, manyetik alanın manyetik partikülleri plasma membranından hücrenin içine doğru çekmesi olabilir. DNA, sitoplazmada serbestleşir ve manyetik partiküllerin hücresel fonksiyonları etkilemeyeceği düşünülmektedir. Bu yöntem, viral veya viral olmayan vektörlerle yapılan standart transfeksiyon prosedürünün etkisini artırır; DNA vektörü bir manyetik partikül ile kompleks oluşturmadığı takdirde manyetik alan tek başına etkili olamaz.

Magnetofeksiyon endotelial hücreler gibi primer hücre kültürlerini transfekte etmekte uygun olabilir (Scherer vd., 2002; Krotz vd., 2003). *In vitro* olarak yüksek etkinlik göstermekte olan yöntem *in vivo* olarak da gastrointestinal sistem ve kan damarlarında lokal transfeksiyon göstermiştir (Scherer vd., 2002). Magnetofeksiyon, *in vitro* ve *in vivo*'da antisens oligonükleotidlerin aktarımında başarıyla uygulanmıştır (Krotz vd., 2003).

2.5.7 Lipozom Aracılı Gen Transferi

Fiziksel metodların en önemli avantajı genetik materyalin hücrelere direkt olarak aktarılabilmesidir. Bu durum fiziksel metodları kesin bir çizgiyle lipofeksiyon-polifeksiyon gibi viral olmayan gen transfer teknolojilerinden ayırır. Sentetik bir vektörle gen aktarımı hücrenin bağlanması, endositoz ve endositik veziküllerin girişi, endozomun lizozoma olgunlaşması, veziküler kompartmanlardan ayrılması, nükleus çeperine doğru göç, lipid-aracılı gen transferinde lipid ile DNA'nın ayrılması (Marcusson vd., 1998) ve son olarak DNA'nın nükleusa girişi ile gerçekleşir. Böylece transfeksiyon etkinliği çeşitli bariyerlerle sınırlanmış ve düşük seviyede plazmit girişi ve gen ekspresyonu sağlanmış olur. Katyonik lipid-DNA komplekslerinin hücrelere girişinin oldukça yavaş olduğu ve birçoğunun 6 saatten önce hücreye giriş yapamadığı gösterilmiştir (Zabner vd., 1995). Daha hızlı plazmit girişi, komplekslerin DNA-vektör inkübasyonunun 15. saatinde perinükleer bölgede görülmesiyle sağlanmıştır (Remy-Kristensen vd., 2001). Nükleer lokalizasyon sinyalleri kullanılarak DNA'nın sitosolden nükleusa hareketi artırılabilir (Hebert, 2003). Endozomal salınımı artırmak için farklı stratejiler adapte edilerek (örneğin fotokimyasal internalizasyon (Hogset vd., 2002)) gen ekspresyon kinetiklerinin ivme kazanması amaçlanmıştır.

2.5.7.1 Katyonik Lipozomlar

Katyonik lipid veya polimer aracılığıyla gen transferi hücre türüne bağlıdır. Örneğin, primer kültür hücrelerinden bazıları (primer nöronlar, primer dendritik hücreler ve primer endotelial hücreler) katyonik lipidlerin de dahil olduğu geleneksel viral olmayan transfeksiyon metodlarına dirençlidir. Bu durum büyük ölçüde endositozun hücre türüne bağlı olmasından kaynaklanır (Zabner vd., 1995; Remy-Kristensen vd., 2001). Dahası kompleks formülasyonlarının lipopleks büyüklüğü, yükü ve DNA/vektör dağılımı gibi fizikokimyasal parametreler transfeksiyon etkinliğini etkiler. Bunun aksine, fiziksel teknikler, plazma membranından direkt gen transferinin sağlanması nedeniyle hücre tipine bu derece bağlı değildir. Böylece, katyonik lipidlerin *in vivo* gen transferini kolaylaştırması zor gözükmemektedir (Niculescu-Duvaz vd., 2003). Ligand için yüzey reseptörü kodlayan bir hedef

hücre popülasyonuna özgü reseptör aracılı gen aktarımı geliştirilmiş olduğu halde sentetik vektörler *in vivo*'da spesifiktikten yoksundur.

Katyonik lipid ajanlar kullanılarak gerçekleştirilen lipofeksiyon işlemi (kültüre hücrelerde katyonik lipidli ortamda DNA transferi), monokatyonik lipid ajanın polikatyonik biri ile yer değiştirmesi ile geliştirilmiştir (Ciccarone vd., 1993; Hawley-Nelson vd., 1993). Örneğin Lipofektamin DNA'nın ve siRNA'nın hücre içine girmesini sağlayan özel olarak tasarlanmış katyonik lipidlerden biri olan transfeksiyon ajanıdır (Dokka vd., 2000). Bu metod DNA'nın iyonik etkileşimine ve kültüre hücrelerde DNA'yı fonksiyonel koruyabilen komplekslerden lipozomlara dayanır. Yani lipozomlar aracılığı ile yapılan gen transferidir. Katyonik lipid ajanlar, sulu çözeltilerde küçük unilamellar lipozomlar oluştururlar. Lipozomların pozitif yükü nükleik asit ve hücre membranında etkileşmesini sağlar; böylece lipozom/nükleik asit/hücre membran kompleksi (transfeksiyon kompleksi) oluşur. DNA lipozomların içine enkapsüle olmaz fakat negatif yüklü olduğu için lipozomlara bağlanarak kompleksler oluşturur. Bu kompleks endozomlardan ve lipozomlardan salınır. DNA-lipid oranı, inkübasyon süresi, serum varlığı, antibiyotik varlığı, hücre kültürünün durumu, hücre yoğunluğu, promotör seçimi ve DNA kalitesi her hücre hattı için optimize edilmelidir.

2.5.7.2 Anyonik Lipozomlar

Anyonik lipozomlar, DNA enkapsülasyonunda kullanılırlar. Enkapsülasyondan önce pozitif yüklü polilizin eklenerek negatif yüklü DNA'nın küçük kompleksler oluşturması sağlanır. Klasik transfeksiyon metodlarının, düşük verimlilik, hücre toksisitesi gibi sorunlarına karşın katyonik lipid ajanların yüksek transfeksiyon verimliliklerine sahip ve pek çok ökaryotik hücrenin transfeksiyonunda etkindirler. Yine diğer metodlara göre viruslar, proteinler, sentetik oligonükleotidler ve RNA ile transfeksiyon için adapte olabilmeleri diğer bir avantajlarıdır. Son olarak lipozomlar genlerin fonksiyonlarının başarılı bir şekilde dağılımında ya da *in vivo* viral genomlarda kullanılabilirler.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Atomik güç mikroskobu	Shimadzu SPM 9600
CO ₂ inkübatörü	Sanyo MCO-18
Çalkalamalı su banyosu	GFL 1083
Çalkalayıcı tabla	Grant-bio PMR-30
Distile su cihazı	GFL
Etüv	Binder
Floresan mikroskobu	Olympus BX50
Floresan mikroskobu fotoğraf makinası	JVC TK-1270
Hassas terazi	Shimadzu AX-200
Isıticılı manyetik karıştırıcı	Heidolph MR 3001
Işık mikroskobu	Olympus CK2
Kaba terazi	Sartorius PT 1200
Laminer hava akım kabini	Holten Model 1.2
Lipofast Basic enjeksiyon sistemi	Avestin
Mikrosantrifüj	Hettrich Universal 16A
pH-metre	Hanna Instruments HI 8314
Rotary evaporatör	Heidolph
Soğutmalı santrifüj	SIGMA 3K30
Su banyosu	GFL
Spektrofotometre	Shimadzu PharmaSpec UV-1700
Transmisyon elektron mikroskobu	Jeol T-100
U.V. transilluminatör	Vilber Luormat
Vorteks	Heidolph REAX top
Yatay jel elektroforez cihazı	Labnet Gel XL Ultra V-2
Zeta-sizer	Malvern Instruments NanoZS

3.1.2 Kullanılan Malzemeler

- Otomatik pipet :0.5-10 μ l, 1-20 μ l, 20-100 μ l, 100-1000 μ l, 1-5 ml
- Beher :50ml, 100 ml, 500 ml, 1 L
- Balon: :50ml, 100 ml, 500 ml, 1 L
- Erlen: :50ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 L
- Mezür
- Ependorf tüpleri
- Deney tüpleri

3.1.3 Kullanılan Kimyasal Sarf Malzemeler

4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit (HEPES)	Sigma
Agar	Difco
Agaroz	Biobasic Inc.
Aminonaftol sülfonik asit	Sigma
Amonyum asetat	Sigma
Amonyum molibdat	Sigma
Ampisilin	Sigma
β -merkaptotanol	Fluka
Sodyum bikarbonat	Sigma
Bromfenol mavisi	Sigma
Bovin serum albumin (BSA)	Sigma
Coomassie brilliant blue G-250	Sigma
Di-sodyum hidrojen fosfat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dulbecco's modified eagle medium (D'MEM)	Difco
Etanol	Riedel-de Haen
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)	Sigma
Etidyum bromür	Sigma
Fenol	Merck
Fetal calf serum (FCS)	Biochrom
Fluorik asit (HF)	Merck
Fosforik asit (H_3PO_4)	Riedel-de Haen
Formvar	Sigma
Glasiyal asetik asit	Merck
Glukoz	Sigma
Hekzan	Merck
Hidroklorik asit (HCl)	Merck
İzopropanol	Riedel-de Haen
Kalsiyum klorür ($CaCl_2$)	Merck
Kanamisin	Sigma
Kitozan	Fluka
Kloroform	Merck

Kolin	Sigma
Ksilen siyanol	Merck
Magnezyum sülfat hepta-hidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Maya özütü	Difco
Metanol	Riedel-de Haen
N-[1-(2,3-Dioleoiloksi) propil]-N,N,N-trimethylamonyum metilsülfat (DOTAP)	Sigma
orto-Nitrofenil- β -D-galaktopiranosid (ONPG)	Amresco
Penisilin	Merck
Polietilen glikol (PEG)	Sigma
Polibren	Sigma
Potasyum asetat	Merck
di-Potasyum fosfat (K_2HPO_4)	Merck
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Merck
Potasyum hidroksit	Merck
Potasyum klorür	Sigma
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma
Sodyum karbonat	Merck
Sodyum klorür	Sigma
Sodyum sülfat	Merck
Sodyum sülfid (Na_2SO_3)	Merck
Sodyum meta-bisülfid ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)	Merck
Streptomisin	Sigma
Sülfürik asit	Merck
Tri-kloro asetik asit (TCA)	Merck
Tripsin	Biological Industries
Tripton	Difco
Tris-HCl	Sigma
Sodyum sitrat	Merck
Triton X-100	Sigma

3.1.4 Besiyerleri

Luria Bertani (LB)

10 g tripton, 5 g maya özütü, 10 g sodyum klorür, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek 1 L'ye tamamlandı (Sambrook vd., 1989). Besiyeri 1 atmosfer basınçta 121°C'da 20 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

Luria Bertani Agar (LBA)

Yukarıda verilen sıvı LB besiyerine %1.5 (w/v) oranında agar eklenerek hazırlandı. LB ve LBA besiyerleri 1 atmosfer basınçta 121°C'da 20 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Gerekli durumlarda besiyerlerine ampisilin (final konsantrasyonu 100 µg/ml) ya da kanamisin (final konsantrasyonu 50 µg/ml) eklendi (Sambrook vd., 1989).

Brown Besiyeri

180 g NaCl, 20 g MgSO₄.7H₂O, 5 g Maya özütü, 3 g C₆H₅Na₃O₇.2H₂O, 2 g KCl tartılıp deiyonize distile su ile 1 L'ye tamamlandı. pH'ı 4 N NaOH ile 7.5'e ayarlandı. Katı besiyeri için aynı karışıma %1.5 olacak şekilde agar eklendi. Besiyeri otoklav ile sterilize edildi.

3.1.5 Tampon ve Çözeltiler

Tamponlanmış Fizyolojik Tuzlu Su (PBS) (-) (x10)

2 g KCl, 2 g KH₂PO₄, 80 g NaCl ve 21.6 g Na₂HPO₄.7H₂O tartılıp final hacim 1000 ml olacak şekilde deiyonize distile su ile çözüldü (pH: 7.4). 1/10 sulandırılarak kullanıldı.

Formvar Çözeltisi (%0.25'lik (w/v))

0.125 g formvar 50 ml kloroform içinde çözündürülerek hazırlandı (Chrystie, 1996).

Hidrojen Florür (HF) Çözeltisi (%1 (w/v))

2.21 ml (1 g) %40'lık (w/v) HF deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. (%40 HF çözeltisi için d = 1.13 g/ml)

Amonyum Molibdat Çözeltisi (%1 (w/v))

1 g amonyum molibdat 100 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü.

Bradford Belirteci (x5)

25 mg Coomassie brilliant blue G-250, 12.5 ml %99.9'luk etanolde çözündürüldü. Üzerine 25 ml %85'lik H_3PO_4 eklenerek konsantre boya çözeltisi elde edildi. Kullanılacağı zaman 5 kez seyreltildi ve filtre kağıdından geçirildi.

HEPES Tamponu

2.38 g HEPES 90 ml deiyonize distile suda çözündürüldü, 2 N NaOH ile pH=7.4'e ayarlandıktan sonra hacimi 100 ml'ye tamamlandı.

%5 TCA Çözeltisi

5 g TCA deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

 H_2SO_4 Çözeltisi (5 M)

100 ml deiyonize distile su üzerine yoğunluğu 1.84 g/ml olan 100 ml %98'lik H_2SO_4 ilave edildi. Karıştırıldı ve 150 ml deiyonize distile su ilave edildi. ($M_{W_{H_2SO_4}} = 98.08$ g/mol)

Molibdat Reaktifinin Hazırlanması

6.25 g amonyum molibdat 50 ml deiyonize distile su ile çözüldü ve üzerine 75 ml 5 M H_2SO_4 çözeltisi ilave edildi. Çözeltinin hacmi deiyonize distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

Sodyum Metabisülfid Çözeltisi (%15)

7.5 g $Na_2S_2O_5$ final hacim 50 ml olacak şekilde deiyonize distile su ile çözüldü.

Sodyum Sülfid Çözeltisi (%20)

5 g Na_2SO_3 final hacim 50 ml olacak şekilde deiyonize distile su ile çözüldü.

Aminonaftol Sülfonik Asit Çözeltisi

0.125 g aminonaftol üzerine 48.75 ml $Na_2S_2O_5$ çözeltisi, 5 ml Na_2SO_3 çözeltisi ilave edildi ve 30 dakika karıştırıldı. Bulanık olduğu için 0.25 ml Na_2SO_3 ilave edildi. Kahverengi şişede saklandı.

KH₂PO₄ Stok Çözeltisi (2.5 M)

351 mg KH₂PO₄ deiyonize distile su ile 990 ml'ye tamamlandı ve üzerine 10 ml 5 M H₂SO₄ çözeltisi ilave edildi. ($M_{w_{KH_2PO_4}} = 136.09$ g/mol)

Seyreltik Standart KH₂PO₄ Çözeltisi (%3.2)

2.5 M KH₂PO₄ stok çözeltisinden 2.5 ml alınıp %5 TCA ile 25 ml'ye tamamlandı.

NaOH Çözeltisi (2 M)

4 g NaOH deiyonize distile suda çözüldükten sonra hacmi deiyonize distile su ile 50 ml'ye tamamlandı. ($M_{w_{NaOH}} = 40$ g/mol)

Tris-HCl Tamponu (1 M, pH = 8.0)

121.1 g Tris, 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. 5 N HCl çözeltisi ile pH 8'e ayarlandı ve hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Çözelti 1 atmosfer basınçta 121°C'da 20 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. ($M_{w_{Tris}} = 121.1$ g/mol)

Etilendiamin Tetra-Asetik Asit (EDTA) Çözeltisi (0.5 M, pH = 8.0)

186.1 g EDTA, 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. Pellet halde NaOH eklenerek çözeltinin pH'ı 8.0'a ayarlandı. Çözelti hacmi deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve otoklavlanarak sterilize edildi. ($M_{w_{EDTA}} = 372.2$ g/mol)

Tris / EDTA (TE) Tamponu (10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH = 8.0)

10 ml 1 M Tris-HCl tamponu (pH = 8.0) ve 2 ml 0.5 M EDTA çözeltisi (pH = 8.0) deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

Glukoz Çözeltisi (0.5 M)

9.01 g glukoz deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek 100 ml'ye tamamlandı. ($M_{w_{Glukoz}} = 180.2$ g/mol)

Potasyum Asetat Çözeltisi (5 M)

49.07 g potasyum asetat deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı. (Potasyum asetat $M_w = 98.14$ g/mol)

Solüsyon I (50 mM Glukoz, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH = 8.0)

10 ml 0.5 M glukoz, 2.5 ml 1 M Tris-HCl (pH = 8.0) ve 2 ml 0.5 M EDTA (pH = 8.0) çözeltisi deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (Sambrook vd., 1989).

Solüsyon II (0.2 N NaOH, %1 SDS)

0.8 g NaOH ve 1 g sodyum dodesil sülfat (SDS) deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek 100 ml'ye tamamlandı (Sambrook vd., 1989). ($M_{wNaOH} = 40 \text{ g/mol}$)

Solüsyon III (3 M potasyum : 5 M asetat)

60 ml 5 M potasyum asetat ve 11.5 ml glasiyal asetik asit deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (Sambrook vd., 1989).

50x Tris : Asetat : EDTA (TAE)

242 g tris deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek 843 ml'ye tamamlandı. Çözelti üzerine 57 ml glasiyal asetik asit, 100 ml 0.5 M EDTA çözeltisi (pH = 8.0) eklendi. Elektroforez tamponu olarak ya da agaroz jellerin hazırlanmasında 50 kat seyreltilerek kullanıldı (Sambrook vd., 1989).

6x Elektroforez Yükleme Tamponu

4 g sukroz, 0.025 g bromfenol mavisi ve 0.025 g ksilen siyanol, deiyonize distile su içinde çözündürülerek 10 ml'ye tamamlandı (Sambrook vd., 1989).

Etidyum Bromür (10 mg/ml)

0.1 g etidyum bromür 10 ml deiyonize distile su içinde çözündürülerek hazırlandı.

CaCl₂ Çözeltisi (0.1 M)

5.4 g CaCl₂.6H₂O, deiyonize distile su içinde çözündürülerek 100 ml'ye tamamlandı. Elde edilen çözelti 0.22 µ filtreden geçirilerek sterilize edildi. ($M_{wCaCl_2.6H_2O} = 147 \text{ g/mol}$)

LiCl Çözeltisi (5 M)

9 g LiCl tartılıp deiyonize distile suda çözündürüldü ve final hacim deiyonize distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

Lizis Tamponu

50 ml 0.2 M fosfat tamponu (pH = 7.5) ve 2 ml Triton X-100 ve 48 ml deyonize distile su karıştırılarak hazırlandı. Kullanılmadan hemen önce 1 mM DTT (1 µL/ml) karışıma eklenerek kullanıma hazır hale getirildi.

Tampon A

100 ml 0.2 M fosfat tamponu (pH = 7.5), 800 µl 2.5 M KCl, 200 µl 1 M MgCl₂ ve 99 ml deiyonize distile su karıştırılarak hazırlandı. Kullanmadan önce 50 mM β-merkaptoetanol (2.7 µl/ml) tampon çözeltisine eklendi.

ONPG Substrat Çözeltisi

orto-Nitrofenil-β-D-galaktopiranosid 100 mM fosfat tamponunda (pH = 7.5) 4 mg/ml konsantrasyonda çözündürülerek hazırlandı.

Na₂CO₃ Çözeltisi (1 M)

10.6 g Na₂CO₃ deiyonize distile suda çözöldürölerek 100 ml'ye tamamlandı ($M_{WNa_2CO_3}=105.99$ g/mol).

Tripsin Çözeltisi (% 0.25 – w/v)

0.25 g tripsin 100 ml PBS içinde çözöndüröldü, 0.2 µ filtre ile steril edildikten sonra -20°C'de saklandı.

Tripsin-EDTA Çözeltisi (%0.05 Tripsin, %0.05 EDTA)

10 ml %0.25'lik tripsin, 39.5 ml PBS ve 0.5 ml %5'lik EDTA karıştırıldı, 4°C'de saklandı.

D'MEM (4x)

13.48 g Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-high glucose, deiyonize distile su içersinde çözöndürölerek 250 ml'ye tamamlandı. Besi ortamı 0.2 µ filtre ile steril edildikten sonra 4°C'de saklandı.

Üretme Besiyeri

50 ml x4 D'MEM, 130 ml deiyonize distile su, 20 ml FCS ve 2 ml Penisilin/Streptomisin karıştırılarak hazırlandı. %7.5 NaHCO₃ ile ortam pH'sı 7.2 - 7.4'e ayarlandı.

Brown Besiyeri

Sıvı Brown besiyeri 180 g NaCl, 20 g MgSO₄.7H₂O, 5 g maya özütü, 3 g C₆H₅Na₃O₇.2H₂O ve 2 g KCl 1 litre deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hazırlandı. Besiyerinin pH'ı 4 N NaOH ile 7.5'e ayarlandı. Katı Brown besiyeri hazırlamak için ortama %2 (w/v) oranında agar eklendi. Besiyerleri otoklav ile sterilize edildi.

3.1.6 Plazmitler

Çalışmada memeli hücrelerinde ekspresyon için geliştirilen pSV-β-Gal (Promega) ve pEGFP-N1 (Clontech) plazmit vektörlerinden yararlanıldı. pSV-β-Gal plazmit vektörü SV40 promotörü ve “enhancer” bölgesi kontrolünde bakteriyel Lac Z geni taşır. Lac Z geni spektrofotometrik yöntemlerle kantitatif olarak kolayca analiz edilebilen β-Galaktosidaz enzimini kodlar (Silhavy vd, 1984; Schenborn ve Groskreutz, 1999). pEGFP-N1 plazmit vektörü ise canlı hücrelerde floresan mikroskop altında incelenebilen yeşil floresan protein (green fluorescence protein - GFP) kodlar (Rosenthal, 1987). GFP geni biyolüminesant denizanasından (*Aequorea victoria*) elde edilir ve canlı hücrelerde floresan mikroskopu altında gen anlatımını kalitatif olarak izleme olanağı vermektedir (Shimomura vd., 1962; Morin ve Hastings, 1971). GFP varyantı EGFP (enhanced green fluorescent protein) ise daha parlak yeşil floresan verir (Cormack vd., 1996).

3.1.7 Standart DNAlar

DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmesi için EcoRI ve HindIII ile kesilen lambda DNA'sı (λEcoRI-Hind III, Fermentas) ve 1 kb Ladder (250-10 000 bp, Fermentas SM0311) standart olarak kullanıldı.

3.1.8 Plazmit DNA'ların İzolasyonu ve Kontrol Edilmesinde Kullanılan Enzimler

Lizozim (Roche): Plazmit DNA'nın izolasyonu aşamasında kullanıldı. Bakteri çeper yapısını zayıflatan dolayısıyla hücrelerin kolayca parçalanmasını sağlayan bir enzimdir.

RNaz: Plazmit DNA'nın saflaştırılması aşamasında DNA'ya karışan RNA moleküllerin yıkılmasında kullanılır.

Restriksiyon endonükleazlar: DraI ve AseI (Fermentas) enzimleri, saflaştırılan plazmit DNA'ların kontrol edilmesinde kullanıldı.

3.1.9 Lipid Kaynağı Olarak Kullanılan Arkeler

Çalışmada Birbir vd., (2004) tarafından Tuzköy tuz madeninden izole edilen ve tiplendirmesi yapılan *Haloarcula hispanica* 2TK2 suşu kullanıldı.

3.1.10 Memeli Hücre Hatları

In vitro transfeksiyon çalışmalarında insan orijinli HEK293 (Human embryonic kidney cell line) ve MCF7 (Human breast adenocarcinoma cell line) hücre hatlarından yararlanıldı. Bu hücre hatlarından HEK293 insan embriyonik böbrek hücresi orijinli ve MCF7 kanserli insan göğüs hücresi orijinlidir. Hücrelerin üretilmesi ve devamlılığı %10 FCS içeren D'MEM-hg besi ortamında ortalama 4 günde bir gerçekleştirilen pasajlarla sağlandı.

3.2 Metod

3.2.1 Halofilik Arkelerin Üretilmesi

Haloarcula hispanica 2TK2 izolatu katı Brown besiyerine yayma metodu ile ekilerek 40°C'da 7 gün süresince üremesi sağlandı. Katı besiyerinde oluşan bakteri kolonilerinden bir öze yardımıyla 100 ml sıvı Brown besiyerine ekim yapılarak ön kültür hazırlandı. Kültür ortamı 40°C'da 14 gün inkübe edildi. Hazırlanan ön kültür 1000 ml taze Brown besiyerine transfer edildi ve 40°C'da 30 gün inkübe edilerek orta ölçekte kültürler elde edildi. Hücrelerin yavaş üremesi ve istenilen doygunluğa ulaşması uzun zaman alması nedeniyle hazırlanan kültürlerin ortalama %10'luk bir bölümü taze Brown besi yerine aktararak kültürlerin devamlılığı sağlanırken kalan %90'luk bölümü lipid ekstraksiyonunda kullanıldı (Lillo ve Valera, 1990).

3.2.2 Lipid Ekstraksiyonu

Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan *Haloarcula hispanica* kültürleri 4°C'da 10000 dev/dak hızda 10 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Elde edilen hücrelerin lipidleri Bligh ve Dyer'a göre (1957) ekstrakte edildi. Hücre çökeltisine 30 ml kloroform / metanol / distile su (1:2:0.8 (v/v)) karışımından oluşan çözücü eklendi ve 1-2 saat mekanik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra ortam 4°C'da 10000 dev/dak hızda 10 dakika santrifüj edilerek organik ve su fazı ayrıştırıldı. Total lipidleri içeren organik faz temiz bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 2 hacim soğuk aseton eklendi. Soğuk aseton eklenmesi ile çökelen polar lipid fraksiyonu 4°C'da 10000 dev/dak hızda 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Elde edilen çökelti kloroform içerisinde çözündürüldü. Rotary evaporatör yardımıyla kloroform uçurulduktan sonra elde edilen lipid miktarı hassas terazi ile tartılarak belirlendi.

Miktarı saptanan lipidler kloroform içerisinde belirlenen konsantrasyonlarda yeniden çözündürülerek arkeozom hazırlamakta kullanıldı.

3.2.3 Arkeozomların Hazırlanması

3.2.2’de belirtilen şekilde hazırlanan arkeal lipidler 1 mg/ml konsantrasyonda kloroform içinde çözüldü. Arkeal lipid çözeltisi 50 ml’lik şilifli bir balona transfer edildi ve bir rotary evaporatör yardımıyla çözücüsü uçurularak balon cidarında ince bir film tabaka elde edildi. Bu film tabaka 2 ml HEPES tamponu (pH = 7.4) içerisinde hidrate edilerek arkeozomlar elde edildi. Hidrate edilen polar lipid izolatu vortekslendi, insülin enjektöründen geçirildi. Boyutlandırma işlemi uygulanan örnekler ise Lipofast Basic (Avestin) enjeksiyon sistemi ile 100 nm por büyüklüğündeki polikarbonat filtreden geçirilerek deneylerde kullanıldı (Şekil 3.1). Örnekler +4°C’da saklandı.



Şekil 3.1 Lipofast Basic enjeksiyon sistemi.

3.2.4 Fosfolipid Standart Grafiğinin Hazırlanması ve Fosfolipid Tayini

Fosfat miktarı belli olan 0.5 ml’lik standart çözeltiler üzerine sırasıyla 0.1 ml molibdat reaktifi, 0.04 ml aminonaftol sülfonik asit çözeltisi ilave edildi ve deiyonize distile su ile 1 ml’ye tamamlandı. Beş dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 680 nm’de absorbansları ölçüldü. Renk değişiminin hızı ve renk şiddeti çözeltinin sıcaklığına bağlıdır. Sıcaklığın 1°C artışı renk şiddetini %1 artırır. Bu nedenle hazırlanan standartların ve çözeltilerin sıcaklığının 20-30°C arasında olmasına dikkat edildi. Kör olarak %5 TCA kullanıldı. % konsantrasyona karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi (Tesoro ve Birchwood, 1972).

Hazırlanan arkeozom örneklerinden 0.5 ml alınarak üzerine sırasıyla 0.1 ml molibdat reaktifi, 0.04 ml aminonaftol sülfonik asit çözeltisi ilave edildi ve deiyonize distile su ile 1 ml’ye tamamlandı. Beş dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 680 nm’de absorbansları ölçüldü. Elde edilen absorbans değerlerinden standart grafik yardımıyla fosfolipid konsantrasyonları saptandı.

3.2.5 Plazmit DNA'ların Çoğaltılması ve Saflaştırılması

Plazmitlerin üretilmesinde konak bakteri olarak *Escherichia coli DH5a* ırkı kullanıldı. Küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonunda SDS-Alkali/Lizis yönteminden yararlanıldı. *In vitro* transfeksiyon deneylerinde kullanılmak üzere hazırlanan orta ölçekte plazmit DNA izolasyonu ve saflaştırılmasında ticari kitlerden yararlanıldı.

3.2.5.1 Transformasyon için *E. coli*'nin Kompetant Hale Getirilmesi

Konak *E. coli* hücreleri Cohen ve arkadaşlarının (1972) geliştirdiği yöntem kullanılarak kompetant hale getirildi. Yöntem kısaca şöyledir: -80°C'de saklanan bakteri stoğundan LBA besiyerine yayma metodu ile ekim yapıldı ve bir gece boyunca 37°C'de inkübe edilerek bakterilerin büyümesi sağlandı. Katı besiyerinde oluşan kolonilerden bir kaç öze yardımıyla 100 ml sıvı LB besiyerine aktarıldı. Kültür 25°C 150 dev/dak çalkalama hızında üremeye bırakıldı. Kültürden belirli aralıklarla alınan örnekler 600 nm dalga boyundaki optik yoğunlukları ölçülerek bakteri üremesi izlendi. $OD_{600} = 0.25 - 0.3$ değerleri arasındaki bakteri kültürü kompetant hücre hazırlanması için kullanıldı. Bakteri kültürü 4°C 4000 dev/dak hızda 15 dakika santrifüj edildi. Hücre çökeltisi buzda soğutulmuş 40 ml 0.1 M $CaCl_2$ çözeltisi içinde süspanse edilerek 15 dakika buzda bekletildi ve tekrar 4°C 4000 rpm hızda 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen hücre çökeltisi 10 ml soğuk 0.1 M $CaCl_2$ çözeltisi içinde süspanse edildi ve transformasyonda kullanıldı.

3.2.5.2 Transformasyon

10-20 ng plazmit DNA üzerine 100 µL kompetant hücre eklendi ve 10-15 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 90 saniye 42°C'lik su banyosunda ve hemen ardından 2 dakika buzda tutularak sıcaklık şoku uygulandı. Buzdan alınan plazmit DNA'lar 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu. Örneklerin üzerine 500 µL LB (-) (antibiyotik içermeyen besiyeri) eklendi ve 37°C'de 45 dakika boyunca inkübe edildi. Elde edilen hücre süspansiyonundan 100 µL alınarak antibiyotikli LBA besiyerine yayma yöntemiyle ekildi. pEGFP-N1 plazmiti için kanamisin, pSV-β-Gal plazmiti için ampicilin içeren katı besiyeri kullanıldı. Ekimi yapılan petri bir gece boyunca 37°C'lik etüvde üremeye bırakıldı (Sambrook vd., 1989). Transformasyonu gerçekleşen hücrelerin oluşturduğu kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldı.

3.2.5.3 Plazmitlerin Üretilmesi ve İzolasyonu

Transformasyon sonunda elde edilen kolonilerden 10 ml küçük ölçekli kültür hazırlandı. Hazırlanan doymuş kültürler 150 ml'lik antibiyotikli LB besiyerine aktarıldı. 37°C 120

dev/dak çalkalama hızında bir gece boyunca üretilen kültür bu sürenin sonunda 4°C’de 4000 dev/dak hızında 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Çöktürülen hücrelerden plazmit DNA izolasyonu ve saflaştırılmasında orta-ölçekli plazmit DNA izolasyon Kit’i (Peqlab Gold XChange Plazmit Midi Kit) kullanıldı. Uygulanan işlemler kısaca şöyledir: Hücreler 4 ml Sol I/RNase A içersinde süspanse edildi. Sol II’den 4 ml eklendi ve yavaşça karıştırılıp 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sol III’ten 8 ml eklendi, karıştırıldı ve 20000 g 4°C’de 15 dakika santrifüj edildi. Saflaştırma kolonu 2.5 ml EQ tamponu ile dolduruldu. Tamponun yer çekimiyle akması beklendi. Süpernatant kolona aktarıldı ve akması beklendi. Kolona bağlanan plazmit DNA 12 ml yıkama tamponu kullanılarak yıkandı ve ardından 5 ml elüsyon tamponu eklenerek temiz bir tüpte toplandı. 3.5 ml izopropanol eklenerek elue olmuş plazmit DNA çöktürüldü. 20000 g 4°C’de 15 dakika santrifüj edilen çökeltiye -20°C’deki etanolden 2 ml eklenip vortekslenildi. 15000 g 20°C’de 10 dakika santrifüj edildi. Etanol fazı bir pipet yardımıyla dikkatlice çekilerek atıldı ve pellet oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. İşlem sonunda TE tamponunda çözülerek -20°C’de saklandı.

3.2.5.4 Plazmit DNA’nın Spektrofotometrik Yöntemle Analizi

Elde edilen plazmit DNA’ların saflığının kontrolü ve miktarının tayini için 260 ve 280 nm dalga boylarında verdikleri optik yoğunluklar (OD_{260} , OD_{280}) belirlendi. Plazmit DNA’ların saflığı, spektrofotometrik analiz sonunda elde edilen A_{260}/A_{280} oranına bakılarak ve 220-340 nm dalga boyları arasında spektrum alınarak belirlendi. Plazmit DNA’ların miktar tayini ise seyreltilen DNA çözeltisinin hem 260 hem de 280 nm’lerde absorbansı okunarak belirlendi. Hesaplamada çift iplikli plazmit DNA için $1 OD_{260} = 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ sabitinden yararlanıldı.

3.2.5.5 Plazmit DNA’ların Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü

İzolasyon sırasında DNA’nın kırılması arzu edilen bir durum değildir. Tercih edilen kapalı halkasal moleküllerin olabildiğince yüksek oranda elde edilmesidir. Bu nedenden dolayı izole edilen plazmit DNA’lar enzimatik olarak kesilmeden agaroz jele uygulandı ve elektroforez sonuçları değerlendirildi. Kalitatif ve kantitatif kontrolleri yapılan plazmit DNA’lar uygun restriksiyon endonükleazları ile kesildikten sonra, agaroz jel elektroforezinde verdikleri DNA bantları ve boyutları değerlendirilerek doğrulukları kontrol edildi. Bu amaçla pEGFP-N1 plazmit DNA DraI ve AseI restriksiyon endonükleazları ile, pSV- β -Gal ise DraI restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim işlemi 20 μL reaksiyon ortamında gerçekleştirildi. 1 μg plazmit DNA, 2 U enzim, 2 μL reaksiyon tamponu (x10) deiyonize distile su ile 20 μL ’ye tamamlandı

ve 37°C'da su banyosu içerisinde 1-2 saat süreyle kesime bırakıldı. Kesilen DNA örnekleri Bölüm 3.2.6'da belirtildiği şekilde %1'lik agaroz jel elektroforezi ile incelendi.

