ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

BİR GEN AKTARIM MODELİ OLARAK NÖTRAL LİPOZOMLARIN BİVALAN METAL İYONLARI İLE BİRLİKTE KULLANIMININ İNCELENMESİ

Fatma Funda Demirsoy

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Hilal Özdağ

Eylül

2015

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Fatma Funda Demirsoy

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Hilal Özdağ danışmanlığında Fatma Funda Demirsoy tarafından hazırlanan bu çalışma 30/09/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Vedat BULUT İmza:

Üye: Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ İmza:

Üye: Prof. Dr. İhsan GÜRSEL İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr.E.Doruk ENGİN İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Bir Gen Aktarım Modeli Olarak Nötral Lipozomların Bivalan Metal İyonları İle Birlikte Kullanımının İncelenmesi

Fatma Funda Demirsoy

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Hilal Özdağ

Gen tedavileri; kalıtsal, otoimmün, immün sistemi baskılayıcı ve kanser hastalıklarının iyileştirilmesinde kullanılmak üzere geliştirilen yöntemlerdir. Gen tedavisi amacıyla kullanılan viral vektörlerin aktarmak üzere taşıdıkları DNA'yı hücreye taşırken hedefleri dışında olan hücreleri de enfekte edebilme, taşıdıkları DNA'yı konakçı genomunda entegre olmaması gereken bir bölgeye sokabilme gibi risklerinin bulunması nedeniyle, gen tedavisindeki kullanımları sınırlanmaktadır. Gen tedavisinin önündeki bu sınırlamayı kaldırmak üzere, hücreye DNA aktarımında plazma membranından geçebilme özelliğine sahip olan lipitvesikülleri denenmektedir. Gen transferi için kullanılan ve lipitveziküllerininin nükleik asitlerle beraber oluşturduğu nanobileşenler, genozom veya lipopleks adını almaktadır. Günümüzde insan gen tedavisi ile ilgili araştırmalarda alınan sonuçlar yalnızca tedavi edilmesi hedeflenen hücreye özgü gen aktarım araçları bulunmadığından henüz istenen verimde çalışmamaktadır. Lipitvesiküllerinin hücrelerin bulunduğu ortama verilmesinden, gen ifadesine kadar giden yolda terapötik geni taşıyan DNA'yı degradasyondan koruyacak optimize edilmiş gen taşıma sistemlerine ihtiyaç vardır. Yoğun olarak kullanılan katyonik lipitlerle yapılan lipofeksiyon deneyleri sıkça istenmeyen sitotoksisiteye neden olabilmekte, kontrolü zor olan serum stabilitesine olumsuz etki edebilmekte ve tüm bu olumsuzluklar nedeniyle düşük transfeksiyon oranları ile sonuçlanmaktadır.

Bu tez çalışmasında sitotoksik katyonik lipozomlar yerine, zwitteriyonik fosfolipitler, çift değerli katyonlar (Mg^{+2} ve Ca^{+2}) ile DNA bir araya getirilerek toplaşımlar oluşturulmuş ve bu yapıların özellikleri ile kullanımları irdelenmiştir. Daha spesifik olarak çok katmanlı

(MLV) ve tek katmanlı (ULV) fosfatidilkolin vezikülleri oluşturulduktan sonra, çift valanslı metal katyonlarca tetiklenen DNA'nın MLV ve ULV fosfatidilkolin vezikülleri üzerine adsorpsiyonu, agregasyonu ve adhezyonu UV/VIS spektroskopisi ile araştırılmıştır. Zwitteriyonik lipozomların termotropik faz değişimleri, Mg^{+2} varlığında polinükleotitler ve çeşitli DNA'lar ile bileşik oluşturmaları, termodinamik ölçümler ve floresan mikroskopisi ile incelenmiş ve çeşitli elektrostatik lipit-nükleik asit bileşiklerinin oluşumları ile ilgili daha önce yayınlanan verilerle kıyaslanmıştır. Bu şekilde oluşan üçlü bileşiklerin (DNA, lipit Mg^{+2}) yüzey tanınma ve sınırlararası özellikleri Langmuir-Blodgett tek katman, titreşim (FTIR ve Raman) spektroskopisi ile araştırılmıştır. Bu genozomların boyut ve morfoloji analizleri z-potansiyel, Dinamik Işın Saçılımı (DLS) ile gerçekleştirilmiştir. Üçlü bileşiklerin yapısal değişikleriyle ilgili termodinamik ve kinetik modellerin ortaya konmasına yönelik olarak Diferansiyel Taramalı Kalorimetrik (DSC), Termogravimetrik Analiz (TGA) ve İzotermal Titrasyon Kalorimetrik (ITC) ölçümleri yapılmıştır. Mg^{+2} varlığında DNA ile lipozomlar arasında meydana gelen füzyon olayları ise floresan ve konfokal mikroskopisi ile incelenmiştir. Transfeksiyon için etkili dairesel ve süpersarmallı plazmidlerin oluşumu agaroz jel elektroforez ile gösterilmiştir. Spektroskopik ölçümlerle üçlü bileşenlerin yapılarında yer alan biyomakromoleküllerin ikincil yapılarındaki yapısal değişiklikler gösterilmiştir. Mikroskobik ölçümler sonucunda üçlü oluşumlar görsel olarak tanımlanmış, boyut-potansiyel ölçümleri sonucunda görsel olarak TEM ile belirlenen sonuçlar teyit edilmiştir. Termal ölçümler ile biyodinamikleri ve oluşum termodinamiği parametreleri hesaplanmıştır. Ayrıca lipit/DNA/(Mg^{+2} ve Ca^{+2}) üçlü kompleksinin hücresel sisteme aktarılması için transfeksiyon deneyleri yapılmış; metal katyonlarca (Me^{+2}) gerçekleştirilen transfeksiyon etkinlikleri incelenmiştir. Bu üçlü toplaşımın Mg^{+2} ile yapılan kısmında transfeksiyon gerçekleşmiş ancak deney tekrarlanamamıştır. Lipit/DNA/Ca^{+2} ile transfeksiyon ise başarılı olmuştur.

2015, 281 sayfa

Anahtar kelimeler: Nükleik asit-hücre zarı etkileşmeleri; gen tedavisi; viral olmayan gen aktarımı; zwitteriyonik lipit-polinükleotit toplaşımları; Mg^{+2}; fizikokimyasal karakterizasyon; *in vitro* transfeksiyon.

ABSTRACT

PhD Thesis

Investigation of The Usage of Neutral Liposomes Together with Bivalent Metal Ions as a Gene Transfer Model

Fatma Funda Demirsoy

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Hilal Ozdag

Gene therapies are developed for curing inherited, autoimmune, immune system suppressive and cancer diseases. The use of viral vectors in gene therapy is limited because viral vectors have the risk to infect cells other than targeted ones and the DNA they carry can integrate into an undesirable locus in the host genome. In order to overcome these limitations of gene therapy lipid vesicles capable of transfering DNA across the cellular plasma membrane are being tested. Lipid vesicles used in gene transfer and the nanocomplexes they formed with nucleic acids are referred to as genosomes or lipoplexes. Nowadays, the results obtained in the field of human gene therapy are unsatisfactory, due to the lack of selective tools towards the targeted cells. There is a need for optimized lipid vesicle based gene carrying systems protecting the DNA from degradation throughout their routes from the application site to gene expression. Lipofection experiments undertaken with widely used cationic lipids frequently lead to undesired cytotoxicity and has negative effect on serum stability. Thus their transfection rates were low.

In this thesis, the use of zwitterionic phospholipids, forming assemblies with divalent metal cations (Ca^{2+} and Mg^{2+}) with DNA and the potential use of these structures were investigated. More specifically, upon multilamellar (MLV) and unilamellar (ULV) phosphatidylcholine vesicle formations, the DNA adsorption, aggregation and adhesion onto these vesicles, triggered by divalent metal cations, were analyzed by UV/VIS spectroscopy.

The thermotropic phase transitions, the complex formations between polynucleotides and various DNA in the presence of Mg^{2+} were studied by thermodynamic measurements and fluorescence microscopy. The results were compared to previously reported electrostatic lipid-nucleic acid formations. The surface recognition and interfacial properties of the formed ternary complexes (DNA/lipid/Mg^{2+}) were investigated by Langmuir-Blodgett monolayers and vibrational (FTIR and Raman) spectroscopy. Size and morphology analyses of these genosomes were undertaken by z-potential and Dynamic Light Scattering (DLS) measurements. Thermodynamic and kinetic models concerning structural changes of ternary complexes were built based on Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravymetric Analysis (TGA) and Isothermal Titration Calorimetry (ITC). Fusion events occuring between DNA and liposomes in the presence of Mg^{2+} were analyzed by fluoresence and confocal microscopies. Transfection competent circular and supercoiled plasmid formations were shown by agarose gel electrophoresis. Secondary structural changes of biomacromolecules engaged in ternary complex formations were shown by spectroscopic measurements. Ternary formations were depicted visually by microscopic measurements and the obtained results on their sizes were verified by Transmission Electron Microscopy (TEM). Their biodynamical features and formation thermodynamic parameters were estimated by thermal measurements. Moreover, the cellular transfers of lipid/DNA/(Mg^{2+} and Ca^{2+}) ternary complexes were analyzed by transfection experiments and the transfection efficiencies trigerred by metal cations (Me^{2+}) were determined. Transfection studies based on these ternary complexes and Mg^{2+} were accomplished but these results cannot reproduced. Transfections based on lipid/DNA/Ca^{2+} system were successful.

2015, 281 pages

Keywords: Nucleic acid-cell membrane interactions; gene therapy; non-viral gene delivery; zwitterionic lipit - polynucleotide self - assemblies; Mg^{+2}; physicochemical characterization; *in vitro* transfection.

TEŞEKKÜR

Sorunların çözümlenmesinde çok önemli katkılar sağlayan ve destekleyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Hilal Özdağ'a, sonsuz saygı ve şükranlarımı yürekten arz ediyor ve kendileriyle çalışmanın benim için büyük bir şans ve onur verici olduğunu belirtmek istiyorum. Proje çalışmasını, konuyla ilgili bilgi birikimini paylaşmaktan çekinmeyen, tüm umutlarımın tükendiği anda bana elini uzatan Uzman Erhan Süleymenoğlu'na teşekkür ederim. Tez izleme jürisinde yer alan ve bu vesileyle de hem çalışmanın şekillenmesinde hem de karşılaşılan sorunların giderilmesindeki katkılarından dolayı saygıdeğer hocalarım Sayın Prof. Dr. Vedat Bulut ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu'na teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni her konuda maddi ve manevi olarak destekledikleri ve her zaman yanımda oldukları için, değerli aileme, annem Ferdane Güldür Kaya, babam Muharrem Kaya'ya canım kardeşlerim Özlem ve Demet'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu zorlu süreçte sonsuz sevgi ve sabrıyla hep yanımda olan, hayat arkadaşım canım eşim Ali Demirsoy'a yaşattığı tüm güzellikler ve her şey için, canım kızım Aliye Doğa ve canım oğlum Ali Evren'e varlıklarıyla zorluklara dayanma gücümü arttırdıkları için teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve doktora eğitimimde maddi destek sağlayan, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (TÜBİTAK-BİDEB),

Tez çalışmamı 111S495 nolu proje olarak 2515-Bilim ve Teknolojide Avrupa İşbirliği (COST) programı kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a,

Birlikte çalışmaktan ve tanımaktan mutluluk duyduğum, yardım ve destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili Dr. Nevin Belder'e, Dr. Yeşim Doğan'a, Dr. Nilgün Tekin'e, Dr. Günseli Deniz Çubukçuoğlu'na, Dr. Semih Dalkılıç'a, Blm. Uzm. Seda Taşır Yılmaz'a Blm. Uzm. Özge Cumaoğulları Eker'e Arş. Gör. A.Emre Akpınar'a, Blm. Uzm. Aynur Karadağ, Blm. Uzm. Mohammad Reza Dastori, Blm. Uzm. Nuri Ergen'e, Uzm. Dr. Burcu Yener İlçe'ye, Uzm. Dr. Evrim Güneş Altuntaş'a, Blm. Uzm. Yasemin Öztemur'a ve klavyesiyle hep yanımda olan Blm. Uzm. Alp Aydos'a teşekkür ederim.

Şekil çizimlerinde özverili desteği için, ENUPRO Enerji Mühendislik Mimarlık Müşavirlik Taah. Turizm İnş. San. Tic. Ltd. Şti. sahibi Sayın Süer Karol'a teşekkür ederim.