3.2.6 Plazmit DNA'nın Arkeozomlara Yüklenmesi

Plazmit DNA / arkeozom formülasyonlarının hazırlanmasında iki farklı yol izlendi:

Birincisi, 3.2.3'te belirtildiği şekilde hazırlanan boş arkeozomlar farklı oranlarda plazmit DNA ile karıştırıldı (DNA (μg) / Arkeozom (μl): 1/1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, 1/8, 1/10) ve arkeozom/plazmit DNA komplekslerinin oluşması için oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi.

İkinci yöntemde ise plazmit DNA, arkeozomların hazırlanması aşamasında evaporasyon balonu cidarında oluşturulan lipid film tabakasının hidrasyonu sırasında ortama katıldı. Bu deneylerde 1 ml HEPES tamponuna 25-50 ng/ μl plazmit DNA katıldı ve boş arkeozomların hazırlanmasında olduğu gibi hidrasyon işlemi gerçekleştirildi.

Her iki yöntemle hazırlanan örneklerde plazmit DNA'nın tutulma kapasiteleri agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi.

3.2.7 Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez

DNA analizlerinde %1'lik agaroz jeli kullanıldı. Bunun için 1 g agaroz 100 ml 1xTAE tamponu içerisinde kaynatılarak çözündürüldü. Jel yaklaşık 60-65°C'a soğutuldu ve 2 μl 10 mg/ml etidyum bromür eklendikten sonra kasetlere dökülerek donması sağlandı. Hazırlanan jeller 1xTAE içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Plazmit DNA örnekleri ya da arkeozom/plazmit DNA formülasyonlarına 5:1 oranında x6 DNA jel yükleme tamponu eklendi ve jele uygulandı. Elektroforez işlemi 20-30 dakika süre ile 100 V sabit akımda gerçekleştirildi. Elektroforez işlemi sonrası DNA örnekleri UV-transillüminatör üzerinde görüntülendi ve fotoğrafları alındı (Sambrook vd., 1989).

3.2.8 Arkeozom Formülasyonlarının Zeta Potansiyellerinin ve Partikül Boyutlarının Ölçülmesi

Bölüm 3.2.3'te belirtildiği şekilde hazırlanan arkeozomların zeta potansiyelleri ve partikül boyutları Zetasizer Nano ZS (Malvern Ins.) cihazında ölçüldü. Zeta Sizer cihazı, dinamik ve elektroforetik ışık saçılması yöntemleriyle çalışmaktadır. Bu cihaz yardımı ile çözelti içinde bulunan partiküllerin, emülsiyonların partikül büyüklüğü ölçümünde, zeta potansiyel ölçümü ile stabilite değerlendirilmesinde, molekül ağırlığı ölçümünde kullanılmaktadır. Bu cihazda, partikül büyüklüğü 0,6 ile 6000 nm aralığında, molekül ağırlığı 1103 ile 2107 Dalton

aralığında olan partiküllerin ölçümleri yapılabilir. Ayrıca, partikül büyüklüğü 5 nm ile 10 µm aralığında olan partiküllerin zeta potansiyeli ölçümünde de kullanılabilir. Zeta ve boyut dağılımı analizi yapılan arkeozomlara ölçüm öncesinde herhangi bir boyutlandırma işlemi uygulanmadı. Zeta analizi yapılacak örnekler hazırlandıkları tampon çözeltisi ile 10 kat seyreltildi ve özel kuvvetler kullanılarak analiz edildi.

3.2.9 Arkeozomların Transmisyon Elektron Mikroskobu ile Analizi

Oluşturulan arkeozomların morfolojik özellikleri transmisyon elektron mikroskobu (Transmission Electron Microscopy, TEM) ile analiz edildi. Bu amaçla arkeozom örnekleri formvar kaplı gridler kullanılarak negatif boyama tekniği (Chrystie vd., 1996) ile hazırlandı.

3.2.9.1 Gridlerin Formvar ile Kaplanması

Kloroform içinde hazırlanan %0.25'lik formvar çözeltisine batırılan temiz bir lam oda sıcaklığında kurutularak üzerinde ince bir formvar filminin oluşması sağlandı. Filmin hasar görmeden lamdan ayrılması için kenarları bistüri ile kazındı ve %1'lik HF içine batırılıp çıkartıldı. Ardından yaklaşık 45°'lik açıyla geniş bir kap içindeki saf suya batırılarak filmin lamdan ayrılarak saf suda yüzmesi sağlandı. Gridler, yüzen film tabaka üzerine sivri uçlu bir pens yardımıyla bırakıldı. Gridli film tabaka temiz bir lam aracılığıyla ters yüz edildi ve yüzeyi kaplı gridlerin kuruması sağlandı. Hazırlanan gridler arkeozomlu preparatların hazırlanmasında kullanıldı (Chrystie vd., 1996).

3.2.9.2 Örneklerin Negatif Boyama Tekniği ile Hazırlanması

HEPES içinde hazırlanan arkeozom süspansiyonundan 40-50 µl formvar kaplı gridlerin üzerine damlatıldı. Örneğin yüzeye adsorbe olması için 10 dakika bekletildi. Filtre kağıdı ile grid üzerindeki süspansiyon fazlası alındı. Grid üzerine bir damla %1'lik amonyum molibdat çözeltisi damlatıldı ve birkaç dakika sonra filtre kağıdı ile çekildi. Gridler +4°C'de kurumaya bırakıldı ve hazırlanan preparatlar elektron mikroskobu (Jeol T-100) ile incelenerek arkeozomların elektron mikrografları çekildi (Chrystie vd., 1996).

3.2.10 Arkeozomların Atomik Güç Mikroskobu ile Analizi

Hazırlanan arkeozom örnekleri atomik güç mikroskobu (AFM) ile de incelendi. Örnekler mika kaplı gridlere MgCl₂ ile bağlandı ve her örnek 2 defa distile su ile yıkandı. Plazmit DNA 4 µg/ml olacak biçimde deiyonize distile su ile seyreltildi. Arkeozom örnekleri ise seyreltilmeden kullanıldı. Mika üzerine adsorbe olan plazmit DNA ve arkeozom örnekleri 15

dakika oda sıcaklığında kurutuldu ve Shimadzu SPM 9600 model tarayıcı prob mikroskobunun atomik güç modunda incelendi (Liang vd., 2005).

3.2.11 Memeli Hücrelerine Plazmit DNA Transfeksiyonu

Transfeksiyon deneylerinde HEK293 ve MCF7 hücreleri kullanıldı. Hücreler transfeksiyondan bir gün önce 24-kuyulu plakalara ekildi (HEK293, 5×10^4 hücre/kuyu; MCF7 1×10^5 hücre/kuyu). *In vitro* transfeksiyon işleminden hemen önce kültürlerin besi ortamları 0,5 ml FCS içeren [D'MEM (+)] ya da FCS eklenmemiş [D'MEM (-)] besiyerleri ile değiştirildi. *In vitro* transfeksiyon için plazmit DNA/arkeozom formülasyonları metod 3.2.5'te belirtildiği gibi hazırlandı. Boş arkeozomlar ile plazmit DNA transfeksiyonunda her bir kuyucuk için 1 μ g pEGFP-N1 ya da pSV- β -Gal plazmit DNA, D'MEM (-) içerisinde 20 ng/ μ l olacak şekilde sulandırıldı. Plazmit DNA örnekleri üzerine 1, 3, 5, 10, 20, 30 μ l boş arkeozom eklendi ve kompleks oluşumu için 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra plazmit DNA/arkeozom örnekleri hücre kültürlerine eklendi.

Hidrasyon aşamasında plazmit DNA katılarak hazırlanan formülasyonlar kullanılarak yapılan *in vitro* transfeksiyonda ise besi ortamları değiştirildikten sonra 1-15 μ l plazmit DNA/arkeozom ortama eklendi. Plazmit DNA/arkeozom örnekleri eklendikten sonra kültür ortamı 37°C'de inkübe edildi. D'MEM (-) içeren kültürlerle 6 saatlik inkübasyondan sonra D'MEM (+) besiyeri eklendi. Kültürler 48 saat standart koşullarda inkübe edildikten sonra GFP ve β -Galaktosidaz enzimi ekspresyonu için analiz edildi (Shimomura vd., 1962; Turan ve Nagata, 2006).

3.2.12 Arkeozom/Plazmit DNA Transfeksiyonuna Ca^{2+} , Polibren, DOTAP ve Kitozan Etkileri

Anyonik özellik gösteren lipozomlar negatif yükleri olması nedeniyle DNA ile kompleks oluşturma eğilimi göstermezler. Bu nedenle anyonik lipozomlarla memeli hücrelerine DNA transfeksiyonunu artırmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Patil vd., 2004; Bouille vd., 1995; Lee vd., 2004; Turan ve Daştan, 2004). Bu çalışmada da plazmit DNA taşıma kapasiteleri düşük olan arkeozomların etkinliğini artırmak için pozitif yüklü iyon ya da moleküllerden yararlanıldı.

3.2.12.1 Ca^{2+} İyonlarının Arkeozomlarla Plazmit DNA Transfeksiyonuna Etkisi

Anyonik özellikteki lipozomlar DNA ile kompleks oluşturma eğilimi göstermezler. Anyonik lipozomlarla memeli hücrelerine DNA transfeksiyonu çalışmalarında Ca^{2+} iyonlarının etkinliği arttırdığı bilinmektedir (Patil vd., 2004). *H. hispanica* lipidlerinden hazırlanan arkeozomların negatif zeta potansiyeline sahip olmaları DNA ile kompleks oluşturmaya güçleştirdiğinden arkeozom/plazmit DNA örneklerinin hazırlanması aşamasında ortama belirli konsantrasyonlarda Ca^{2+} iyonları eklendi. Bu amaçla, D'MEM (-) içerisinde 20 ng/ μL konsantrasyonunda sulandırılan plazmit DNA örneklerine önceden 0.2 μm filtreden geçirilerek sterilize edilen 2.5 M stok CaCl_2 çözeltisi seyreltilerek 10 mM, 20 mM, 50 mM ve 100 mM konsantrasyonlarda eklendi. Plazmit DNA miktarı tüm deneylerde Ca^{2+} iyonu konsantrasyonundan bağımsız olarak her karışım tüpünde sabit tutuldu. Her bir kuyucuk için 1 μg plazmit DNA'sı kullanıldı. Daha sonra bu örneklerle 5 – 10 μL arkeozom eklendi ve kompleks oluşumu için oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Hücre kültürlerinin besiyerleri serumsuz taze besiyeri ile değiştirildi. Hazırlanan örnekler hücrelere eklendi ve 6 saat sonra üzerlerine serumlu besiyeri eklendi. 48 saat 37°C %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi. GFP ekspresyonu floresan mikroskobu ile β -Galaktosidaz ekspresyonu β -Galaktosidaz aktivitesi saptanarak belirlendi.

3.2.12.2 Polibrenin Arkeozomlarla Plazmit DNA Transfeksiyonuna Etkisi

Polibren, pozitif yüklü özelliğinden dolayı özellikle retroviral vektörlerin memeli hücrelerini enfekte etme etkinliğini arttırmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Bouille vd., 1995). Bu nedenle, elektronegatif özellikteki arkeozom ve plazmit DNA formülasyonlarında polibrenin (Sigma) etkisi incelendi. Bu doğrultuda farklı miktarlarda arkeozom farklı konsantrasyonlarda polibrenle formüle edilerek zeta değerleri ölçüldü, plazmit DNA'yı tutma kapasiteleri agaroz jel elektroforezi ile incelendi ve *in vitro* transfeksiyonda kullanıldı. 25 mg/ml konsantrasyondaki stok polibren 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ve 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konsantrasyonlara seyreltildi. Hazırlanan arkeozom formülasyonları ile kompleks oluşumu için 20 dakika oda sıcaklığında bekletilen örnekler pEGFP-N1 ve pSV- β -Gal plazmit DNA'larının HEK293 hücrelerine transfeksiyonunda kullanıldı. Her bir kuyucuk için 0.5 – 1 μg plazmit DNA, D'MEM (-) besiyerinde 20 ng/ μL olacak şekilde sulandırıldı. Hücre kültürlerinin besiyerleri 500 μL taze serumsuz besiyeri ile değiştirildi. Hazırlanan plazmit DNA/arkeozom örnekleri hücrelere eklendi. 6 saat sonra serumlu besiyeri eklenen hücreler 48 saat 37°C %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi. GFP ekspresyonu floresan mikroskobu ile β -Galaktosidaz ekspresyonu β -Galaktosidaz aktivitesi saptanarak belirlendi.

3.2.12.3 DOTAP'ın Arkeozomlarla Plazmit DNA Transfeksiyonuna Etkisi

DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride), memeli hücrelerine DNA transfeksiyonunda kullanılan katyonik özellikte bir moleküldür (Lee vd., 2004; Dokka vd., 2000, Xu ve Anchordoquy, 2008). DOTAP (Sigma) kullanılarak hazırlanan lipozomlar, HEPES tamponu ile hidrate edilerek hazırlanan boş arkeozomlarla belli oranlarda karıştırılarak *in vitro* transfeksiyon işleminde kullanıldı. DOTAP ve arkeal lipidlerin farklı oranlarda karıştırılması ile elde edilen formülasyonların *in vitro* transfeksiyon etkinlikleri incelendi.

Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan farklı lipozomlar (arkeozom, DOTAP-arkeozom), pEGFP-N1 ve pSV- β -Gal plazmit DNA'larının HEK293 hücrelerine transfeksiyonunda kullanıldı. Her bir kuyucuk için 0.5 – 1 μ g plazmit DNA, D'MEM (-) besiyerinde 20 ng/ μ L olacak şekilde sulandırıldı. Hücre kültürlerinin besiyerleri 500 μ L taze serumsuz besiyeri ile değiştirildi. Hazırlanan plazmit DNA-lipozom örnekleri hücrelere eklendi. 6 saat sonra serumlu besiyeri eklenen hücreler 48 saat 37°C %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. GFP ekspresyonu floresan mikroskobu ile β -Galaktosidaz ekspresyonu β -Galaktosidaz aktivitesi saptanarak belirlendi.

3.2.12.4 Kitozanın Arkeozomlarla Plazmit DNA Transfeksiyonuna Etkisi

Kitozan özellikle deniz kabuklularından bol miktarda elde edilen kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen doğal bir polimerdir. Katyonik özellik göstermesi, toksik olmaması ve biyoyumlu olması nedeniyle kitozan, memeli hücrelerine gen transferinde üzerinde yaygın olarak çalışılan bir polimerdir (Turan ve Daştan, 2004). Bu özellikleri nedeniyle, arkeozomların plazmit DNA transfeksiyon etkinliğini arttırmak amacıyla kitozan örneklerinden yararlanıldı. Deneylerde molekül ağırlığı 400 kDa olan medium kitozan kullanıldı. 0.25 g, 0.50 g veya 0.75 g M-kitozan 100 ml asetik asit/Tween 80 çözeltisinde çözündürülerek hazırlandı (Daştan, 2003). Kitozan çözeltisi kullanılarak yapılan *in vitro* transfeksiyon deneylerinde ekstrakte edilen lipidlerden izole edilen polar lipidlerle hazırlanan arkeozomlar farklı miktarlardaki kitozan çözeltisiyle kompleks oluşturması amacıyla karıştırıldı. Transfeksiyon plakasının kuyucuklarına sabit hacimde arkeozoma karşılık artan miktarda (1, 2, 4, 8 μ g) kitozan çözeltisi eklendiği gibi sabit kitozan miktarına karşılık artan miktarlarda arkeozom formülasyonları da denendi. Sonuçlar floresan mikroskobu ile gözlemlendi ve β -Galaktosidaz aktivitesi saptanarak belirlendi.

3.2.13 Transfeksiyon Sonuçlarının Analizleri

3.2.13.1 β -Galaktosidaz Standart Grafiğinin Hazırlanması ve Aktivite Tayini

Arkeozomlar ve pSV- β -Gal plazmit DNA ile farklı koşullarda transfekte edilen hücrelerde, *in vitro* transfeksiyon etkinliği, bu hücrelerden hazırlanan lizatlarda β -Galaktosidaz aktivitesinin ölçülmesi ile ortaya konuldu. Transfekte HEK293 ya da MCF7 hücrelerinde hazırlanan lizatlarda β -Galaktosidazın aktivitesinin ölçülmesinde Turan ve Nagata'nın (2006) uyguladığı yöntem izlendi.

Stok β -galaktosidaz enzimi (Roche) (1 μ l = 100 mU) kullanılarak hazırlanan standart grafik için 1 mU ile 0.01 mU arasında değişen seyreltmeler yapıldı. Her seyreltme tüpünde derişim yarıya düşürüldü ve seyreltmelerde lizis tamponu kullanıldı. Her tüpe 295 μ l buffer A (+), 100 μ L ONPG substrat çözeltisi eklenerek 37°C'de 4 saat ve 12 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir örneğe 180 μ l 1 M Na₂CO₃ çözeltisinden eklenerek reaksiyon durduruldu. Örneklerin absorbansı 420 nm'de Shimadzu PharmaSpec UV-1700 spektrofotometre ile ölçülerek biri 4 diğeri 12 saatlik inkübasyona ait olan iki standart grafik hazırlandı.

β -Galaktosidaz aktivitesinin belirlenmesi işleminde *in vitro* transfeksiyondan 48 saat sonra besiyerleri uzaklaştırıldı, hücreler 0,5 ml PBS ile yıkandı. Yirmi dört kuyulu plakalarda gerçekleştirilen deneylerde her bir kuyuya 100 μ l lizis tamponu eklendi ve 15-20 dakika oda sıcaklığında düşük hızda çalkalanarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Elde edilen lizatlardan 25 μ l örnek alındı ve üzerine 295 μ l buffer A (+), 100 μ L ONPG substrat çözeltisi eklenerek 37°C'de 4-16 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir örneğe 180 μ l 1 M Na₂CO₃ çözeltisinden eklenerek reaksiyon durduruldu. Örneklerin absorbansı 420 nm'de Shimadzu PharmaSpec UV-1700 spektrofotometre ile ölçüldü. Elde edilen absorbans değerlerinden, protein ve β -galaktosidaz standart grafiklerinden de yararlanarak örneklerin aktiviteleri mU/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.2.13.2 Bradford Metodu ve BSA Standart Grafiğinin Hazırlanması

Proteinlerin miktar tayininde çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan hassas ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle en fazla tercih edilenlerinden biri Bradford metodudur. Bu yöntem, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması sonucunda oluşturduğu renkli çözeltilerin 595 nm'de absorbansının ölçülmesi ilkesine dayanır.

Standart grafiğin oluşturulması için bovin serum albumin (BSA) kullanıldı. 100 μ L deiyonize

distile su içerisinde 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 ve 20 µg BSA içeren örnekler hazırlandı. Konsantrasyonları belli olan bu standartlar üzerine 1 ml Bradford belirteci eklendi ve vortekslendi. Kör için standart çözelti yerine 1 ml distile koyularak aynı işlem uygulandı. Karanlıkta oda sıcaklığında 5 dakika bekletilen örneklerin absorbansları 595 nm dalga boyunda BSA içermeyen köre karşı okundu. Optik yoğunluktaki (OD_{595}) değişim ile protein miktarı arasındaki korelasyon grafik haline dönüştürüldü (Ertan ve Arda, 1999).

Transfeksiyon süreci tamamlanmış ve lizis tamponu eklenerek parçalanmış hücrelerin bulunduğu 24 kuyulu plaktaki her örnekten 100 µl alınarak tüplere konuldu; üzerlerine 1 ml Bradford belirteci eklendi ve vortekslendi. Örnekler 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 595 nm dalga boyundaki absorbansları ölçüldü. Elde edilen absorbanslarla standart grafiğin eğiminden yararlanılarak örneklerdeki protein miktarı hesaplandı.

3.2.13.3 Arkeozomların *In Vitro* Transfeksiyon Etkinliklerinin Yeşil Floresan Proteini ile Saptanması

pEGFP-N1 kontrol vektörü yeşil floresan proteini kodlayan, memeli hücrelerinde yüksek transfeksiyon etkinliği gösteren pozitif bir kontrol vektörüdür. Bu vektör kullanılarak yapılan *in vitro* transfeksiyon deneyleri sonucunda memeli hücreleri tarafından sentezlenen yeşil floresan proteini Olympus BX50 floresan mikroskobu altında incelendi. Kalitatif gözlemler ile belirlenen floresan, JVC TK-1270 floresan mikroskobu fotoğraf makinası kullanılarak fotoğraflandı.

3.2.14 Mikroskobik inceleme

In vivo çalışmada kullanılması düşünülen arkeozom formülasyonlarının ve hücre hatlarının morfolojisinin belirlenmesi için yapılan fotoğraf çekimlerinde Olympus CK2 ışık mikroskobu kullanıldı. Mikroskopta büyütme olarak x400 kullanıldı. Bu yöntemle, hazırlanan arkeozomların morfolojik yapıları ve homojen partiküllerin oluşup oluşmadığı incelendi.

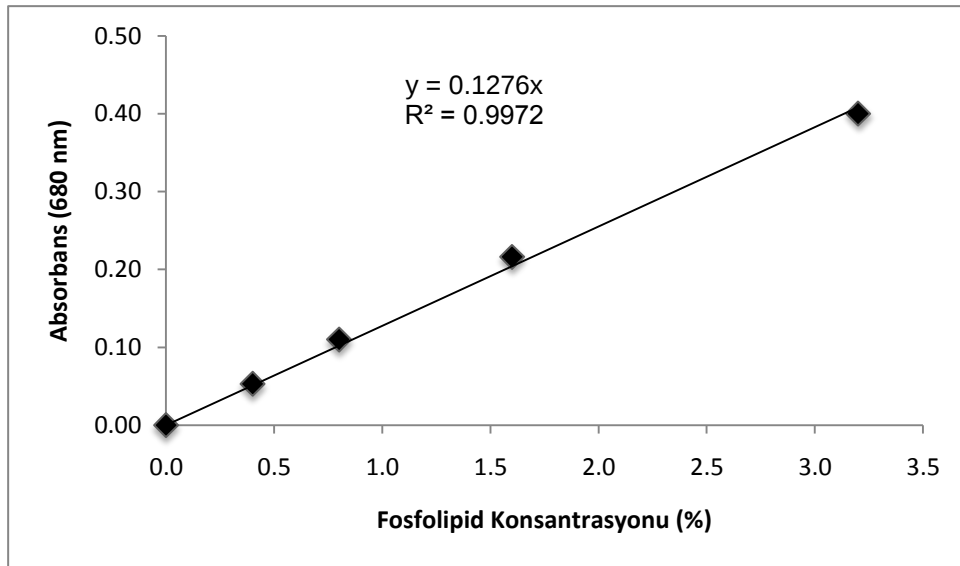
4 SONUÇLAR ve TARTIŞMA

4.1 Arkebakterilerden Lipid Ekstraksiyonu ve Kantitatif Tayinler

Bligh ve Dyer'a (1957) göre elde edilen lipid miktarı iki farklı yol izlenerek belirlendi. Birinci yöntemde ekstraksiyon sonucu elde edilen total lipid fraksiyonu evaporasyon yolu ile kurutulduktan sonra hassas terazi ile tartıldı. Bu deneyler sonucunda ortalama 2 litre sıvı kültürden çöktürülen arkebakterilerden 20 ± 5.773 mg total lipid elde edildi. İkinci yöntem olarak total lipid içerisinde mevcut olan fosfolipid miktarı tayin edildi. Bu amaçla, metod 3.2.4'te belirtildiği şekilde hazırlanan çözeltiler kullanılarak standart grafik elde edildi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Fosfolipid tayini standart çözeltilerinin konsantrasyonları ve 680 nm'deki absorbans değerleri

FOSFOLİPİD KONSANTRASYONU (%)	ABSORBANS (OD ₆₈₀)
0,4	0,053
0,8	0,110
1,6	0,216
3,2	0,400



Şekil 4.1 Fosfolipid tayini için hazırlanan standart grafik.

Arkeobakterilerden ekstrakte edilen total lipid fraksiyonundaki fosfolipid miktarının tayini hidrate edilmiş arkeal lipid örnekleri kullanılarak yapıldı. Standart grafiğin eğiminden faydalanarak örneklerin fosfolipid içerikleri hesaplandı. 100 ve 250 µl olarak hazırlanan örneklerin 680 nm'deki absorbans değeri ölçüldü. Bu değerler üzerinden standart grafiğin eğim formülü ($y = 0.1276x$) kullanılarak fosfolipid miktarı hesaplandı. Bu deneyler sonucunda ortalama örneklerde 1.73 ± 0.08 mg fosfolipid bulunduğu saptandı.

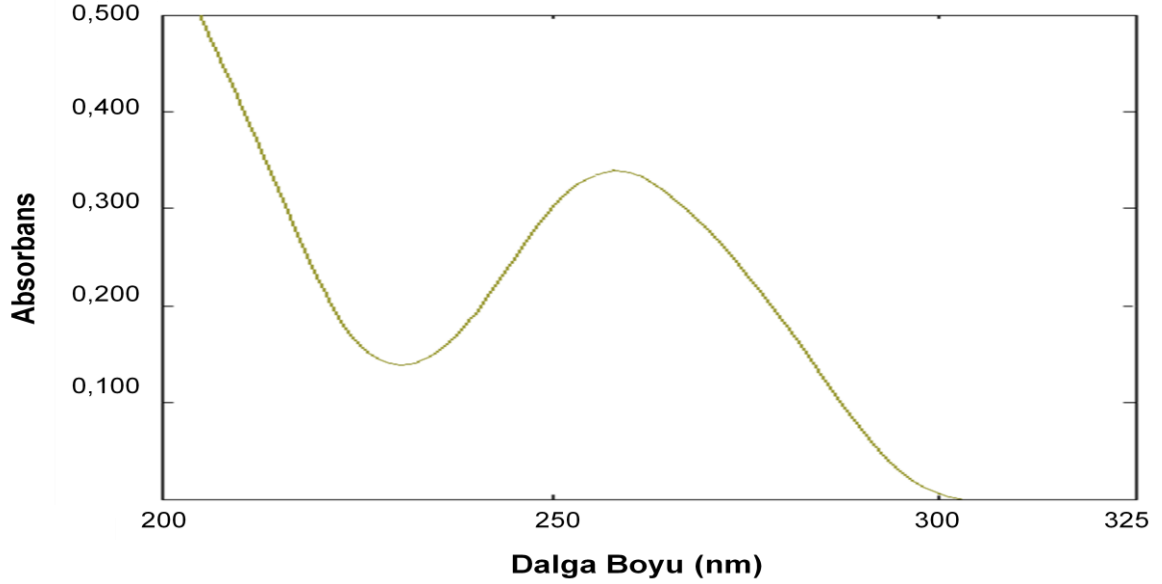
4.2 Çalışmada Kullanılan Plazmitlerin Safılık Kontrolleri

Arkeozomların DNA taşıyıcısı olarak potansiyellerinin araştırıldığı bu çalışmada pEGFP-N1 ve pSV-β-Gal plazmit DNA'larından yararlanıldı. Bu plazmitlerden pEGFP-N1 insan cytomegalovirus (CMV) promotörü kontrolünde yeşil floresan protein (green fluorescence protein-GFP) kodlamaktadır. Bu nedenle, pEGFP-N1 plazmitinin memeli hücrelerine alınması, plazmit üzerinden GFP proteininin canlı hücrede floresan mikroskop altında incelenmesi ile kolayca izlenebilmektedir. Bununla birlikte, hücrelerde GFP ekspresyonu kantitatif verilerden çok, kalitatif sonuçlar vermektedir. Bu nedenle, çalışmalarda SV40 konstitütif promotör kontrolünde bakteri β-galaktosidaz geni taşıyan, dolayısıyla memeli hücrelerinde β-galaktosidaz enziminin sentez edilmesine olanak veren pSV-β-Gal plazmit vektörü de kullanılmıştır. Bu plazmitin memeli hücrelerine verilmesi (transfeksiyon) sonucunda hücrelerde sentez edilen β-galaktosidaz enzimi kantitatif olarak ölçülebilmektedir. Her iki plazmit vektörün çoğaltılmasında *E. coli DH5α* konak bakteri olarak kullanıldı. Çoğaltılan plazmitlerin kalite ve miktarları spektrofotometrik yöntemlerle saptandı. Plazmitlerin doğrulukları ise belirli restriksiyon endonükleazları ile kesim sonrası oluşan DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

4.2.1 Plazmit DNA'ların Kalite ve Miktarlarının Spektrofotometrik Yöntemle Tayini

Özellikle memeli hücrelerinde transfeksiyon çalışmalarında kullanılacak DNA'nın kalitesi önemlidir. DNA kalitesinin saptanmasında örneklerin spektrofotometrik ölçümler sonucu elde edilen A_{260} ve A_{280} değerlerinden yararlanılır (Sambrook vd., 1989). Kaliteli bir DNA 260 nm dalga boyunda pik verecek şekilde absorpsiyon spektrumuna sahiptir ve A_{260}/A_{280} oranı 1,8'e yakın bir değer verir. Bu çalışmada plazmitler alkali lizis metodu ile izole edildikten sonra Peqlab Gold XChange Plazmit Midi Kit ile saflaştırıldı (bkz. 3.2.7.3). Plazmit DNA'lar kalitatif olarak spektrofotometrik ölçümle elde edilen A_{260}/A_{280} oranına bakılarak ve 200-325 nm dalga boyları arasında spektrum alınarak incelendi (Şekil 4.2). Örneklerin A_{260}/A_{280} oranının 1.7 ile 1.8 arasında değiştiği görüldü. DNA örneklerinin

konsantrasyonları “1 OD₂₆₀ = 50 µg/ml DNA” sabitinden (Sambrook vd., 1989) yararlanılarak belirlendi. Yapılan ölçümler sonucunda 100 ml doymun kültürden elde edilen pEGFP-N1 DNA miktarı ortalama 0,5-0,6 mg; pSV-β Gal DNA miktarı 0,3-0,4 mg olarak saptandı.

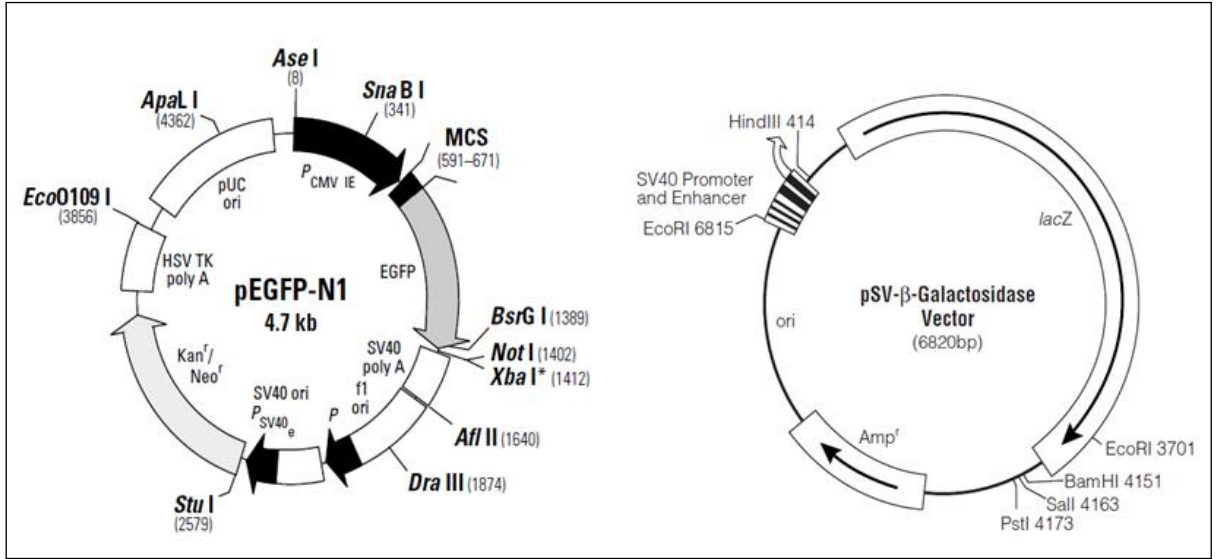


Şekil 4.2 200 ile 325 nm dalga boyları arasında elde edilen DNA spektrumu.

4.2.2 Plazmit DNA'ların Doğruluklarının Kontrolü

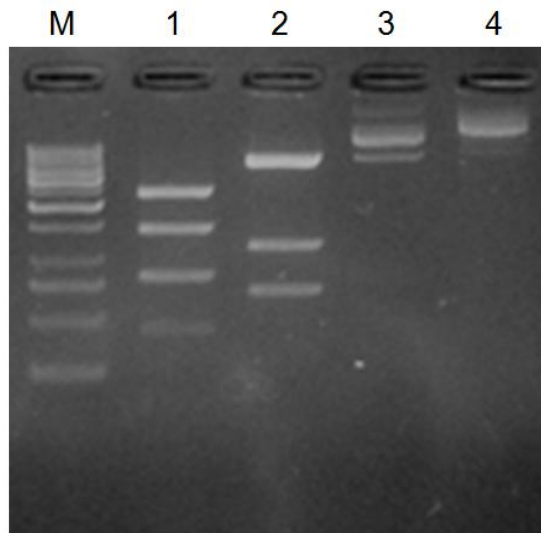
Saf olarak elde edilen plazmit DNA'lar, hem restriksiyon endonükleaz enzimleri ile işlem görmeden hem de enzimlerle kesim sonrası agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Doğal koşullarda çift zincirli halkasal yapıdaki plazmit DNA kendi üzerinde katlanarak kapalı halkasal formda bulunur. Bununla birlikte halkasal DNA molekülü üzerinde tek ya da çift zincirde meydana gelecek kırılmalar sonucunda az miktarda açık halkasal ve doğrusal DNA molekülleri ortaya çıkar. Bu tür DNA kırılmaları arzu edilen bir durum değildir. Agaroz jel elektroforezinde, molekül ağırlıkları aynı olsa bile genellikle kapalı halkasal molekül daha hızlı hareket eder; bunu doğrusal DNA molekülleri izler. Açık halkasal moleküller ise konformasyonları gereği jelde daha yavaş ilerlerler. Elektroforez ile yapılan incelemelerde elde ettiğimiz plazmit DNA örneklerinin büyük oranda kapalı halkasal formda moleküllerden oluştuğu görüldü (Şekil 4.4).

Yukarıda belirtildiği gibi plazmit DNA'lar farklı formlarda farklı elektroforez profilleri verdiğinden, restriksiyon enzimleri ile kesilerek doğrusal DNA fragmentleri elde etmeksizin karşılaştırılamazlar. Bu nedenle, ele alınan bir plazmit DNA'nın doğruluğu, restriksiyon haritalarından yararlanılarak uygun enzimlerle kesildikten sonra kontrol edilebilir. Bu çalışmada kullanılan plazmit DNA'ların kontrol edilmesinde Şekil 4.3'te verilen plazmit haritalarından yararlanıldı.



Şekil 4.3 pEGFP-N1 ve pSV-β-Gal plazmitlerinin genetik haritaları.

Bu amaçla, pEGFP-N1 plazmit DNA'sı DraI ve AseI enzimleri ile; pSV-β-Gal plazmit DNA'sı ise DraI enzimi ile kesilerek jel elektroforezi ile incelendi. pEGFP-N1 plazmit DNA'sı DraI ve AseI enzimleri ile 0, 1460, 3902 ve 3921 noktalarından kesilerek 4 parçaya bölündü. pSV-β-Gal plazmit DNA'sı ise DraI enzimi ile 3819, 4993, 5685 ve 5704 noktalarından kesilerek 4 parçaya bölündü. Kesim sonrası DNA örnekleri agaroz jel elektroforezi ile incelendi ve Şekil 4.4'te görüldüğü gibi restriksiyon haritalarına uygun DNA bantları elde edildi. Kontrolleri yapılan plazmit DNA'lar ileriki aşamalarda arkeozomlarla formüle edilmek üzere +4°C'da saklandı.