Annem

Ferdane Güldür Kaya'ya

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN ..... **İ**

ÖZET ..... **İİİ**

ABSTRACT ..... **V**

TEŞEKKÜR ..... **Vİİ**

İÇİNDEKİLER ..... **X**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **XVİİ**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **XXX**

SİMGELER DİZİNİ ..... **XXXİ**

1. GİRİŞ **1**

2. KURAMSAL TEMELLER **4**

2.1. GEN TEDAVİSİ VE GEN TEDAVİ YAKLAŞIMLARI **4**

2.1.1. DNA TAŞIYICI SİSTEMLER 13

2.1.1.1. Viral Vektörler 14

2.1.1.2. Viral Olmayan Vektörler 14

2.1.1.2.1. Viral Olmayan Fiziksel Vektörler 15

2.1.1.2.2. Viral Olmayan Kimyasal Vektörler 16

2.2. KOMPLEKS OLUŞTURUCU OLARAK İKİ DEĞERLİ METAL KATYONLARIN (Mg^{+2} VE Ca^{+2}) KULLANILMASI **25**

2.3. LİPOZOM-HÜCRE ETKİLEŞİMLERİ **26**

2.3.1. HÜCRE MEMBRAN YAPISI 27

2.3.1.1. Biyomembranların İçeriği 28

2.3.1.2. Biyolojik Membranların Sıvı Kristal Özellikleri 33

2.3.1.2.1. Çift Lipit Katmanı 33

2.3.1.2.2. Membranın Fizikokimyasal Özelliklerini Etkileyen Faktörler 34

2.3.1.2.3. Lipit Fazlarını Etkileyen Faktörler ve Biyosistemlerdeki Önemi 34

2.3.2. LİPOZOM (TEK KATMANLI (ULV) VE ÇOK KATMANLI (MLV) LİPİT VESİKÜLLERİ) 35

2.3.2.1. Vezikül Oluşumunun Mekanizması 36

2.3.2.2. Lipozom Hazırlama Yöntemleri 36

2.3.2.2.1. Hidrasyon İşlemi 37

2.3.2.2.2. Lipit Filminin Hidrasyonu 38

2.3.2.2.3. Lipit Süspansiyonlarının Boyutlandırılması 40

2.3.3. DNA-LİPOZOM NANOBİLEŞENLERİNİN HÜCRE İÇİ GEÇİŞ MEKANİZMASI 44

2.3.3.1. Lipozom-Hücre Etkileşmeleri 47

3. GEREKÇE VE AMAÇ 52

4. MATERYAL VE YÖNTEM 55

4.1. MATERYAL 55

4.2. YÖNTEM 56

4.2.1. TEK KATMANLI (ULV) VE ÇOK KATMANLI (MLV) LİPİT VESİKÜLLERİ OLUŞTURULMASI 57

4.2.2. LİPİT VESİKÜLLERİNİN SPEKTROSKOPİK KARAKTERİZASYONU 62

4.2.2.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin UV/Visible spektroskopisi ile incelenmesi 63

4.2.2.2. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin Dairesel Dikroizm (Circular Dichroism, CD) ile incelenmesi 63

4.2.2.3. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin floresan spektroskopisi ile incelenmesi 65

4.2.2.4. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin titreşim spektroskopisi ile incelenmesi 65

4.2.2.4.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin FT-IR (Fourier Transform Infrared) kızılötesi titreşim spektroskopisi ile incelenmesi 66

4.2.2.4.2. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin SERS Raman saçılım spektroskopisi ile incelenmesi 67

4.2.3. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN TERMODİNAMİK KARAKTERİZASYONU 67

4.2.3.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin diferansiyel taramalı kalorimetri (Differencial Scanning Calorimetry,DSC) ile incelenmesi 67

4.2.3.2. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin izotermal titrasyon kalorimetri (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) ile incelenmesi 68

4.2.3.3. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin termogravimetrik analiz (Thermogravimetric Analysis, TGA) ile incelenmesi 69

4.2.4. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN MİKROSKOBİK KARAKTERİZASYONU 69

4.2.4.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin konfokal mikroskopi ile incelenmesi 70

4.2.4.2. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin kontrast taramalı elektron mikroskopi (CTEM) ile incelenmesi 71

4.2.5. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN BOYUT VE POTANSİYEL ANALİZİ 73

4.2.5.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin dinamik ışık saçılımı (Dynamic Light Scattering, DLS) ile incelenmesi 74

4.2.5.2. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin z-potansiyel analizi ile incelenmesi 74

4.2.6. NÜKLEİK ASİT-FOSFOLİPİT ARA YÜZEYLERİNİN LANGMUİR-BLODGETT FİLM YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ 75

4.2.7. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ 79

4.2.8. HÜCRE KÜLTÜRÜ 81

4.2.8.1. Hücre hatlarının tripsinlenmesi ve sayımı 83

4.2.8.2. Hücre hatlarının dondurulması 84

4.2.8.3. Dondurulmuş hücrelerin çözülmesi 85

4.2.9. HÜCRE HATLARINDA LİPİT VESİKÜLLERİNİN (MLV VE ULV) MTT SİTOTOKSİSİTE TESTİ İLE ANALİZİ 85

4.2.10. HÜCRELERİN TRANSFEKSİYONU 86

4.2.10.1. Transfekte edilecek lipit vesiküllerinin (ULV ve MLV) hazırlanması 90

5. ARAŞTIRMA BULGULARI 94

5.1. LİPİT VESİKÜLLERİNİN SPEKTROSKOPİK KARAKTERİZASYONU SONUÇLARI 94

5.1.1. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN UV/VISIBLE SPEKTROSKOPİSİ İLE İNCELENMESİ SONUÇLARI 94

5.1.1.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin floresan spektroskopisi ile incelenmesi sonuçları 101

5.1.1.2. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin titreşim spektroskopisi ile incelenmesi sonuçları 104

5.1.1.2.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin FT-IR (Fourier Transform Infrared) kızılötesi titreşim spektroskopisi ile incelenmesi sonuçları 105

5.1.2. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN TERMODİNAMİK KARAKTERİZASYONU SONUÇLARI 111

5.1.2.1. Lipozomların ve oluşturulan üçlü bileşenlerin diferansiyel taramalı kalorimetri (Differencial Scanning Calorimetry, DSC) ile incelenmesi sonuçları 112

5.1.3. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN MİKROSKOBİK KARAKTERİZASYONU SONUÇLARI 114

5.1.3.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin kontrast taramalı elektron mikroskopi (CTEM) ile incelenmesi sonuçları 114

5.1.4. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN BOYUT VE POTANSİYEL ANALİZİ SONUÇLARI 119

5.1.4.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin dinamik ışık saçılımı (Dynamic Light Scattering, DLS) ile incelenmesi sonuçları 119

5.1.4.2. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin Z-potansiyel analizi ile incelenmesi sonuçları 122

5.1.4.3. Nükleik asit-fosfolipit ara yüzeylerinin Langmuir-Blodgett film yöntemiyle incelenmesi bulguları 128

5.1.5. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ SONUÇLARI 136

5.1.6. HÜCRE HATLARINDA LİPİT VESİKÜLLERİNİN (MLV VE ULV) MTT SİTOTOKSİSİTE TESTİ SONUÇLARI 147

5.1.6.1. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında oluşturulan örneklerin sıcaksu banyosunda inkübasyonundan sonra MCF7 hücre hattı canlılığına etkisi 147

5.1.6.2. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında oluşturulan örneklerin gece boyu inkübasyonundan sonra MCF7 hücre hattı canlılığına etkisi 149

5.1.6.3. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonu sonunda MCF7 hücre canlılığına etkisi 151

5.1.6.4. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek hazırlanan örneklerin sıcak su banyosu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi 153

5.1.6.5. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi 155

5.1.6.6. ULV'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerinin sıcak su banyosunda inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi 156

5.1.6.7. ULV'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerinin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi 158

5.1.6.8. Artan ULV konsantrasyonlarının sıcak su banyosunda inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi 159

5.1.6.9. Farklı konsantrasyonlarda ULV'lerin gece boyu inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi 160

5.1.7. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN HÜCRE HATLARINA TRANSFEKSİYONU SONUÇLARI 161

5.1.7.1. X-tremeGENE HP transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonu ve 24, 48 ve 72. saatlerde görüntü alınması 161

5.1.7.2. DOTAP Lipozomal transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonu ve 24, 48 ve 72. saatlerde birleştirilmiş (beyaz ışık ve floresan) görüntüsünün alınması 164

5.1.7.3. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ve edilmemiş ULV ve MLV'lerin MCF7 hücre hattına farklı (2,5uM-200uM) Mg^{+2} konsantrasyonlarında transfeksiyonu 166

5.1.7.4. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin MCF7 hücre hattına farklı $CaCl_2$ ve $MgCl_2$ (2,5uM-200uM) konsantrasyonlarında transfeksiyonu 168

5.1.7.5. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin He-La hücre hattına farklı $CaCl_2$ ve $MgCl_2$ (2,5 mM-200 mM) konsantrasyonlarında transfeksiyonu. 171

6. TARTIŞMA VE SONUÇ 173

6.1. TARTIŞMA 173

6.1.1. LİPİT/DNA/MG^{+2} ÜÇLÜ OLUŞUMUNUN SPEKTROSKOPİK DEĞERLENDİRİLMESİ 173

6.1.2. LİPİT/DNA/MG+2 ÜÇLÜ OLUŞUMUNUN TERMODİNAMİK DEĞERLENDİRİLMESİ 176

6.1.3. LİPİT/DNA/MG^{+2} ÜÇLÜ OLUŞUMUNUN MİKROSKOPİK DEĞERLENDİRİLMESİ..... 178

6.1.4. LİPİT/DNA/MG^{+2} ÜÇLÜ OLUŞUMUNUN BOYUT VE POTANSİYEL ANALİZİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ 178

6.1.5. LİPİT/DNA/MG+2 ÜÇLÜ OLUŞUMUNUN LANGMUİR BLODGETT TEK KATMAN YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ 179

6.1.6. LİPİT/DNA/MG^{+2} OLUŞUMUNUN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ 180

6.1.7. LİPİT/DNA/MG^{+2} ÜÇLÜ OLUŞUMUNUN HÜCRESEL SİSTEME AKTARILMASININ DEĞERLENDİRİLMESİ 182

6.2. SONUÇ 183

7. KAYNAKLAR 186

8. ÖZGEÇMİŞ 219

9. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR 220

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Viral ve viral olmayan gen nakli tasarımları (12). 5

Şekil 2.2. Doğrudan ve hücresel gen nakli tasarımları (13). 5

Şekil 2.3. Viral gen taşıyıcı tasarımlarının genel şeması (14). 6

Şekil 2.4. Çeşitli lipozomal veya polimere dayalı gen taşıyıcılarının hücre içi (intraselüler) yolu (11) 7

Şekil 2.5. İntravasküler (sol) veya doku (sağ) enjeksiyonundan sonra plazmid DNA'nın *in vivo* akıbeti (9) 8

Şekil 2.6. Polipleksler ve lipoplekslerin transfeksiyon esnasında hücresel farklı akıbetlerinin özeti. (15) 10

Şekil 2.7. Lipozom-DNA veya lipozom-plazmid DNA ile hedef hücre arasında oluşan elektrostatik etkileşmelerinin şeması (16). 10

Şekil 2.8. Transfeksiyon yaklaşımları (42) 13

Şekil 2.9. Hücresel DNA tedavisinde fiziksel ve kimyasal metodlar. 15

Şekil 2.10. Doğal poliamin olan sperminin '3-4-3' ve çeşitli türevlerinin kimyasal yapıları (57). 17

Şekil 2.11. Doğrusal, zincirli ve polietilen glikol ile konjuge edilmiş polietileniminler (57). 18

Şekil 2.12. Polipropilenimin dendrimerlerinin beş ayrı çeşidinin kimyasal yapıları (57) ... 19

Şekil 2.13. Protamine amino asit dizilişinin şematik çizimi (58). 20

Şekil 2.14. Hering protaminin (protamine (clupeine) Y-I) yapısı (57). 21

Şekil 2.15. Doğrusal ve zincirli poli-L-lizinin kimyasal yapıları (57). 21

Şekil 2.16. Kitosan (Chitosan)'ın kimyasal yapısı (57). 22

Şekil 2.17. Katyonik lipitlerden en çok bilinen örnekler: l RPR120535, DODAB, DOTAP, BGTC, DOTMA (59,63). 23

Şekil 2.18. Polivalent katyonik lipitler (9). 24

Şekil 2.19. Nötr lipitlerden gen taşıyıcı tasarımlarında sıkça kullanılan örnekler: DOPE, DOPC, A F-PE (64). 25

Şekil 2.20. Lipitler aracılığı ile hücre transfeksiyonu (42). 27

Şekil 2.21. Hücre organel yapıları (69). 29

Şekil 2.22. Biyomembranların günümüzde geçerli olan Singer ve Nicholson modeli (70). 30

Şekil 2.23. Hücre membran yapısı (71). 30

Şekil 2.24. Biyomembran yapısında yer alan fosfolipitlerden tipik bir görünüm (72). 31

Şekil 2.25. Lipozomların genel yapısı (77). 37

Şekil 2.26. Çeşitli lipozom formülasyonlarının hazırlama yöntemlerini özetleyen genel sınıflandırma 37

Şekil 2.27. Çok katmanlı veziküllerin hazırlanması enasında oluşan fosfolipit yapıları (79). 41

Şekil 2.28. MLV'lerin hazırlanmasındaki üç aşamanın şematik gösterimi (79). 42

Şekil 2.29. Makromoleküler enkapsülasyon amaçlı tasarlanan çeşitli lipozomlar (80). 43

Şekil 2.30. Çeşitli lipozom boyutları (81). 43

Şekil 2.31. Tek katmanlı lipozom (lipopleks) içerisinde enkapsüle edilmiş DNA'nın metal iyonlarca tetiklenen hücre içi geçişinin muhtemel mekanizması (82). 46

Şekil 2.32. Ökaryotik hücrelerde meydana gelen nükleik asit-çekirdek membranı arasında oluşan bileşikler ve işlevsel anlamları (85). 50

Şekil 4.1. Kullanılan yöntemlerin şema ile gösterimi. 57

Şekil 4.2. Lipozom yapısı (42) ve lipozomların çeşitli türleri (MLV, SUV, LUV) (108). . 58