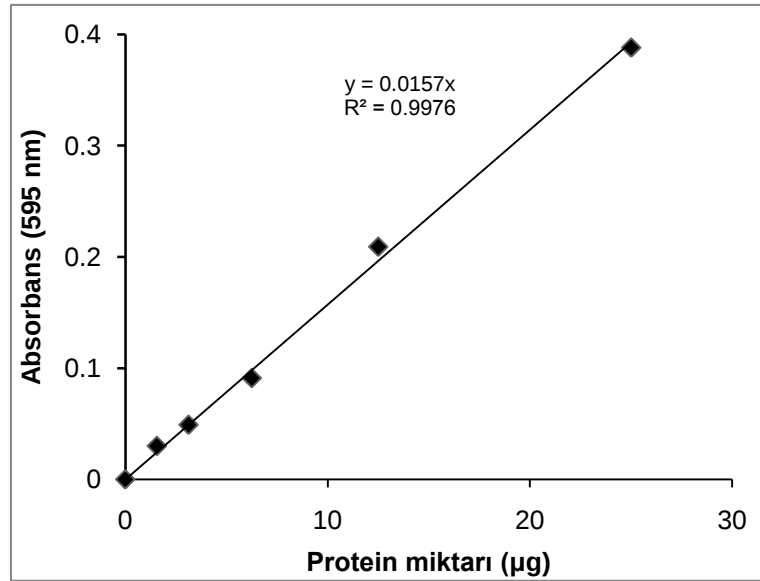
Şekil 4.4 Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş (1- pSV-β-Gal, 2- pEGFP-N1) ya da enzimle işlem görmemiş (3- pSV-β-Gal, 4- pEGFP-N1) plazmitlerin elektroforez profilleri. Elektroforez işleminde %1'lik agaroz jel kullanıldı. Elektroforez işlemi 100 V sabit gerilimde 25 dakikada tamamlandı.

4.3 Protein Standart Grafiğinin Oluşturulması ve Protein Miktar Tayinleri

Enzimlerin protein yapıda olmaları nedeniyle enzim aktivitelerinin tayini için ortamda bulunan total protein miktarının belirlenmesi gerekir. Bu çalışmada hassas sonuçlar veren Bradford metodu kullanıldı. Transfeksiyon deneyleri sonrası hazırlanan hücre lizatlarında total protein miktarlarının saptanmasında BSA (Sigma-fraksiyon V) ile protein standart grafiğinden yararlanıldı (Şekil 4.5). Belirli konsantrasyonlarda BSA içeren örnekler hazırlandı ve metod 3.2.13.2’de anlatılan yöntemle göre Bradford ayırıcı ile girdikleri reaksiyon sonucu verdikleri optik yoğunluk (OD_{595}) değerleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Belirli konsantrasyonlarda BSA içeren örneklerin Bradford ayırıcı ile girdikleri reaksiyon sonucu 595 nm’de verdikleri absorbans değerleri

BSA (μ g)	0	1.56	3.125	6.25	12.5	25
Absorbans (OD_{595})	0.000	0.030	0.049	0.091	0.209	0.388



Şekil 4.5 BSA ile hazırlanan protein standart grafiği.

Örneklerdeki total protein miktarları BSA ile hazırlanan protein standart grafik üzerinden hesaplandı. Elde edilen değerler kullanılarak, protein standart grafiği eğim formülü üzerinden ($y = 0.0157x$) protein miktarları hesaplandı. 24-kuyulu plaklarda yapılan deneylerde her bir kuyuda üretilen hücreler için ortalama 74.324 mg protein/ml lizat protein miktarı saptandı.

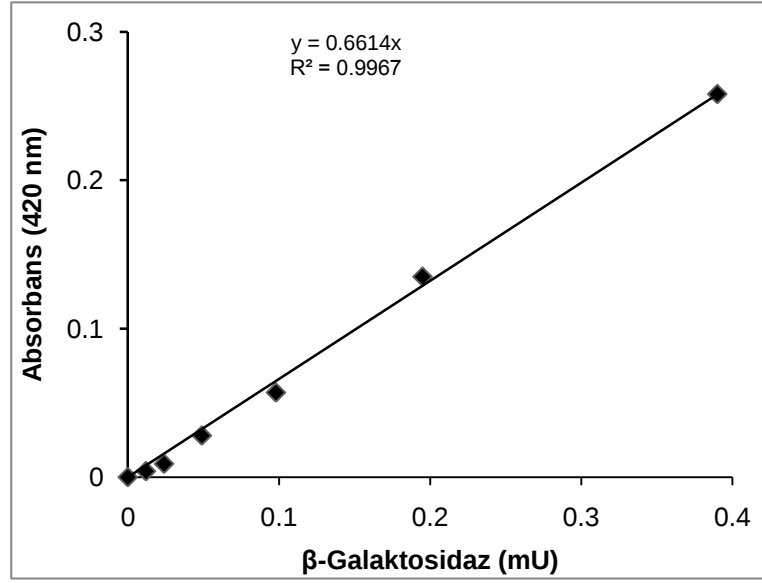
4.4 β -Galaktosidaz Standart Grafiğın Oluşturulması ve Aktivite Tayini

Bu çalışmada arkeozomların *in vitro* transfeksiyon etkinliğini saptamak için GFP ve β -Gal belirteç genlerinden yararlanıldı. Arkeal lipidlerle memeli hücrelerine DNA transfeksiyonun kantitatif olarak saptanmasında pSV- β -Gal plazmit DNA'sı kullanıldı. İnkübasyon sonrasında hücrelerden hazırlanan lizatlarda β -Gal aktivitesinin saptanmasında rekombinant β -Galaktosidaz enzimi (Roche) ile hazırlanan standart grafiklerden yararlanıldı (Şekil 4.6 ve 4.7). Standartların 420 nm dalga boyunda verdiği absorbans değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

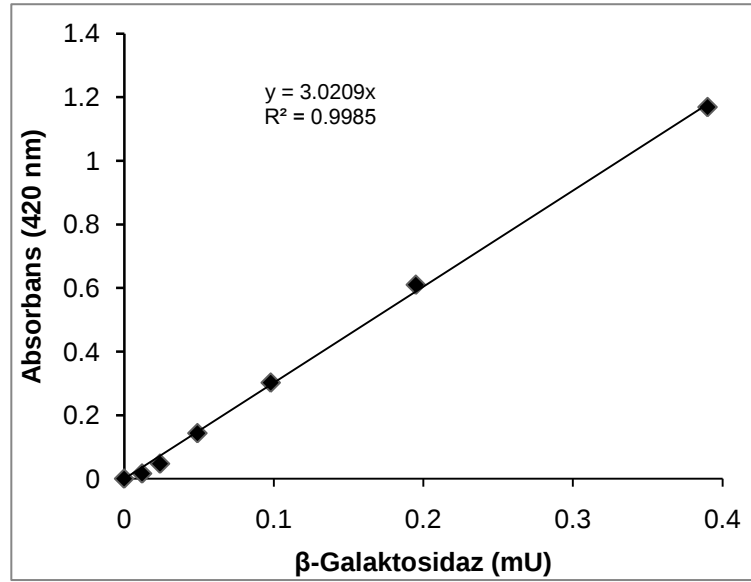
Çizelge 4.3 β -Galaktosidaz standart grafiği için hazırlanan sulandırım serileri ve reaksiyon sonrası 420 nm dalga boyunda ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerleri

β -Galaktosidaz (mU/ml)	Absorbans (OD ₄₂₀)	
	4 saat	12 saat
0	0	0
0.012	0.004	0.016
0.024	0.009	0.047
0.049	0.028	0.143
0.098	0.057	0.302
0.195	0.135	0.61
0.39	0.258	1.169

Hücrelerden hazırlanan lizatlarda β -Galaktosidaz aktivitesi 4 ve 12 saatlik inkübasyonlar sonrasında tayin edildi. Örneklerdeki β -Galaktosidaz aktivitesinin saptanmasında rekombinant β -Galaktosidaz enzimi ile hazırlanan standart grafikten yararlanıldı. Şekil 4.6'da 4 saatlik, şekil 4.7'de 12 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen β -Galaktosidaz standart grafikleri verilmiştir.



Şekil 4.6 4 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen β -Galaktosidaz standart grafiği.



Şekil 4.7 12 saat inkübasyon sonucu elde edilen β -Galaktosidaz standart grafiği.

In vitro transfeksiyon sonrası hazırlanan lizatlarda β -Galaktosidaz aktivitesi standart grafiklerin eğim formülleri üzerinden hesaplandı. Sonuçlar bölüm 4.7'de verilmiştir.

4.5 Arkeozomların Karakterizasyonu

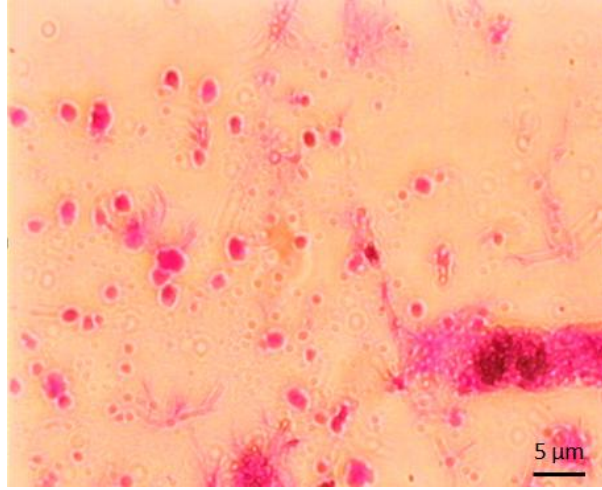
Farklı koşullarda hazırlanan arkeozomlar, zeta değerleri, boyut dağılımı, görünüşleri ve plazmit DNA ile kompleks oluşturup oluşturmama özellikleri bakımından incelendi. Bu aşamada ışık mikroskobu, Zeta-sizer, TEM ve AFM cihazlarından yararlanıldı. Arkeozom / plazmit DNA kompleks analizlerinde ise elektroforez tekniklerinden yararlanıldı.

4.5.1 Boş Arkeozomların Karakterizasyonu

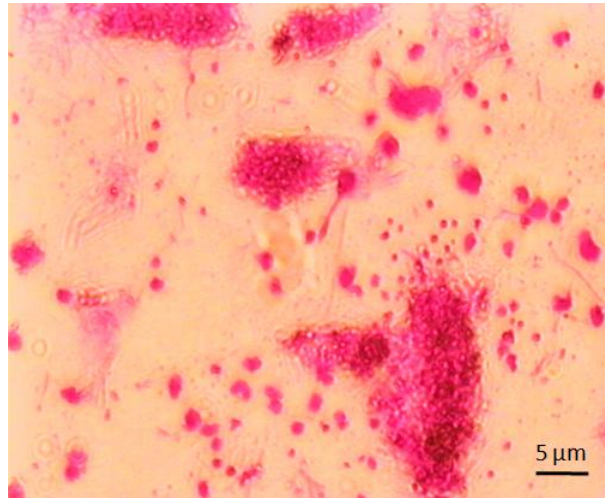
Arkeozomların karakterizasyonu amacıyla arkeal lipidler plazmit DNA ile karıştırılmaksızın boş olarak hazırlandı.

4.5.1.1 Sudan III ile Boyanan Arkeozomların Işık Mikroskobu ile İncelenmesine ait Sonuçlar

Plazmit DNA taşımayan boş arkeozomların morfolojik özelliklerinin incelenmesi için metod 3.2.14'te belirtildiği şekilde Sudan III ile boyanarak ışık mikroskobu ile görüntülendi. 1 mg ve 10 mg polar lipid kullanılarak hazırlanan boş arkeozomların fotoğrafları çekildi. İmmersiyon objektifi kullanılarak x400 kez büyütülen örneklerin fotoğrafları Şekil 4.8 ve 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.8 1 mg polar lipidin 1 ml HEPES tamponu (pH=7.4) ile hidrate edilmesi ile oluşturulan arkeozomların mikroskopik incelemesi.



Şekil 4.9 10 mg polar lipidin 1 ml HEPES tamponu (pH=7.4) ile hidrate edilmesi ile oluşturulan arkeozomların mikroskopik incelemesi.

Farklı konsantrasyonlarda polar lipidlerle hazırlanan arkeozomlar ışık mikroskopunda kırmızıya boyanan vezikül ya da veziküler agregatlar halinde görüntülendi. Kullanılan lipid miktarı ile vezikül boyutları ve agregasyon düzeyleri arasında belirgin bir paralellik gözlenmedi.

4.5.1.2 Boş Arkeozomların Zeta Potansiyellerine ait Sonuçlar

DNA içermeyen boş arkeozomların net yüzey yükleri metod 3.2.8’de belirtildiği şekilde Zeta Sizer Nano ZS (Malvern Ins.) cihazı ile ölçüldü. İki farklı konsantrasyonda hazırlanan arkeozomların negatif zeta potansiyeline sahip olduğu görüldü. Herhangi bir boyutlandırma işlemi uygulanmadan analiz edilen arkeozomların boyut büyüklükleri ve yüzey yükü ölçüm değerleri Çizelge 4.4’te verilmiştir.

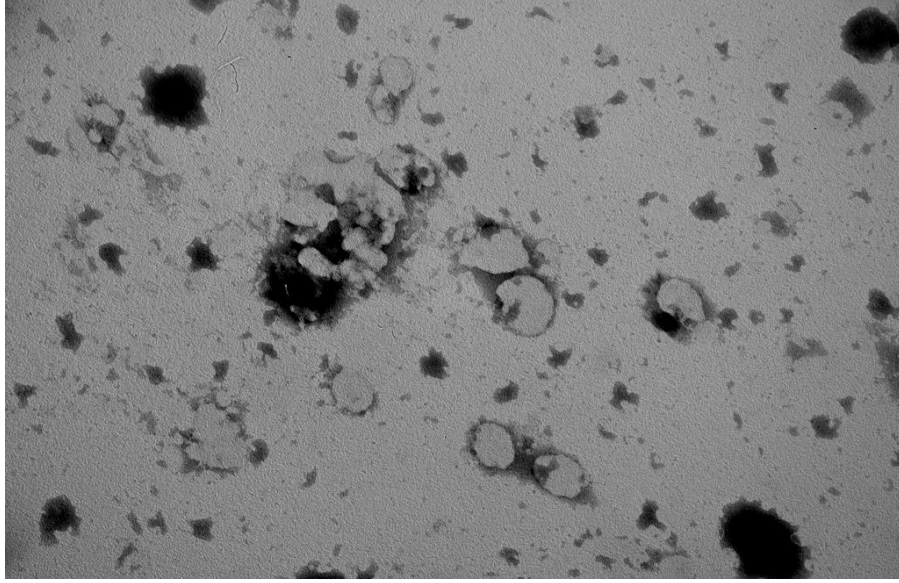
Çizelge 4.4 Boş arkeozomlara ait zeta potansiyeli ve boyut büyüklüğü değerleri.

No	Arkeozom formülasyonu	pH	Zeta potansiyeli	Boyut Büyüklüğü
1	Arkeozom (10 µg/µl)	7.72	- 41.4 mV	346.1 nm
2	Arkeozom (20 µg/µl)	7.72	- 41.8 mV	353.7 nm

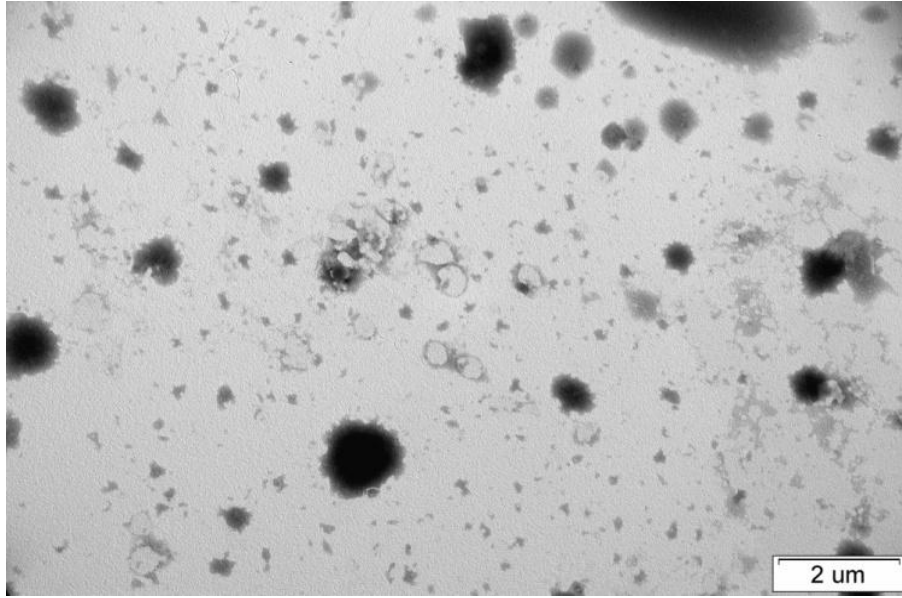
Boyut büyüklükleri 350 nm civarında bulunan boş arkeozomlar metod 3.2.3’te anlatıldığı şekilde Lipofast Basic enjeksiyon sistemi ile 100 nm por büyüklüğündeki polikarbonat filtreden geçirilerek boyutlandırıldı. Net yüzey yükü ölçüm değerlerine göre, hazırlanan arkeozomların anyonik olduğu ortaya çıkmıştır. Boş arkeozomların zeta potansiyeli analizi sonucunda (-) değer taşıdığının görülmesi negatif yüklü DNA ile kompleks oluşturma potansiyelini azaltmaktadır. Bu veriler ışığında, arkeozomları katyonik hale getirmek amacıyla ortama pozitif yüklü maddeler ekleme fikri doğdu.

4.5.1.3 Boş Arkeozomların TEM Analizine ait Sonuçlar

Negatif boyama tekniği ile gridlere kaplanan (bkz. metod 3.2.9) 3 mg polar arkeal lipidden elde edilen boş arkeozomların transmisyon elektron mikroskobu ile incelenen görüntüsü Şekil 4.10 ve 4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.10 3 mg polar arkeal lipidin 1 ml HEPES tamponunda hidrate edilmesi ile hazırlanan arkeozomların TEM görüntüsü.

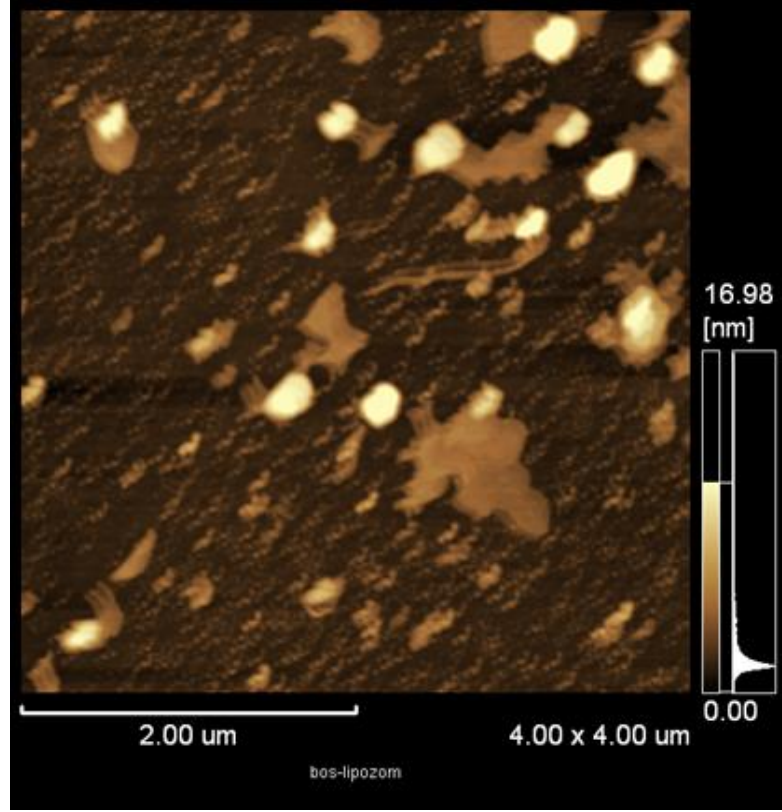


Şekil 4.11 Arkeozomların boyut analizine ilişkin TEM görüntüsü.

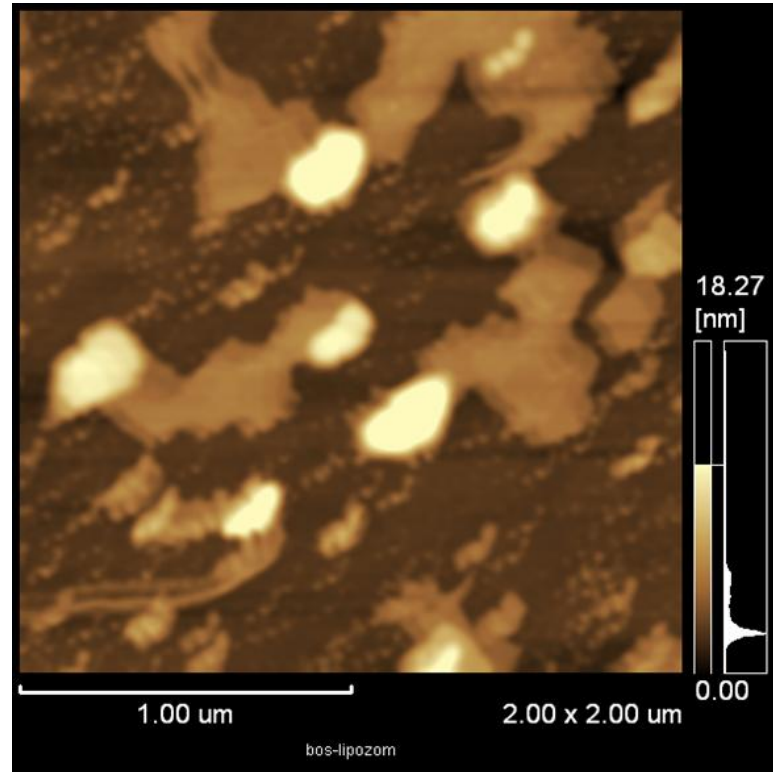
Şekil 4.11'den de görüldüğü gibi transmisyon elektron mikroskopisi ile boş arkeozomların çoğunlukla küresel ve 100 nm'den küçük veziküller olduğu saptanmıştır. Bunun yanı sıra daha büyük çaplı veziküllere de rastlanmaktadır.

4.5.1.4 Arkeozomların AFM Analizine ait Sonuçlar

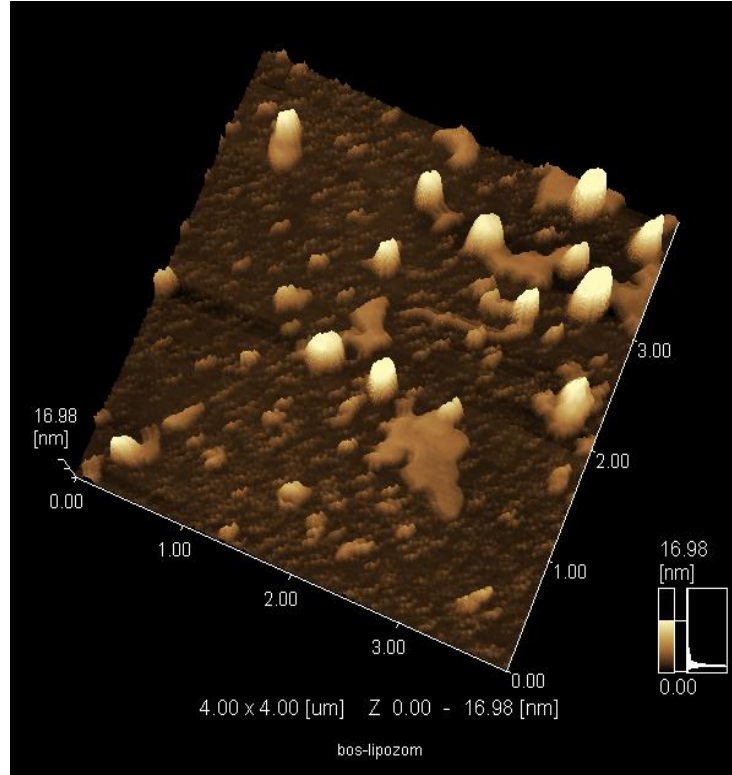
Arkeal polar lipid fraksiyonunun hidrasyonu ile oluşturulan arkeozomların morfolojileri metod 3.2.10'da belirtildiği şekilde tarayıcı prob mikroskobunun atomik güç mikroskobu modu kullanılarak incelendi. 4x4 µm ve 2x2 µm'lik alanlarda taranan yüzeylerin iki ve üç boyutlu görüntüleri alındı (Şekil 4.12, 4.13, 4.14, 4.15).



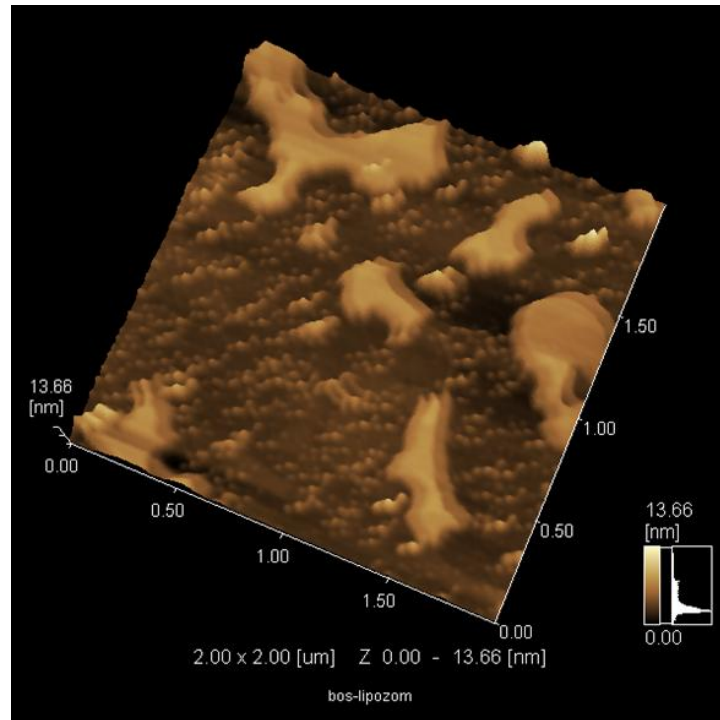
Şekil 4.12 Arkeozomların 4x4 μm 'lik alan taranarak çekilen AFM görüntüsü.



Şekil 4.13 Arkeozomların 2x2 μm 'lik alan taranarak çekilen AFM görüntüsü.



Şekil 4.14 3 mg arkeal polar lipid ile oluşturulan arkeozomların 4x4 μm’lik alanda alınan üç boyutlu AFM görüntüsü.



Şekil 4.15 3 mg arkeal polar lipid ile oluşturulan arkeozomların 2x2 μm’lik alanda alınan üç boyutlu AFM görüntüsü.

Elde edilen arkeozomların 100 nm’den daha küçük çaplarda olduğu ve homojen bir dağılım gösterdiği gözlemlendi.

4.5.2 Arkeozomların Plazmit DNA ile Oluşturduğu Komplekslerin Karakterizasyonu

Arkeozomların plazmit DNA'yı tutma kapasitesini incelemek amacıyla hazırlanan arkeozomlar plazmit DNA ile karıştırılarak belirli bir süre oda sıcaklığında kompleks oluşumu için bekletildi. Elde edilen arkeozom/plazmit DNA kompleksleri agaroz jel elektroforezinde incelendi, zeta potansiyelleri ölçüldü, TEM ve AFM cihazlarında mikrografları çekildi. Karşılaştırma yapmak amacıyla kompleks oluşturmamış plazmit DNA'ların da AFM görüntüleri alındı.

4.5.2.1 Arkeozom/Plazmit DNA Komplekslerinin Zeta Potansiyeli ve Boyut Dağılımı Analizine ait Sonuçlar

Hazırlanan arkeozom/plazmit DNA komplekslerinin boyut büyüklüğü ve net yüzey yükü ölçümleri metod 3.2.8'de belirtildiği şekilde Zeta Sizer Nano ZS cihazında yapıldı. Komplekslere ait yüzey yükü ölçüm değerleri Çizelge 4.5'te verilmiştir.

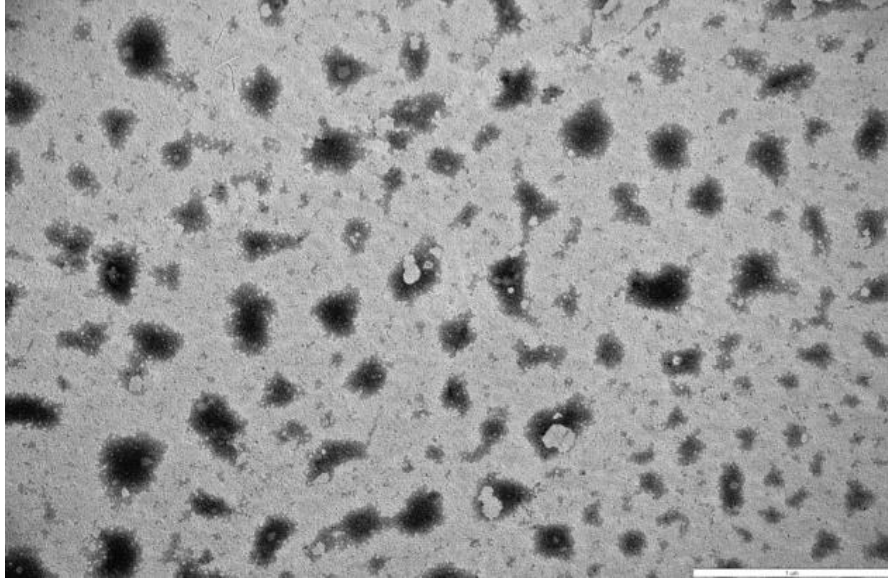
Çizelge 4.5 Arkeozom/plazmit DNA kompleksine ait boyut ve zeta değerleri

No	Arkeozom formülasyonu	pH	Zeta potansiyeli	Boyut Büyüklüğü
1	PBS + Plazmit DNA	7.74	- 12.4 mV	-
2	Arkeozom + Plazmit DNA (50 ng/μl)	7.74	- 40.8 mV	417.8 nm

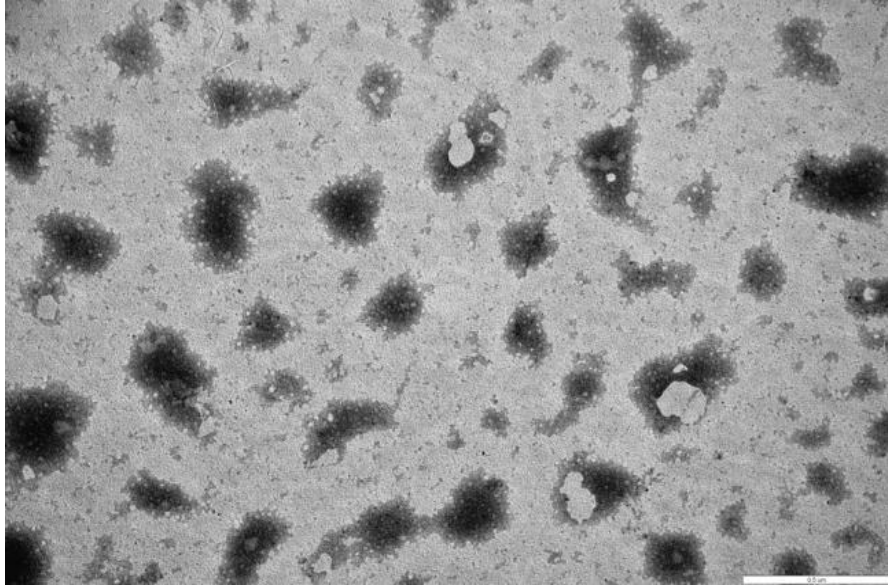
Çizelgeden de görüldüğü gibi arkeozom/plazmit DNA kompleksleri negatif yük taşımaktadır. Çizelge 4.4'te verilen boş arkeozomların yaklaşık -41 mV değerindeki zeta potansiyelleri ile karşılaştırıldığında elektronegatif olan plazmit DNA ile kompleks oluşturan arkeozomların zeta potansiyellerinde belirgin bir değişiklik olmadığı görüldü. Boyut büyüklüğünde ise boş arkeozomlara oranla artış belirlendi.

4.5.2.2 Arkeozom/Plazmit DNA Komplekslerinin TEM Analizine ait Sonuçlar

10 μl arkeozom ile 1 μg pEGFP-N1 plazmit DNA'nın oluşturduğu kompleksler metod 3.2.9'da belirtildiği şekilde hazırlandı. Örneklerin transmisyon elektron mikroskobunda alınan görüntüleri şekil 4.16 ve 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.16 pEGFP-N1 plazmit DNA ile kompleks oluşturan arkeozomların (10 μ l arkeozom/ μ g DNA) TEM görüntüsü.

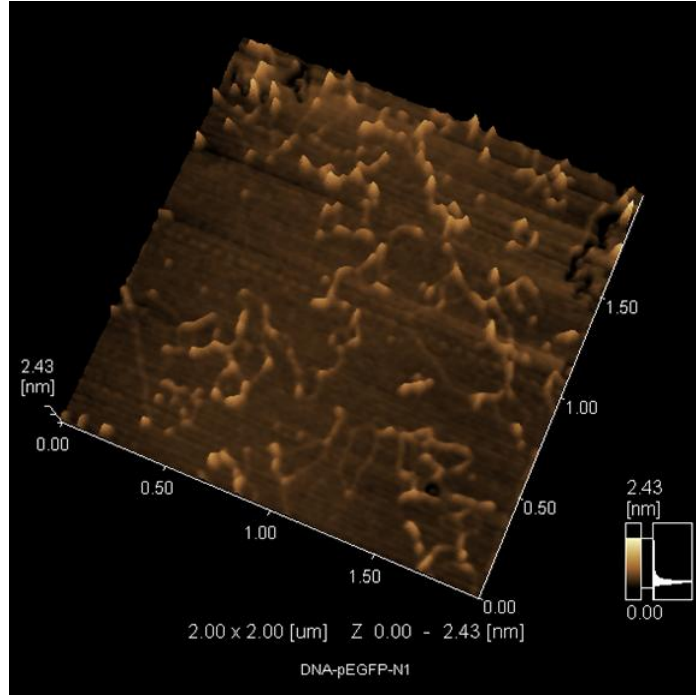


Şekil 4.17 pEGFP-N1 plazmit DNA ile kompleks oluşturan arkeozomların (10 μ l arkeozom/ μ g DNA) TEM görüntüsü.