Şekil 4.3. Lipit filminden tek katmanlı (ULV) ve çok katmanlı (MLV) lipit vesiküllerinin ekstruzyon yöntemiyle oluşturulması. 61

Şekil 4.4. Ekstruzyon yöntemiyle tek katmanlı ve çok katmanlı lipit vezikülleri oluşturulması, üçlü oluşumunun CTEM ve konfokal mikroskopi ile görüntülenip, boyut analizi ile doğrulanması 70

Şekil 4.5. 1 kb DNA molekül ağırlığı belirteci (114). 80

Şekil 4.6. Hek293 ile 6 kuyulu plate'de çalışılacak hücre sayısının belirlenmesi 83

Şekil 4.7. Transfekte edilecek lipit vesikülleri (ULV ve MLV) ile yapılan deneyler 91

Şekil 4.8. DOTAP lipozomal transfeksiyon ajanı kullanarak HEK-293 hücrelerinin pCMV.GFP plazmidi ile transfeksiyonu 93

Şekil 5.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin UV/Visible spektroskopisi ile gösterilmesi 95

Şekil 5.2. Çeşitli *E. coli* pUC plazmid DNA profilleri 96

Şekil 5.3. Yükselen plazmid DNA (15 mM *E. coli* pUC plazmid) tipik UV/VIS spektrumu 97

Şekil 5.4. Mg^{+2} yokluğunda DPPC-çok katmanlı vezikül (MLV)-plazmid DNA etkileşmeleri UV/VIS spektrumu 98

Şekil 5.5. DPPC-çok katmanlı vezikül (MLV)-plazmid DNA etkileşmeleri UV/VIS spektrumu 99

Şekil 5.6. Çeşitli Mg^{+2} derişimlerinde farklı molar oranlarında DPPC-çok katmanlı veziküllerle plazmid DNA arasında oluşan bileşenler UV/VIS spektrumu 100

Şekil 5.7. Çeşitli oranlarda oluşturulan DPPC-MLV-plazmid DNA bileşenleri üzerine 20 mM Mg^{+2} etki UV/VIS spektrumu 101

Şekil 5.8. Oluşturulan üçlü bileşenlerin floresan spektroskopisi ile ölçüm grafiği. 102

Şekil 5.9. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin floresan spektroskopisi sonuçları. 102

Şekil 5.10. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin floresan spektroskopisi sonuçları. 103

Şekil 5.11. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin kullanılan EB miktarına bağlı olarak floresan spektroskopisi. 103

Şekil 5.12. Artan Mg^{+2} miktarına bağlı olarak lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin floresan spektroskopisi ile ölçüm grafiği 104

Şekil 5.13. (a) MLVs–T7 FajDNA binary (b) MLV (c) MLV–Mg^{+2} d MLV–Mg^{+2}–T7 DNA üçlü kompleks ve (e) T7 faj DNA FTIR spektrumları. 105

Şekil 5.14. DNA/lipit(ULV) ve Mg^{+2} parçacıkların ve bileşenlerinin FTIR spektroskopisi ile ölçümleri. 106

Şekil 5.15. DPPC-MLV (siyah çizgi) ve DPPC-ULV (kırmızı çizgi) oluşumların ayrıştırılmasının FTIR analizi (Nicolet 6700 FTIR). 107

Şekil 5.16. DPPC-MLV (siyah çizgi) ve DPPC-ULV (kırmızı çizgi) oluşumların ayrıştırılmasının FTIR analizinin tüm frekansları. 108

Şekil 5.17. DPPC-ULV/Bakteriyofaj T7 ikili oluşumunun FTIR spektrumu. 109

Şekil 5.18. Tek başına DPPC-ULV veziküllerinin FTIR spektrumu. 109

Şekil 5.19. DPPC-ULV/Mg^{+2} (1:1) ikili oluşumunun FTIR spektrumu. 110

Şekil 5.20. Ekimolar DPPC-MLV/Mg^{+2}/Bakteriyofaj T7 DNA (1:1:1) üçlü bileşiklerinin FTIR spektrumu. 110

Şekil 5.21. Bakteriyofaj T7 DNA'nın tek başına ve ligandla bağlanmamış FTIR spektrumu. 111

Şekil 5.22. pDNA/Mg^{+2}, ULV/Mg^{+2}, ULV/pDNA, ULV/pDNA/Mg^{+2}, ULV, pDNA bileşenlerinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) ölçümleri. 112

Şekil 5.23. Oluşturulan ikili ve üçlü bileşenlerin (DPPC-MLV/DNA/Mg^{+2}) diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ile ölçümleri. 113

Şekil 5.24. Oluşturulan ikili ve üçlü bileşenlerin (DPPC-ULV/DNA/Mg^{+2}) diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ile ölçümleri. 113

Şekil 5.25. Ag nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (TEM, Transmission Electron Microscope) görüntüsü. 115

Şekil 5.26. DPPC(ULV)/Ag nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (CTEM) görüntüsü. 115

Şekil 5.27. pDNA/Ag nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (CTEM) görüntüsü. 116

Şekil 5.28. pDNA/DPPC(ULV)/Ag nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (CTEM) görüntüsü. 116

Şekil 5.29. pDNA/DPPC(ULV)/Mg^{+2}/Ag nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (CTEM) görüntüsü. 117

Şekil 5.30. DPPC (MLV) örneklerinin taramalı elektron mikroskobu (CTEM) görüntüsü. 117

Şekil 5.31. pDNA/DPPC (MLV) örneklerinin taramalı elektron mikroskobu (CTEM) görüntüsü. 118

Şekil 5.32. pDNA/DPPC(MLV)/Mg^{+2} örneklerinin taramalı elektron mikroskobu (CTEM) görüntüsü. 118

Şekil 5.33. DPPC (MLV) boyut analizi. 119

Şekil 5.34. DPPC (ULV) boyut analizi. 120

Şekil 5.35. Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü kompleksler oluşturan serbest ve ligand bağlı moleküllerin parçacık boyutu analizi. 121

Şekil 5.36 MLV lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin DLS analizi ile gösterilmesi. 121

Şekil 5.37. ULV lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin DLS analizi ile gösterilmesi. 122

Şekil 5.38. DPPC/DSPC/Chol karışımında oluşan tek katmanlı veziküllerin (ULV) z-boyut dağılımlarının gösterilmesi. 123

Şekil 5.39. Mg^{+2}/lipozom/dana timus DNA üçlü oluşumun zeta-boyut dağılımının gösterilmesi. 124

Şekil 5.40. Mg^{+2}/lipozom/phage T7 DNA üçlü oluşumunun z-boyut dağlımının gösterilmesi. 124

Şekil 5.41. DPPC(ULV)/DSPC/Chol karışımından oluşan sistemin z-potansiyel dağlımının gösterilmesi. 125

Şekil 5.42. Mg^{+2}/lipozom/phage T7 DNA üçlü oluşumunun z-potansiyel dağlımının gösterilmesi. 125

Şekil 5.43. Mg^{+2}/lipozom/dana timus DNA üçlü oluşumunun z-potansiyel dağılımının gösterilmesi. 126

Şekil 5.44. DPPC(MLV) Zeta potansiyel ölçümlerinin gösterilmesi. 126

Şekil 5.45. DPPC(ULV) lipozomların boyut dağılımının gösterilmesi. 127

Şekil 5.46. 1 hafta bekletilen DPPC(ULV) lipozomların boyut dağılımının gösterilmesi. 127

Şekil 5.47. Langmuir-Blodgett düzeneği üzerinde bu üçlü bileşiklerin (DNA/Lipit/Mg^{+2}) meydana getirilmesi 129

Şekil 5.48. DPPC ve dana timus DNA ile ikili kompleksin Langmuir-Blodgett ile elde edilen yüzey basıncı alan izotermleri. 129

Şekil 5.49. Lipit /DNA, Langmuir-Blodgett ile elde edilen yüzey basınç alanı izotermleri. 130

Şekil 5.50. Hava/su ara yüzeylerde oluşturulan DPPC ve DPPC/dana timus DNA/Mg^{+2} tek katmanların π-A izotermleri. 131

Şekil 5.51. Hava/su ara yüzeylerde oluşturulan DPPC/kolesterol ve DPPC/Kolesterol/ DNA tek katmanların π-A izotermleri. 131

Şekil 5.52. Hava/su (air/water interphase) ara yüzeylerde oluşturulan DPPC ve DPPC/dana timus DNA/ tek katmanların π-A izotermleri. 132

Şekil 5.53. Hava/su ara yüzeylerde oluşturulan DPPC; DPPC/DNA ikili bileşik ve DPPC/dana timus DNA/Mg^{+2} üçlü bileşiklerin tek katmanların π-A izotermleri. 132

Şekil 5.54. Hava/su ara yüzeylerde oluşturulan saf ve ligandla bağlanmamış DPPC ve DPPC/dana timus DNA ikili bileşiklerin π-A izotermleri. 133

Şekil 5.55. Hava/su ara yüzeylerde oluşturulan saf ve ligandla bağlanmamış DPPC ve DPPC/dana timus DNA ikili bileşiklerin ve Mg^{+2}/DPPC/DNA üçlü bileşiklerin π-A izotermleri. 133

Şekil 5.56. Hava/su ara yüzeylerde oluşturulan kolesterol tek katmanın π-A izotermi. ... 134

Şekil 5.57. Hava/su ara yüzeylerde oluşturulan DPPC/Kolesterol, DPPC/Kolesterol/DNA ve Mg^{+2}/DPPC:Chol/DNA ara yüzey izotermleri. 134

Şekil 5.58. Hava/su ara yüzeylerde DPPC/dana timus DNA ikili bileşiklerin π-A izotermleri. 135

Şekil 5.59. 1 kb ladder ve PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sının temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü ve oluşan bantlar. 137

Şekil 5.60. 1-0,1-0,05-0,02-0,01 µg PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'larının, Ag nanopartikül varlığında temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 137

Şekil 5.61. 0,25 µg ve 0,5 µg PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı ve 1-5 µl MLV'lerin temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 138

Şekil 5.62. 5 ve 20 dakika inkübasyon süresi ve 5, 10, 15 µl ULV varlığında ve Mg^{+2} yokluğunda ULV-plazmid DNA temsili agaroz jel elektroforez görüntüsü. 139

Şekil 5.63. 75 dakika inkübasyon süresi ve 2,5, 5, 10 µl ULV varlığında ve Mg^{+2} yokluğunda, 0,25 µg ve 0,5 µg plazmid DNA'larının temsili agaroz jel elektroforez görüntüsü. 140

Şekil 5.64. 1, 2, 3, ve 4 saat inkübasyon süresi ve 5 µl ULV varlığında ve Mg^{+2} yokluğunda, 0,5 µg plazmid DNA'sının temsili agaroz jel elektroforez görüntüsü. 140

Şekil 5.65. DOTAP enkapsülasyon kontrolü (2. ve 3. Kuyular). 0,5 µg PCMV.GFPDH5α plazmid DNA, ULV ve 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 mM Mg^{+2} eklenmesinin etkisinin temsili agaroz jel elektroforez görüntüsü. 141

Şekil 5.66. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı ve 2,5-200 mM Mg^{+2} konsantrasyonlarında, Ag nanopartikülü varlığında temsili agaroz jel görüntüsü. 142

Şekil 5.67. PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV (yeni ve eski tarihte hazırlanmış)'lerin, temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 142

Şekil 5.68. PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV (yeni ve eski tarihte hazırlanmış) örneklerinin uzun koşulması ile elde edilen temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 143

Şekil 5.69. 5 µg/5 µl ve 2,5 µg/5 µl PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı, PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV, PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV, eski tarihli PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV örneklerinin temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 144

Şekil 5.70. PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV ve 2,5-200 mM Mg^{+2} konsantrasyonlarında, Ag nanopartikülü varlığında agaroz jel görüntüsü 145

Şekil 5.71. PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV ve PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin 2,5-200 mM Mg^{+2} konsantrasyonlarında, temsili agaroz jel görüntüsü. 146

Şekil 5.72. PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sının 10U ve 20U S1Nuclease enzim kesimli, Ag varlığında ve yokluğunda temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 147

Şekil 5.74. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek farklı CaCl2 konsantrasyonlarında oluşturulan örneklerin sıcaksu banyosunda inkübasyonundan sonra MCF7 hücre hattı canlılığına etkisinin incelenmesi için kurulan deney planı. 147

Şekil 5.75. Plazmid DNA'sının kapsüle edilmemiş MLV'lerin ve 30 dk benmaride inkübe edilerek farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında MCF7 hücre canlılığına etkisi. 148

Şekil 5.76. Plazmid DNA'sının kapsüle edilmiş MLV'lerin ve 30 dk benmaride inkübe edilerek farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında MCF7 hücre canlılığına etkisi. 149

Şekil 5.77. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında oluşturulan örneklerin gece boyu inkübasyonundan sonra MCF7 hücre hattı canlılığına etkisinin incelenmesi için kurulan deney planı. 150

Şekil 5.78. MLV'lerin ve plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden gece boyu inkübe edilerek hazırlanan farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında örneklerin MCF7 hücre canlılığına etkisi 150

Şekil 5.79. Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanmış örneklerin sıcak su banyosu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi. 151

Şekil 5.80. MLV'lerin plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisinin incelenmesi için kurulan deney planı. 152