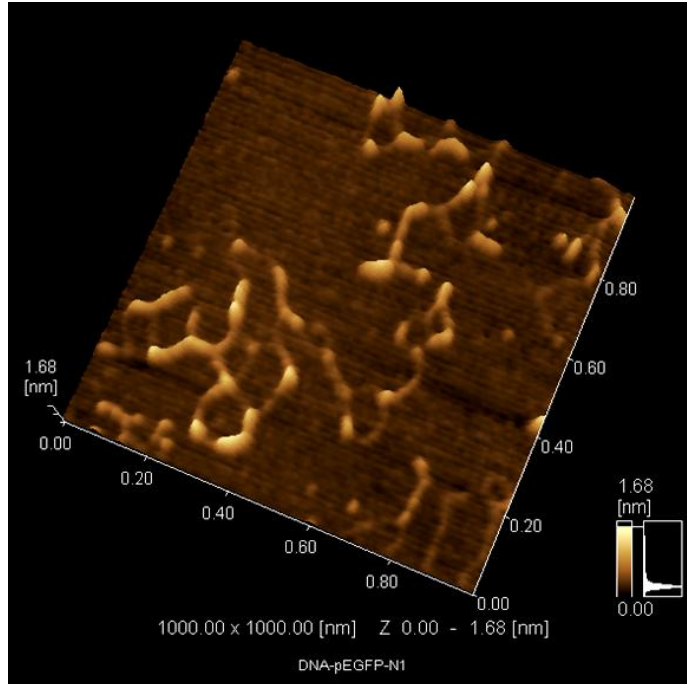
Lipozom formülasyonlarının morfolojik özelliklerinin belirlenebilmesi amacı ile yapılan transmisyon elektron mikroskopisi sonucunda küçük lipozom komplekslerinin olduğu görülmüştür. Hazırlanan lipozom formülasyonlarının boyutu çoğunlukla 100 nm'den küçük olmakla beraber bir araya gelerek daha büyük boyutlara ulaşan lipid kürelerin de olduğu görülmektedir.

4.5.2.3 Plazmit DNA'nın AFM Analizine ait Sonuçlar

8 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyondaki pEGFP-N1 plazmit DNA'sı AFM cihazı ile görüntülenmiştir. Şekil 4.18 ve 4.19'da plazmit DNA'nın 2x2 μm ve 1x1 μm 'lik alanlar taranarak alınan görüntüleri verilmiştir.



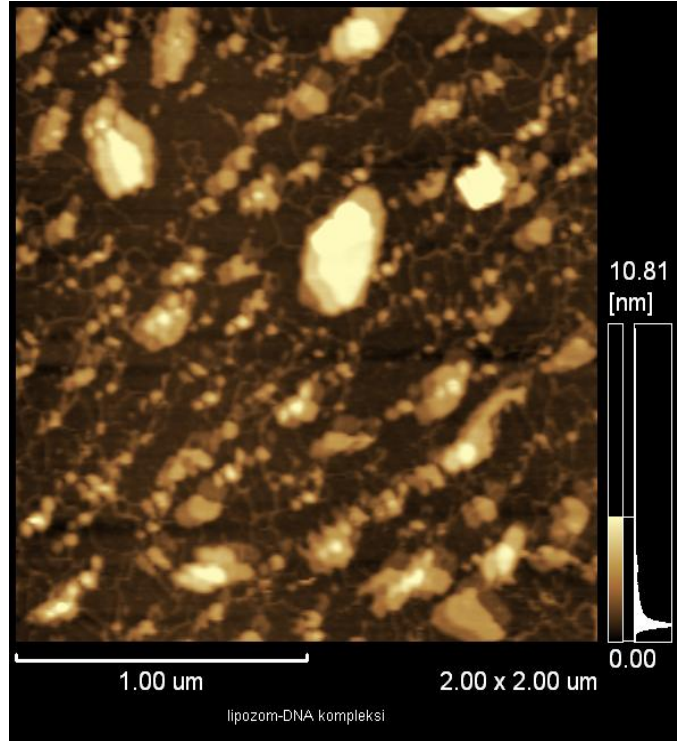
Şekil 4.18 pEGFP-N1 plazmit DNA'nın (8 $\mu\text{g/ml}$) 2x2 μm 'lik alan taranarak alınan AFM görüntüsü.



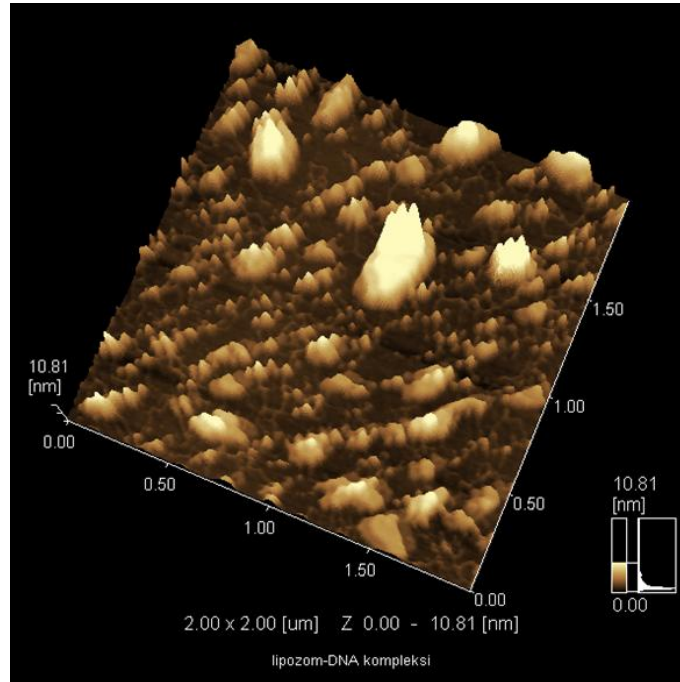
Şekil 4.19 pEGFP-N1 plazmit DNA'nın (8 $\mu\text{g/ml}$) 1x1 μm 'lik alan taranarak alınan AFM görüntüsü.

4.5.2.4 Arkeozom/Plazmit DNA Komplekslerinin AFM Analizine ait Sonuçlar

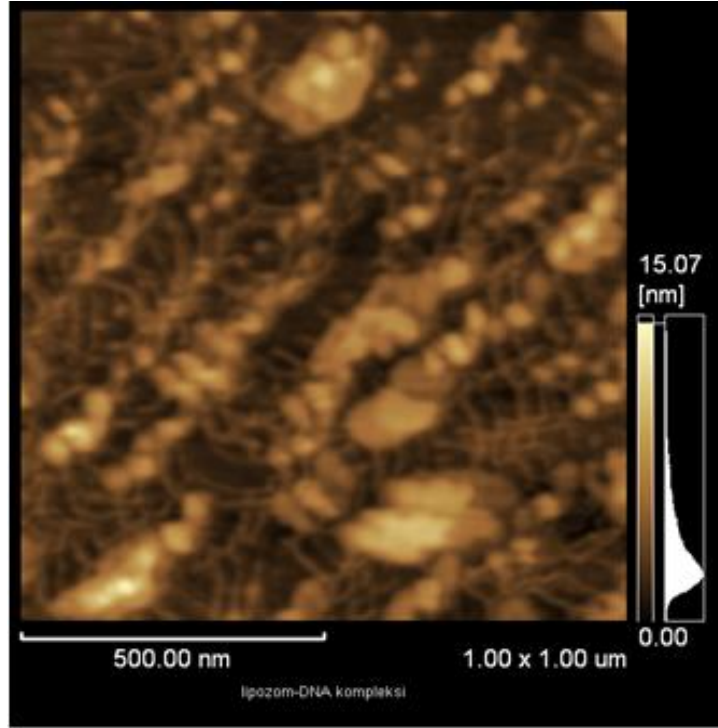
μg plazmit DNA başına 10 μl arkeozom kullanılarak oluşturulan komplekslerin iki ve üç boyutlu görüntüleri Şekil 4.20, 4.21 ve 4.22’de verilmiştir.



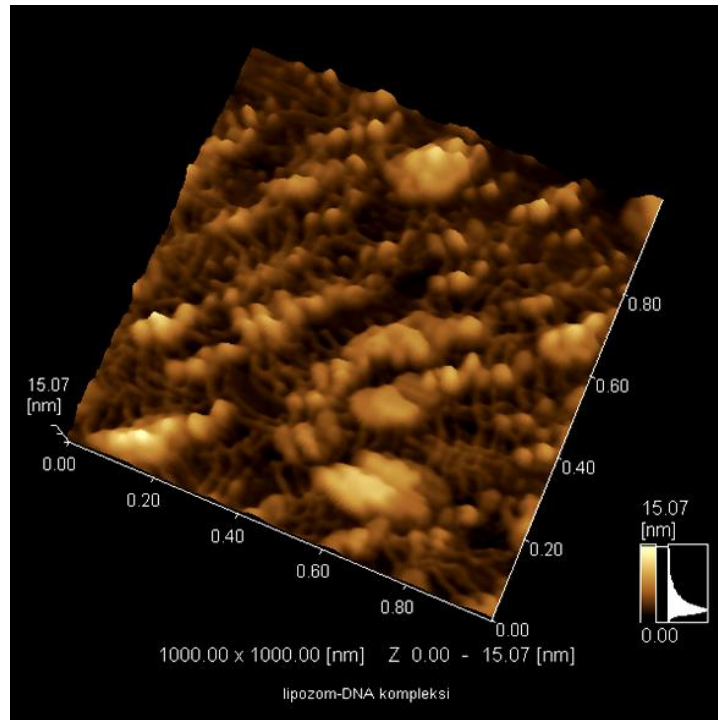
Şekil 4.20 pEGFP-N1 plazmit DNA ile kompleks oluşturan arkeozomların (10 μl arkeozom/ μg DNA) AFM görüntüsü.



Şekil 4.21 pEGFP-N1 plazmit DNA ile kompleks oluşturan arkeozomların (10 μl arkeozom/ μg DNA) 2x2 μm ’lik alan taranarak çekilen üç boyutlu AFM görüntüsü.



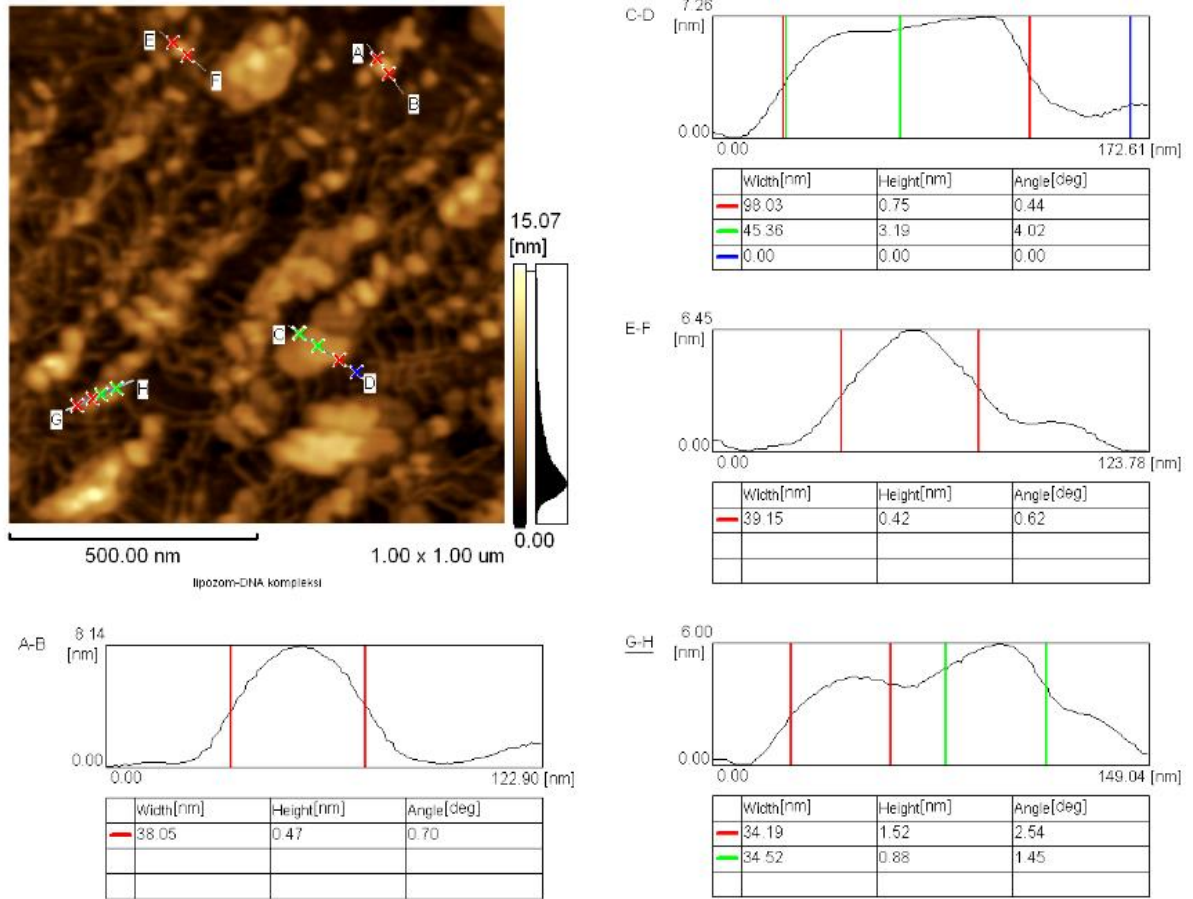
Şekil 4.22 pEGFP-N1 plazmit DNA ile kompleks oluşturan arkeozomların (10 μl arkeozom/ μg DNA) AFM görüntüsü.



Şekil 4.23 pEGFP-N1 plazmit DNA ile kompleks oluşturan arkeozomların (10 μl arkeozom/ μg DNA) 1x1 μm 'lik alanda tarandığı üç boyutlu AFM görüntüsü.

4.5.2.5 Arkeozom/Plazmit DNA Kompleksinin Boyut Analizine ait Sonuçlar

Şekil 4.24'te de görüldüğü gibi, atomik güç mikroskobu ile elde edilen sonuçlara göre, arkeozomların 100 nm'den küçük veziküller oluşturmakla birlikte mekanik etkilerle bir araya gelen küçük veziküllerden lipid yığınları da oluştuğu belirlendi.

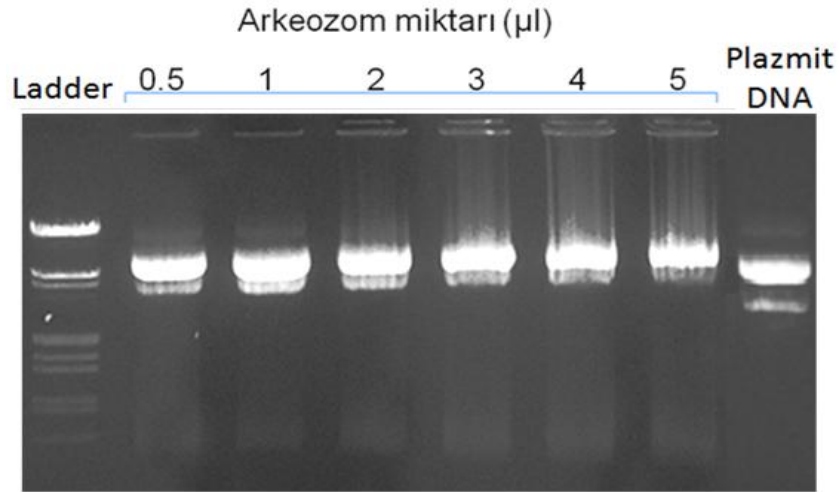


Şekil 4.24 Plazmit DNA ile arkeozom kompleksinin boyut analizine ait grafik ve değerler.

4.5.2.6 Arkeozom/Plazmit DNA Komplekslerinin Agaroz Jel Elektrofrezine ait Sonuçlar

Arkeozomlar hazırlanırken arkeal lipidlerin miktarı artırılarak kompleks oluşumuna etkisi incelendi.

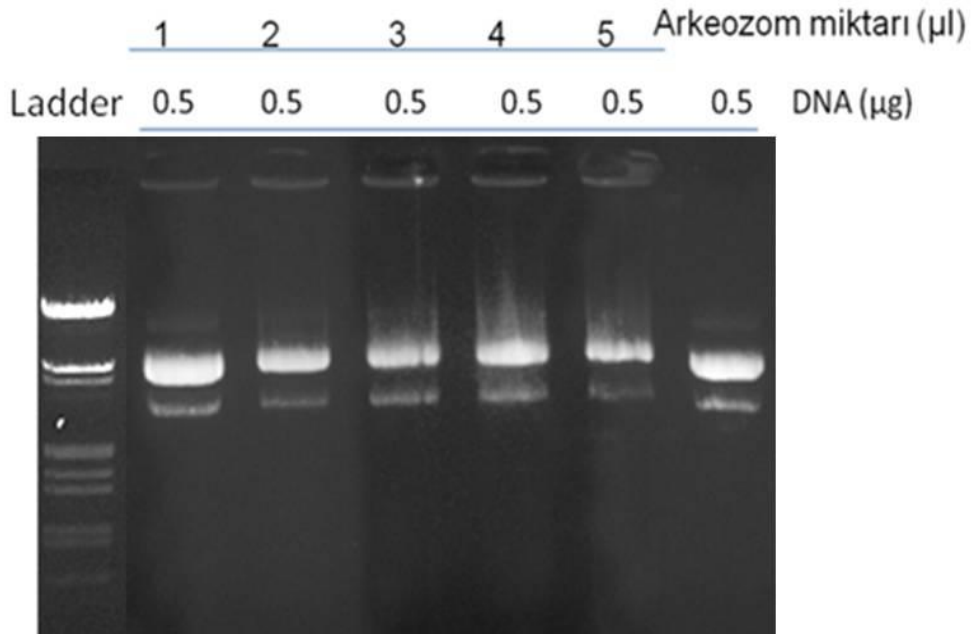
Yaklaşık 20 mg arkeal lipid ile oluşturulan ve 2 ml HEPES ile hidrate edilerek hazırlanan arkeozomların DNA ile kompleks oluşturup oluşturmadığını gözlemlemek için 2 µl PEGFP-N1 plazmit DNA (0.55 µg/µl) ile karıştırılan ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen arkeozomlar agaroz jelde 20 dakika 100 V sabit akımla yürütüldü. Marker olarak λ-Hind III-EcoRI kullanıldı (Şekil 4.25).



Şekil 4.25 Arkeozom / plazmit DNA komplekslerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

Plazmit DNA miktarı sabit tutulurken arkeozom miktarı artırılarak gerçekleştirilen bu deneyde arkeozom miktarı arttıkça sürüklenmenin arttığı görülmektedir. 3 µl arkeozom yüklemesinden itibaren bir miktar plazmit DNA'nın ceplerde tutulduğu görülmektedir. Arkeozomların elektronegatifliği dolayısıyla plazmit DNA'nın az bir kısmı ile kompleks oluşturduğu belirlendi.

10 mg arkeal lipid kullanılarak hazırlanan arkeozomlar ile yapılan bir başka deneyde ise Şekil 4.26'daki görüntüler alınmıştır.



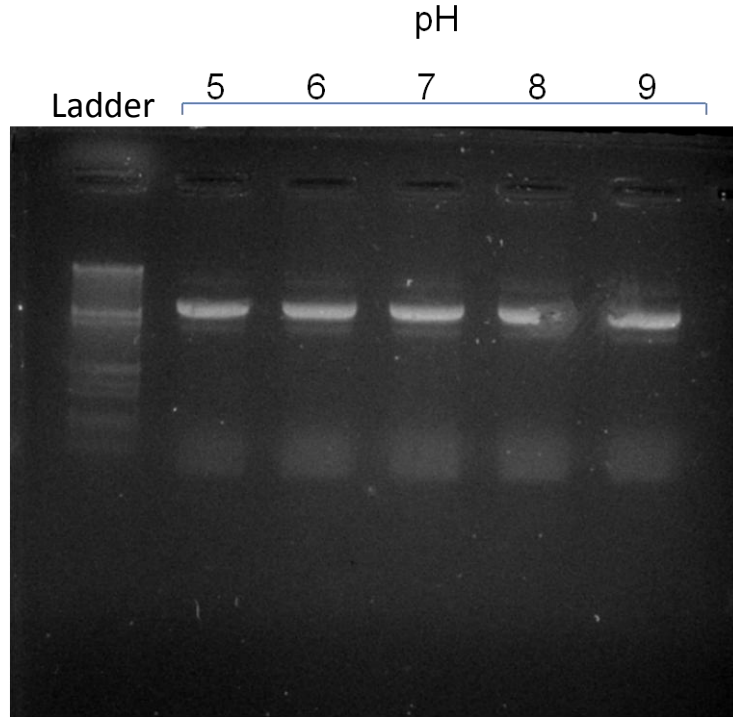
Şekil 4.26 Arkeozom / plazmit DNA komplekslerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

Her iki şekilde de en yüksek lipid miktarına sahip olan 5 numaralı kuyucuktaki sürüklenmenin en fazla olduğu görüldü. Arkeozom miktarının artışına bağlı olarak

sürüklenmenin arttığı görülmektedir. 20 ve 10 mg arkeal lipid kullanılarak hazırlanan iki örnek arasında kompleks yapma açısından önemli bir fark görülmemiştir.

4.5.2.6.1 Kompleks Oluşumunda pH'ın Etkisi

Arkeozomlar ile plazmit DNA arasında kompleks oluşmasına etki eden ortam koşullarından en önemlisi olan pH'ın etkisini incelemek amacıyla farklı pH'larda HEPES tamponu hazırlandı. Sabit miktarda arkeozom sabit miktarda plazmit DNA (0.5 μ g) ile farklı pH'larda HEPES tamponu içeren ortamlarda karıştırılarak kompleks oluşumu için oda sıcaklığında 20 dakika bekletildikten sonra ceplere uygulandı. Şekil 4.27'de görüldüğü gibi 5 ile 9 arasındaki pH'ların kompleks oluşumuna etki etmediği görüldü.



Şekil 4.27 Kompleks oluşumuna pH etkisini gösteren agaroz jel elektroforez resmi. Her kuyucukta 5 μ l arkeozom ile 0.5 μ g plazmit DNA'dan oluşan kompleks bulunmaktadır.

4.5.3 Arkeozomların Plazmit DNA'yı Enkapsüle Etmesine ait Karakterizasyon Çalışmaları

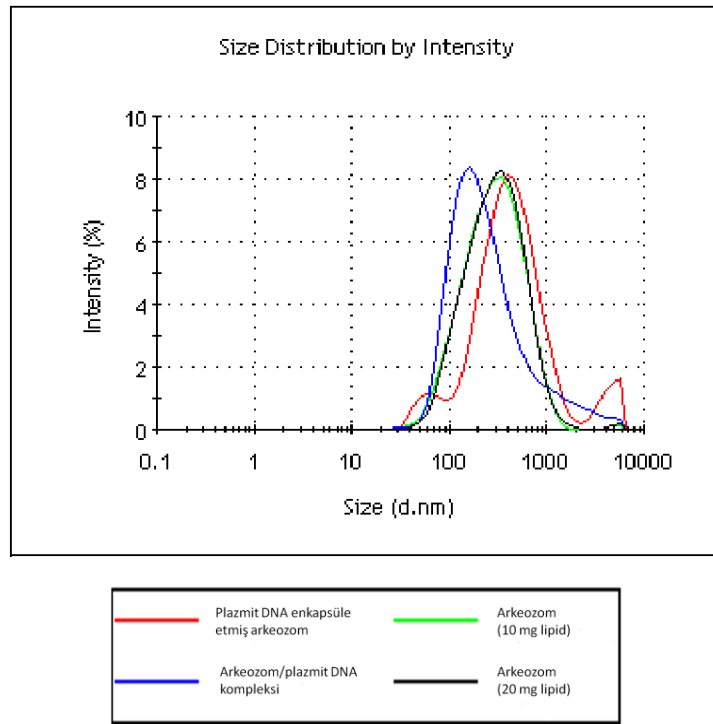
pEGFP-N1 plazmit DNA'nın arkeozomların hidrasyon aşamasında ortama katılmasıyla enkapsülasyonu gerçekleştirildi. Bu doğrultuda oluşturulan arkeozomların karakterizasyonu için Zeta-Sizer, TEM, AFM ve agaroz jel elektroforezinden yararlanıldı.

4.5.3.1 Arkeozomların Plazmit DNA'yı Enkapsüle Etmesine ait Zeta Potansiyeli Analizi Sonuçları

Çizelge 4.6 Plazmit DNA'nın arkeozomlar tarafından enkapsüle edilmesine ait zeta değerleri

No	Arkeozom formülasyonu	pH	Zeta potansiyeli	Boyut Büyüklüğü
1	PBS + DNA	7.74	- 12.4 mV	-
2	Plazmit DNA enkapsüle etmiş arkeozom	7.74	- 41.1 mV	490.6 nm

Zeta potansiyeli ölçümlerine göre, hazırlanan arkeozom formülasyonlarının elektronegatif olduğu saptandı. Çizelgede görülen zeta potansiyeli değerleri, kompleks sonuçları ile yaklaşık olarak aynı değerdedir.

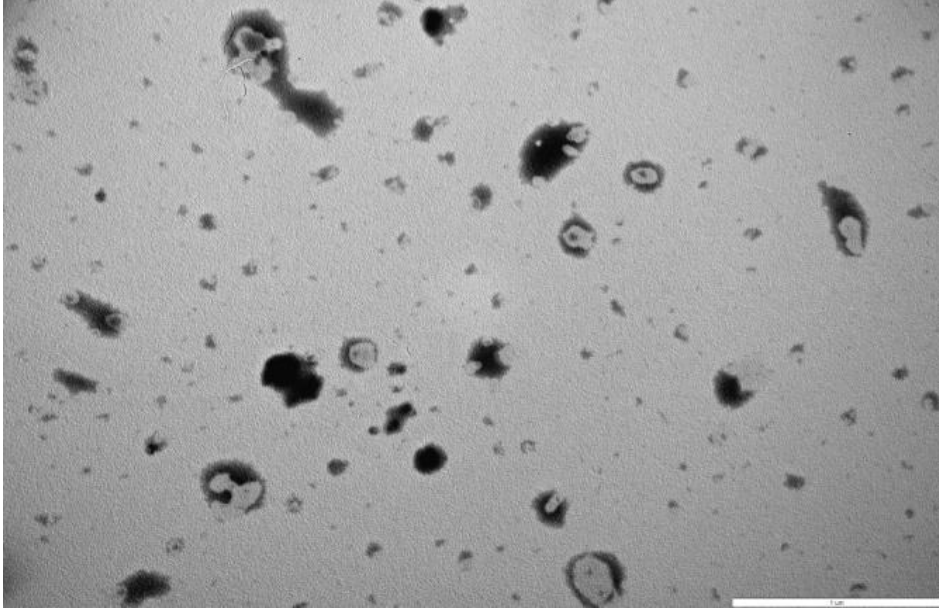


Şekil 4.28 Boyutlandırması yapılmamış arkeozom formülasyonlarına ait boyut dağılım grafiği.

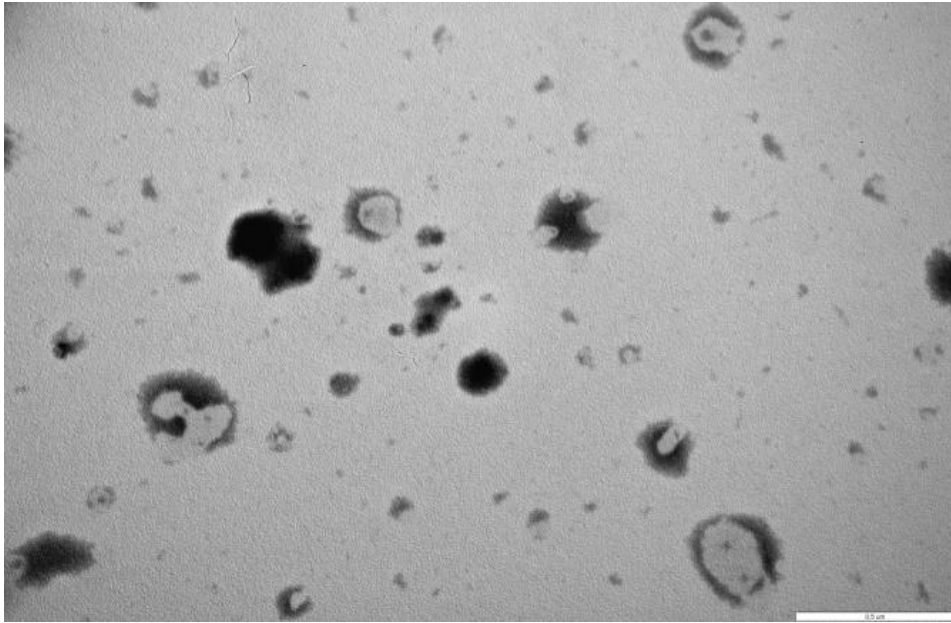
Zeta-Sizer cihazında yapılan şiddete bağlı boyut dağılımı ölçümlerine göre Lipofast Basic enjeksiyon sistemi ile boyutlandırması yapılmayan boş arkeozomlar 350 nm civarında çapa sahipken arkeozom/plazmit DNA kompleksi 417 nm, plazmit DNA enkapsüle etmiş arkeozomlar ise en büyük boyuta sahip ve 490 nm çapındadır.

4.5.3.2 Arkeozomların Plazmit DNA'yı Enkapsüle Etmesine ait TEM Analizi Sonuçları

Plazmit DNA'nın arkeozomların hazırlık aşamasında ortama katılmasıyla metod 3.2.3'te anlatıldığı biçimde oluşturulan DNA enkapsüle etmiş arkeozomlar, metod 3.2.9'da anlatılan prosedüre göre transmisyon elektron mikroskobu altında incelendi. Şekil 4.29 ve 4.30'da hazırlanan preparatların farklı büyütme ile elde edilen fotoğrafları verilmiştir.



Şekil 4.29 pEGFP-N1 plazmit DNA enkapsüle etmiş arkeozomların TEM görüntüsü.

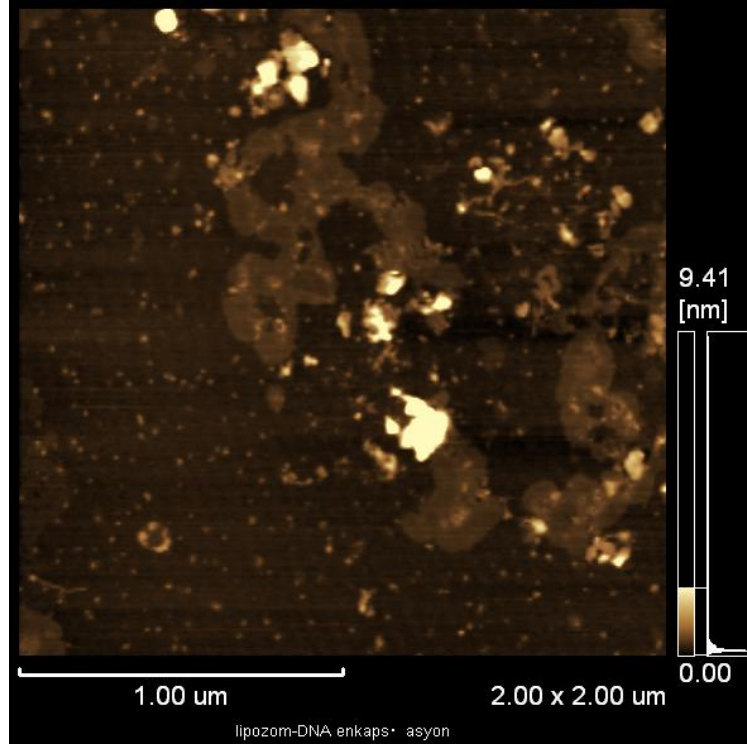


Şekil 4.30 pEGFP-N1 plazmit DNA enkapsüle etmiş arkeozomların TEM görüntüsü.

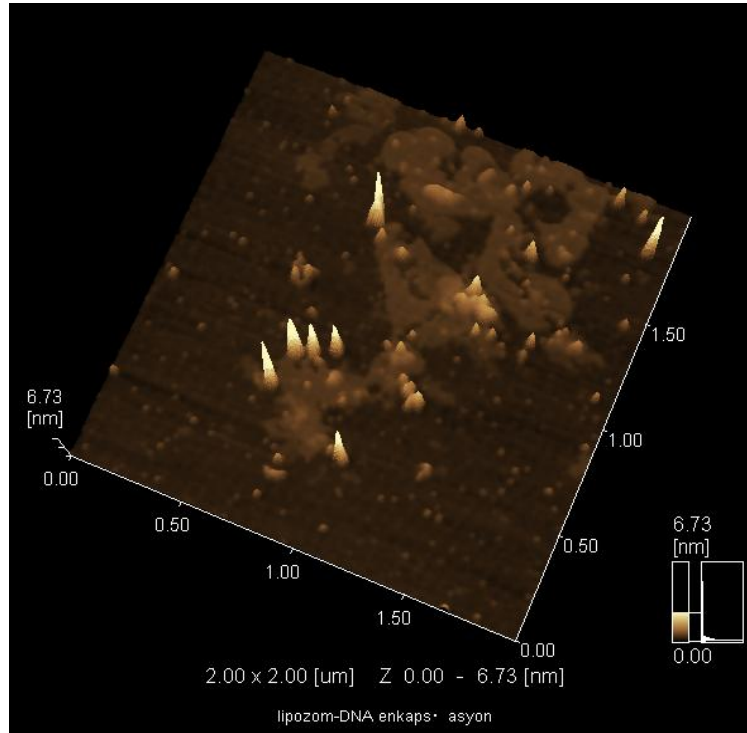
4.5.3.3 Arkeozomların Plazmit DNA'yı Enkapsüle Etmesine ait AFM Analizi Sonuçları

Metod 3.2.3'te anlatılan ikinci yönteme göre hazırlanan arkeozomlar, metod 3.2.10'da belirtilen prosedüre göre atomik güç mikroskobunda incelendi. Hazırlanan preparatlardan 2x2

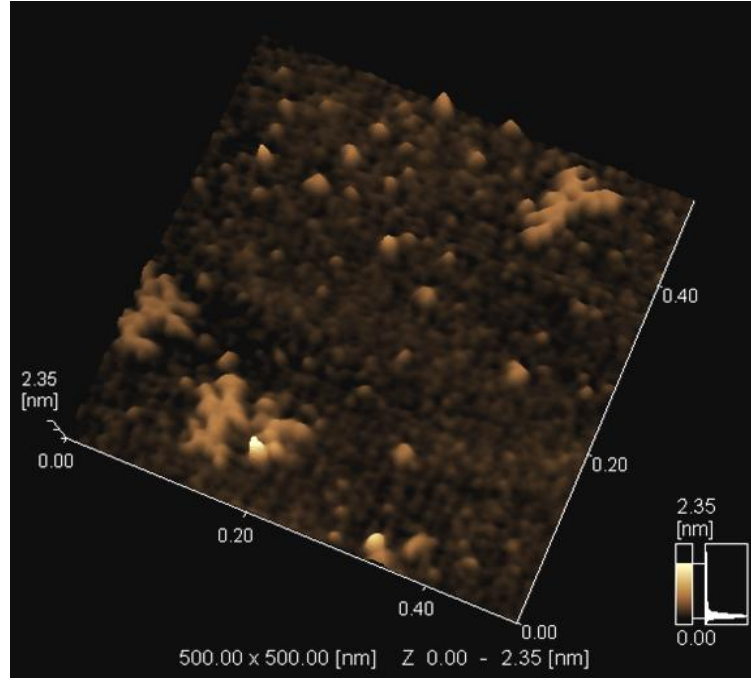
μm alan taraması yapılarak elde edilen 2 ve 3 boyutlu görüntüler Şekil 4.31 ve 4.32’de, $0.5 \times 0.5 \mu\text{m}$ alan taraması yapılarak elde edilen 3 boyutlu görüntü ise Şekil 4.33’te verilmiştir.



Şekil 4.31 pEGFP-N1 plazmit DNA enkapsüle etmiş arkeozomların atomik güç mikroskopunda alınan görüntüsü.



Şekil 4.32 pEGFP-N1 plazmit DNA enkapsüle etmiş arkeozomların atomik güç mikroskopunda alınan üç boyutlu görüntüsü.

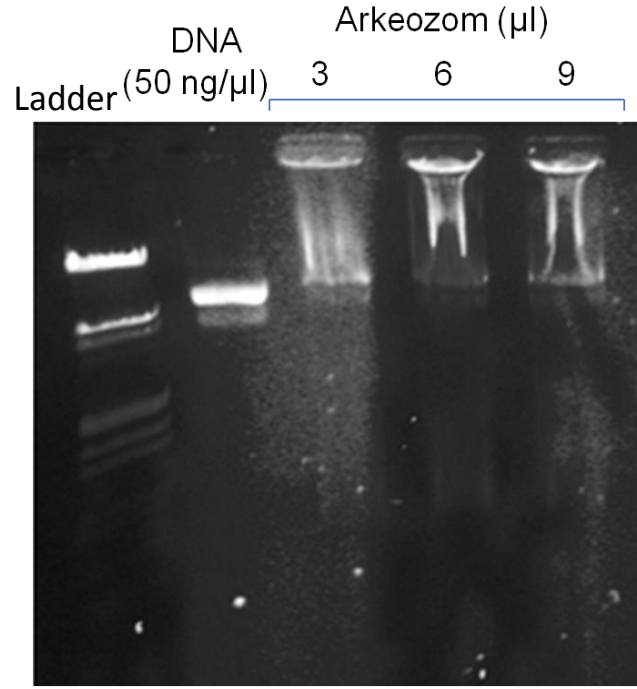


Şekil 4.33 500 nm’lik alanda taranan plazmit DNA enkapsüle etmiş arkeozom preparatının atomik güç mikroskobu ile çekilen mikrosafı.

DNA enkapsüle etmiş arkeozomların ebatları, boş arkeozomlara oranla büyümüşür. Bu da, enkapsülasyonun gerçekleştiğini göstermektedir.

4.5.3.4 Arkeozomların Plazmit DNA’yı Enkapsüle Etmesine ait Agaroz Jel Elektroferezi Sonuçları

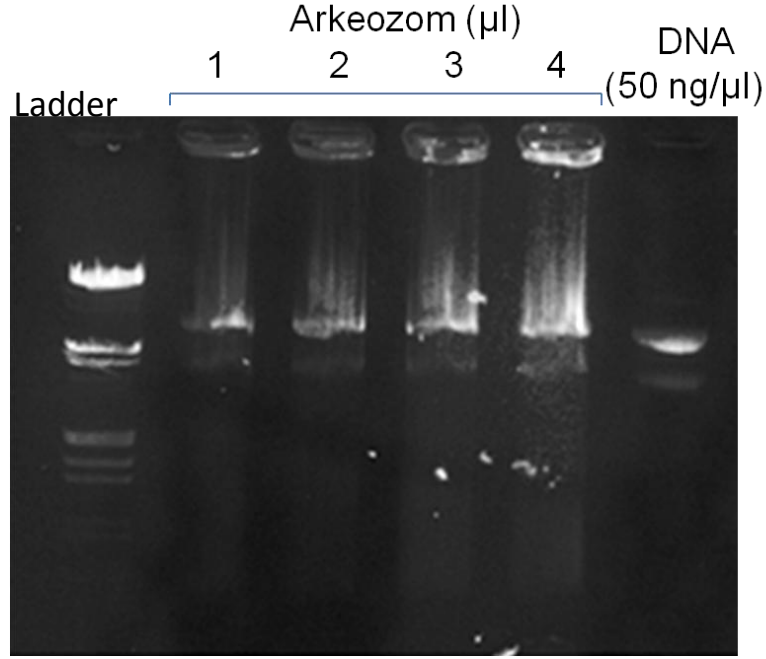
Yaklaşık 10 mg arkeal lipidden elde edilen film tabakaya hidrasyon aşamasında 50 ng/µl konsantrasyonda plazmit DNA eklenmesi ile hazırlanan plazmit DNA enkapsüle etmiş arkeozomlar bölüm 3.2.7’de anlatılan yöntemle göre agaroz jel elektroferezi ile incelendi (Şekil 4.34). 3, 6 ve 9 µl arkeozom kullanılarak yapılan deneyde 100 V sabit akım 25 dakika süresince uygulandı.



Şekil 4.34 Arkeozomların plazmit DNA enkapsülasyonuna ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

Şekildeki ilk kuyucukta kontrol amacıyla kullanılan ladder bulunmaktadır. İkinci kuyucukta ise boş plazmit DNA mevcuttur. Jel fotoğrafındaki diğer kuyucuklar incelendiğinde plazmit DNA'ya kıyasla geride kalan arkeozomların bir kısmının (%25-30) kuyucuklarda kaldığı görülmektedir. Elde edilen sonuç arkeozomların plazmit DNA'nın bir kısmını enkapsüle ettiğini göstermektedir. Plazmit DNA'nın bir kısmının arkeozomlar tarafından tutulduğu için kuyucuklarda kaldığı ve bir kısmının da sürüklendiği gözlemlendi.

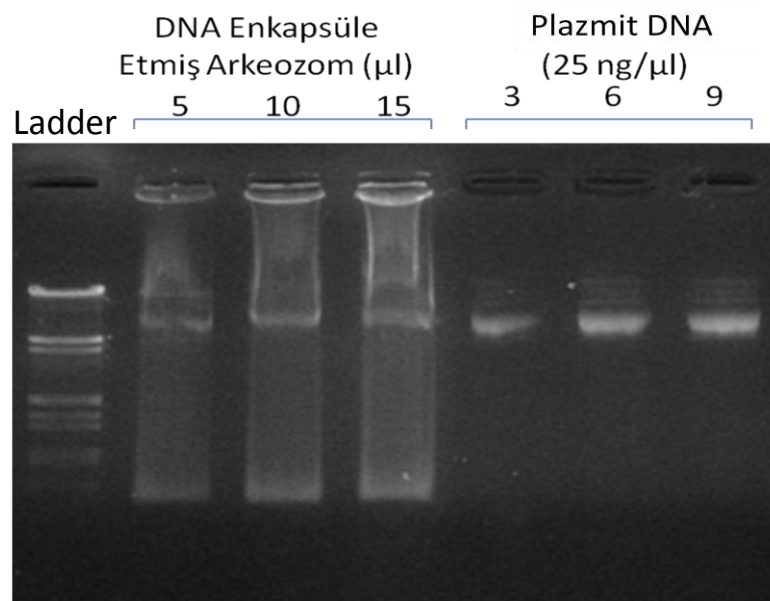
Bir başka deneyde ise, aynı arkeozom örneğinin farklı miktarları (1-4 μ l) kuyucuklara uygulanarak arkeozom miktarının yaptığı etki incelenmeye devam edildi (Şekil 4.35).



Şekil 4.35 Arkeozomların DNA enkapsülasyonuna ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

En yüksek arkeozom konsantrasyonu içeren 4. kuyucukta en fazla tutulma görülmektedir. Boş DNA, arkeozomlu örneklerden daha hızlı yürümüştür. Elde edilen sonuç bize arkeal lipid miktarı arttıkça DNA sürüklenmesinin de arttığını göstermektedir. Sonuç olarak arkeozom miktarı arttıkça enkapsülasyonun fazla olduğu belirlenmiştir.

Arkeozom miktarı arttırılıp plazmit DNA konsantrasyonu yarıya indirilerek yapılan deneyde ise hazırlanan arkeozomların DNA enkapsülasyonu agaroz jel elektroforezi ile incelendi (Şekil 4.36). 100 V sabit akım 25 dakika uygulandı.



Şekil 4.36 Arkeozomların DNA enkapsülasyonunun incelendiği agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Arkeozomlu kuyucuklardaki sürüklenme enkapsülasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. En yoğun sürüklenme 15 μ l arkeozom olan kuyucukta görülmektedir. Arkeozom miktarı arttıkça sürüklenmenin de arttığı gözlenmiştir.

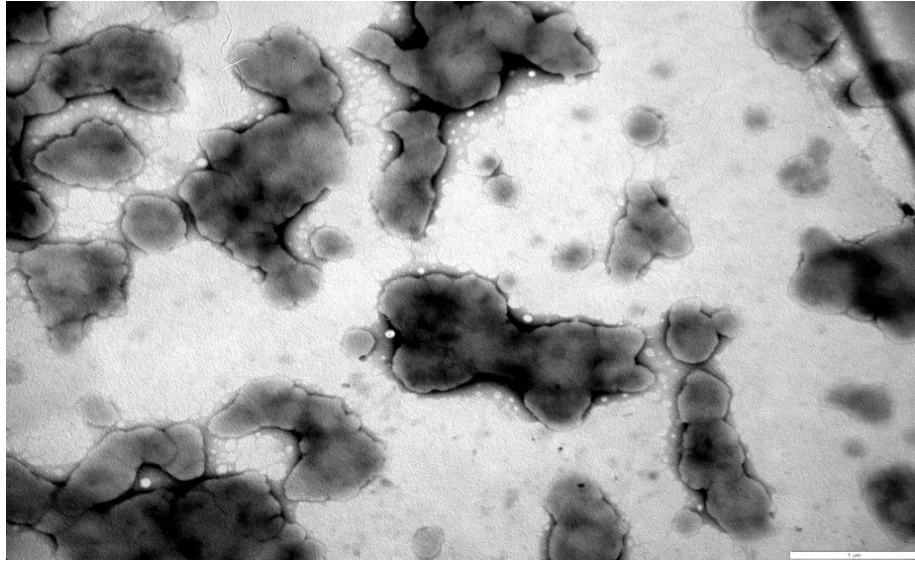
Boş arkeozomlarla plazmit DNA karıştırılarak hazırlanan örneklerle karşılaştırıldığında, enkapsülasyon yönteminde plazmit DNA'nın daha yüksek oranda arkeozomlarda tutulduğu anlaşılmaktadır.

4.5.4 Arkeozom ve DOTAP'ın Plazmit DNA ile Kompleks Oluşturmasına ait Sonuçlar

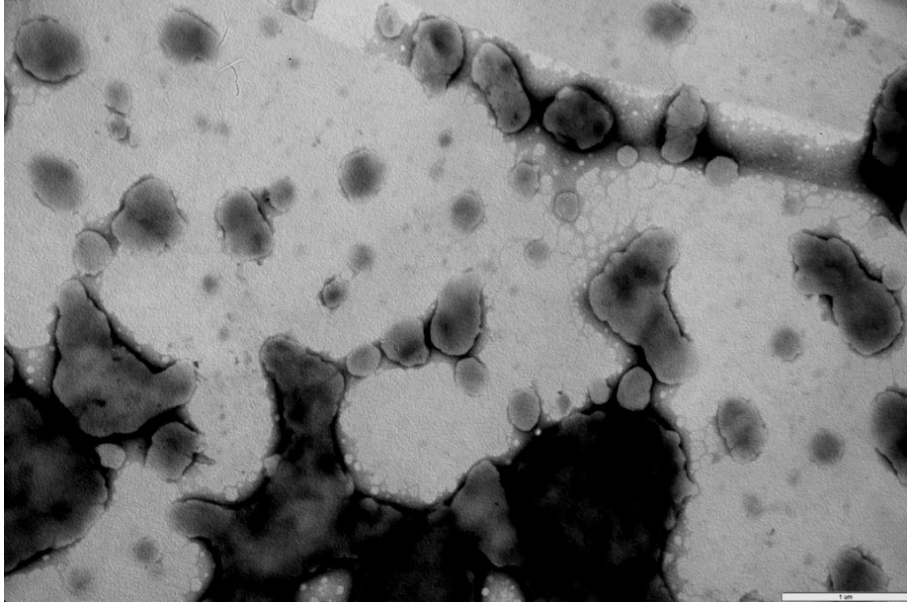
Çalışmada kullanılan arkeozom formülasyonlarının DNA'yı tutma etkinliklerinin artırılması amacıyla ticari olarak satılan DOTAP'tan yararlanıldı. DOTAP'lı örneklerin karakterizasyonu TEM, AFM ve agaroz jel elektroforezi ile yapıldı.

4.5.4.1 DOTAP'ın Plazmit DNA ile Kompleks Oluşturmasına ait TEM Analizi Sonuçları

Lipozom formülasyonlarının morfolojik özelliklerinin belirlenebilmesi amacı ile transmisyon elektron mikroskobu (TEM) incelemeleri metod 3.2.9'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Transmisyon elektron mikroskobu incelemeleri öncesinde hazırlanan DOTAP içeren lipozom formülasyonlarından negatif boyama yöntemi ile hazırlanan preparatların görüntüleri Şekil 4.37 ve 4.38'de verilmiştir.



Şekil 4.37 DOTAP ile pEGFP-N1 plazmit DNA kompleksinin (6 μ l/ μ g DNA) TEM görüntüsü.

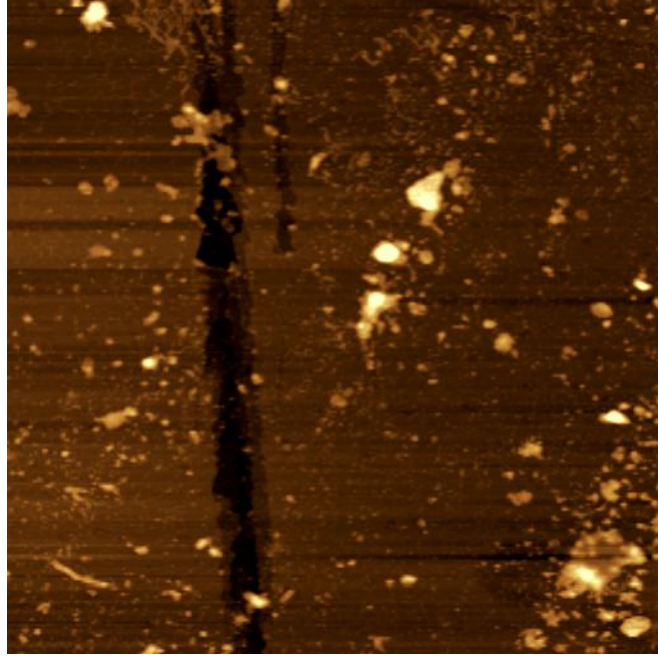


Şekil 4.38 pEGFP-N1 plazmit DNA ile kompleks oluşturan DOTAP'ın (6 µl lipozom/µg DNA) TEM görüntüsü.

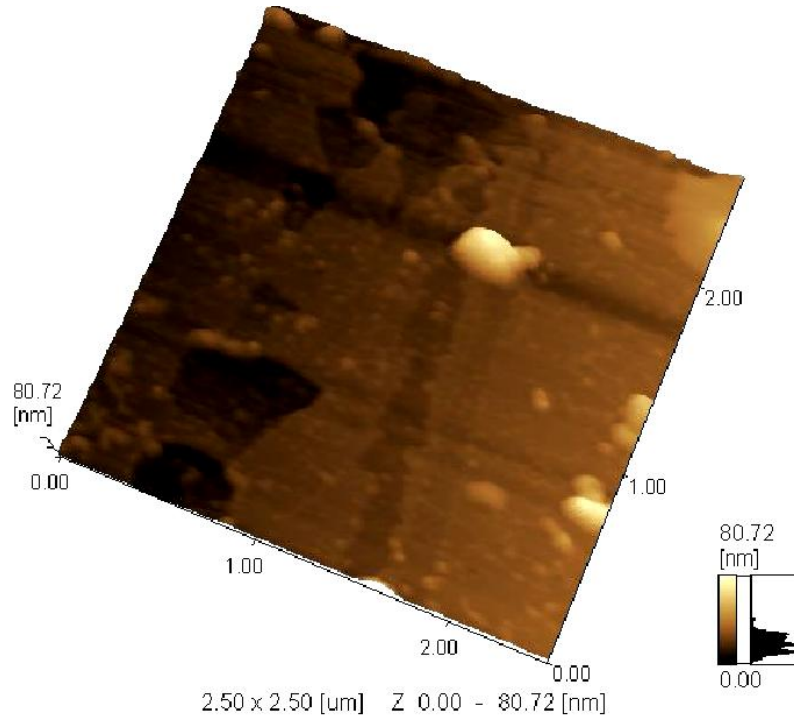
Gerçekleştirilen transmisyon elektron mikroskobu incelemelerinin sonuçlarına göre hazırlanan lipozomlar ortamdaki plazmit DNA'yı bağlayarak geniş çaplı kompleksler oluşturmuştur.

4.5.4.2 DOTAP'ın Plazmit DNA ile Kompleks Oluşturmasına ait AFM Analizi Sonuçları

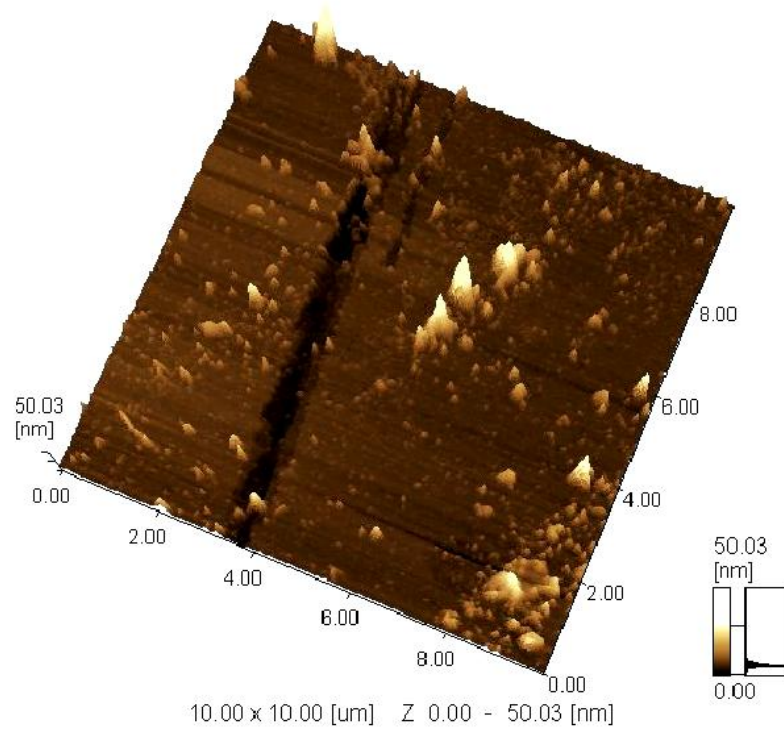
Hazırlanan DOTAP'lı lipozom formülasyonlarının morfolojik özelliklerinin belirlenebilmesi ve plazmit DNA ile oluşturduğu komplekslerin görüntülenmesi amacıyla metod 3.2.10'da belirtildiği şekilde atomik güç mikroskobu incelemeleri gerçekleştirildi (Şekil 4.39, 4.40 ve 4.41).



Şekil 4.39 DOTAP/pEGFP-N1 DNA'sının $1 \times 1 \mu\text{m}$ 'lik alan taranarak alınan AFM görüntüsü.



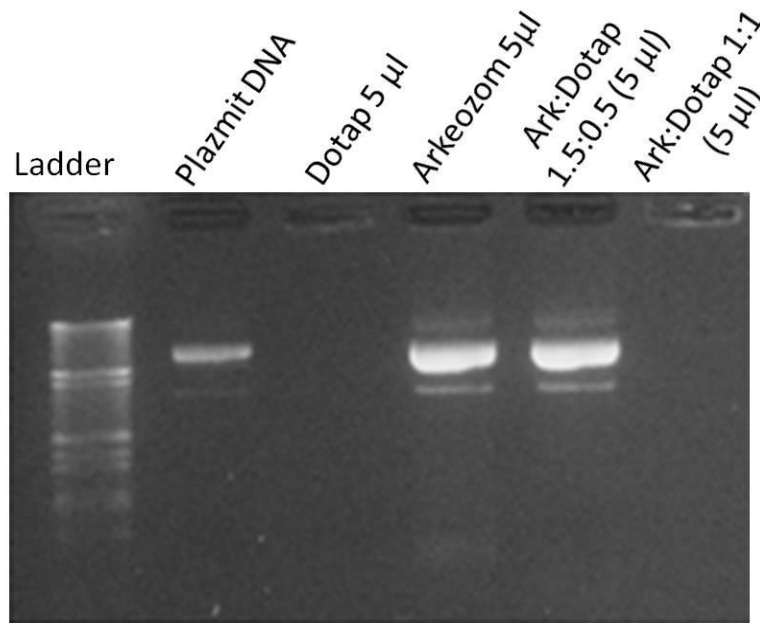
Şekil 4.40 DOTAP/pEGFP-N1 DNA'sının $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ 'lik alan taranarak alınan üç boyutlu AFM görüntüsü.



Şekil 4.41 DOTAP/pEGFP-N1 DNA'sının 10x10μm'lik alan taranarak alınan üç boyutlu AFM görüntüsü.

Atomik güç mikroskopunda gerçekleştirilen incelemelerin sonuçlarına göre, istenilen özelliklere sahip küçük lipozomlar oluşturulduğu görülmüştür.

4.5.4.3 Arkeozom ve DOTAP'ın Plazmit DNA ile Kompleks Oluşturmasına ait Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçları



Şekil 4.42 DOTAP ile hazırlanan lipozomlar, boş arkeozomlar ve DOTAP/arkeozom formülasyonlarının elektroforez sonuçları.

Şekilden de görüldüğü gibi DOTAP'ın tek başına kullanıldığı 2. kuyucuğa uygulanan tüm plazmit DNA tutularak kuyucukta hapsedildi. DOTAP ile arkeozomların 1/1 oranında uygulandığı 5 numaralı kuyucukta da herhangi bir yürüme olmazken DOTAP ile arkeozomların 1/3 oranında uygulandığı 5 numaralı kuyucukta ve plazmit DNA'nın enkapsüle edildiği örneği içeren 6. kuyucukta tutulmanın zayıf olduğu görüldü. Arkeozomlar ile DOTAP karışımı, plazmit DNA'yı aynı miktardaki DOTAP kadar etkin biçimde bağlamıştır.

4.5.5 Arkeozom ve Polibrenin Plazmit DNA ile Kompleks Oluşturmasına ait Sonuçlar

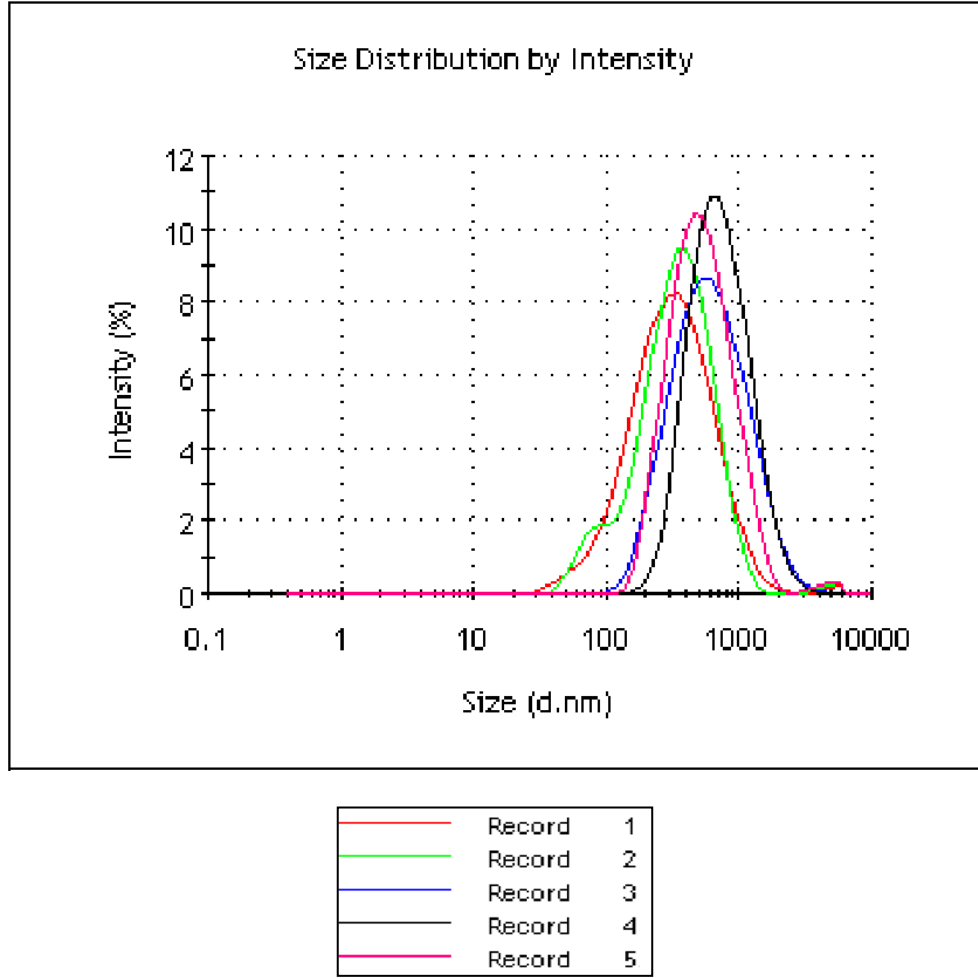
Çalışmada kullanılan arkeozom formülasyonlarının DNA'yı tutma kapasitesini arttırmak amacıyla polibren (Sigma) kullanılarak farklı miktarlarda arkeozom farklı konsantrasyonlarda polibrenle formüle edildi, zeta değerleri ölçüldü ve plazmit DNA'yı tutma kapasiteleri agaroz jel elektroforezi ile incelendi.

4.5.5.1 Arkeozom ve Polibrenin Plazmit DNA ile Kompleks Oluşturmasına ait Zeta Potansiyeli Analizinin Sonuçları

Hazırlanan arkeozom formülasyonlarının net yüzey yükleri 3.2.8'de belirtildiği şekilde Zeta Sizer Nano ZS cihazında yapıldı. 1 µl arkeozom ile artan konsantrasyonlarda polibrene ait yüzey yükü ölçüm değerleri çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Farklı konsantrasyonlardaki polibrenin ve polibrenle formüle edilen arkeozomların zeta potansiyeli ve boyut büyüklüğü değerleri

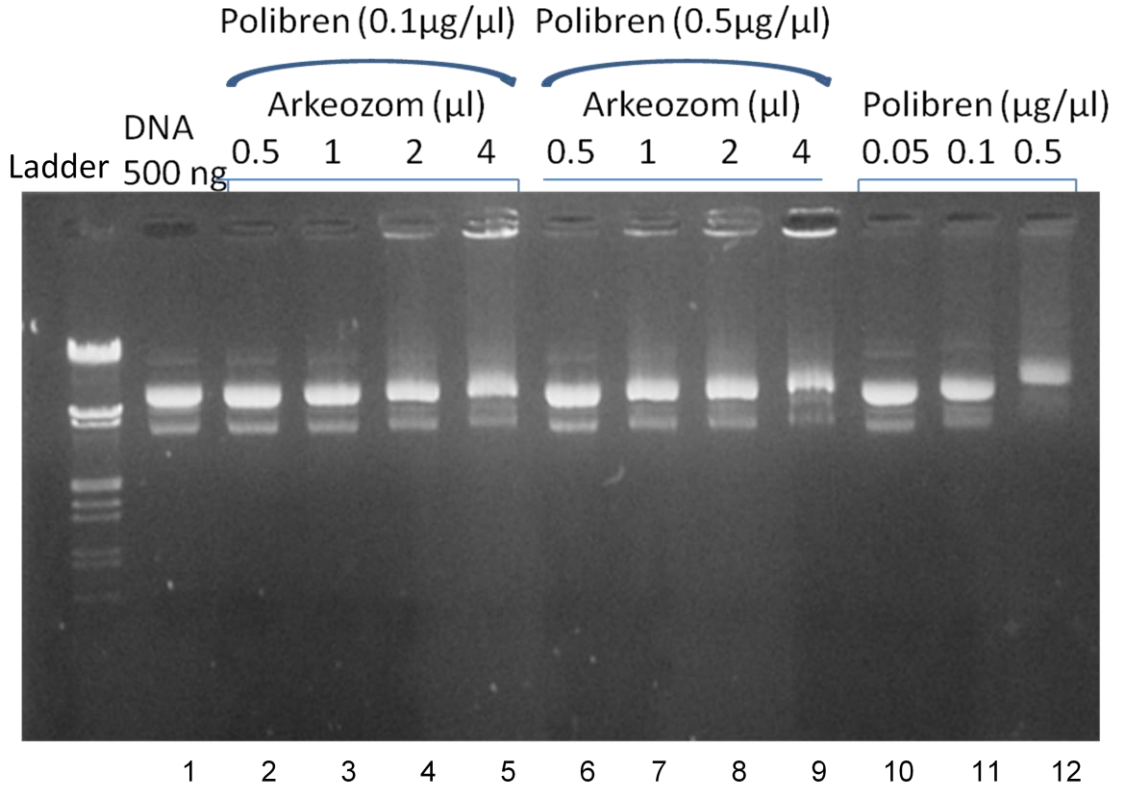
No	Arkeozom formülasyonu	Zeta potansiyeli	Boyut Büyüklüğü
1	Arkeozom - Polibren (0.1 µg/µl)	- 38.6 mV	382.7 nm
2	Arkeozom - Polibren (0.5 µg/µl)	- 35.0 mV	383.7 nm
3	Arkeozom - Polibren (2.5 µg/µl)	- 4.18 mV	726.4 nm
4	Polibren (1 mg/ml)	2.75 mV	803.1 nm
5	Polibren (0.1 mg/ml)	- 2.68 mV	577.6 nm



Şekil 4.43 Çizelge 4.7’de verilen örneklerin şiddete bağlı boyut dağılımını gösteren grafik.

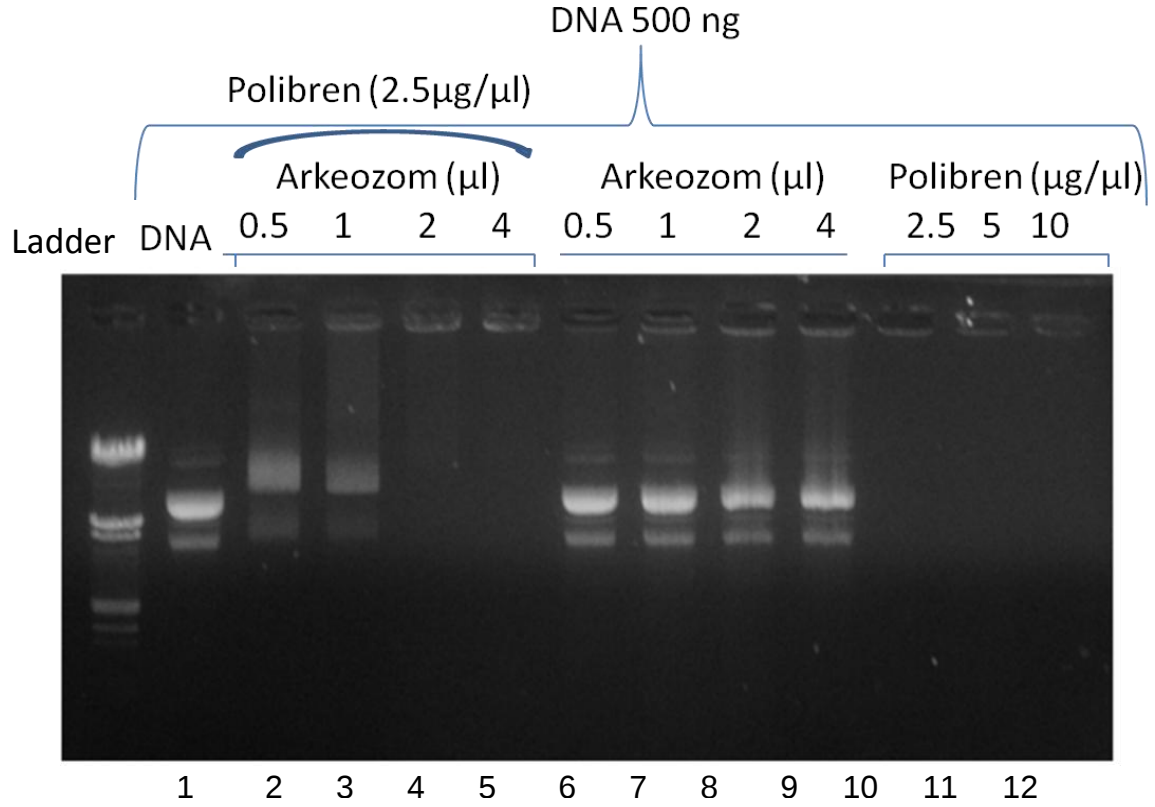
4.5.5.2 Arkeozom ve Polibrenin Farklı Konsantrasyonlarının Plazmit DNA ile Kompleks Oluşturmasına ait Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçları

Plazmit DNA 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konsantrasyona seyreltilerek örnek başına 500 ng olacak biçimde uygulandı. 25 mg/ml konsantrasyondaki stok polibren ise 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ve 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konsantrasyonlara seyreltilen, kompleks oluşturan örneklerin elektroforezi Şekil 4.44 ve 4.45'te verilmiştir.



Şekil 4.44 Çeşitli miktarlardaki arkeozom ve polibrenin plazmit DNA ile kompleks oluşturmaya ait jel fotoğrafı.

DNA'nın en yüksek oranda sürüklendiği ve tutulduğu kuyucuklar 5 ve 9 numaralıdır. Buradan 4 μl 'lik arkeozom hacminin 500 ng plazmit DNA'yı 0.1 ve 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konsantrasyondaki polibrenli ortamda uygulanan diğer hacimlere oranla daha fazla tutabildiği görülmektedir.



Şekil 4.45 Çeşitli miktarlardaki arkeozom ve polibrenin plazmit DNA ile kompleks oluşturmaya ait jel fotoğrafı.

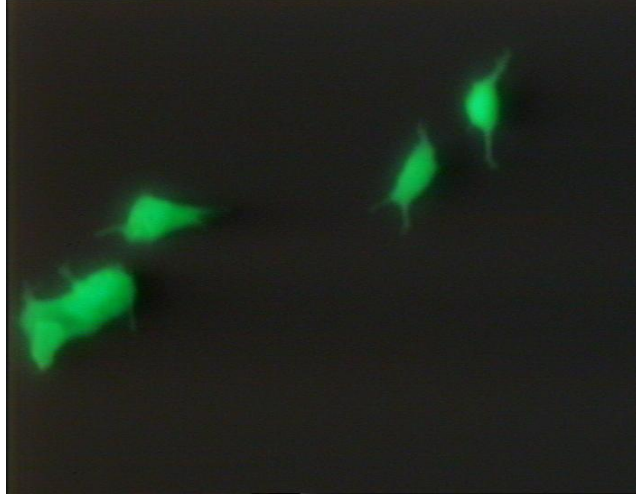
Jel resmi, 2 ve 4 µl arkeozomun, 2.5 µg/µl konsantrasyondaki polibrenli ortamda tüm plazmit DNA'yı tuttuğunu göstermektedir.

4.6 Arkeozomların *In Vitro* Transfeksiyon Etkinliklerinin Yeşil Floresan Proteini ile Saptanmasına Ait Sonuçlar

pEGFP-N1 plazmit vektörü kullanılarak yapılan transfeksiyon deneyleri sonucunda memeli hücreleri tarafından sentezlenen yeşil floresan proteini, floresan mikroskobu altında incelendi.

4.6.1 Boş Arkeozomların *In Vitro* Transfeksiyon Etkinlikleri

pEGFP-N1 plazmit DNA ile boş arkeozomların kullanıldığı *in vitro* transfeksiyon deneylerinde transfekte olan hücreler tespit edildi ve floresan mikroskobu ile fotoğraflandı (Şekil 4.46).