Şekil 5.81. MLV'lerin plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi. 152

Şekil 5.82.Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi. 153

Şekil 5.83. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek hazırlanan örneklerin sıcak su banyosu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisinin incelenmesi için kurulan deney planı. 154

Şekil 5.84. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden hazırlanan örneklerin sıcak su banyosu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi. 154

Şekil 5.85. Plazmid DNA'sının kapsüle edilmiş hazırlanan örneklerin sıcak su banyosu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi 154

Şekil 5.86. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisinin incelenmesi ile ilgili deney planı. 155

Şekil 5.87. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi. 156

Şekil 5.88. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilerek hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi. 156

Şekil 5.89. ULV'lerin farklı CaCl2 konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerinin sıcak su banyosunda inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi. 157

Şekil 5.90. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsule edilmiş ULV'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanmış örneklerinin sıcak su banyosu inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi. 157

Şekil 5.91. ULV'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi. 158

Şekil 5.92. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsule edilmiş ULV'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerinin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi. 158

Şekil 5.93. Artan ULV konsantrasyonlarının sıcak su banyosunda inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi. 159

Şekil 5.94. ULV içine kapsüle edilmiş PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'larının sıcaksu banyosunda inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi. 159

Şekil 5.95. Farklı konsantrasyonlarda ULV'lerin gece boyu inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi 160

Şekil 5.96. ULV içine kapsüle edilmiş PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'larının gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi. 160

Şekil 5.97. X-tremeGENE HP transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonunun 24 saat sonra alınan birleştirilmiş (beyaz ve floresan ışık) görüntüsü. 162

Şekil 5.98. X-tremeGENE HP transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonunun 24 saat sonra alınan ve floresan görüntüsü. 162

Şekil 5.99. X-tremeGENE HP transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonunun 48 saat sonra alınan birleştirilmiş (beyaz ve floresan ışık) görüntüsü. 163

Şekil 5.100. X-tremeGENE HP transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonunun 72 saat sonra alınan birleştirilmiş (beyaz ve floresan ışık) görüntüsü. 163

Şekil 5.101. DOTAP Lipozomal transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonu ve 24.saatte birleştirilmiş (beyaz ışık ve floresan) görüntüsü. 164

Şekil 5.102. DOTAP Lipozomal transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonu ve 48.saatte birleştirilmiş (beyaz ışık ve floresan) görüntüsü. 165

Şekil 5.103. DOTAP Lipozomal transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonu ve 72.saatte birleştirilmiş (beyaz ışık ve floresan) görüntüsü. 165

Şekil 5.104. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmemiş MLV'lerin MCF7 hücrelerine farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında transfeksiyonu. 166

Şekil 5.105. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmemiş ULV'lerin MCF7 hücrelerine farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında transfeksiyonu. 167

Şekil 5.106. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV'lerin MCF7 hücrelerine farklı MgCl2 konsantrasyonlarında transfeksiyonu. 167

Şekil 5.107. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin MCF7 hücrelerine farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında transfeksiyonu. 168

Şekil 5.108. PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı Kapsüle Edilmiş ULV'lerin MCF7 hücre hattına 5mM $CaCl_2$ konsantrasyonunda transfekte olmuş hücre görüntüleri. 169

Şekil 5.109. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin MCF7 meme kanseri hücre hattına farklı $MgCl_2$ + $CaCl_2$ (2,5 mM-200 mM) konsantrasyonlarında transfeksiyonu. 170

Şekil 5.110. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin MCF7 hücre hattına PCR kitinde kullanılan farklı $MgCl_2$ (2,5 mM-200 mM) konsantrasyonlarında transfeksiyonu. 170

Şekil 5.111. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin MCF7 meme kanseri hücre hattına PCR kitinde kullanılan $MgCl_2$ + $CaCl_2$ farklı (2,5 mM-200 mM) konsantrasyonlarında transfeksiyonu. 171

Şekil 5.112. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin He-La serviks kanseri hücre hattına PCR kitinde kullanılan $MgCl_2$'ün farklı (2,5 mM-200 mM) konsantrasyonlarında transfeksiyonu. 171

Şekil 5.113. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin He-La hücre hattına PCR kitinde kullanılan $MgCl_2$ + $CaCl_2$'nin farklı konsantrasyonlarında transfeksiyonu. 172

Şekil 8.1. Nükleik asitler ve fosfolipitlerin CD spektroskopik görüntülemeleri 197

Şekil 8.2. Lipit sabit miktarda DNA arttırılarak bağlanmalarının CD spektroskopik görüntüsü. 198

Şekil 8.3. DPPC/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun Sers Raman titreşim spektroskopisi ile ölçümleri. 200

Şekil 8.4. Oluşturulan ikili ve üçlü bileşenlerin (DPPC-ULV/DNA/Mg^{+2}) termogravimetrik analiz (Thermogravimetric Analysis, TGA) ölçümleri 203

Şekil 8.5. Oluşturulan ikili ve üçlü bileşenlerin (DPPC-ULV/DNA/Mg^{+2}) termogravimetrik analiz (Thermogravimetric Analysis, TGA) ile termal profillerinin kıyaslanarak gösterilmesi..... 204

Şekil 8.6. MLV/Bakteriyofaj T7 DNA sistemin oluşum kinetiğinin ($KD\ 330\pm506\ M^{-1}$) izotermal titrasyon kalorimetrisi (ITC) ile ölçüm sonuçları. 205

Şekil 8.7. DPPC-MLV/DNA ikili oluşumunun ITC ile ölçüm sonuçları. 207

Şekil 8.8. Nil kırmızısı boyası ile boyanan fosfolipit veziküllerinden MLV'lerin karanlık alan konfokal mikroskopi ile görüntüleri. 208

Şekil 8.9. Nil kırmızısı boyası ile boyanan fosfolipit veziküllerinden ULV'lerin karanlık alan konfokal mikroskopi ile görüntüleri. 209

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Hücrelerin tipleri, nereden temin edildikleri ve pasaj numaraları. 55

Çizelge 4.2. Hücre hatlarının idamesi için kullanılan besiyerleri 82

Çizelge 4.3. Hücre hatlarının uzun ve kısa süreli testler için belirlenen hücre yoğunlukları 83

Çizelge 4.4. Transfekte edilecek lipit vesiküllerinin (ULV ve MLV) hazırlanması 91

Çizelge 4.5. DOTAP lipozomal transfeksiyon ajanı kullanarak HEK-293 hücrelerinin pCMV.GFP plazmidi ile transfeksiyonu 93

Çizelge 5.1. X-tremeGENE HP transfeksiyon ajanı kullanılarak yapılan trransfeksiyonun deney planı. 161

Çizelge 5.2. Transfeksiyon deney sonuçları 172

Çizelge 8.1. SERS ve FTIR ölçümleri ile lipit ve büyük DNA vibrasyon frekanslarının saptanması. 200

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Baz çifti
Ch	Kitozan
$CHCl_3$	Kloroform
ddH_2O	Çift distile su
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate veya Dioleiloksi-trimetilammonio propan
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
DTA	Diferansiyel Termal Analiz
DTG	Diferansiyel Termal Gravimetri
Dulbecco's PBS	Dulbecco's Balanced Salt Solution
E.coli	Escherichia coli
EB	Etidium bromide
ECACC	European Collection of Cell Cultures
FBS	Fetal sığır serumu
FRV	Freeze-Drying Rehydration Vesicle (Dondurulup-kurutulmuş rehidrate vesikül)
FT-IR	Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi)

g	gram
g	yerçekimi kuvveti
GFP	Yeşil Floresan Proteini
kb	Kilobaz
LUV	Large Unilamellar Vesicle (büyük lipit vesikülü)
Me^{+2}	iki değerlikli metal iyonu
ml	mililitre
MLV	Multi Lamellar Vesicle (çok tabakalı lipit vesikülü)
mM	milimol
MTT	(3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) ya da Dimetil tiyazolil difeniltetrazolyum bromid
NEAA	Non Essential Amino Acid
ng	nanogram
nm	nanometre
ºC	Santigrat derece
OD	Optik dansite
PBS	Phosphate Buffered Saline ya da Fosfat tamponlu serum fizyolojik
pDNA	Plazmid DNA
PEG	Polietilen glikol
PEI	Polietilenimin
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikada dönüş sayısı
sn	saniye
SUV	Small Unilamellar Vesicle (küçük)
TBE	Tris-borik asit-EDTA
TEM	Taramalı elektron mikroskobu (Transmission Electron Microscope)

TGA	Termogravimetrik Analiz
ULV	Tek takalı lipit vesikülü
UV-VIS	Ultraviyole Görünür Bölge Spektroskopisi

1. GİRİŞ

İnsan gen tedavisi, birçok oto immün ve kalıtsal hastalıkların ve kanser patolojilerinin tedavisinde şimdiye kadar uygulanan alışagelmiş yaklaşımlar dışında bu hastalıkların tedavilerinde yeni bir umut olarak ortaya çıkmıştır (1–10). Gen tedavisi, son yıllarda moleküler biyoloji ve biyoteknolojideki gelişmeler sayesinde mümkün olmuştur. Olağanüstü öneme sahip ve uluslararası boyutta olan insan genomun gen dizilişinin ortaya çıkarılması projesi (Human Genome Sequencing Project) bu yeni tedavi yöntemini, birçok hastalığın moleküler düzeyde incelenmesini gerçekleştirerek bu doğrultuda yeni veriler ortaya çıkararak desteklemektedir. Bu gibi çok değerli genetik bilgilerin elde edilmesiyle, gen tedavisinin yakın gelecekte moleküler tıp alanında önemli yöntemlerden birini oluşturacağına inanılmaktadır. Gen tedavisinin amacı hastalığa neden olan genetik bozuklukların tedavi edilmesidir (4).

DNA dizilişindeki nokta mutasyonları teorik olarak tedavisi mümkün olan birçok hastalığa neden olmaktadır. Genomlarda, nokta mutasyonlarını ortadan kaldırmak için çok sayıda yaklaşım uygulanmaktadır. Bunlardan hibrit (veya kimerik) RNA-DNA oligonükleotit veya söz konusu DNA dizilişinin kesilmesi (deletion of DNA sequences) her ne kadar gelecek vaat eden yöntemler olarak sunulmuşsa da frekans olarak meydana gelme olasılıkları çok düşük olduğundan, henüz uygulamaları söz konusu değildir. Sonuç olarak, gen tedavisinin amacı genetik düzenlemelerinin gerçekleştirilmesi olduğundan ve bu sürecin klinik ortamlarda uygulanabilirliğinin bir hayli zor olmasından dolayı, günümüzde gen tedavi yaklaşımlarının birçoğu işlevsel genlerin ortama katılmasına dayanmaktadır. Bu yaklaşımda, terapötik genler farmasötik bileşenler olarak tasarlanırlar ve ortama verilirler. Söz konusu genlerin hedeflendirildikleri hücre içi bölgeye ulaşma yollarında sitoplazmik engeller bulunduğundan, *in vivo* ortamda, yeni ve kontrolü mümkün olan özellikler taşıyan, güvenilir ve tekrarlanabilir gen tedavisi deneysel protokollerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Gen yer değişimi tedavisinin (Gene Replacement Therapy) dışında, *in vivo* gen naklindeki başarı, antijenik proteinin optimal immün cevaba neden olacak şekilde naklinin gerçekleştirildiği, DNA aşılarının geliştirilmesiyle mümkün olabilecektir (1,4,8,9).

Daha yakın zamanda, bu bileşikler gen tedavilerinde terapötik gen taşıyıcıları olarak önem kazanmıştır. Günümüzde insan gen tedavisi ile ilgili araştırmalar etkilenen hücre türlerine

özgü uygun nükleik asit aktarım araçları yokluğundan dolayı tatmin edici değildir. Uygulama noktasından gen ifadesine kadar giden yolda tedavi edici polinükleotit sarmalı yıkımdan koruyacak optimize edilmiş gen taşıma sistemlerine ihtiyaç vardır. Çeşitli lipitlerle nükleik asitler arasında oluşan toplaşımlar günümüzde güvenilir viral olmayan gen aktarım vektörleri olarak denenmektedir. Yoğun olarak kullanılan katyonik lipitlerle yapılan lipofeksiyon deneyleri sıkça istenmeyen sitotoksisiteye, kontrolü zor olan makromoleküler özelliklere, düşük transfeksiyon oranlarına ve diğer tatmin edici olmayan neticelerle sonuçlanmaktadır. Daha etkili hücre transfeksiyon protokollerinin geliştirilmesinin ön koşulu olan lipit-poli(ribo)nükleotit bileşiklerinin fizikokimyasal özellikleri hakkında bilgiler yeterli değildir. Günümüzde kullanılan katyonik lipitlerin hazırlanmasında ortaya çıkan zorluklar dışında, sitotoksisiteleri şimdiye kadar ortadan kaldırılamayan bir engel olmuştur. Lipit-nükleik asit etkileşmeleriyle ilgili sıkça yayımlanan raporların olmasına rağmen, bunları bileşik hale getiren elektrokimyasal, kolloidal ve intermoleküler güçler bilinmemektedir. Bunların karakterizasyonunda şimdiye kadar uygulanan floresan ölçümler, X-Ray saçılım, çeşitli elektron mikroskopik, termodinamik ve spektroskopik tekniklerin transfeksiyonun hücresel mekanizmalarına ilişkin bağlantı kurulamayacak şekilde, soyut ve sıkça birbirine çelişkili olan neticelerle sonuçlanmaktadır. Bu bakımdan, iyileştirilmiş özelliklere sahip yeni gen aktarım sistemlerinin tasarlanması önemlidir.