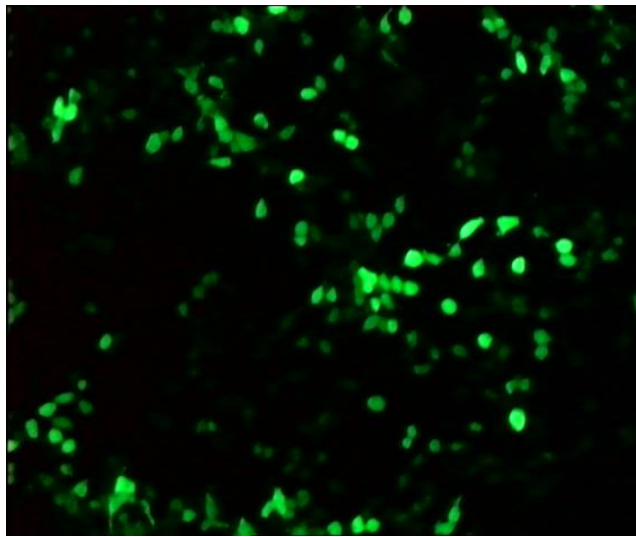


Şekil 4.46 1 μ g pEGFP-N1 DNA'ya karşılık 10 μ l arkeozom kullanılarak oluşturulan komplekslerin transfeksiyonuna ait fotoğraf.

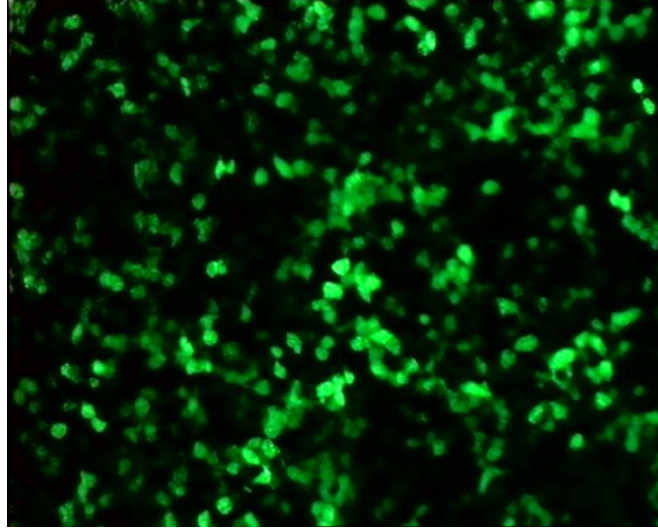
Şekilden de görüldüğü gibi boş arkeozomların transfeksiyon etkinliğinin olduğu görüldü, fakat transfeksiyon seviyesinin yüksek olmadığı belirlendi.

4.6.2 DOTAP'ın *In Vitro* Transfeksiyon Etkinliği

Ticari bir lipid olan DOTAP ile yapılan *in vitro* transfeksiyon çalışmasında yeşil floresan proteini ekspres eden pEGFP-N1 plazmit vektörü kullanıldı. Floresan mikroskobu altında yapılan gözlemler sonucu transfeksiyon etkinliği kalitatif olarak tespit edildi. 0.5 ve 1 μ g pEGFP-N1 DNA'sına karşılık 5 μ l lipozom kullanıldı. Oluşan ticari lipozom ile plazmit DNA kompleksinin *in vitro* transfeksiyon etkinliği 48 saatlik süre sonunda floresan mikroskobu ile incelendi.



Şekil 4.47 0.5 μ g pEGFP-N1 DNA'ya karşılık 5 μ l DOTAP kullanılarak oluşturulan kompleksler ile gerçekleştirilen transfeksiyona ait fotoğraf.



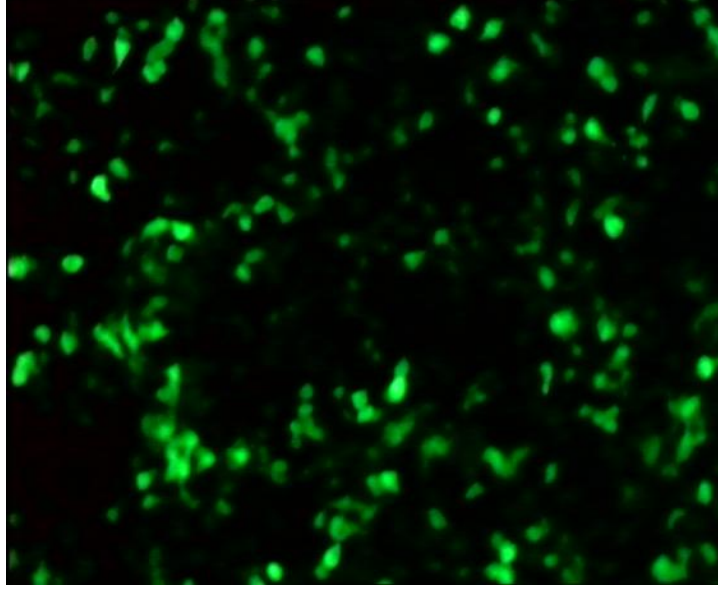
Şekil 4.48 1 µg pEGFP-N1 DNA'ya karşılık 5 µl DOTAP kullanılarak oluşturulan kompleksler ile gerçekleştirilen transfeksiyona ait fotoğraf.

Plazmit DNA konsantrasyonunun 2 kat arttırılarak uygulandığı deneyde *in vitro* transfeksiyon etkinliğinin de arttığı görüldü.

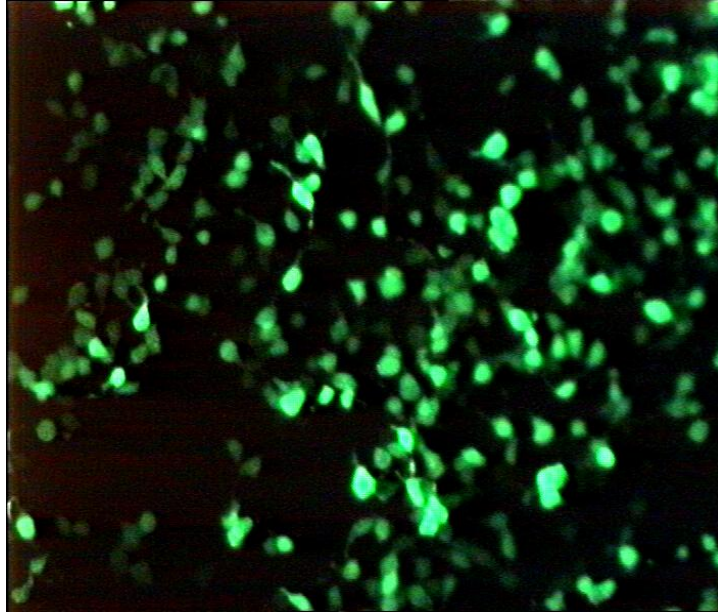
4.6.3 DOTAP'ın Arkeozomlarla Plazmit DNA Transfeksiyonuna Etkisi

1 mg arkeal polar lipide 1 mg DOTAP katılması ile oluşturulan lipozomlar pEGFP-N1 plazmit vektörü kullanılarak HEK293 hücre hattının transfeksiyonunda kullanıldı. Transfeksiyon etkinliğinin kontrolü için ticari liyofilize lipidlerden oluşturulan DOTAP miktarı sabit tutularak hazırlandı ve pozitif kontrol olarak aynı hacimde uygulandı.

Arkeal lipid ile ticari DOTAP'ın 1/1 oranında karıştırılmasıyla oluşturulan lipozomlar ve kontrol amacıyla DOTAP ile oluşturulan lipozomların *in vitro* transfeksiyon etkinliği floresan mikroskopunda incelendi.



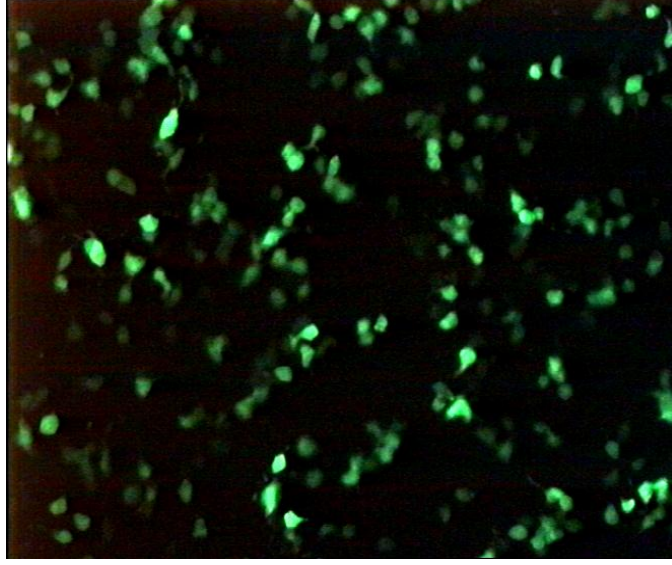
Şekil 4.49 0.5 µg pEGFP-N1 DNA ile 5 µl DOTAP kullanılarak gerçekleştirilen transfeksiyona ait fotoğraf.



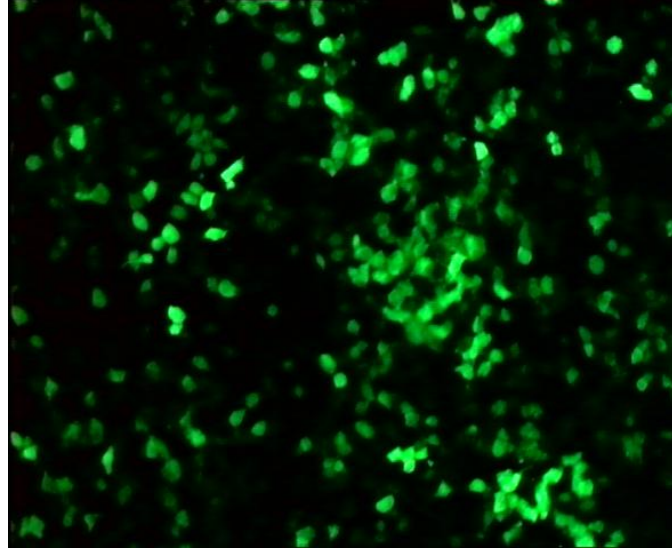
Şekil 4.50 0.5 µg pEGFP-N1 DNA ile 5 µl arkeozom-DOTAP karışımı (1:1) kullanılarak gerçekleştirilen transfeksiyona ait fotoğraf.

Şekil 4.49 ve 4.50’de görüldüğü gibi ticari lipozomlara arkeozom eklenmesi ile hem transfekte hücre sayısı hem de *in vitro* transfeksiyon etkinliği artmıştır.

Bir başka deneyde, arkeal lipid ile DOTAP’ın 1/1 oranında karıştırılmasıyla oluşturulan lipozomların *in vitro* transfeksiyon etkinliği lipozom miktarı 2 katına çıkartılarak incelendi.



Şekil 4.51 1 µg pEGFP-N1 DNA ile 10 µl DOTAP kullanılarak gerçekleştirilen transfeksiyona ait fotoğraf.



Şekil 4.52 1 µg pEGFP-N1 DNA ile 10 µl arkeozom-DOTAP karışımı (1:1) kullanılarak gerçekleştirilen transfeksiyona ait fotoğraf.

Arkeal lipidler ve DOTAP'tan elde edilen lipozomların miktarları iki katına çıkarılarak tekrarlanabilir sonuçlar verip vermediği araştırıldı. Şekil 4.51 ve 4.52'den de anlaşılacağı üzere konsantrasyonun artırılması ile transfekte hücre sayısı beklendiği şekilde artmıştır.

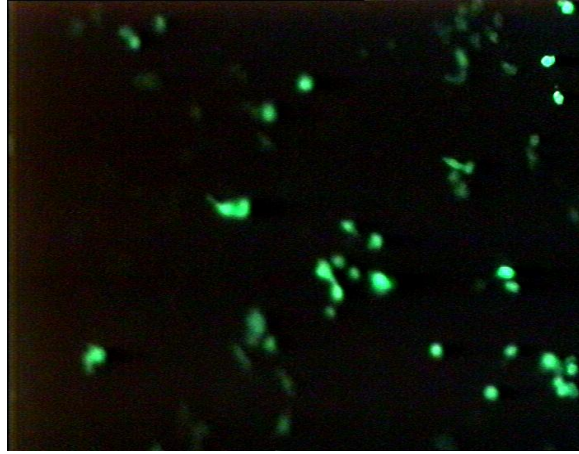
4.6.4 Arkeozomların *In Vitro* Transfeksiyon Etkinliğinin Arttırılmasında Kalsiyumun Etkisi

Arkeozom ve pEGFP-N1 plazmit DNA miktarları sabit tutularak sırasıyla 10, 20, 50, 100 mM CaCl_2 ilave edilmesiyle oluşturulan komplekslerin HEK293 hücre hattındaki transfeksiyon etkinliği floresan mikroskobu ile görüntülendi. Görüntüler incelendiğinde 10 mM CaCl_2 'nin etkin olmadığı, 20 mM CaCl_2 'nin ise az miktarda etkinlik gösterdiği belirlendi (Şekil 4.53).

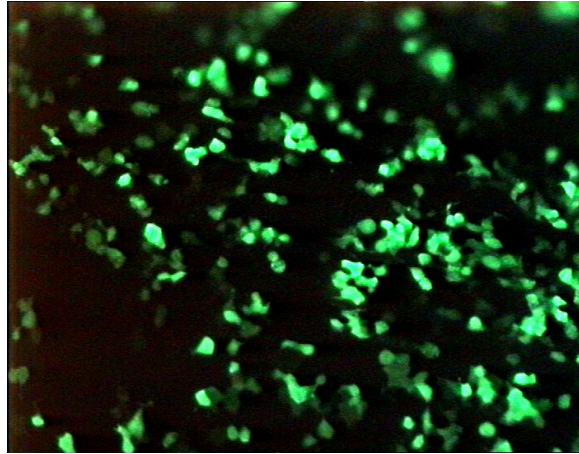
CaCl_2 konsantrasyonu arttırıldığında 50 mM CaCl_2 ile *in vitro* transfeksiyon etkinliğinin oldukça arttığı (Şekil 4.54), 100 mM CaCl_2 konsantrasyonunda ise *in vitro* transfeksiyonun en iyi sonuç verdiği saptanmıştır (Şekil 4.55).



Şekil 4.53 Arkeozomlara 20 mM CaCl_2 eklenmesiyle elde edilen transfeksiyona ait fotoğraf.

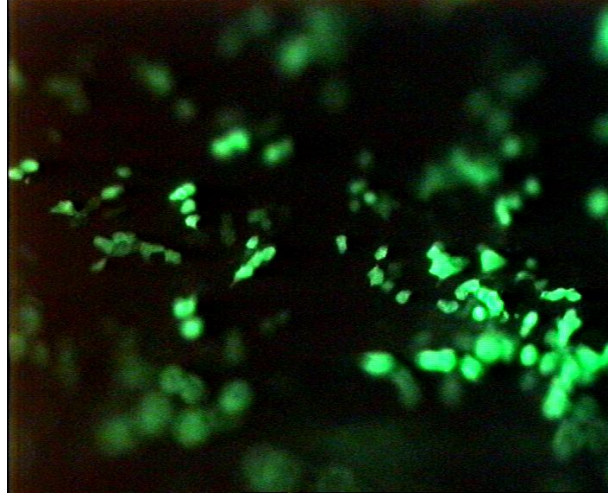


Şekil 4.54 Arkeozomlara 50 mM CaCl_2 eklenmesiyle elde edilen transfeksiyona ait fotoğraf.



Şekil 4.55 Arkeozomlara 100 mM CaCl_2 eklenmesiyle elde edilen transfeksiyona ait fotoğraf.

Kontrol amacı ile arkeozom eklenmeden aynı hacimde çıplak plazmit DNA 100 mM CaCl_2 ile oluşturulan kompleksin *in vitro* transfeksiyon etkinliği incelendiğinde transfeksiyon etkinliğinin arkeozom katılmış örneklerle göre daha düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.56).

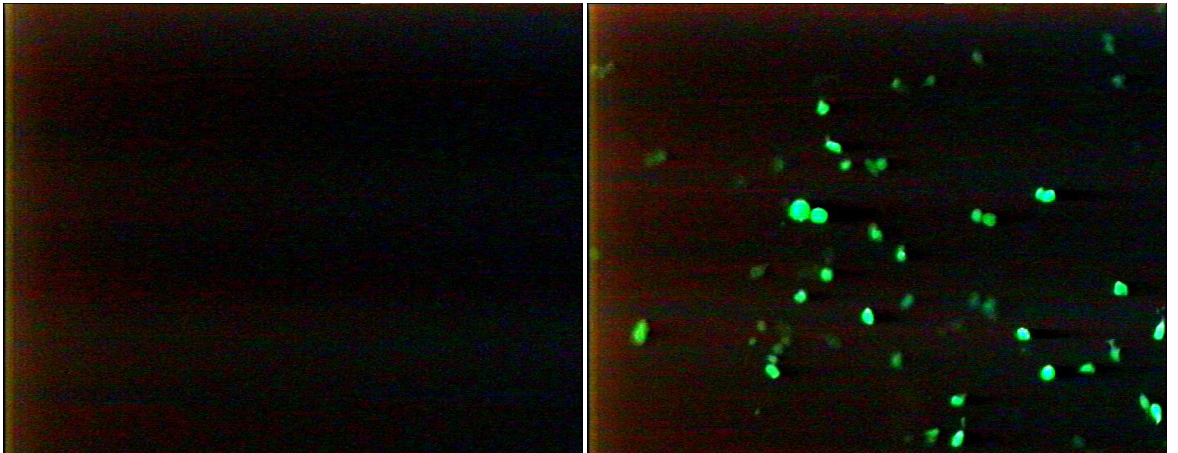


Şekil 4.56 Plazmit DNA'ya 100 mM CaCl_2 eklenmesiyle elde edilen transfeksiyona ait fotoğraf.

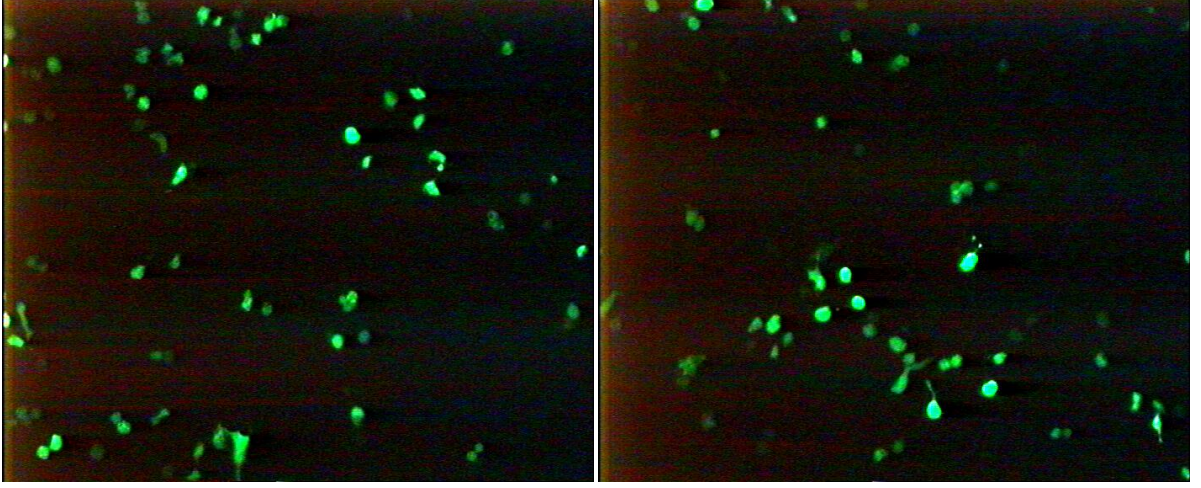
100 mM CaCl_2 'nin arkeozomların *in vitro* transfeksiyon etkinliğini belirgin bir şekilde arttırdığı gözlemlendi.

4.6.5 Arkeozomların *In Vitro* Transfeksiyon Etkinliğinin Arttırılmasında Kitozanın Etkisi

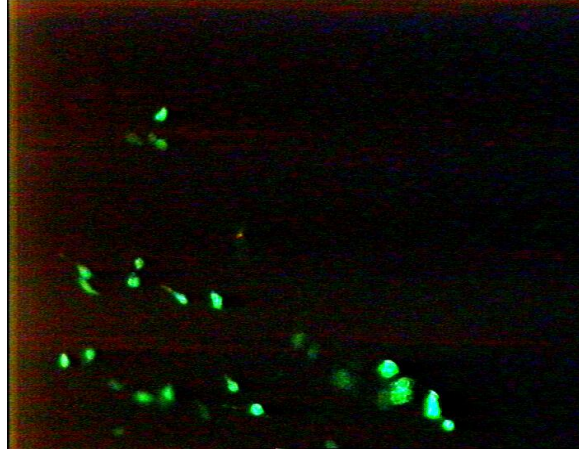
10 μl sabit hacimde arkeozoma karşılık, artan miktarda (1, 2, 4, 8 μg) kitozan çözeltisi eklenmesi ile elde edilen komplekslerin *in vitro* transfeksiyon etkinliği floresan mikroskobu ile incelendiğinde alınan sonuçlar Şekil 4.57, 4.58, 4.59 ve 4.60'da verilmiştir.



Şekil 4.57 1 μg ve 2 μg kitozan ile 1 μg pEGFP-N1 plazmit DNA'sının oluşturduğu kompleksin transfeksiyon etkinliğini gösteren fotoğraflar.



Şekil 4.58 4 μ g ve 8 μ g kitozan ile 1 μ g pEGFP-N1 plazmit DNA'sının oluşturduğu kompleksin transfeksiyon etkinliğini gösteren fotoğraflar.



Şekil 4.59 2 μ g kitozan ile 10 μ l arkeozomun 1 μ g pEGFP-N1 plazmit DNA'sı ile oluşturduğu kompleksin transfeksiyon etkinliğini gösteren fotoğraf.



Şekil 4.60 8 μ g kitozan ile 1 μ g pEGFP-N1 plazmit DNA'sının 10 μ l arkeozom ile oluşturduğu kompleksin transfeksiyon etkinliğini gösteren fotoğraf.

Kitozan kullanılarak gerçekleştirilen bu deney sonucunda, elde edilen en yüksek GFP ekspresyonunun 8 µg kitozan ile 10 µl arkeozomun oluşturduğu kompleks ile gerçekleştiği saptanmıştır.

4.7 Örneklerdeki β-Galaktosidaz Aktivitelerinin Saptanmasına Ait Sonuçlar

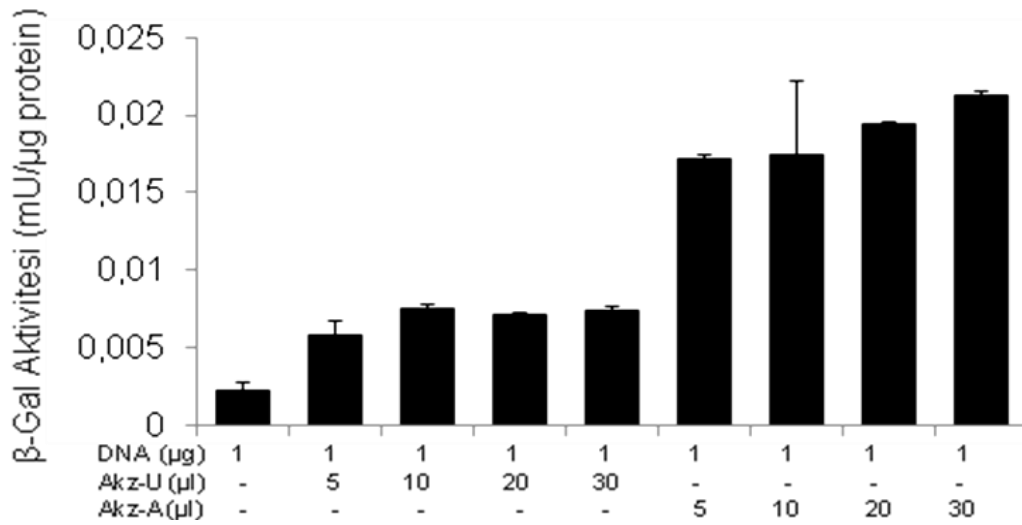
In vitro transfeksiyon etkinliği ve β-Galaktosidaz ekspresyonunun kantitatif analizinde orto-nitrofenil-β-D-galaktopiranosid (ONPG) ile enzimatik tayin yöntemi uygulandığında ekspresyon seviyesi, metod 3.2.13.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanan standart grafik üzerinden hesaplandı (Şekil 4.6 ve 4.7).

Farklı arkeozom formülasyonları, pSV-β-Gal plazmit DNA’sının memeli hücrelerine transfeksiyonunda kullanıldı. Elde edilen absorbans değerleri ile, protein ve β-galaktosidaz standart grafiklerinden de yararlanarak örneklerin aktiviteleri mU/mg protein olarak belirlendi.

1 ünite β-Galaktosidaz, 37°C’de, pH 7.5’te, dakikada 1 µmol orto-nitrofenil-β-D-galaktopiranosidi (ONPG) o-nitrofenol ve galaktoza parçalayan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

4.7.1 Boş Arkeozomlar Kullanılarak Elde Edilen β -Galaktosidaz Aktiviteleri

pSV- β -Gal plazmit DNA'sının memeli hücrelerine *in vitro* transfeksiyonunda ilk olarak metod 3.2.2'de anlatıldığı şekilde Bligh ve Dyer'a (1959) göre ekstraksiyonu yapılan arkeal lipidlerden elde edilen arkeozomlar kullanıldı. Lipid ekstraksiyonu sonrasında yapılan soğuk aseton presipitasyonu ile polar lipid fraksiyonu elde edildi (Choquet vd., 1992). Kloroform:metanol:su ekstraktının sulu üst fazından elde edilen arkeozomlar ile kloroform:metanol:su ekstraktının soğuk aseton presipitatından elde edilen arkeozomlar arasındaki *in vitro* transfeksiyon etkinliği farkı incelendi. Her kuyucukta pSV- β -Gal plazmit DNA miktarı sabit tutuldu, arkeozom miktarı ise arttırıldı.

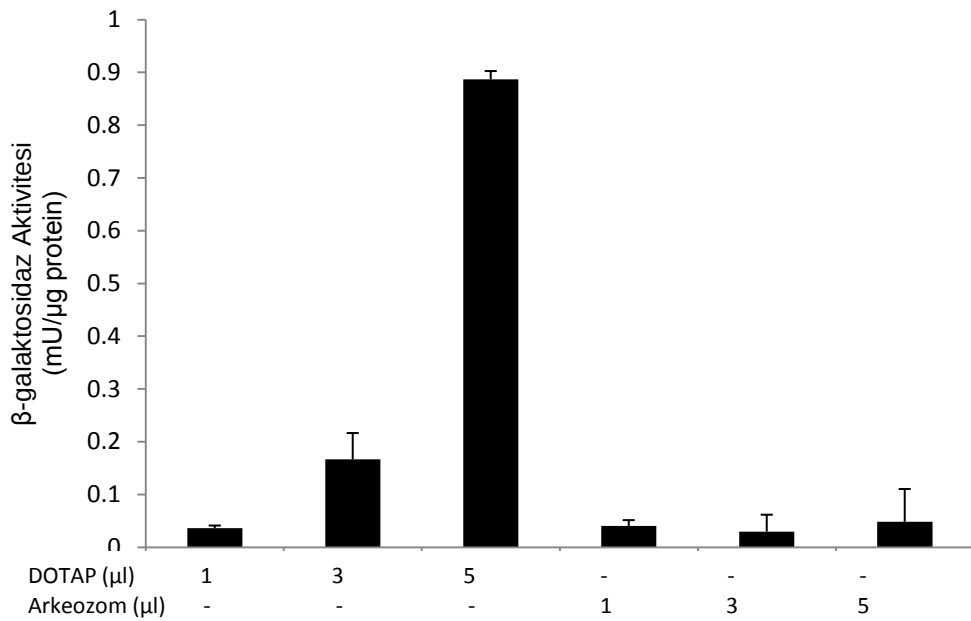


Şekil 4.61 Arkeozomlarla gerçekleştirilen *in vitro* transfeksiyon sonucunda elde edilen β -Galaktosidaz aktiviteleri.

Şekilden de görüldüğü gibi total lipid fraksiyonundan elde edilen arkeozomlarla yapılan *in vitro* transfeksiyon sonucu elde edilen β -Galaktosidaz aktivitesi maksimum 0.0073 mU'ye kadar çıkarken polar lipidlerden elde edilen arkeozomlar kullanıldığında enzim aktivitesinde yaklaşık 3 kat artış gerçekleşmiş ve 0.0212 mU seviyesine çıkmıştır. Grafikte görülen ilk sütun arkeozom içermeyen çıplak DNA'nın transfeksiyonuna aittir. Enzim aktivitesi 0.0023 olarak tespit edilen çıplak DNA transfeksiyonu arkeozomlu örneklerle kıyaslandığında arkeozomların plazmit DNA transfeksiyonunu birkaç kat arttırdığı görülmektedir.

4.7.2 DOTAP ve Arkeozomlar Kullanılarak Elde Edilen β -Galaktosidaz Aktiviteleri

Haloarcula hispanica'nın polar lipidlerinden hazırlanan arkeozomlar ile transfeksiyon etkinliği oldukça yüksek olan ve ticari olarak satılan DOTAP karşılaştırıldı. DOTAP ile hazırlanan lipozomlar katyonik özelliktedir ve negatif yüklü DNA'yı yüksek verimlilikte bağlar. Bölüm 4.5.4'te verilen sonuçlar da bunu desteklemektedir. *Haloarcula hispanica*'dan elde edilen doğal lipidlerden hazırlanan ve saflaştırma, liyofilizasyon gibi herhangi bir işlem uygulanmadan hazırlanan arkeozomların *in vitro* transfeksiyon etkinliği ile DOTAP'ın *in vitro* transfeksiyon etkinliği şekil 4.62'de karşılaştırılmıştır. Her kuyucukta sabit miktarda (1 μ g) plazmit DNA bulunmaktadır.

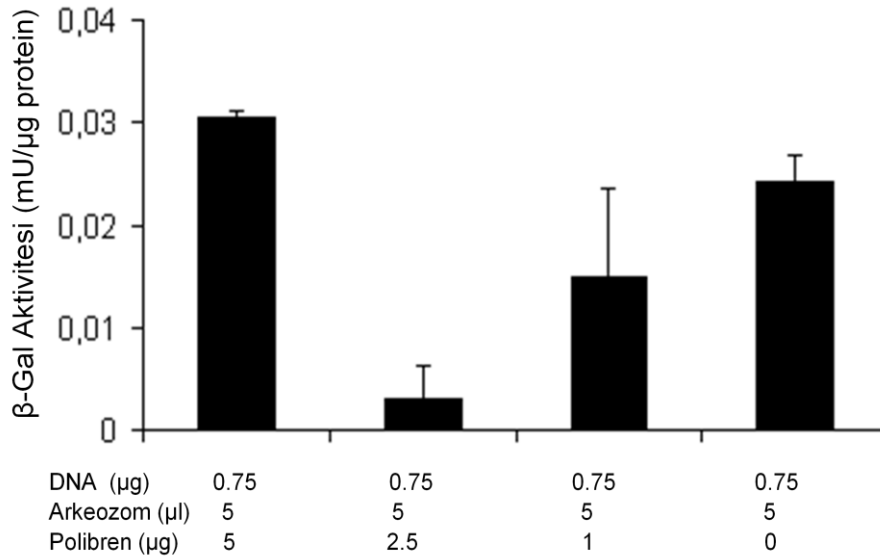


Şekil 4.62 DOTAP kullanılan *in vitro* transfeksiyon ile arkeozom kullanılan *in vitro* transfeksiyon sonucunda elde edilen β -Galaktosidaz aktiviteleri.

1 μ l DOTAP kullanılan kuyucukta 0.036 mU β -Galaktosidaz aktivitesi elde edilirken buna paralel olarak 1 μ l arkeozom kullanılan kuyucukta 0.029 mU β -Galaktosidaz aktivitesi elde edildi. Bu iki değer birbirine yakın olmasına rağmen DOTAP'ın hacim artışıyla enzim aktivitesi yüksek miktarda artmış, fakat arkeozom kullanılan *in vitro* transfeksiyonda aynı durum gözlenmemiştir. Arkeozom miktarının 1 μ l'den 5 μ l'ye çıkarılması β -Galaktosidaz aktivitesini 0.029 mU'den 0.048 mU'ye yükseltmiştir.

4.7.3 Polibren ve Arkeozomlar Kullanılarak Elde Edilen β -Galaktosidaz Aktiviteleri

Pozitif yüklü olan polibren özellikle retroviral vektörlerin memeli hücrelerini enfekte etme etkinliğini arttırmak amacıyla kullanılan bir moleküldür. Arkeozom ve DNA formülasyonlarında polibrenin etkisi incelendiğinde her kuyucukta pSV- β -Gal plazmit DNA miktarı ile arkeozom miktarı sabit tutulurken polibren miktarı ise değiştirildi (Şekil 4.63).

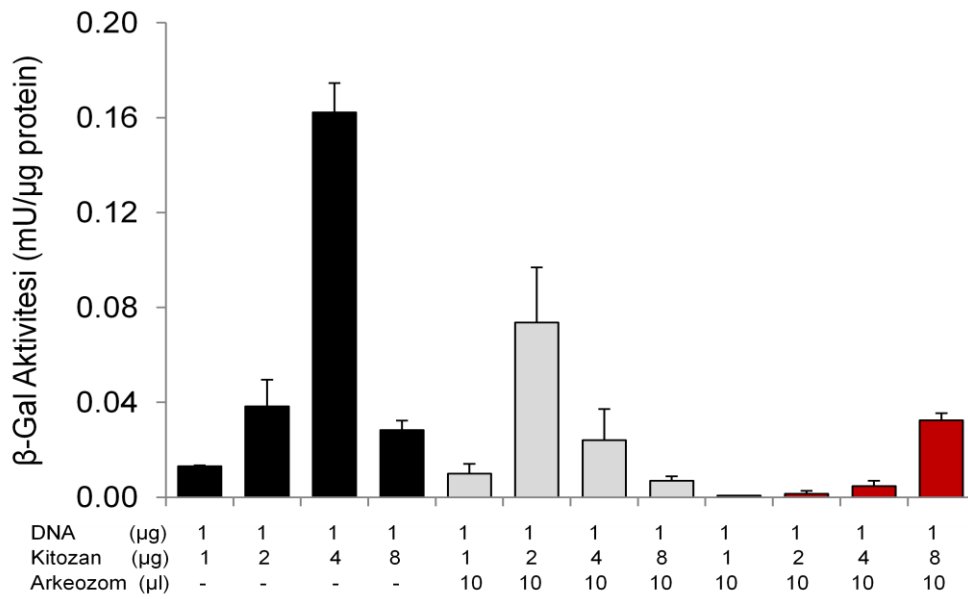


Şekil 4.63 Plazmit DNA'nın polibren ile bağlanması sonucu elde edilen arkeozomal transfeksiyona ait β -Galaktosidaz aktiviteleri.

Kontrol amacıyla hiç polibren eklenmeden gerçekleştirilen *in vitro* transfeksiyona ait son sütundan da görüldüğü gibi arkeozomların HEK293 hücrelerine β -Gal genini transfekte etme etkinliği, 1 µg ve 2.5 µg polibren kullanılan örneklerden daha yüksektir. En yüksek enzim aktivitesi 5 µl arkeozom ile 5 µg polibren kullanılan kuyucuktaki hücrelerden elde edilmiş olup (0.03 mU/µg protein) polibren kullanılmayan örneklerin β -Galaktosidaz aktivitesine yakındır (0.024 mU/µg protein).

4.7.4 Kitozan ve Arkeozomlar Kullanılarak Elde Edilen β -Galaktosidaz Aktiviteleri

Kitozan, kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen doğal ve katyonik bir polimerdir. Arkeozomların *in vitro* transfeksiyon etkinliğini arttırmak amacıyla kitozan örneklerinden yararlanıldı. 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konsantrasyondaki kitozan çözeltisi kullanılarak yapılan *in vitro* transfeksiyon deneylerinde polar arkeal lipidlerle hazırlanan arkeozomlar, farklı miktarlardaki kitozan çözeltisiyle kompleks oluşturması amacıyla karıştırıldı. Her kuyucuktaki pSV- β -Gal plazmit DNA miktarı ile arkeozom miktarı sabit tutulup kitozan miktarı değiştirildiğinde elde edilen sonuçlar şekil 4.64'te verilmiştir.

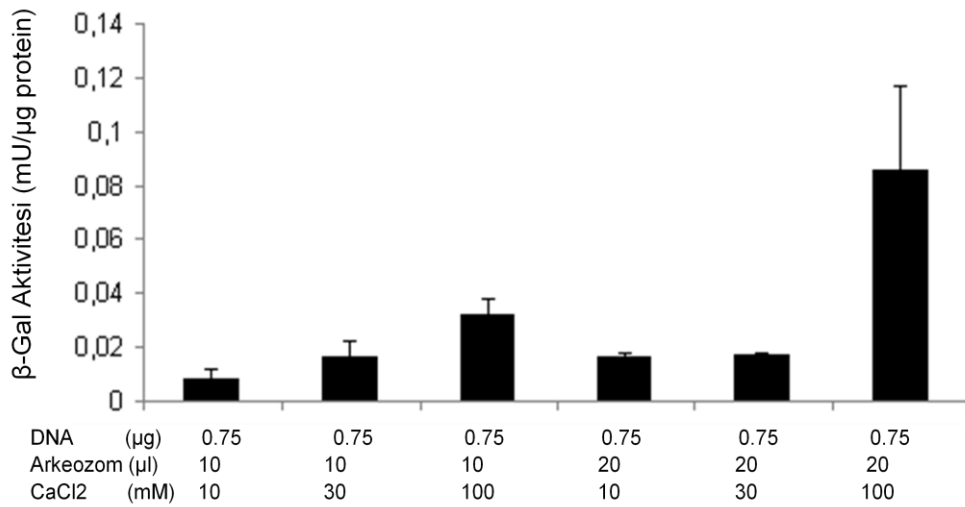


Şekil 4.64 Kitozanın arkeozomlarla yapılan *in vitro* transfeksiyon üzerindeki etkisini gösteren β -Galaktosidaz aktiviteleri.

Şekilden de görüldüğü gibi, ilk dört sütun kitozanın *in vitro* transfeksiyon etkinliğine aittir. Kitozanın 4 μg olduğu örneklerde en yüksek *in vitro* transfeksiyon etkinliği saptanmıştır. Diğer örneklerde ise gri sütunlar kitozan/plazmit DNA kompleksine arkeozom eklenmesine ait sonuçları, kırmızı sütunlar ise kitozan/arkeozom kompleksine plazmit DNA eklenmesi ile elde edilen sonuçları göstermektedir. Şekilden de açıkça görüldüğü üzere, kitozan/plazmit DNA kompleksine arkeozom karıştırılması sonucu elde edilen *in vitro* transfeksiyon daha verimlidir (0.074 mU/ μg protein) ve aynı miktar kitozanın tek başına yaptığı etkiden (0.038 mU/ μg protein) yaklaşık 2 kat fazladır.

4.7.5 Ca^{2+} İyonları ve Arkeozomlar Kullanılarak Elde Edilen β -Galaktosidaz Aktiviteleri

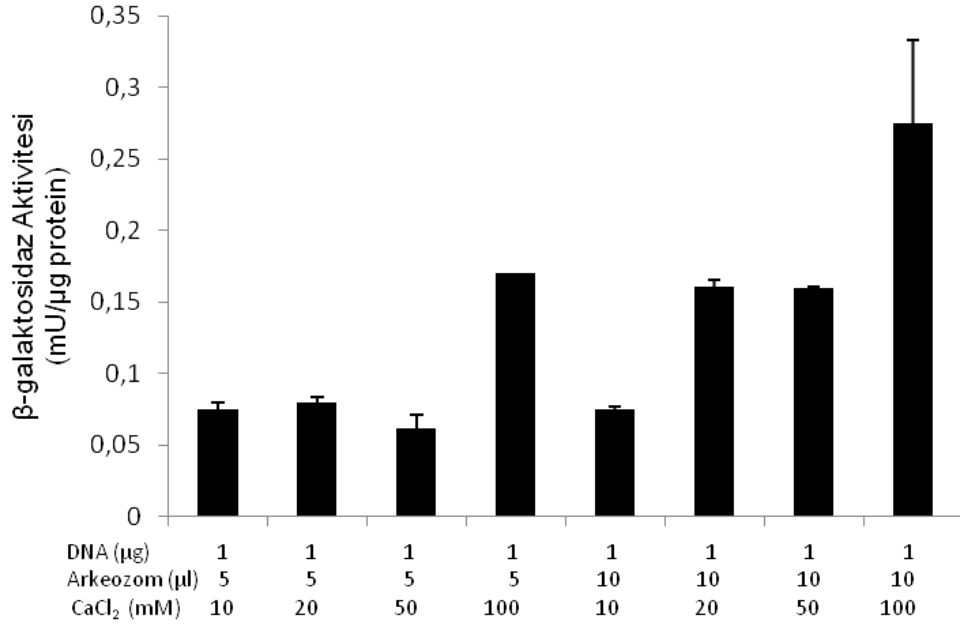
Arkeal lipidlerden hazırlanan arkeozomların negatif yüklü olmaları, DNA ile kompleks oluşturmayı güçleştirdiğinden arkeozom/plazmit DNA örneklerinin hazırlanması aşamasında ortama 10, 30 ve 100 mM CaCl_2 eklendi. Metod 3.2.3'te anlatıldığı şekilde elde edilen arkeal lipidlerden hazırlanan veziküllerin farklı konsantrasyonlarda CaCl_2 çözeltisi bulunan ortamda transfeksiyon etkinliği incelendi. Bölüm 3.2.12.1'de belirtilen yöntemle gerçekleştirilen deneylerde plazmit DNA miktarı sabit tutulurken diğer iki parametre değiştirildi.



Şekil 4.65 Kalsiyum ve arkeozom ile gerçekleştirilen *in vitro* transfeksiyonlara ait β -Galaktosidaz aktiviteleri.

Ortamdaki pozitif yüklü iyon konsantrasyonunun artışı ile enzim aktivitesindeki artış paraleldir. 10 mM kalsiyum içeren örnekler 0.008 mU β -Galaktosidaz aktivitesi gösterirken 30 mM kalsiyum içerenler 0.016 mU ile aktivitelerini iki katına çıkartmıştır. 100 mM kalsiyum bulunan ortamda ise β -Galaktosidaz aktivitesi 0.031 mU/μg protein olarak tespit edilmiştir. Aynı koşullarda arkeozom hacmi iki katına çıkartıldığında 10 mM kalsiyum içeren örneklerin β -Galaktosidaz aktivitesinin iki kat arttığı görülmüştür. 30 mM kalsiyum eklenen örneklerin enzim aktivitesinde arkeozom miktarının artışına karşın belirgin bir değişim olmazken 100 mM kalsiyum klorür içeren örneklerin en yüksek değere ulaştığı ve 0.085 mU/μg protein enzi aktivitesi gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.65).

Bir başka deneyde ise, yine artan konsantrasyonlarda CaCl_2 çözeltisi kullanılarak farklı kompleksler oluşturuldu. Şekil 4.66’da görüldüğü gibi, ilk dört sütun arkeozomlarla Ca^{2+} iyonlarının oluşturduğu komplekse plazmit DNA katılmasıyla elde edilen β -Galaktosidaz aktivitelerine aitken, diğer dört sütunda Ca^{2+} iyonlarının plazmit DNA ile oluşturduğu komplekse arkeozomların eklenmesiye elde edilen β -Galaktosidaz aktivitelerini göstermektedir.

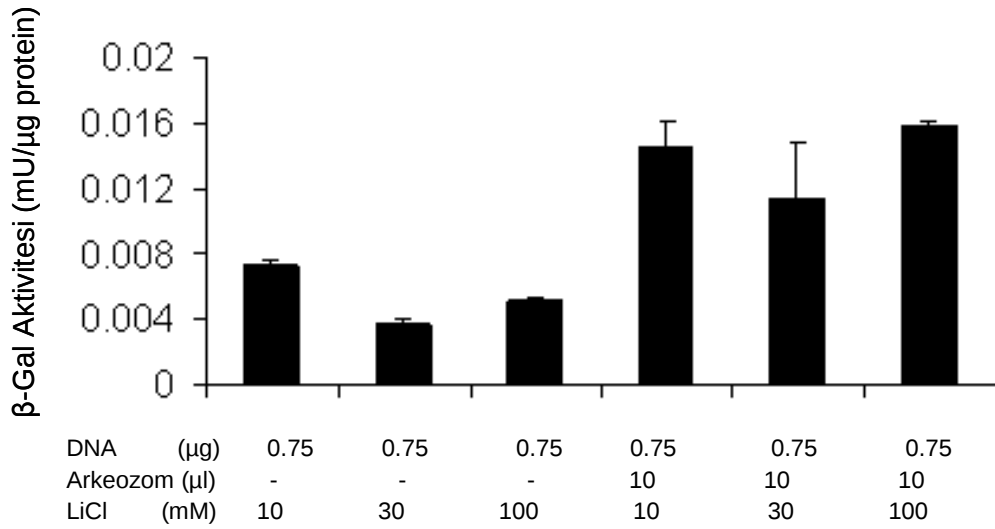


Şekil 4.66 Kalsiyumun arkeozomal transfeksiyona etkisini gösteren β -Galaktosidaz aktiviteleri.

Bu deneyde ulaşılan en yüksek enzim aktivitesi 0.27 mU/μg protein değerinde olup 100 mM CaCl_2 çözeltisi bulunan ortamda oluşan komplekslere aittir. 10 mM CaCl_2 çözeltisi bulunan her iki örnekte de 0.074 mU/μg protein değerinde enzim aktivitesi belirlendi. Bu durumda komplekslerin farklılığı enzim aktivitesine yansımamıştır. 20 mM CaCl_2 çözeltisi bulunan örneklerde ise Ca^{2+} iyonlarının plazmit DNA ile oluşturduğu komplekse arkeozomların eklenmesiye elde edilen aktivite diğer örneğin yaklaşık iki katıdır (0.079 ve 0.16 mU/μg protein). 50 mM’lık örneklerdeki β -Galaktosidaz aktiviteleri belirgin bir artış göstermemiştir. Sonuçlara göre, Ca^{2+} iyonları ile plazmit DNA tarafından oluşturulan komplekse katılan arkeozomların daha yüksek *in vitro* transfeksiyon etkinliğine sahip olduğu belirlenmiştir.

4.7.6 Li⁺ İyonları ve Arkeozomlar Kullanılarak Elde Edilen β -Galaktosidaz Aktiviteleri

Elektronegatif olmalarından dolayı, hazırlanan arkeozomların plazmit DNA'yı memeli hücrelerine transfer etmesini kolaylaştırmak amacıyla yararlandığımız pozitif yüklü iyonlardan biri de lityum iyonudur. Uygulanan prosedür kalsiyum deneylerine paralel olarak yapılmıştır. Lityum iyonunun taşıdığı pozitif (+1) yük nedeniyle negatif yüklü DNA ve negatif yüklü arkeozomlar arasında ligand görevi yaparak kompleks oluşturma potansiyelini arttırması beklenmektedir.



Şekil 4.67 Arkeozom ve lityumlu komplekslerin *in vitro* transfeksiyon etkinliğini gösteren β -Galaktosidaz aktiviteleri.

Plazmit DNA miktarı sabit tutulurken diğer iki parametre değiştirilerek gerçekleştirilen deney sonuçları, aseton presipitasyonu ile total lipidlerden ayrılan polar lipid fraksiyonu kullanılarak hazırlanan arkeozom formülasyonunun yüksek *in vitro* transfeksiyon verimliliği olduğunu gösterdi. Şekil 4.67'de görüldüğü gibi, arkeozomlu örneklerde her üç LiCl konsantrasyonunda da oldukça yüksek β -Galaktosidaz aktivitesi saptanmıştır (sırasıyla 0.014, 0.011, 0.016 mU/μg protein). Bu değerler LiCl'nin arkeozomsuz ortamda tek başına gerçekleştirdiği *in vitro* transfeksiyona ait β -Galaktosidaz aktivitesinden (0.007 mU/μg protein) daha yüksektir. Deney sonuçları arkeozomların varlığının *in vitro* transfeksiyon etkinliğini arttırdığını işaret etmektedir.

Literatür ve deneysel verilerin değerlendirilmesi:

Gen terapisi, genetik temeli bulunan hastalıkların tedavisinde stratejiler geliştirmek için kullanılan bir yöntemdir (Romano vd., 2000; Patil ve Burgess, 2003; Patil vd., 2005). Başarılı bir gen terapisi ilgili transgenleri içeren plazmitlerin hedeflenmiş hücelere transfeksiyonunu gerektirir (Luo ve Saltzman, 2000). Gen tedavisi çalışmalarında karşılaşılan en önemli sorun olan DNA moleküllerinin hedef hücelere ulaştırılması, bu alanda çalışan tüm araştırmacıları etkili bir yol bulmaya yönlendirmiştir. Çıplak DNA'nın hücelere girme yeteneğinin kısıtlı oluşu ve DNA'nın enzimatik degradasyona uğrama ihtimali nedeniyle DNA transfeksiyonu çoğunlukla viral veya viral olmayan vektörler kullanılarak gerçekleştirilir (Liu ve Huang, 2002). Lipozomlar gibi viral olmayan transfeksiyon sistemleri viruslardan daha fazla tercih edilir, çünkü bunlar immünojenik değildir, yapımı kolaydır ve endüstriyel üretim amacıyla ölçek büyütme kolaydır (Brown vd., 2001, Zhdanov vd., 2002). Lipozomal taşıma araçları morfoloji ve salınım karakteristiği olarak çeşitlilik sağlar; doku hedeflemede kullanılabilir ve plazmit DNA'yı degradatif nükleazların saldırılarından koruyabilir. 1987'de potansiyel taşıma sistemi olarak tanımlanmalarından beri (Felgner vd., 1987), DNA-katyonik lipid kompleksleri çeşitli hücre tiplerinde farklı DNA aktarım protokollerinde kullanılmıştır ve halen gen terapisinin klinik çalışmaları için araştırılmaktadır (Audouy vd., 2002). Bazı çalışmalar katyonik lipozomlara alternatif olarak anyonik lipozomal aktarım vektörlerinin kullanıldığını bildirmektedir (Fillion vd., 2001; Lakkaraju vd., 2001; Patil vd., 2004). Anyonik lipozomlar önceleri DNA'nın hücreler arası reseptör aracılı olmayan transportunda hücre yüzeyinin stimülasyonu için model olarak kullanılmaktaydı (Akhtar vd., 1991). Anyonik lipozom formülasyonları DNA aktarımı amacıyla oligonükleotidlerin hippokampal nöronlara (Lakkaraju vd., 2001) ve bakteri hücrelerine (Fillion vd., 2001) transferinde kullanılmıştır. Fakat bu araştırmalar, DNA'nın anyonik lipozom içine yeterli miktarda hapsedilememesi ve toksisite verilerinde yoksun olması nedeniyle kısıtlıdır (Fillion vd., 2001). Bu iki negatif yüklü türün arasındaki itici elektrostatik etkileşimden kaynaklanan yetersiz birleşmenin üstesinden gelmek için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır (Patil ve Rhodes, 2000; Perrie ve Gregoriadis, 2000). Biz de literatürdeki bu veriler ışığında çalışmamızda *Haloarcula hispanica*'dan ekstre edilen polar lipidler ile hazırladığımız arkeozomların DNA moleküllerinin memeli hücrelerine verilmesinde taşıyıcı olarak potansiyelini inceledik.

Eşsiz tetraeter lipid yapısı *Haloarcula hispanica*'ya zorlu çevresel şartlarda membran fonksiyonlarını koruyabilme avantajı sağlar. Geniş bir pH aralığında, eter bağları ester bağlarından daha karardır ve dallanmış metil grupları hem kristalleşmenin hem de membran

geçirgenliğinin azalmasına yardımcı olur. Alkil zincirlerinin yan dallara ayrılması oksidatif bozunmaya karşı kararlılığı artırır. Gliserol iskeletinin az rastlanır stereokimyası diğer organizmalar tarafından ortama salınan fosfolipazların saldırısına dayanıklılığı artırır, böylelikle organizma için yaşamsal değeri vurgular (Jacquemet vd., 2009).

Arkeal lipid formülasyonlarının oldukça yüksek kararlılıkta oksidatif stres, yüksek sıcaklık, alkali pH, fosfolipaz aktivitesi, safra tuzları ve serum ortamında bulunabildiği gösterilmiştir (Benvegna, 2005; Brard vd., 2007; Patel vd., 2000; Patel ve Sprott, 1999). Arkeal lipid özellikleri sayesinde arkeozomlar her sıcaklıkta oluşturulabilmektedir, böylece termal olarak kararsız bileşikler en kapsüle etmeyi sağlar. Hava/oksijen varlığında bozunmadan hazırlanabilir ve saklanabilirler (Patel ve Sprott, 1999; Patel vd., 1999). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar arkeozomların güvenli olduğunu, farelerde toksisite göstermediğini ispatlamıştır (Patel ve Sprott, 1999; Omri vd., 2003). Arkeozomların biyoyumluluğu ve yüksek kararlılıkları üretim aşamasında ve aşı, ilaç, gen aktarımı gibi biyoteknolojik uygulamalarda avantaj sağlar. Arkeozomlar, bu özelliklerinden ötürü DNA transferinde umut vaat etmektedirler.

Krishnan ve Sprott (2008), hazırladıkları arkeozomların sonikasyon işleminden sonra büyüklüklerini 100-150 nm olarak bildirmiştir. Li vd., (2010) ise hazırladıkları arkeozomların boyut büyüklüklerinin 250 nm'den küçük çaplarda ve net yüzey yüklerinin -36.2 mV olduğunu bildirmiştir.

Haloarcula hispanica lipidlerinden hazırladığımız arkeozomların zeta potansiyelleri değerlendirildi ve elektronegatif oldukları saptandı. Arkeozomların homojen dağılım gösteren küresel veziküller halinde bulundukları belirlendi. TEM ve AFM görüntüleme sistemleri ile yaptığımız çalışmalara göre, Lipofast Basic enjeksiyon sistemi ile boyutlandırması yapılan arkeozomların 100 nm ve daha küçük boyutlarda olduğu, boyutlandırma yapılmayanların ise daha büyük çaplarda veya agregat halinde bulundukları görüldü. Zeta-Sizer ölçümlerine göre Lipofast Basic enjeksiyon sistemi ile boyutlandırması yapılmayan boş arkeozomlar 350 nm civarında çapa sahipken arkeozom/plazmit DNA kompleksi 417 nm, plazmit DNA en kapsüle etmiş arkeozomlar ise en büyük boyuta sahip ve 490 nm çapındadır.

Omri vd., (2003) hayvan modeli üzerinde göstermiştir ki, nanometrik büyüklüklerdeki arkeozomların intravenöz ve oral aktarımı belirgin hiçbir toksisite göstermemiştir. *In vitro* transfeksiyon çalışmalarında toksik etkisine rastlanmayan arkeozomlar biyoyumludur. Arkeozomların (-) yükleri dezavantaj olarak görülmekle birlikte kararlı ve biyoyumlu lipozomlar oluşturmaları nedeniyle hazırlanan arkeozomların ilaç taşıma ve ilaç salınımı

alışmalarında aktif olarak kullanılabilmesi söz konusudur. Biz de çalışmamızda hazırladığımız arkeozomların +4°C’de aylarca saklanabildiği gözlemledik ve arkeozomların DOTAP gibi ticari ajanlara göre daha kararlı olduğu belirledik.

Arkeal lipidlerden elde edilen polar lipid fraksiyonu kullanılarak hazırlanan arkeozomların *in vitro* transfeksiyon etkinliği nötral arkeal lipidlere oranla daha yüksektir. Halofilik arkelerin polar lipidlerinden elde edilen lipozomların total lipidlerden hazırlanan lipozomlara göre daha dayanıklı olduğu bildirilmiştir (Krishnan vd., 2000).

Arkeozomların anyonik olmaları nedeniyle plazmit DNA ile kompleks oluşturma eğilimleri düşüktür, bu nedenle *in vitro* transfeksiyon deneylerinde DOTAP, polibren, kitozan, CaCl₂, LiCl gibi katyonik bileşiklerden yararlandık. Kullandığımız bu bileşikler içindeki en etkili ajan DOTAP’tır. DOTAP’ın ticari olarak satılan bir transfeksiyon reaktifi olmasına rağmen 1 µl DOTAP ile gerçekleştirilen *in vitro* transfeksiyon ile 1 µl arkeozom kullanılan *in vitro* transfeksiyon sonucu birbirine çok yakındır (0.036 ve 0.029 mU); fakat DOTAP miktarı 5 µl’ye çıkarıldığında *in vitro* transfeksiyon etkinliği aynı miktardaki arkeozomlara göre çok yüksek kalmaktadır (Şekil 4.62). DOTAP bir transfeksiyon reaktifidir ve tek başına kullanıldığında oldukça iyi sonuçlar vermektedir (Şekil 4.47 ve 4.48). DOTAP ile arkeozomların birlikte kullanılması ile benzer etkiler elde edilmiş olduğundan (Şekil 4.50) bu yöntem pahalı bir ürün olan DOTAP’ın daha az kullanılmasını sağlayabilir.

Polibren (Mumper vd., 1996) ve kitozan (Corsi vd., 2003) gibi polimerlerin DNA’ya bağlandığı ve memeli hücrelerinde değişen seviyelerde transfeksiyon etkinliği gösterdiği belirtilmiştir. Yine de, lipozomlar viral olmayan gen transferi vektörleri içinde en yaygın olarak kullanılanlardır (Singh ve Ariatti, 2006). Çalışmamızda polibrenin arkeozomlarla birlikte gösterdiği *in vitro* transfeksiyon etkinliğini inceledik. Polibrensiz ortamda arkeozomların tek başına gösterdiği etki polibren kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* transfeksiyonlardaki etkiye oldukça yakın değerdedir (Şekil 4.63).

Mansouri vd., (2004), yayınladıkları makalede kitozan gibi katyonik polimerlerin DNA ile kompleks oluşturabileceğini ve viral olmayan vektör olarak gen terapisinde kullanılabileceğini belirtmiştir. Kitozanın doğal ve toksik olmayan bir polisakkarit olması nedeniyle biyoyumlu ve biyobozunurdur ve DNA’yı DNaz aktivitesine karşı korur. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar, *in vitro* transfeksiyonda ortama arkeozom eklenmesi ile kitozanın transfeksiyon etkinliğinin yaklaşık 2 kat arttığını göstermiştir (Şekil 4.64).

Patil vd., (2004), DNA transfeksiyonu için anyonik lipozomal sistemlerden yararlanarak

yaptıkları çalışmada anyonik lipidlerin DNA aktarımı ve ekspresyon etkinliğini araştırmıştır. Çalışma, divalent Ca^{2+} aracılığıyla plazmit DNA ile fizyolojik orijinli lipidlerden oluşturulan kompleksin anyonik lipozomal taşıma vektörü olarak tasarlanmasını ve kullanılmasını içerir. Çalışmada anyonik lipozomların Ca^{2+} iyonları ile bağlanarak yüksek miktarda DNA'yı hapsedebildiği gösterilmiştir. Oluşturulan lipopleksler yeşil floresan proteini (GFP) plazmitini Çin hamster yumurtalık K-1 (CHO-K1) hücrelerine düşük seviyede toksisite ile taşımıştır.

Ca^{2+} gibi divalent katyonların anyonik lipozomal sistemlerde füzyonu indüklemeye mekanizması (-) yüklü lipidin yüzey yükünün nötralizasyonu ile ilişkilidir (Tilcock vd., 1984). Yüzey yükünün nötralizasyonu, yüklü lipid türlerine göre daha az etkili bir uç grubun oluşmasına yol açar. Redüklenmiş yüzey yükü interveziküler elektrostatik çekimi de redükleyerek füzyon için gerekli aggregasyon basamağını organize eder. Bu olay yük nötralizasyon etkisi olarak bilinir. Anyonik lipopleksler, divalent Ca^{2+} köprüleri aracılığıyla plazmit DNA iskeletindeki fosfatlar ile lipozomların yüzeylerindeki anyonik rezidülerin etkileşimi sonucu oluşur. Ca^{2+} artışı, lipozomlarla kompleks oluşturan DNA miktarını ve transfeksiyon etkinliğini arttırabilir (Tari vd., 1994).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar göstermektedir ki, Ca^{2+} miktarının artışı arkeozom aracılı *in vitro* transfeksiyonu arttırmaktadır ve en fazla artış 100 mM CaCl_2 konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. Arkeozom miktarının iki katına çıkartılması ve 100 mM CaCl_2 ile birlikte kullanılması enzim aktivitesinin yaklaşık 3 kat artmasına neden oldu. Kompleks oluşumu Ca^{2+} 'lu ortamda kitozan ile elde edilen sonuçlar ile paralellik gösterdi.

Lityum ile yapılan çalışmalar da önceki sonuçları destekler nitelikte olup polar lipid fraksiyonunun daha yüksek *in vitro* transfeksiyon etkinliği olduğunu gösterdi. Arkeozomların ortama eklenmesi, LiCl 'nin tek başına gösterdiği transfeksiyon etkinliğinin iki katından fazla transfeksiyon etkinliği sağladı.

Canlı hücreler söz konusu olduğundan transfeksiyon çalışmaları oldukça zahmetli ve uzun zaman alan çalışmalardır. Sonuçların verimliliği açısından *in vitro* transfeksiyon deneylerine devam edilecektir, ayrıca *Haloarcula hispanica*'dan hazırlanan arkeozomların lipid karakterizasyonu merak konusudur.

Ticari lipozomların düşük pH ve safra tuzlarına karşı zayıf kararlılık sergilemesi, lipozomların özellikle oral yoldan verilmesinde aşılması gereken başlıca sorundan biridir. Li vd., (2010) peptid ilaçlarının ağız yoluyla verilmesinde arkeozomların taşıyıcı olarak kullanılması üzerine yaptıkları çalışmada arkeozomların ticari lipozomlardan daha kararlı olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda kullandığımız halofilik arkelerden elde edilen arkeozomlarda geleneksel lipozomlardaki fosfat esterleri yerine eter bağlı fosfogliseridlere sahip olmaları onları daha kararlı yapılar haline getirmektedir. Bu nedenle arkeozomlar sadece DNA molekülleri için değil aynı zamanda aşı olarak kullanılacak çeşitli peptid antijenlerin taşınmasında da önemli bir potansiyele sahiptir.

KAYNAKLAR

Adams, M.W.W. ve Kelly, R.M., (1995), "Enzymes from Microorganisms in Extreme Environments", C&EN, 73: 32–42.

Akhtar, S., Basu, S., Wickstrom, E. ve Juliano, R.L., (1991), "Interactions of Antisense DNA Oligonucleotide Analogs with Phospholipid Membranes (Liposomes)", *Nucleic Acids Res.*, 19: 5551-5559.

Allen, T.M., (2000), Solving Drug Delivery Problems with Liposomal Carriers in Controlled Drug Delivery, Designing Technologies for Future, Park, K. ve Mersny, R.J. (Eds) American Chemical Society, Washington.

Andreason, G.L. ve Evans, G.A., (1988), "Introduction and Expression of DNA Molecules in Eukaryotic Cells by Electroporation, Biotechniques, 6 (7): 650–660.

Audouy, S.A., de Leij, L.F., Hoekstra, D. ve Molema, G., (2002), "In Vivo Characteristics of Cationic Liposomes as Delivery Vectors for Gene Therapy", *Pharm Res.*, 19: 1599-1605.

Auerbach, A.B., (2004), "Production of Functional Transgenic Mice by DNA Pronuclear Microinjection", *Acta Biochim. Pol.*, 51: 9 – 31.

Bangham, A.D. ve Horne, R.W., (1964), "Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface Active Agents as Observed in the Electron Microscopy", *Molecular Biology*, 8: 660-668.

Bao, S., Thrall, B.D. ve Miller, D.L., (1997), "Transfection of a Reporter Plasmid into Cultured Cells by Sonoporation in vitro", *Ultrasound Med. Biol.*, 23 (6): 953–959.

Barenholz, Y., (2001), "Liposome Application: Problems and Prospects", *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 6: 66–77.

Benvegnu, T., Brard, M. ve Plusquellec, D., (2004), "Archaeobacterial Bipolar Lipid Analogues: Structure, Synthesis and Lyotropic Properties", *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8: 469-479.

Benvegnu, T., Rethore, G., Brard, M., Richter, W. ve Plusquellec, D., (2005), "Archaeosomes Based on Novel Synthetic Tetraether-Type Lipids for the Development of Oral Delivery Systems", *Chem. Commun.*, 44: 5536–5538.

Benvegnu, T., Lemiegre, L. ve Cammas-Marion, S., (2008), "Archaeal Lipids: Innovative Materials for Biotechnological Applications", *Eur. J. Org. Chem.*, 28: 4725–4744.

Bertrand, J. C., Almallah, M., Acquaviva, M. ve Mille, G., (1990), "Biodegradation of Hydrocarbons by an Extremely Halophilic Archaeobacterium", *Letters in Applied Microbiology*, 11: 260-263.

Berzina, T.S., Troitsky, V.I., Vakula, S., Riccio, A., Gambacorta, A., De Rosa, M., Gobbi, L., Rustichelli, F., Erokhin, V.V. ve Nicolini, C., (1995), “Langmuir-Blodgett Multilayers of Native and Synthetic Glycerol-Dialkylglycerol Tetraether Derivatives from *Archaea*”, *Mater. Sci. Eng.*, 3: 23–31.

Birbir, M., Ogan, A., Calli, B. ve Mertoğlu, B., (2004), “Enzymatic Characteristics of Extremely Halophilic Archaeal Community in Tuzkoy Salt Mine, Turkey”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 613-621.

Bligh, E.G., and Dyer, W.J., (1959), “A Rapid Method For Total Lipid Extraction and Purification”, *Can.J.Biochem.Physiol.*, 37: 911-917.

Bochot, A., Fattal, E., Gulik, A., Couarraze, G. Ve Couvreur, P., (1998), “Liposomes Dispersed within a Thermosensitive Gel: A New Dosage Form for Ocular Delivery of Oligonucleotides”, *Pharmaceutical Res.*, 15: 1364-1369.

Bouille, P., Subra, F., Geoulaouic, H., Carteau, S. ve Auclair, C., (1995), “Impairment of Moloney Murine Leukemia Virus Integration in a Cell Line Underexpressing DNA Topoisomerase II”, *Cancer Research*, 55: 3211-3217.

Brard, M., Laine, C., Rethore, G., Laurent, I., Neveu, C., Lemiegre, L. ve Benvegna, T., (2007), “Synthesis of Archaeal Bipolar Lipid Analogues: A Way to Versatile Drug/Gene Delivery Systems”, *J. Org. Chem.*, 72: 8267–8279.

Brenner, D. J., Staley, J. T. ve Krieg, N. R., (2001), Classification of Prokaryotic Organisms and The Concept of Bacterial Speciation In: *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology V.I, The Archaea and Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*, Garrity, G. M. (Man. Ed.), 2nd Ed., Springer, New York.

Brown, M.D., Schatzlein, A.G. ve Uchegbu, I.F., (2001), “Gene Delivery with Synthetic (Non Viral) Carriers”, *Int J Pharm.*, 229(1-2): 1-21.

Capecchi, M.R., (1980), “High Efficiency Transformation by Direct Microinjection of DNA into Cultured Mammalian Cells”, *Cell*, 22: 479–488.

Chaga, G, Porath, J. ve Illéni, T., (1993), “Isolation and Purification of Amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*”, *Biomedical Chromatography*, 7: 256-261.

Chang, D.C., (1992), Structure and Dynamics of Electric Field-Induced Membrane Pores as Revealed by Rapid-Freezing Electron Microscopy, in: D.C. Chang, B.M. Chassy, J.A. Saunders, A.E. Sowers (Eds.), *Guide to Electroporation and Electrofusion*, Academic Press, Inc., San Diego.

Choquet, C.G., Patel, G.B., Beveridge, T.J. ve Sprott, G.D., (1992), “Formation of Unilamellar Liposomes from Toatal Polar Lipid Extracts of Methanojens”, *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (9): 2894-2900.

- Chrystie, I.L., (1996), Electron Microscopy, Virology Methods Manual, Academic Press, London.
- Chuah, M.K., Collen, D. ve VandenDriessche, T., (2003), "Biosafety of Adenoviral Vectors", Curr. Gene Ther., 6: 527–543.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. ve Hsu, L., (1972), "Nonchromosomal Antibiotic Resistance Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 2110-2114.
- Coral, G., (2000), Lipozom Protoplast Elektrofüzyon Metoduyla *Aspergillus niger* Kökenli Glikoamilaz Geninin *Saccharomyces cerevisiae* Hücrelerine Aktarılması ve Ekspresyonu, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H. ve Falkow, S., (1996), "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)", Gene, 173: 33-8.
- Corsi, K., Chellat, F., Yahia, L. ve Fernandes, J.C., (2003), "Mesenchymal Stem Cells, MG63 and HEK293 Transfection Using Chitosan–DNA Nanoparticles", Biomaterials, 24: 1255–1264.
- Crommelin, D.J.A. ve Storm, G., (1987), "Liposomes as Drug Carrier Systems in Therapy: Their Potential and Limitations", International Pharmacy Journal, 1: 179-181.
- Daniel, R.M., (2000), "Biomolecular Stability and Life at High Temperatures", Cell. Mol. Life Sci., 57: 250–264.
- Danson, M. ve Hough, D. W., (1997), "The Structural Basis of Protein Halophilicity", Comp. Biochem. Physiol., 117A (3): 307-312.
- Dante, S., De Rosa, M., Maccioni, E., Morana, A., Nicolini, C., Rustichelli, F., Troitsky, V.I. ve Yang, B., (1995), "Thermal Stability of Bipolar Lipid Langmuir Blodgett Films by X-ray Diffraction", MCLC, 262: 191–207.
- Daştan, T., (2003), Kitozan Mikrokürelerden DNA Serbestleşmesinin in vitro Koşullarda İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- De Rosa, M., Esposito, E., Gambacorta, A., Nicolaus, B. ve Bu'Lock, J.D., (1980), "Effects of Temperature on Ether Lipid Composition of *Caldariella acidophila*", Phytochemistry, 19: 827–831.
- De Rosa, M., Gambacorta, A. ve Gliozzi, A., (1986), "Structure, Biosynthesis, and Physicochemical Properties of Archaeobacterial Lipids", Microbiol. Rev. 50: 70–80.
- De Rosa, M., Morana, A., Riccio, A., Gambacorta, A., Trincone, A. ve Incani, O., (1994), "Lipids of the Archaea: A New Tool for Bioelectronics", Biosens. Bioelectron., 9: 669–675.