Bu tez çalışmasında, sitotoksik katyonik lipozomlar yerine, çift valanslı katyonlarca (Ca^{+2} ve Mg^{+2}) zwitteriyonik (nötral) fosfolipitlerle DNA'yı bileşik haline getiren ve nükleik asit taşıyıcı veziküllerin kullanımı ele alınmaktadır. Hayvan, bitki ve bakteri membranlarında en çok rastlanan lipit olduğu için bu araştırmada lipit olarak DPPC seçilmiştir. Fizikokimyasal parametrelerinin iyi bilinmesi dışında, biyolojik olarak aktif Mg^{+2}'un, bu çalışmada sıvı ortamda ortaya çıkan kendi kendine toplaşımlarla ilgili günümüzde geçerli olan polielektrolit teorilere bir yaklaşım olarak incelenmesi amaçlanmaktadır. Karşı yüklere sahip amfifillerle metal iyonların bağlanması konusu ayrıntılı bir şekilde fizikokimyasal olarak araştırılmıştır. Diğer yandan, zwitteriyonik (nötral) lipitlerle katyonların bağlanması konusu yeterince bilinmemektedir. Günümüzde, katyon-fosfolipit etkileşmeleriyle ilgili hesaplanan sitokiyometrik oranların yorumlanmasında ve bağlanma enerjileriyle bağlanma sabitlerinin tayininde zorluklar bulunmaktadır. Bu bakımdan, bu tez

çalışması, metal iyonlarca meydana getirilen supramoleküler kendi kendine toplaşımların oluşum mekanizmaları hakkında daha fazla bilgiler vermeyi hedeflemiştir.

Bu tez çalışmasında, yük taşımayan lipitlerle çeşitli konformasyonlara ve boyutlara sahip polinükleotitler arasında oluşan kendi kendine toplaşımların (self-assemblies) hazırlanması ve kullanımları ile ilgili temel biyofiziksel parametreler incelenmiştir. Daha spesifik olarak, çift valanslı metal katyonlarca tetiklenen tek ve çift sarmallı polinükleotitlerin çok katmanlı (MLV) ve tek katmanlı (ULV) fosfotidilkolin vezikülleri üzerine adsorpsiyonu, agregasyonu ve adhezyonu UV/VIS spektroskopisi ile araştırılmıştır. Zwitteriyonik (nötral) lipozomların termotropik faz değişimleri Mg^{+2} varlığında polinükleotitlerle ve çeşitli DNA türleri ile bileşikler oluşturmaları termodinamik ölçümler ve floresan mikroskopisi ile incelenmiştir ve çeşitli elektrostatik lipit-nükleik asit bileşiklerinin oluşumları ile ilgili daha önce yayımlanan verilerle kıyaslanmıştır.

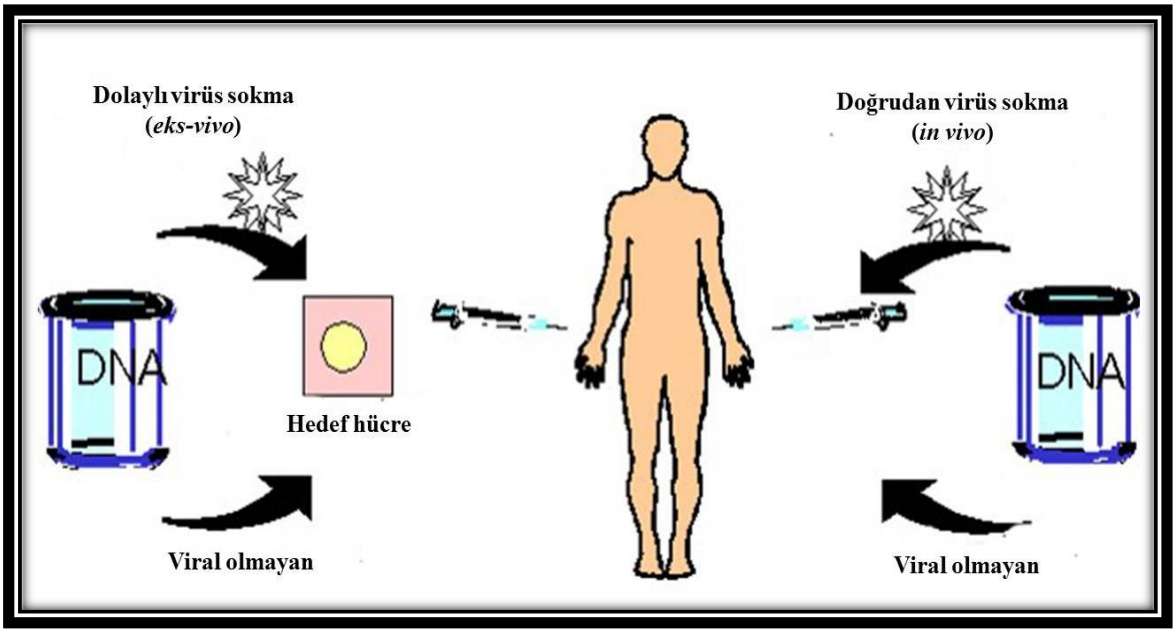
Oluşan üçlü bileşiklerin yüzey tanınma ve sınırlararası özellikleri Langmuir-Blodgett tek katman, titreşim (FT-IR ve Raman) spektroskopisi ile araştırılmıştır. Bu genozomların boyut ve morfoloji analizleri UV/VIS spektrokopisi, dairesel dikroizm ile incelenirken, Mg^{+2} varlığında DNA tarafından meydana getirilen lipozomlar arasında füzyon olayları floresan mikroskopisi ve salınım deneyleriyle incelenmiştir. İnorganik katyonların varlığında sentetik fosfotidilkolin vezikülleri ile polinükleotitler arasında oluşan üçlü bileşikler Diferansiyel Taramalı Mikrokalorimetrik (DSC), İzotermal Titrasyon Kalorimetrik (ITC) ve TermoGravimetrik Analiz (TGA) ölçümlerden elde edilmiş olan veriler, söz konusu bileşiklerin yapısal değişikleriyle ilgili termodinamik ve kinetik modellerin ortaya çıkarılmasında kullanılmıştır. Ayrıca genozomların mikroskopik karakterizasyonu; floresan mikroskopisi, konfokal karanlık alan mikroskopi ve kontrast taramalı elektron mikroskopi (CTEM) ile yapılmıştır. Transfeksiyon için etkili dairesel ve süpersarmallı plazmidlerin oluşumu agaroz jel elektroforez ile ortaya çıkarılmıştır. Lipozom-Mg^{+2}-DNA üçlü bileşenlerinin *in vitro* transfeksiyon etkinliklerinin incelenmesi ile hücresel tedaviler ve gen aktarım çalışmalarına katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

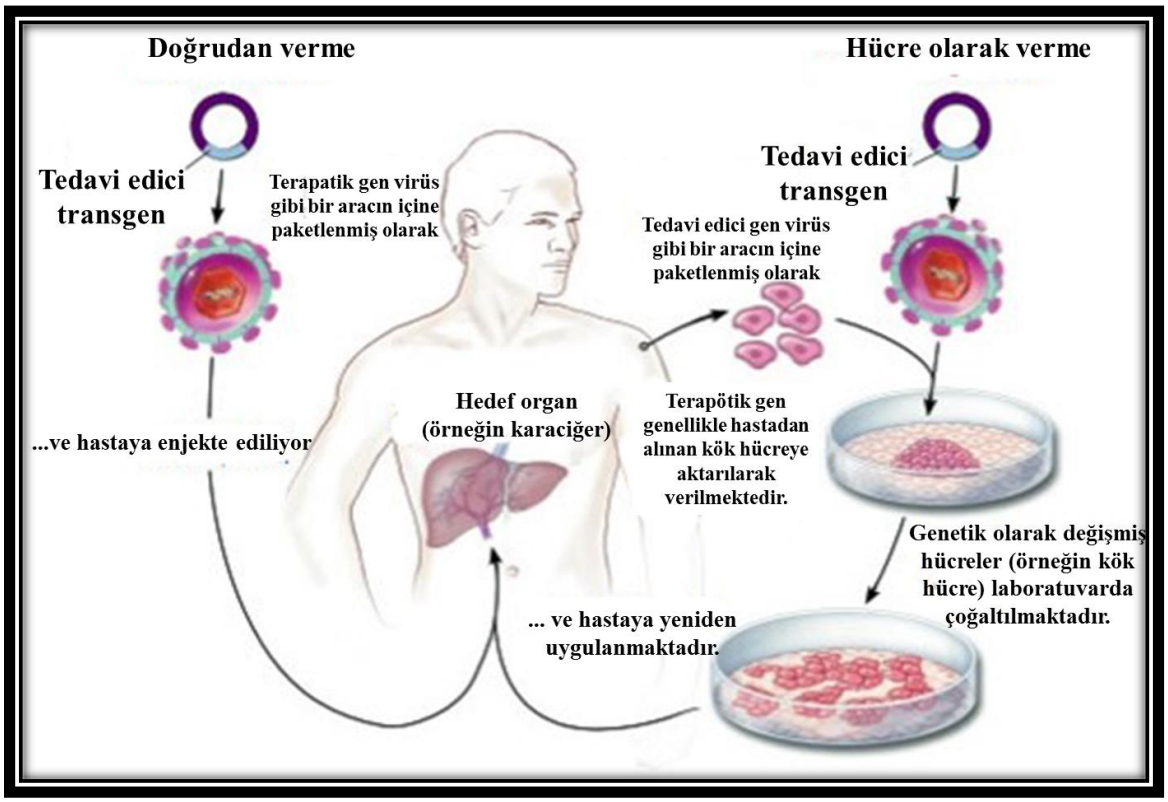
DNA taşıyıcı sistemler; viral olan ve olmayan vektörler olmak üzere ikiye ayrılır. Viral olmayan vektörler; fiziksel ve kimyasal olarak değerlendirilir. Viral olmayan fiziksel polipleksler, lipopolipleksler ve lipopleksler vektörlerden nötr lipitlerle, uygun metal katyonların kullanımı ile yeni gen taşıyıcı sistemler geliştilmeye çalışılmaktadır.

2.1. GEN TEDAVİSİ VE GEN TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

Günümüzde, gen nakli viral ve viral olmayan sistemlerle gerçekleştirilmektedir (11) (Şekil 2.1-Şekil 2.3). Taşıyıcılar genel olarak polimerleri, lipitleri ve polisakkaritleri (ancak çözünürlükleri çok düşük olduğundan, polisakkaritlerin gen taşıyıcı tasarımlarında kullanımları çok kısıtlıdır) içerip, hücresel nükleazlar tarafından muhtemel degredasyonu engelleyecek ve daha küçük boyutlu ve daha az miktarda negatif yük taşıyan ve böylece hücreler tarafından alımı kolaylaştırılmış olan ve intraselüler haberleşmeyi gerçekleştirebilecek şekilde olmalıdır. Bu doğrultuda, taşıyıcıya hücre dışı ve hücre içi engelleri aşmak için uygun fonksiyonel gruplar da eklenebilmektedir. Bunlar, taşıyıcının serum bileşenleriyle tepkimeye girmesini engellemekle birlikte hücre veya doku türüne özgü bağlanmayı kolaylaştıran gruplardır. Söz konusu gruplar, DNA'nın çekirdeğe girmesini, endozomlardan kaçışını veya çekirdeğin porlarından geçişini sağlayarak da bağlanmayı kolaylaştırmaktadır. Belirli patojenin veya tümörün antijenini kodlayan DNA vektörleri önleyici veya terapötik kullanım imkanı sağlayarak bu patolojilere karşı DNA aşısı geliştirilmesinde önemli rol oynayabilirler (1,8). *Ex vivo* gen tedavisi hastadan söz konusu hücrelerin ayrıştırılmasını ve bunların daha sonra *in vitro* olarak terapötik gen ile değişime uğratılmasını kapsamaktadır (4,9). Bu şekilde manipüle edilen hücreler daha sonra tekrar hastaya nakledilmektedir (Şekil 2.2). Diğer yandan, *in vivo* gen tedavisi (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2), direk olarak önceden tasarlanmış genin hastanın dokularına nakledilmesinden ibarettir. Her iki yöntemde de, henüz daha başarılmış olmayan ilgili nükleotit dizilişinin istenilen ekspresyonunu gerçekleştirecek spesifik hedef hücrelere yeterli miktarda aktif ve işlevsel DNA'nın nakli konusu çözümünü beklemektedir. Günümüzde, ilgili hedef hücrelere DNA transferi için birkaç yöntem geliştirilmiştir. Bunlar fiziksel ve kimyasal (sentetik) yöntemler adı altında iki ayrı gruba ayrılmaktadır.

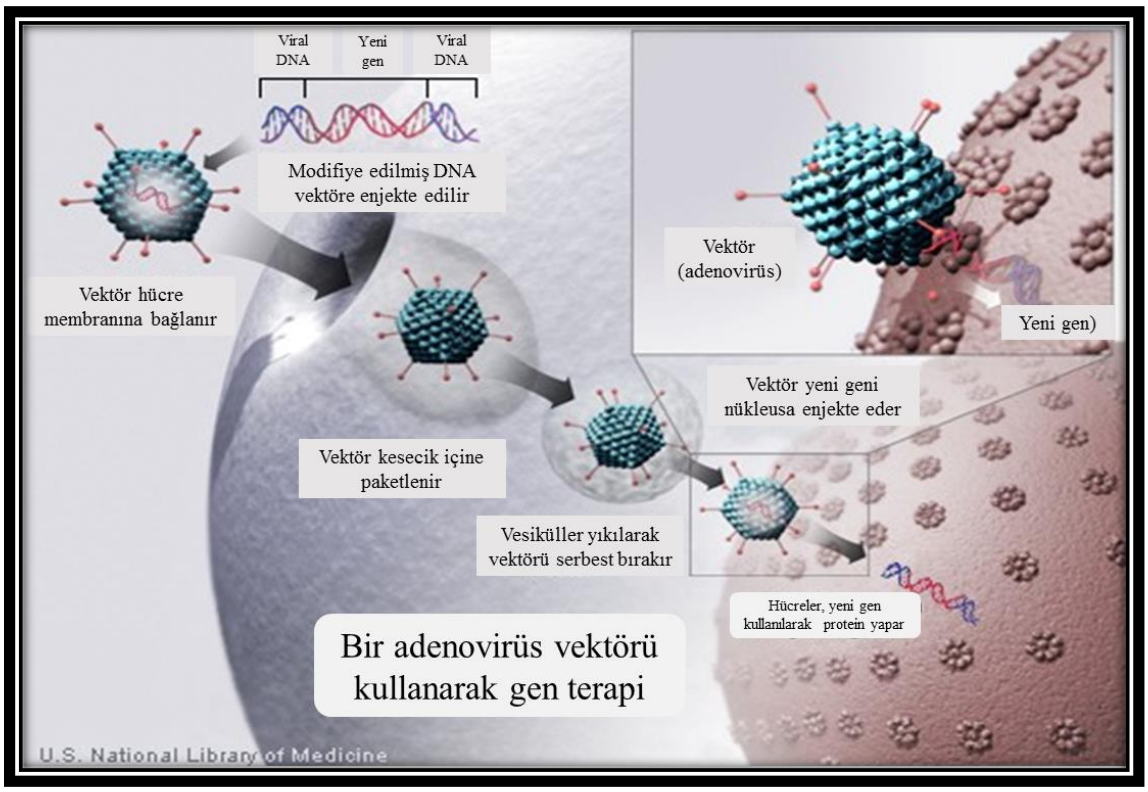


Şekil 2.1. Viral ve viral olmayan gen nakli tasarımları (12).



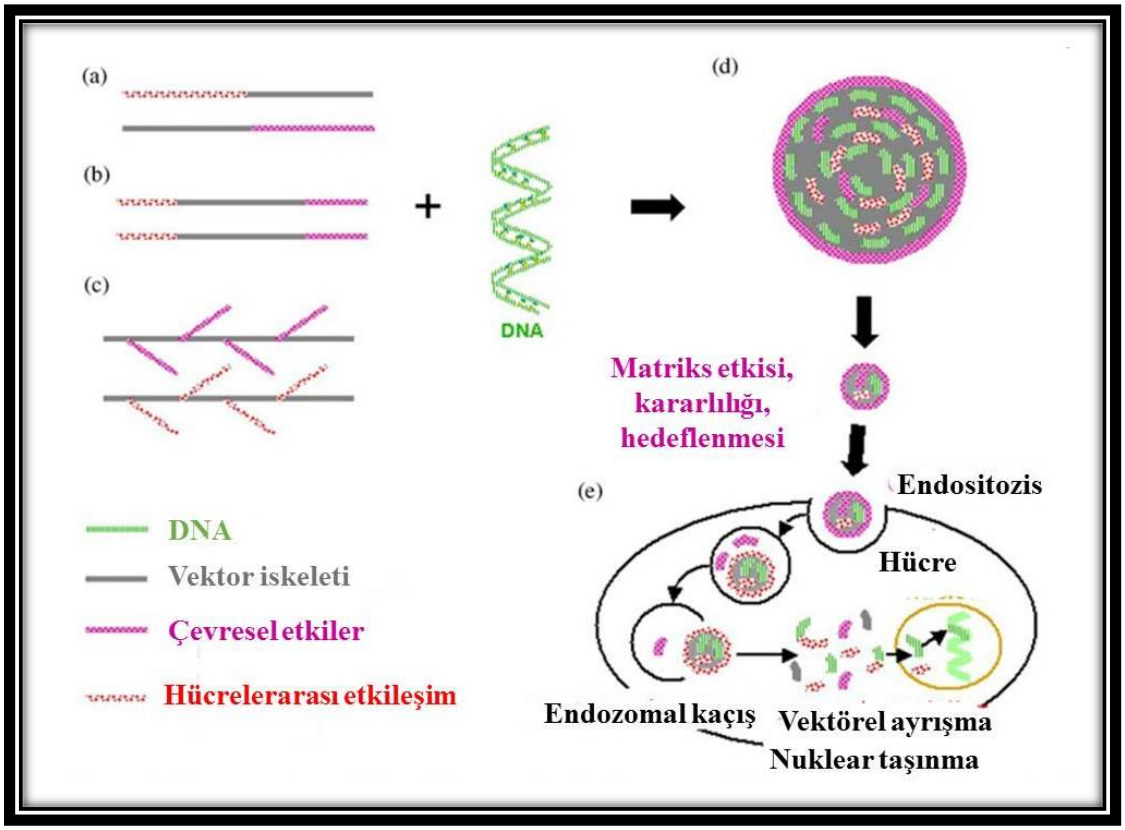
Şekil 2.2. Doğrudan ve hücresel gen nakli tasarımları (13).

Aşağıdaki Şekil 2.3'te yeni gen, adenovirüs vektörüne enjekte edilmekte ve bu modifiye edilen DNA'nın daha sonra ilgili insan hücresine hedeflendirilmesi için kullanılmaktadır. Tedavinin başarılı olması durumda, bu şekilde nakledilen genin ürünü olan işlevsel proteinin sentezi gerçekleşecektir (14).



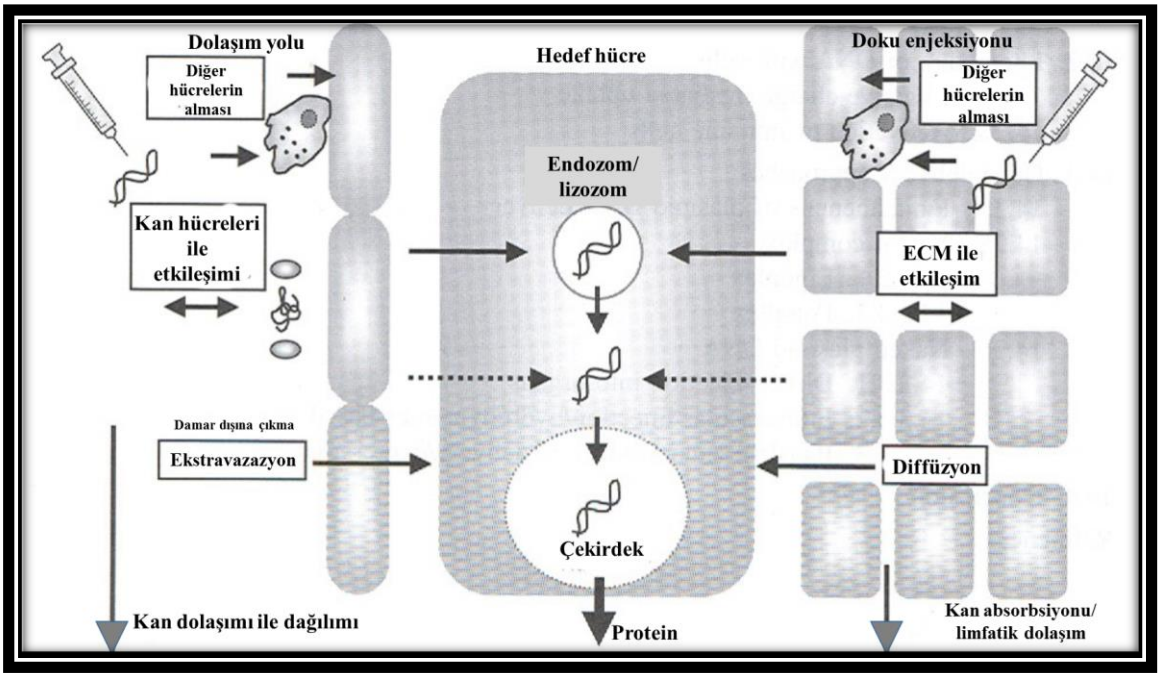
Şekil 2.3. Viral gen taşıyıcı tasarımlarının genel şeması (14).

Aşağıdaki Şekil 2.4'te (a–c) ile gösterilmiş yol, tasarlanan gen taşıyıcının yapı-aktivite özelliklerini de değiştirebilen DNA ile kompleks oluşturma yoludur. (d) Taşıyıcı kesitinden görünen DNA, (e) taşıyıcılar endositozis ile hücre içine alınmakta ve daha sonra engel olarak işlev yapan endozomları aşarak nükleusa girme özelliklerine sahip olmalıdırlar. Bunu takiben tüm kompleks ayrılıp, nükleus içindeki transkripsiyona katılmaktadırlar (11).



Şekil 2.4. Çeşitli lipozomal veya polimere dayalı gen taşıyıcılarının hücre içi (intraselüler) yolu (11)

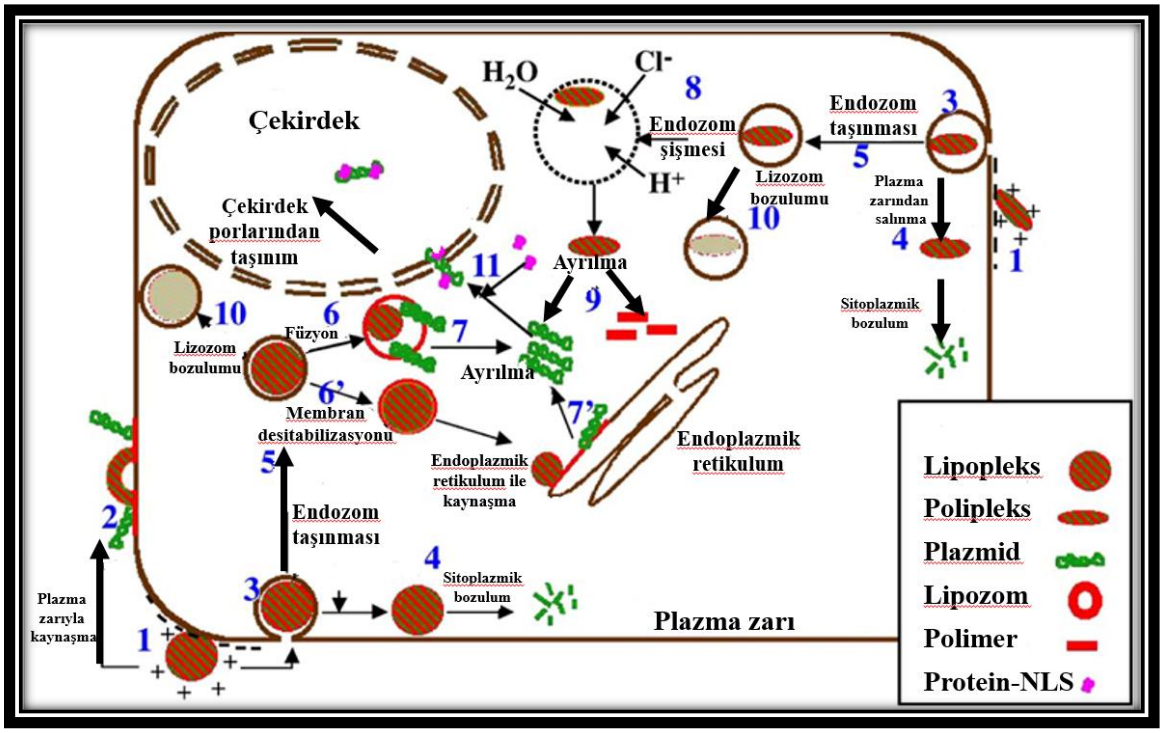
Aşağıdaki Şekil 2.5'te plazmid DNA uygulandıktan sonra, makrofajlar gibi tek hücreli olan, mononükleer fagositlerin de aralarında bulunduğu çeşitli hücreler tarafından alınmaktadır. Ayrıca, plazmid DNA'sı plazma proteinleri ve ekstraselüler matriks bileşenleri ile de etkileşime girmektedir. Bazı durumlarda, plazmid DNA'nın ulaşması gereken hedef hücreyi tanıması için intravasküler yol (extravasation) veya doku enjeksiyonu (difüzyon)'nun gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Gen nakli için kullanılan araç ve nakil protokolüne bağlı olarak, DNA'nın hücrelerce alınması endositotik yol ile (kalın oklar) ve/veya endositotik olmayan yol (kesintili oklar) ile gerçekleşmektedir. Endositozun gerçekleştiği durumlarda, plazmid DNA enzimatik olarak parçalanacağından, endositozu engellemek gerekmektedir. Sadece nükleusa ulaşan plazmid DNA'nın terapötik protein sentezleme şansı vardır (9).