- De Rosa, M., (1996), "Archaeal Lipids: Structural Features and Supramolecular Organization", *Thin Solid Films*, 284–285: 13–17.
- Dokka, S., Toledo, D., Shi, X., Ye, J. ve Rojanasakul, Y., (2000), "High Efficiency Gene Transfection of Macrophages by Lipoplexes", *Int. J. Pharm.*, 206: 97-104.
- Dussault, H. P., (1955), "An Improved Technique For Staining Red Halophilic Bacteria", *J. of Bacteriol.*, 70: 484-485.
- Eguchi, T., Nishimura, Y. ve Kakinuma, K., (2003), "Importance of The Isopropylidene Terminal of Geranylgeranyl Group for The Formation of Tetraether Lipid in Methanogenic Archaea", *Tetrahedron Lett.*, 44: 3275–3279.
- Eisenbraun, M.D., Fuller, D.H. ve Haynes, J.R., (1993), "Examination of Parameters Affecting the Elicitation of Humoral Immune Responses by Particle Bombardment-Mediated Genetic Immunization", *DNA Cell Biol.*, 12 (9): 791–797.
- Ertan, H. ve Arda, N., (1999), *Proteinlerin İzolasyonu ve Saflaştırılması, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Emerson, D., Chauhan, S., Oriel, P. ve Breznak, J. A., (1994), "*Haloferax* sp. D1227, A Halophilic Archaeon Capable of Growth on Aromatic Compounds", *Arch. Microbiol.*, 161: 445-452.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., (1987), "Lipofection: A Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 7413-7417.
- Fillion, P., Desjardins, A., Sayasith, K. ve Lagace, J., (2001), "Encapsulation of DNA in Negatively Charged Liposomes and Inhibition of Bacterial Gene Expression with Fluid Liposome-Encapsulated Antisense Oligonucleotides", *Biochim Biophys Acta*, 1515: 44-54.
- Forterre, P., Benachenhou-Lahfa, N., Confalonieri, F., Duguet, M., Elie, C. ve Labedan, B., (1992), "The Nature of the Last Universal Ancestor and the Root of the Tree of Life, Still Open Questions", *Biosystems*, 28: 15–32.
- Freisleben, H.J., Bormann, J., Litzinger, D.C., Lehr, F., Rudolph, P., Schatton, W. ve Huang, L., (1995), "Toxicity and Biodistribution of Liposomes of the Main Phospholipid from the Archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum* in Mice", *J. Liposome Res.*, 5: 215–223.
- Fresta, M., Wehrli, E. ve Puglisi, G., (1995), "Enhanced Therapeutic Effect of Cytidine-5'-Diphosphate Choline When Associated with GM1 Containing Small Liposomes as Demonstrated in Rat Ischemia Model", *Pharmaceutical Research*, 12: 1769-1774.
- Gallo-Penn, A.M., Shirley, P.S., Andrews, J.L., Tinlin, S., Webster, S., Cameron, C., Hough, C., Notley, C., Lillicrap, D., Kaleko, M. ve Connelly, S., (2001), "Systemic Delivery of an Adenoviral Vector Encoding Canine Factor VIII Results in Short-Term Phenotypic Correction, Inhibitor Development, and Biphasic Liver Toxicity in Hemophilia A Dogs",

Blood 97: 107– 113.

Gambacorta, A., Gliozzi, A. ve De Rosa, M., (1995), “Archaeal Lipids and Their Biotechnological Applications”, *World J. Microbiol. Biotechnol*, 11: 115–131.

Gehl, J., (2003), “Electroporation: Theory and Methods, Perspectives for Drug Delivery, Gene Therapy and Research”, *Acta Physiol. Scand.*, 177 (4): 437– 447.

Gliozzi, A., Rolandi, R., De Rosa, M. ve Gambacorta, A., (1982), “Artificial Black Membranes from Bipolar Lipids of Thermophilic Archaeobacteria”, *Biophys. J.*, 37: 563–566.

Gliozzi, A., Rolandi, R., De Rosa, M. ve Gambacorta, A., (1983), “Monolayer Black Membranes from Bipolar Lipids of Archaeobacteria and Their Temperature Induced Structural Changes”, *J. Membr. Biol.*, 75: 45–56.

Gliozzi, A., Robello, M., Fittabile, L., Relini, A. ve Gambacorta, A., (1996), “Valinomycin Acts as a Channel in Ultrathin Lipid Membranes”, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1283: 1–3.

Gliozzi, A., Relini, A. ve Chong, P.L.-G., (2002), “Structure and Permeability Properties of Biomimetic Membranes of Bolaform Archaeal Tetraether Lipids”, *J. Membr. Sci.*, 206: 131–147.

Goo, Y. A., Yi, E. C., Baliga, N. S., Tao, W. A., Pan, M., Aebersold, R., Goodlett, D. R., Hood, L. ve Ng, W. V., (2003), “Proteomic Analysis of An Extreme Halophilic Archaeon, *Halobacterium* sp. NRC-1”, *Molecular and Cellular Proteomics*, 2: 506- 524.

Goodwin, S.C., Bittner, C.A., Peterson, C.L. ve Wong, G., (2001), “Singledose Toxicity Study of Hepatic Intra-Arterial Infusion of Doxorubicin Coupled to a Novel Magnetically Targeted Drug Carrier”, *Toxicol. Sci.*, 60 (1): 177–183.

Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. ve Ruddle, F.H., (1980), “Genetic Transformation of Mouse Embryos by Microinjection of Purified DNA”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77: 7380–7384.

Gordon, J.W. ve Ruddle, F.H., (1983), “Gene Transfer into Mouse Embryos: Production of Transgenic Mice by Pronuclear Injection”, *Methods Enzymol.*, 101: 411–433.

Graether, O. ve Arigoni, D., (1995) “Detection of Regioisomeric Macrocyclic Tetraethers in the Lipids of *Methanobacterium thermoautotrophicum* and Other Archaeal Organisms”, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 4: 405–406.

Grant, W. D, Gemmell, R.T. ve McGenity, T. J., (1998), “Halobacteria: The Evidence For Longevity”, *Extremophiles*, 2: 279-287.

Grant, W. D., Kamekura, M., McGenity, T. J. ve Ventosa, A., (2001), Order I. Halobacteriales In: *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology V.I, The Archaea and Deeply Branching and*

Phototrophic Bacteria, Garrity, G. M. (Man. Ed.), 2nd Ed., Springer, New York.

Gupta, P.K. ve Hung, C.T., (1993), Magnetically Controlled Targeted Chemotherapy, in: N. Willmott, J. Daly (Eds.), Microspheres and Regional Cancer Therapy, CRC Press, Boca Raton, USA.

Gutierrez, M. C., Garcia, M. T., Ventosa, A., Nieto, J. J. ve Ruiz-Berraquero, F., (1986) "Occurrence of Megaplazmits in Halobacteria", J. of Applied Bacteriology, 61: 67-71.

Gürsoy, A., (1989), Lipozomlar Kontrollü İlaç Serbestleştirilen Sistemler, Ada Ofset, İstanbul.

Gürsoy, A., (2002), Lipozomlar Kontrollü Salım Sistemleri, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, İstanbul.

Hartmann, R., Sickinger, H., D. ve Oesterhelt, D., (1980), "Anaerobic Growth of Halobacteria", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 (6): 3821-3825.

Hebert, E., (2003), "Improvement of Exogenous DNA Nuclear Importation by Nuclear Localization Signal-Bearing Vectors: A Promising Way for Non-Viral Gene Therapy", Biol. Cell, 95 (2): 59– 68.

Heller, R., Jaroszeski, M., Atkin, A., Moradpour, D., Gilbert, R., Wands, J. ve Nicolau, C., (1996), "In vivo Gene Electroinjection and Expression in Rat Liver", FEBS Lett., 389 (3): 225–228.

Hezayen, F. F., Rehm, B. H. A., Eberhardt, R. ve Steinbüchel, A., (2000), "Polymer Production by Two Newly Isolatedremely Halophilic Archaea: Application of A Novel Corrosion-Resistant Bioreactor", Appl. Microbiol. Biotechnol., 54: 319-325.

Hofmann, A., Zakhartchenko, V., Weppert, M., Sebald, H., Wenigerkind, H., Brem, G., Wolf, E. ve Pfeifer, A., (2004), "Generation of Transgenic Cattle by Lentiviral Gene Transfer into Oocytes", Biol. Reprod., 71 (2): 405–409.

Hogset, A., Prasmickaite, L., Hellum, M., Engesaeter, B.O., Olsen, V.M., Tjelle, T.E., Wheeler, C.J. ve Berg, K., (2002), "Photochemical Transfection: A Technology for Efficient Lightdirected Gene Delivery", Somat. Cell Mol. Genet., 27 (1–6): 97– 113.

Horikoshi, K., Aono, R. ve Nakamura, S., (1993), "The Triangular Halophilic Archaeobacterium *Haloarcula japonica* strain TR-1", Experientia, 49: 497-502.

Hough, D. W. ve Danson, M. J., (1989), "Archaeobacteria: Ancient Organisms With Commercial Potential", Letters in Applied Microbiolgy, 9: 33-39.

Houk, B.E., Hochhaus, G. ve Hughes, J.A., (1999), "Kinetic Modeling of Plazmit DNA Degradation in Rat Plasma", AAPS PharmSci, 3: E9.

Izotova, L. S., Strongin, A. Y., Chekulaeva, L. N., Sterkin, V. E., Ostoslavskaya, V. I.,

- Lyublinskaya, L. A., Timokhina E. A. ve Stepanov, V. M., (1983), "Purification and Properties of Serine Protease from *Halobacterium halobium*", J. of Bact., 155 (2): 826-830.
- Jacquemet, A., Barbeau, J., Lemiegre, L. ve Benvegna, T., (2009), "Archaeal Tetraether Bipolar Lipids: Structures, Functions and Applications", Biochimie, 91: 711–717.
- Johnsen, U., Selig, M., Xavier, K. B., Santos, H. ve Schönheit, P., (2001), "Different Glycolytic Pathways For Glucose and Fructose in the Halophilic Archaeon *Halococcus saccharolyticus*", Arch. Microbiol., 175: 52-61.
- Jones, . G., Ewing, C. M. ve Melvin, M. V., (1981), "Biotechnology of Solar Saltfield", Hidrobiologia, 82: 391-406.
- Kates, M., (1991), "Archaeobacterial Lipids: Structure, Biosynthesis and Function", Biochem. Soc. Symp., 51–72.
- Kates, M., (1993), Membrane Lipids of Extreme Halophiles: Biosynthesis, Function And Evolutionary Significans. In Halophilic Bacteria, Part II. Experientia, 49; 1027- 1036. Edited by R. H. Vreeland. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Kim, H.J., Greenleaf, J.F., Kinnick, R.R., Bronk, J.T. ve Bolander, M.E., (1996), "Ultrasound-Mediated Transfection of Mammalian Cells", Hum. Gene Ther., 7 (11): 1339–1346.
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R. ve Sanford, J.C., (1987), "High-Velocity Microprojectiles for Delivering Nucleic Acids into Living Cells", Nature, 327: 70–73.
- Koga, Y. ve Morii, H., (2007), "Biosynthesis of Ether-Type Polar Lipids in Archaea and Evolutionary Considerations", Microbiol. Mol. Biol. Rev., 71: 97–120.
- Krishnan, L., Dicaire, C.J., Patel, G.B. ve Sprott, G.D., (2000), "Archaeosome Vaccine Adjuvants Induce Strong Humoral, Cell-Mediated, and Memory Responses: Comparison to Conventional Liposomes and Alum", Infect. Immun., 68: 54–63.
- Krishnan, L., Sad, S., Patel, G.B. ve Sprott, G.D., (2000), "Archaeosomes Induce Long-Term CD8+ Cytotoxic T Cell Response to Entrapped Soluble Protein by the Exogenous Cytosolic Pathway, In the Absence Of CD4 T Cell Help", J. Immunol., 165: 5177–5185.
- Krishnan, L., Sad, S., Patel, G.B. ve Sprott, G.D., (2003), "Archaeosomes Induce Enhanced Cytotoxic T Lymphocyte Responses to Entrapped Soluble Protein in the Absence of Interleukin 12 and Protect Against Tumor Challenge", Cancer Res., 63: 2526–2534.
- Krishnan, L. ve Sprott, G.D., (2008), "Archaeosome Adjuvants: Immunological Capabilities and Mechanism(s) of Action", Vaccine, 26: 2043–2055.
- Krotz, F., Sohn, H.Y., Gloe, T., Plank, C. ve Pohl, U., (2003), "Magnetofection Potentiates Gene Delivery to Cultured Endothelial Cells", J. Vasc. Res., 40 (5): 425–434.

- Krotz, F., de Wit, C., Sohn, H.Y., Zahler, S., Gloe, T., Pohl, U. ve Plank, C., (2003), "Magnetofection - A Highly Efficient Tool for Antisense Oligonucleotide Delivery in vitro and in vivo", *Molec. Ther.*, 7 (5 Pt. 1): 700– 710.
- Kurata, S., Tsukakoshi, M., Kasuya, T. ve Ikawa, Y., (1986), "The Laser Method for Efficient Introduction of Foreign DNA into Cultured Cells", *Exp. Cell Res.*, 162 (2): 372– 378.
- Kushner, D. J., (1985), The Halobacteriaceae. In: C.R. Woese and R. S. Wolfe (Eds), *The Bacteria-A Treatise on Structure and Function*, Archaeobacteria, Academic Press, Orlando.
- Kut, E., (2000), İzonasid ve Rifampisini Beraber İçeren Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması ve Özelliklerinin Türev Spektrofotometresi Yöntemi ile İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Laine, C., Mornet, E., Lemiegre, L., Montier, T., Cammas-Marion, S., Neveu, C., Carmoy, N., Lehn, P. ve Benvegna, T., (2008), "Folate-Equipped Pegylated Archaeal Lipid Derivatives: Synthesis and Transfection Properties", *Chem. Eur. J.*, 14: 8330–8340.
- Lakkaraju, A., Dubinsky, J.M., Low, W.C. ve Rahman, Y-E., (2001), "Neurons are Protected from Excitotoxic Death By p53 Antisense Oligonucleotides Delivered in Anionic Liposomes", *J Biol Chem.*, 276: 32000-32007.
- Lechardeur, D., Sohn, K.J., Haardt, M., Joshi, P.B., Monck, M., Graham, R.W., Beatty, B., Squire, J., O'Brodivich, H. ve Lukacs, G.L., (1999), "Metabolic Instability of Plazmit DNA in the Cytosol: A Potential Barrier to Gene Transfer", *Gene Ther.*, 6: 482– 497.
- Lee, Y., Koo, H., Lim, Y., Lee, Y., Mo, H. ve Park, J.S., (2004), "New Cationic Lipids for Gene Transfer with High Efficiency and Low Toxicity: T-Shape Cholesterol Ester Derivatives", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(10): 2637-41.
- Li, Z., Chen, J., Sun, W. ve Xu, Y., (2010), "Investigation of Archaeosomes as Carriers for Oral Delivery of Peptides", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394: 412–417.
- Liang, X., Mao, G. ve Ng, K.Y.S., (2005), "Effect of chain lengths of PEO–PPO–PEO on small unilamellar liposome morphology and stability: an AFM investigation", *Journal of Colloid and Interface Science*, 285: 360–372.
- Lichtenberg, D. ve Barenholz, Y., (1988), "Liposomes: Preparation, Characterization, and Preservation", *Meth. Biochem. Anal.*, 33: 337–462.
- Lillo, J. G. ve Rodriguez-Valera, F., (1990), "Effects of Culture Conditions on Poly (B-Hydroxybutiric Acid) Production by *Haloferax mediterranei*", *Appl. and Environ. Microbiol.*, 56 (8): 2517-2521.
- Lin, M.T., Pulkkinen, L., Uitto, J. ve Yoon, K., (2000), "The Gene Gun: Current Applications in Cutaneous Gene Therapy", *Int. J. Dermatol.*, 39 (3): 161–170.

- Litchfield, C. D., (2002), "Halophiles", *J. Industrial Microbiol. and Biotechnol.*, 28: 21-22.
- Liu, F. ve Huang, L., (2002), "Development of Non-Viral Vectors for Systemic Gene Delivery", *J Control Release.*, 78(1-3): 259-266.
- Loehr, B.I., Willson, P., Babiuk, L.A. ve Littel-van den Hurk, V.D., (2000), "Gene Gun-Mediated DNA Immunization Primes Development of Mucosal Immunity Against Bovine Herpesvirus1 in Cattle", *J. Virol.*, 74 (13): 6077–6086.
- Lu, B., Scott, G. ve Goldsmith, L.A., (1996), "A Model or Keratinocyte Gene Therapy: Preclinical and Therapeutic Considerations", *Proc. Assoc. Am. Physicians*, 108 (2): 165– 172.
- Luo, D. ve Saltzman, W.M., (2000), "Synthetic DNA Delivery Systems", *Nat Biotechnol.*, 18: 33-37.
- Maccioni, E., Mariani, P., Rustichelli, F., Delacroix, H., Troitsky, V., Riccio, A., Gambacorta, A. ve De Rosa, M., (1995), "X-ray Diffraction Structural Analysis of Langmuir–Blodgett Films Using a Pattern Recognition Approach", *Thin Solid Films*, 265: 74–83.
- Mancinelli, R. L. ve Hochstein L. I., (1986), "The Occurrence of Denitrification in Extremely Halophilic Bacteria", *FEMS Microbiol. Letters*, 35: 55-58.
- Mansouri, S., Lavigne, P., Corsi, K., Benderdour, M., Beaumont, E. ve Fernandes, J. C., (2004), "Chitosan-DNA Nanoparticles as Non-Viral Vectors in Gene Therapy: Strategies to Improve Transfection Efficacy", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57: 1–8.
- Marcusson, E.G., Bhat, B., Manoharan, M., Bennett, C.F. ve Dean, N.M., (1998), "Phosphorothioate Oligodeoxyribonucleotides Dissociate from Cationic Lipids Before Entering The Nucleus", *Nucleic Acids Res.*, 26 (8): 2016– 2023.
- Margesin, H. ve Schinner, F., (2001), "Potential of Halotolerant and Halophilic Microorganisms for Biotechnology", *Extremophiles*, 5: 73-83.
- Mehier-Humbert, S. ve Guy, R.H., (2005), "Physical Methods for Gene Transfer: Improving The Kinetics of Gene Delivery into Cells", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57: 733-753.
- Meister, A. ve Blume, A., (2007), "Self-Assembly of Bipolar Amphiphiles", *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 12: 138–147.
- Moghimi, S.M. ve Patel, H.M., (1992), "Opsonophagocytosis of Liposomes by Peritoneal Macrophages and Bone Marrow Reticuloendothelial Cells", *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, 1135: 269–274.
- Morin, J. G., and Hastings, J. W. (1971), "Energy transfer in a bioluminescent system," *J.*

Cell. Physiol., 77: 313–318.

Muller, S., Pfannmoller, M., Teuscher, N., Heilmann, A. ve Rothe, U., (2006), “New Method for Surface Modification of Nanoporous Aluminum Oxide Membranes Using Tetraether Lipid”, J. Biomed. Nanotechnol., 2: 16–22.

Mumper, R.J., Duguid, J.G., Anwer, K., Barron, M.K., Nitta, H. ve Rolland, A.P., (1996), Polyvinyl Derivatives as Novel Interactive Polymers for Controlled Gene Delivery to Muscle”, Pharm. Res., 13: 701–709.

Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. ve Hofschneider, P.H., (1982), “Gene Transfer into Mouse Lyoma Cells by Electroporation in High Electric Fields”, EMBO J., 1 (7): 841–845.

Niculescu-Duvaz, D., Heyes, J. ve Springer, C.J., (2003), “Structure–Activity Relationship in Cationic Lipid Mediated Gene Transfection”, Curr. Med. Chem., 10 (14): 1233– 1261.

Nishi, T., Yoshizato, K., Yamashiro, S., Takeshima, H., Sato, K., Hamada, K., Kitamura, I., Yoshimura, T., Saya, H., Kuratsu, J. ve Ushio, Y., (1996), “High-Efficiency in vivo Gene Transfer Using Intraarterial Plazmit DNA Injection Following in vivo Electroporation”, Cancer Res., 56 (5): 1050–1055.

Omri, A., Agnew, B.J. ve Patel, G.B., (2003), “Short-term Repeated-Dose Toxicity Profile of Archaeosomes Administered to Mice via Intravenous and Oral Routes”, Int. J. Toxicol., 22: 9–23.

Oren, A. ve Trüper, H. G., (1990), “Anaerobic Growth of Halophilic Archaeobacteria by Reduction of Dimethylsulfoxide and Trimethylamine N-oxide”, FEMS Microbiol. Letters, 70: 33-36.

Oren, A., Duker, S. ve Ritter, S., (1996), “The Polar Lipid Composition of Walsby’s Square Bacterium”, FEMS Microbiol. Letters, 138: 135-140.

Oren, A., Ventosa, A. ve Grant, W.D., (1997), “Proposed Minimal Standarts For Description of New Taxa in the Order *Halobacteriales*”, Int. J. of Syst. Bacteriol., 47 (1): 233-238.

Oren, A., (1999), “Bioenergetic Aspects of Halophilism”, Microbiol. And Molecul. Biology Rev., 63(2): 334-348.

Oren, A. ve Litchfield, D. C., (1999), “A Procedure for the Enrichment and Isolation of *Halobacterium*”, FEMS Microbiology Letters, 173: 353-358.

Oren, A., (2000), “Biological processes in the Dead sea as influenced by short-term and long-term salinity changes”, Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol., 55: 531-542.

Oren, A., (2001), The Order Halobacteriales. In: The prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identifications, Applications, 3rd. Edt.,

(Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E., Eds). Springer-Verlag, New York (electronic publication).

Özcan, B., (2004), Türkiye’den Halofilik Arkebakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü, Doktora Tezi, Ankara.

Palumbo, G., Caruso, M., Crescenzi, E., Tecce, M.F., Roberti, G. ve Colasanti, A., (1996), “Targeted Gene Transfer in Eucaryotic Cells by Dye-Assisted Laser Optoporation”, J. Photochem. Photobiol., B Biol., 36 (1): 41–46.

Parolis, H., Parolis, L. A. S., Boan, I. F., Rodriguez-Valera, F., Widmalm, G., Manca, M. C., Jansson, P. E. ve Sutherland, I. W., (1996), “The Structure of the Exopolysaccharide Produced by The Halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei* Strain R4 (ATCC 33500)”, Carbohydr. Res., 295: 147-156.

Patel, G.B. ve Sprott, G.D., (1999), “Archaeobacterial Ether Lipid Liposomes (Archaeosomes) As Novel Vaccine and Drug Delivery Systems”, Crit. Rev. Biotechnol., 19: 317–357.

Patel, G.B., Agnew, B.J., Jarrell, H.C. ve Sprott, G.D., (1999), “Stability of Liposomes Prepared from the Total Polar Lipids of *Methanosarcina mazei* is Affected by the Specific Salt Form of the Lipids”, J. Liposome Res., 9: 229–245.

Patel, G.B., Agnew, B.J., Deschatelets, L., Fleming, L.P. ve Sprott, G.D., (2000), “In vitro Assessment of Archaeosome Stability for Developing Oral Delivery Systems”, Int. J. Pharm., 194: 39–49.

Patel, G.B. ve Wangxue, C., (2005), “Archaeosome Immunostimulatory Vaccine Delivery System”, Curr. Drug Deliv., 2: 407–421.

Patil, S.D. ve Rhodes, D.G., (2000), “Influence of Divalent Cations on The Conformation of Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides: A Circular Dichroism Study”, *Nucleic Acids Res.*, 28: 2439-2445.

Patil, S.D. ve Burgess, D.J., (2003), “DNA-Based Biopharmaceuticals: Therapeutics for The 21st Century”, *AAPS NewsMagazine*, 6:27.

Patil, S.D., Rhodes, D.G. ve Burgess, D.J., (2004), “Anionic liposomal delivery system for DNA transfection”, *The AAPS Journal*, 6 (4): 1-10.

Patil, S.D., Rhodes, D.G. ve Burgess, D.J., (2005), “DNA-Based Therapeutics and DNA Delivery Systems: A Comprehensive Review”, *AAPS PharmSci.*, 7(1): E61–E77.

Perrie, Y. ve Gregoriadis, G., (2000), “Liposome-Entrapped Plasmid DNA: Characterization Studies”, *Biochim Biophys Acta.*, 1475: 125-132.

Pfeifer, F., Blaseio, U. ve Ghahraman, P., (1988), “Dynamic Plazmit Populations in

Halobacterium halobium", J. of Bacteriology, 170 (8): 3718-3724.

Post, F. J. ve Collins, N. F., (1982), "A Preliminary Investigations of the Membrane Lipid of *Halobacterium halobium* as a Food Additive", J. Food Biochem., 6: 25-38.

Rabussay, D., Dev, N.B., Fewell, J., Smith, L.C., Widera, G. ve Zhang, L., (2003), "Enhancement of Therapeutic Drug and DNA Delivery into Cells by Electroporation", J. Phys. D: Appl. Phys., 36: 348–363.

Rawal, N., Kelkar, S. M. ve Altekar, W., (1988), "Alternative routs of carbohydrate metabolism in halophilic archaebacteria", Indian J. Biohemi Biophys., 25 (6): 674-686.

Relini, A., Cassinadri, D., Fan, Q., Gulik, A., Mirghani, Z., De Rosa, M. ve Gliozzi, A., (1996), "Effect of Physical Constraints on the Mechanisms of Membrane Fusion: Bolaform Lipid Vesicles as Model Systems", Biophys. J., 71: 1789–1795.

Remy-Kristensen, A., Clamme, J.P., Vuilleumer, C., Kuhry, J.G. ve Mely, Y., (2001), "Role of Endocytosis in the Transfection of L929 Fibroblasts by Polyethylenimine/DNA Complexes", Biochim. Biophys. Acta, 1514: 21–32.

Romano, G., Micheli, P., Pacilio, C. ve Giordano, A., (2000), "Latest Developments in Gene Transfer Technology: Achievements, Perspectives, and Controversies Over Therapeutic Applications", *Stem Cells*, 18(1):19-39.

Rosenthal, N., (1987), "Identification of Regulatory Elements of Cloned Genes with Functional Assays", Methods Enzymol., 152: 704-20.

Ruepp, A. ve Soppa, J., (1996), "Fermentative Arginine Degredation in *Halobacterium salinarum* (formerly *Halobacterium halobium*): Genes, Genes Products, and Transcripts of the arcRACB Gene Cluster", J. bacteriol., 178 (8): 4942-4947.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sagi, S., Knoll, T., Trojan, L., Schaaf, A., Alken, P. ve Michel, M.S., (2003), "Gene Delivery into Prostate Cancer Cells by Holmium Laser Application", Prostate Cancer Prostatic Dis., 6 (2): 127– 130.

Schenborn, E. ve Groskreutz, D., (1999), "Reporter Gene Vectors and Assays", Mol. Biotechnol., 13: 29-44.

Scherer, F., Anton, M., Schillinger, U., Henke, J., Bergemann, C., Kruger, A., Gansbacher, B. ve Plank, C., (2002), "Magnetofection: Enhancing and Targeting Gene Delivery by Magnetic Force in vitro and in vivo", Gene Ther., 9 (2): 102–109.

Scherphof, G.L., (1991), *In vivo Behaviour of Liposomes: Interaction with Mononuclear Phagocytic System and Implication for Drug Targeting, Targeted Drug Delivery*, New York.

Sellek, G. A. ve Chaudhuri, J. B., (1999), "Biocatalysis in Organic Media Using Enzymes From Extremophiles", *Enzyme and Microbial Biotech.*, 25: 471-482.

Sharma, A. ve Sharma, U.S., (1997), "Liposomes in Drug Delivery: Progress and Limitations", *International Journal of Pharmaceutics* 154: 123-140.

Shimomura, O., Johnson, F. H., ve Saiga, Y. (1962), "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*," *J. Cell. Comp. Physiol.* 59: 223-239.

Silhavy, T., Weisemann, J. M. ve Weinstock, G. M., (1984), *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Singh, M. ve Ariatti, M., (2006), "A Cationic Cytofectin with Long Spacer Mediates Favourable Transfection in Transformed Human Epithelial Cells", *International Journal of Pharmaceutics*, 309: 189-198.

Sprott, G.D., (1992), "Structures of Archaeobacterial Membrane Lipids", *J. Bioenerg. Biomembr.*, 24: 555-566.

Sprott, G.D., Tolson, D.L. ve Patel, G.B., (1997), "Archaeosomes as Novel Antigen Delivery Systems", *FEMS Microbiol. Lett.*, 154: 17-22.

Sprott, G.D., Dicaire, C.J., Gurnani, K., Deschatelets, L.A. ve Krishnan, L., (2004), "Liposome Adjuvants Prepared from The Total Polar Lipids of *Haloflex volcanii*, *Planococcus* spp. and *Bacillus firmus* Differ in Ability to Elicit and Sustain Immune Responses", *Vaccine*, 22: 2154-2162.

Sreenivasa Rao, B., Seshasayana, A., Pardha Saradhi, S.V., Ravi Kumar, N., Narayan, C.P.S. ve Ramana Murthy, K.V., (2001), "Correlation of in vitro Release and in vivo Absorption Characteristics of Rifampicin from Ethylcellulose Coated Nonpareil Beads", *Int. J. Pharm.*, 230: 1-9.

Szoka, F. ve Papahadjopoulos, D., (1980), "Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes)", *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9: 467-508.

Tao, W., Wilkinson, J., Stanbridge, E.J. ve Berns, M.W., (1987), "Direct Gene Transfer into Human Cultured Cells Facilitated by Laser Micropuncture of The Cell Membrane", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84 (12): 4180-4184.

Tari, A.M., Fuller, N., Boni, L.T., Collins, D., Rand, P. ve Huang, L., (1994), "Interactions of Liposome Bilayers Composed of 1,2-diacyl-3-succinylglycerol with Protons and Divalent Cations", *Biochim Biophys Acta.*, 1192: 253-262.

Tata, D.B., Dunn, F. ve Tindall, D.J., (1997), "Selective Clinical Ultrasound Signals Mediate Differential Gene Transfer and Expression in Two Human Prostate Cancer Cell Lines: LnCap and PC-3", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234 (1): 64- 67.

Tesoro, A. ve Birchwood, B., (1972), "A Semi-Micromethod For Phospholipid Determination", *Clinical Biochemistry*, 5 (1-4): 121-124.

Tilcock, C.P.S., Bally, M.B., Farren, S.B., Cullis, P.R., ve Gruner, SM., (1984), "Cation Dependent Segregation Phenomena and Phase Behaviour in Model Membrane Systems Containing Phosphatidyl-Serine: Influence Of Cholesterol and Acyl Chain Composition", *Biochemistry*, 23: 2696-2703.

Tolson, D.L., Latta, R.K., Patel, G.B. ve Sprott, G.D., (1996), "Uptake of Archaeobacterial Liposomes and Conventional Liposomes by Phagocytic Cells", *J. Liposome Res.*, 6: 755-776.

Turan, K. ve Daştan, T., (2004), "In vitro Characterization and Delivery of Chitosan-DNA Microparticles into Mammalian Cells", *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 2 (7): 205-214.

Turan, K. ve Nagata, K., (2006), "Chitosan-DNA Nanoparticles: The Effect of Cell Type and Hydrolysis of Chitosan on in vitro DNA Transfection", *Pharmaceutical Development and Technology*, 11: 503-512.

Uchida, M., Shimatsu, Y., Onoe, K., Matsuyama, N., Niki, R., Ikeda, J.E. ve Imai, H., (2001), "Production of Transgenic Miniature Pigs by Pronuclear Microinjection", *Transgenic Res.*, 10 (6): 577-582.

Uchida, M., Natsume, H., Kobayashi, D., Sugibayashi, K. ve Morimoto, Y., (2002), "Effects of Particle Size, Helium Gas Pressure and Microparticle Dose on The Plasma Concentration of Indome Thacin After Bombardment of Indomethacin-Loaded Poly-L Lactic Acid Microspheres Using A Helios Gun System", *Biol. Pharm. Bull.*, 25 (5): 690-693.

van Winden, E.C.A. ve Crommelin, D.Y.A., (1999), "Short Term Stability of Freeze-Dried, Cryoprotected Liposomes", *Journal of Controlled Release*, 58: 69-86.

Vemuri, S. ve Rhodes, C.T., (1995), "Preparation and Characterization of Liposomes as Therapeutic Delivery Systems: A Review", *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 70: 95-111.

Ventosa, A. ve Nieto, J. J., (1995), "Biotechnological Applications and Potentialities of Halophilic Microorganisms", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11: 85-94.

Wang, S., Joshi, S. ve Lu, S., (2004), "Delivery of DNA to Skin by Particle Bombardment", *Methods Mol. Biol.*, 245: 185-196.

Wassef, N.M. ve Alving, C.R., (1987), "Complement-Dependent Phagocytosis of Liposomes by Macrophages", *Meth. Enzymol.*, 149: 124-134.

Wasungu, L. ve Hoekstra, D., (2006), "Cationic Lipids, Lipoplexes and Intracellular Delivery of Genes", *J. Controlled Release*, 116: 255-264.

Williams, R.S., Johnston, S.A., Riedy, M., DeVit, M.J., McElligott, S.G. ve Sanford, J.C.,

(1991), “Introduction of Foreign Genes into Tissues of Living Mice by DNA-Coated Microprojectiles”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88 (7): 2726–2730.

Woese, C.R. ve Fox, G.E., (1977), “Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74: 5088–5090.

Woese, C. R., (1999), *Prokaryote Systematics. The evolution of a science* In: *The prokaryotes. A handbook on the biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identifications, Applications*, 3rd. Edt., (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E., Eds). Springer-Verlag, New York (electronic publication).

Xu, L. ve Anchordoquy, T.J., (2008), “Cholesterol Domains in Cationic Lipid/DNA Complexes Improve Transfection”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778: 2177-2181.

Yang, N.S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B. ve McCabe, D., (1990), “In vivo and in vitro gene Transfer to Mammalian Somatic Cells by Particle Bombardment”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87 (24): 9568–9572.

Yurdakul, A. ve Atav, R., (2007), “Lipozomların Yapısı ve Sınıflandırılması”, *Tekstil ve Konfeksiyon*, 4: 234-247.

Zabner, J., Fasbender, A.J., Moninger, T., Poellinger, K.A. ve Welsh, M.J., (1995), “Cellular and Molecular Barriers to Gene Transfer by a Cationic Lipid”, *J. Biol. Chem.*, 270 (32): 18997– 19007.

Zeira, E., Manevitch, A., Khatchatourians, A., Pappo, O., Hyam, E., Darash-Yahana, M., Tavor, E., Honigman, A., Lewis, A. ve Galun, E., (2003), “Femtosecond Infrared Laser-An Efficient and Safe in vivo Gene Delivery System for Prolonged Expression”, *Molec. Ther.*, 8 (2): 342–350.

Zhang, S., Xu, Y., Wang, B., Qiao, W., Liu, D. ve Li, Z., (2004), “Cationic Compounds Used in Lipoplexes and Polyplexes for Gene Delivery”, *J. Controlled Release*, 100: 165–180.

Zhdanov, R.I., Podobed, O.V. ve Vlassov, V.V., (2002), “Cationic Lipid-DNA Complexes—Lipoplexes—for Gene Transfer and Therapy”, *Bioelectrochemistry.*, 58: 53-64.

İnternet Kaynakları

[1] <http://www.transtechinics.com/eng/conceptos1.htm> /26.02.2006

[2] www.elsomresearch.com /26.02.2006

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi 15.02.1979

Doğum yeri Ankara

Lise 1994-1996 Özel Yüce Fen Lisesi

Lisans 1997-2001 Hacettepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fak.
Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans 2001-2004 İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Doktora 2004-2010 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı

Çalıştığı kurumlar

2002-2004 İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Görevlisi

2005-Devam ediyor Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalürji Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü Araştırma Görevlisi