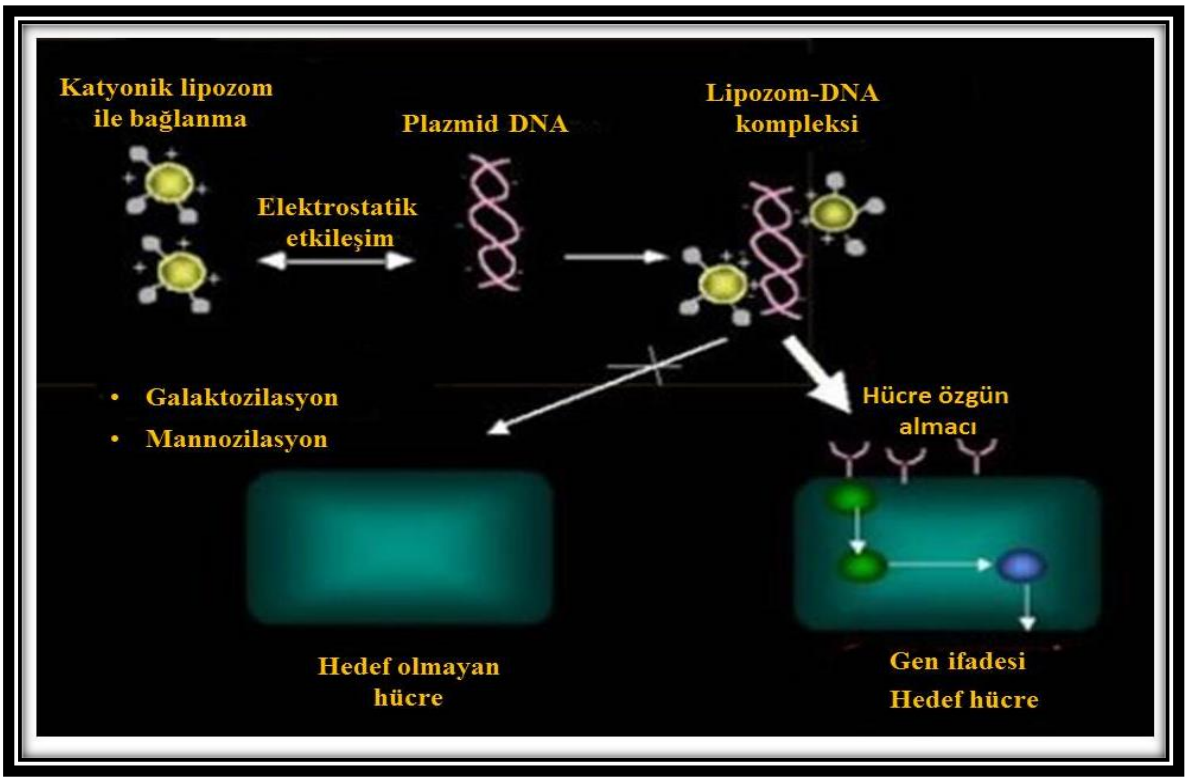
Şekil 2.5. İntravasküler (sol) veya doku (sağ) enjeksiyonundan sonra plazmid DNA'nın *in vivo* akıbeti (9)

Aşağıdaki Şekil 2.6'da lipopleksler ve polipleksler, kırmızı renkli (lipit veya polimeri gösteren) ve yeşil (plazmid DNA'yı gösteren) disk veya elips olarak gösterilmiştir. 1- Sitoplazmanın yokluğunda her iki vektör türünün de hücreye bağlanmaları birçok elektrostatik etkileşmelere dayanır. Sitoplazma varlığında, vektörlere bağlanan proteinler kendilerine özgü hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerce tanınmaktadır (moleküler tanınma olayı gösterilmemiştir). 2- Bazı lipozomların zarıyla plazma membranı arasında füzyon meydana gelebilir, ancak bu durum her zaman DNA'nın hücre içine geçmesiyle sonuçlanmayabilir. 3- Polipleksl erin veya lipopleksl erin hücre içi geçiş mekanizması olarak en genel yolun endositozis üzerinden gerçekleştirildiği bilinmektedir. 4-Polipleks veya lipopleksl erde enkapsüle olarak bulunan terapötik DNA plazma membranının yakınında bulunan endozomlardan çok erken salınıma uğramaktadır ve bu olay neticesinde hedeflendirildikleri (nükleustan) çok uzakta kalmaları yüzünden intraselüler nükleazlar tarafından degradasyona uğratılmaktadır. 5-Endozomların sitoplazmik taşınımları, rekombinant ve transfektan nükleik asitlerin perinükleer bölgeye, daha başarılı bir şekilde çekirdeğe ulaştırılmasında önemli rol oynamaktadır. Genel olarak buradaki amaç DNA'nın nükleusa ulaşmadan önce söz konusu endozomlardan kaçışının sağlanmasıdır. Endozomlardan kaçışı, polipleks ve lipopleks gen taşıyıcı tasarımları farklı yollar takip ederek meydana getirmektedir. Lipopleksl erde, örneğin füzyon yoluyla 6 ve 6'- lipit

taşınımı ve membran desabitizasyonu sayesinde gerçekleştirilmektedir. Polipleks tasarımları ise (en azından polietilenimin (PEI) gibi amin içeren polikatyonlarda veya dendrimerlerde) tamamen hidrofilik olduklarından 8- endozomların osmotik boşaltımı sayesinde gerçekleştirmektedir. Vektörle DNA'nın birbirinden ayrılmasıyla sonuçlanan lipopleks disosiyasyonu 7-endozomlardan kaçış prosedürü esnasında veya (7') sitoplazmada salınıma uğratılan lipoplekslerin endoplazmik retikulum gibi sitoplazmik membran ağı ile füzyonu sonrası meydana gelmektedir. 9-Poliplekslerin sitoplazmada disosiyasyonları henüz daha bilinmeyen başka bir mekanizmayla gerçekleşir. 10-Endozomlardan kaçışı başaramayan lipopleksler ve polipleksler lizozomlarca parçalanmaktadır. Lipoplesklerden veya poliplekslerden ayrılan transfektant DNA hücre döngüsünün mitozis evresi esnasında nükleer membranın degradasyonunun olduğu zamanda nükleusa ulaşabilir (şemada gösterilmemiştir). Bu pasif nükleer lokalizasyon olayı, hücre döngüsünün aktivitesine ve sitoplazmada plazmidin aktif kalma süresine bağlıdır. 11- Aktif, enerji harcanarak gerçekleşen nükleusa geçiş mekanizması da mevcuttur. Bu da çekirdeğe geçişi kodlayan transkripsiyon faktörleri veya DNA-protein kompleksleri gibi makromoleküler bileşenlerin plazmidte bulunan genleri sayesinde meydana gelmektedir. Ayrıca lipozomlarla dolu endozomların membranları direk olarak nükleus membranı ile füzyon yapabilmektedir (şekilde gösterilmemiştir) (15).



Şekil 2.6. Polipleksler ve lipoplekslerin transfeksiyon esnasında hücresel farklı akıbetlerinin özeti. (15)



Şekil 2.7. Lipozom-DNA veya lipozom-plazmid DNA ile hedef hücre arasında oluşan elektrostatik etkileşmelerinin şeması (16).

Hayvan hücresini hedef alarak tasarlanan bir gen nakli genelde şu yolu takip etmektedir. Küçük DNA içeren nanoparçacıkların oluşumu; bu parçacıkların hücreler tarafından alınması; parçacıkların hücre membranından geçip sitoplazmaya girmeleri; DNA'nın çekirdeğe girmesi ve son olarak nakledilen genlerin çekirdekte gerçekleşen ekspresyonu Şekil 2.6 ve Şekil 2.7'de gösterilen DNA genelde plazmid DNA, oligonükleotit, poliribonükleotit veya diğer model DNA'lardan biridir. Bu nükleik asit türleri arasında her ne kadar moleküler ağırlık ve konformasyon bakımından farklılıklar bulunsa da diğer bileşenlerle kompleks oluşumundaki fizikokimyasal etkenler genelde aynıdır. Bu şemalar, bu yüzden herhangi bir nükleik asit (bunlara antisense ribonukleotit tedavisi veya siRNA'ya dayalı tedavilerde olduğu gibi, RNA da dahil olmak üzere) için geçerlidir (Şekil 2.1-Şekil 2.6).

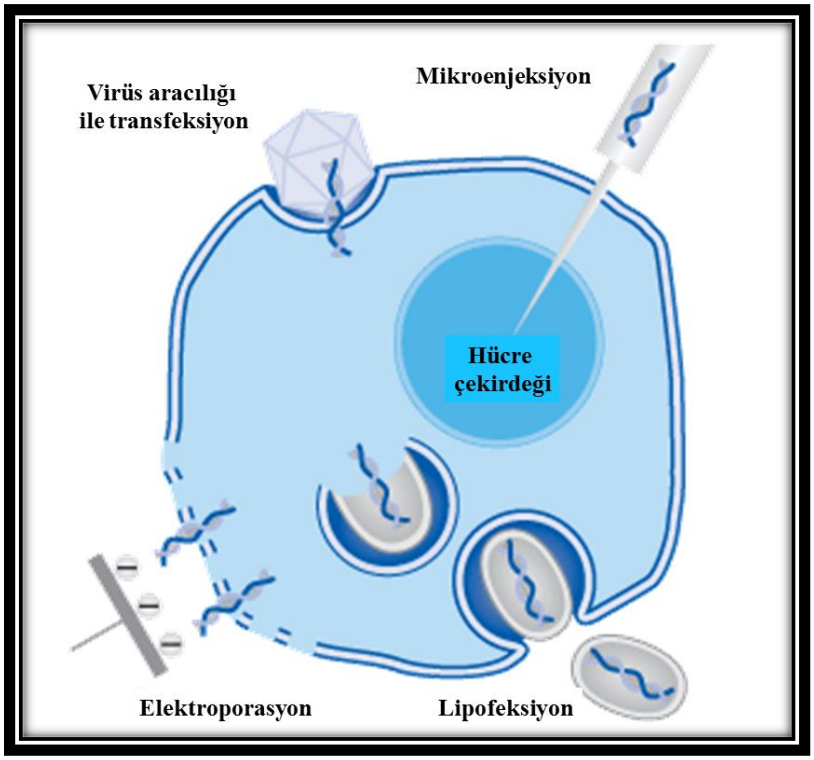
Gen nakli etkili DNA veya oligonükleotitlerin hücre zarı üzerinden geçişine bağlı olarak gerçekleştirilmektedir. Bu olay hücre için son derece etkisizdir ve temelini oluşturan mekanizmalar henüz daha açıklanamamıştır. Ancak, virüsler evrim boyunca enfekte ettikleri çeşitli hücrelerle beraberce (simbiyotik) bir yaşam sürdürdüklerinden nanopartiküler yapılarından dolayı ve viral zarının yapısında bulunan proteinlerce gerçekleştirilen hücre membranı üzerinden geçişi son derece etkili bir şekilde meydana getirebilirler (17–26). Bu bakımdan, gen nakli için retrovirüsler, adenovirüsler, adeno-associated virüsler (AAV) gibi birçok virüs türü gen nakli için birçok araştırmacı tarafından klinik uygulamaya konulmaktadır (Şekil 2.3). Gen naklinin çok etkili bir şekilde başarılabilmesine karşın, viral partiküller bağışıklık sistemini tetiklemekte, antikor ve diğer önemli proteinlerin sentezlenmesine neden olmaktadırlar (27–32). Bu bağlamda, istenilmeyen proteinlerin sentezlenmesi, klinik olarak uygulamalarında ölümle sonuçlanan birçok yan etkilere neden olmuşlardır. Bu yüzden, araştırmalar viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerin sentezlenmesine odaklanmışlardır. Viral olmayan gen taşıyıcılarının geliştirilmesi fizyolojik, iyonik ve pH ortamında negatif yüklü DNA fosfat grupları ile pozitif yüklü gruplar veya polimerik zincirler arasında oluşan elektrostatik etkileşmelere ve makromoleküllerin yapısal özelliklerine bağlı olarak hidrofobik etkileşmelere dayanmaktadır. DNA paketlenmesi veya kondenzasyonu olarak da bilinen bu olay yoğun olarak araştırılmaktadır. DNA paketlenmesi olayında, doğal poliamin putresin ($H_2N(CH_2)4NH_2$), spermidin ($H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$) vespermin'in ($H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$) türevleri olan bazı katyonik moleküller ile

gerçekleştirilmektedir. Genel olarak, nükleik asit ile bu türevlerin kondenzasyonu (yoğunlaşması) morfolojik olarak özgün DNA nanoparçacıklarının oluşmasıyla ortaya çıkarılır. Bu Dynamic Light Scattering (DLS) yöntemi dışında, elektron ve floresan mikroskopik ve son yıllarda atomik kuvvet mikroskopik incelemeleriyle teyit edilmiştir. Ancak, bu küçük katyonik moleküllerle DNA arasında oluşan bileşenler çoğu zaman sabit değildir ve sitoplazma gibi fizyolojik iyonik ortamlarda bu gibi kompleks oluşumları ayrışmayla sonuçlanmaktadır (4,9). Bu yüzden, gen taşıyıcıları olarak, daha yüksek valanslı poliaminler ve spermidin ve sperminin türevleri sentezlenmiştir. Bu gibi sentetik polikatyonlar DNA'yı nanopartiküllere dönüştürüp hücre içi geçişi kolaylaştırmaktadır. Katyonik poliaminler ve polimerler büyük hacimli DNA moleküllerini işlev düzenleyici gen bölgesini de içerecek şeklinde daha küçük boyutlu parçacıklara dönüştürebilmektedirler. Sonuç olarak, viral olmayan sentetik taşıyıcı tasarımlarından bir tanesi DNA'yı elektrostatik etkileşmeler sayesinde yoğunlaştıran ve böylece hücre içi geçişini kolaylaştıran polikatyonik polimerlerin kullanımına dayanmaktadır(33–38). Bir diğer yaklaşım ise H-bağları ile DNA'ya bağlanabilen ancak nükleik asit yoğunlaşması ile sonuçlanmayan, nötr amfifilik polimerleri kullanmaktadır (36,37). Günümüzde, viral sistemlere nazaran, her iki yöntemin de dezavantajı çok düşük transfeksiyon oranlarının olmasıdır (38). Yukarıda adı geçen sentetik polimer yapılardan başka, çeşitli poliamin türevleri, poliamidler ve polivinil türü polimerler gibi üç ayrı polimer türü kullanılmaktadır. Bu polimerlerin transfeksiyon yetenekleri birbirinden çok farklıdır. Ayrıca, yapıları itibariyle sentezlenmeleri kolay olmakla birlikte, kullanılmakta olan sentetik polimerler doğal bileşenler olmadıklarından, elektrostatik ve hidrofobik özelliklerinin kontrolü bir hayli güç olup, bağışıklık sistemini aktive etmektedirler. Viral olmayan taşıyıcılar ayrıca işlevsel organik grupları da içerebilirler ki bu hücre türüne özgü hedeflendirmeyi (cell-specific targeting) ve nükleer lokalizasyonu da kolaylaştırmaktadır. Bu tür yaklaşımlarda en önemli husus, DNA'yı enzimatik degradasyondan koruyacak şekilde toksik olmayan ve biyolojik olarak yok edilebilinen (biyodegradable) gen taşıyıcılarının tasarlanmasıdır. Ayrıca, bu taşıyıcılar membran reseptörlerince meydana getirilen hücresel alımı kolaylaştırıp, DNA'nın endozomal salınımını da gerçekleştirebilmektedirler (9).

2.1.1. DNA TAŞIYICI SİSTEMLER

Başarılı bir gen tedavisi için, tedavi edici geni veya genleri hedef hücreye verimli olarak taşıyabilecek gen aktarım vektörleri gerekmektedir. Gen aktarım vektörleri; istenilen terapötik geni taşıyabilme kapasitesine sahip olmalı, üretimi tekrarlanabilir olmalı, saklama koşullarında sabit kalabilmeli, hedef hücreye gen aktarımını istenilen düzeyde sağlamalıdır (39,40).

Elektroporasyon fiziksel gen nakli yöntemlerinden biridir (4,41). Ancak bu yaklaşımda kullanılan elektrik alanlarının DNA'nın parçalanmasına neden olmaları bu yöntemin problemlerinden biridir. Diğer bir yaklaşım ise Particle-Mediated Gene Transfer (PMGT) yöntemidir ve burada "gene-gun" olarak bilinen yöntem kullanılmaktadır. Her iki yöntem de yüksek frekanslı elektrik akımlarının kullanıldığı son derece ustalık gerektiren yaklaşımlardır. Son yıllarda fiziksel yöntemler arasında direk DNA enjeksiyonu yöntemi de yerini almıştır. Ancak bu yaklaşım daha başlangıç aşamasındadır. Hücreye zarar verme ihtimalinin yüksek olması yüzünden, günümüzde kimyasal (sentetik) gen taşıyıcı tasarımları tercih edilmektedir (4,9).



Şekil 2.8. Transfeksiyon yaklaşımları (42)

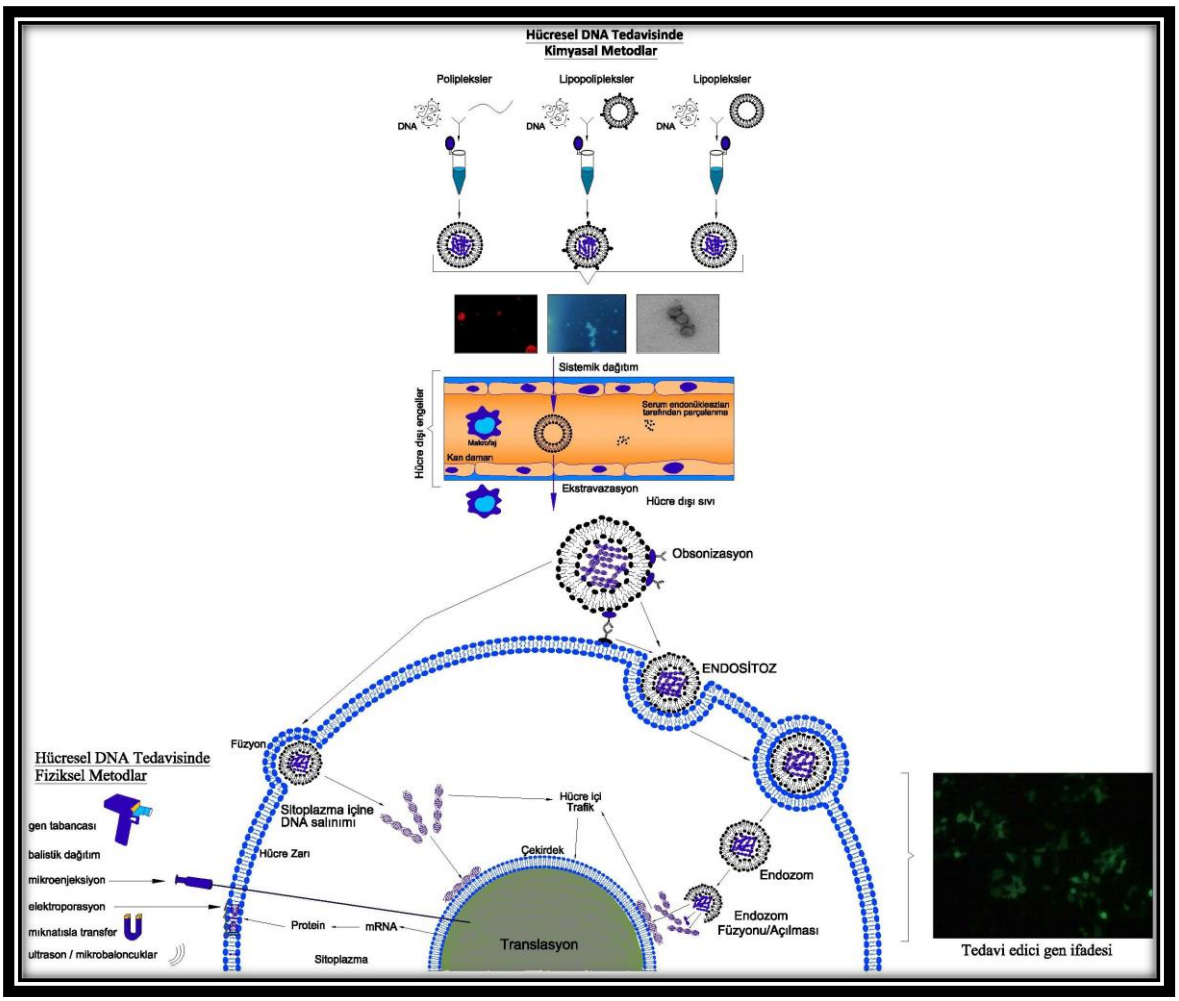
2.1.1.1. Viral Vektörler

Viral bazlı gen taşıyıcı sistemler, viral hastalık oluşturmadan terapötik genleri hedef hücrelere aktarmak üzere, üzerinde modifikasyonlar yapılan taşıyıcılardır (43). Genetik modifikasyona uğramış rekombinant, retrovirüs vektör (44), adenoviral vektör (45), adeno-bağlantılı viral vektör (46), herpes simpleks virüs vektör (47), enzimatik yıkımdan korumak için tedavi edici geni viral kapsid içerisinde taşımaktadır. Yoğunlaştırılmış DNA ile karşılaştırıldığında viral kapsid içerisinde 104-106 oranında sıkılaştırılmış şekilde taşımaktadır. Viral vektörler, hedef hücrenin yüzeyi ile etkileşmekte, reseptör aracılığı ile hücre içerisine alınmakta ve etkin bir şekilde endozom ile çekirdek arasında geçiş sağlamaktadır. Ayrıca çekirdek içerisinde taşıdığı genomik yapı ile konakçı hücrenin kromozomal DNA'sına uyum sağlama kapasitesine sahiptir (48). Bu nedenlerden dolayı şu andaki klinik protokollerin %75'ini viral rekombinant vektörler oluşturmaktadır. Bu protokollere rağmen, güvenlik nedeniyle, insan üzerinde kullanımının sınırlı olması ise düşündürücüdür. Tümörojenik mutasyonu başlatmasındaki olasılık veya rekombinasyon ile aktif viral partikülleri meydana getirebilme olasılıkları ve immünojeniteleri nedeniyle tekrar dozu uygulamada büyük sorunlar oluşmaktadır (49). İmmün yetmezliği olan kişilere uygulanan retroviral kaynaklı gen tedavisinde, taşıyıcıya ait toksisite problemine bağlı lösemi benzeri tablo gelişmiştir (50). Viral vektörlerin diğer zayıf yanları, özel hücre türlerine sınırlı hedefleme, taşıyabileceği DNA'nın sınırlı olması, büyük miktarda üretim zorluğu ve maliyeti olarak sıralanabilir (49). Bu nedenlerle alternatif olarak görülen, viral olmayan sistemlere ilgi artmaktadır.

2.1.1.2. Viral Olmayan Vektörler

Viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerin tedavi edici geni taşıyabilmesi için plazmidlere ihtiyaç duyulmaktadır. Plazmidler, kromozomdan bağımsız olan, kapalı dairesel yapılı, çift iplikli DNA molekülleridir. Memeli hücresinin çekirdeğine aktarıldığında, üzerinde taşıdığı farklı sekans gruplarının (promotor-"ilerletici bölge", enhansır-"hızlandırıcı bölge" ve intron bölgeleri gibi) kontrolünde protein ekspresyonu gerçekleşir. Plazmidleri, nükleaz ataklarından korumak ve hücresel bariyerlerden geçirmek için genellikle bir taşıyıcı ile kombine edilmesi gerekmektedir. Bu grupta en çok araştırılan vektörler katyonik lipitler ve katyonik polimerler olmasına rağmen partikül bombardımanı gibi farklı metodlar ile pDNA'nın yalnız uygulandığı klinik çalışmalar da bulunmaktadır (51).

Aşağıdaki Şekil 2.9'da hücresel DNA tedavisinde kullanılan kimyasal metodlardan; polipleksler, lipopolipleksler, lipopleksler şematize edilirken, fiziksel metodlardan; gen tabancası, balistik dağıtım, mikroenjeksiyon, elektroporasyon, mıknatısla transfer, ultrason/mikrobaloncuklar gösterilmektedir.



Şekil 2.9. Hücresel DNA tedavisinde fiziksel ve kimyasal metodlar.

2.1.1.2.1. Viral Olmayan Fiziksel Vektörler

pDNA yapısının tasıyıcı içermeden (çıplak pDNA) hücre zarından geçmesini sağlamak ve kolaylaştırmak amacıyla uygulanan yöntemlerdir (52). pDNA, boyutunun büyük olması ve yüzey yükünün yüksek negatif değerlerde olması nedeniyle kendi başına hücresel bariyerleri geçemez ve DNase degredasyonuna uğrayarak vücuttan elimine olur. Şaşırtıcı olarak, DNA aşısı uygulaması ile damarın tekrar daralması (restenoz) ve iskemik kalp hastalığı uygulamalarında az da olsa klinik yarar sağlanmıştır (53,54). Çıplak pDNA'nın

hücre içerisine direkt mikroenjeksiyonu ile yüksek etkinlik elde edilmiştir. Tek hücre için verimli bir yöntem gibi görünse de hücre sayısı arttığında yöntem işlevsiz kalmaktadır (55). Çıplak pDNA etkinliğini artırmak için fiziksel stratejiler geliştirilmiştir. Gen tabancası olarak adlandırılan altın kaplı pDNA'nın yüksek basınç altında helyum akımı ile iğnesiz olarak aktarımını sağlayan yöntem, daha çok bitki dokularında kullanılmaktadır. *In vitro* koşullarda ve sadece deriye yüzeyel olarak *in vivo* uygulamaları ile gen tabancası yöntemi başarılı olmuştur (56). Uygulanan düşük doz nedeniyle, yüksek basınç altında sıvı yardımıyla aktarımı sağlayan intraject veya jetgun isimli aletlerin kullanıldığı yöntemler ile doz miktarı göreceli yükseltilebilmiştir. Elektrik akımı ile hücre zarında oluşturulan geçiş alanı ile pDNA aktarımı, elektroporasyon ile sağlanmaya çalışılmış, hücrenin zarar görmesinden dolayı tercih edilmemektedir.

2.1.1.2.2. Viral Olmayan Kimyasal Vektörler

Viral olayan kimyasal vektörler; polipleksler ve lipopleksler olarak ikiye ayrılabilir. Bu tez çalışmasında kullanılan viral olmayan kimyasal vektörlerden lipopleksler ayrı bir başlık altında ayrıntılı anlatılacaktır.

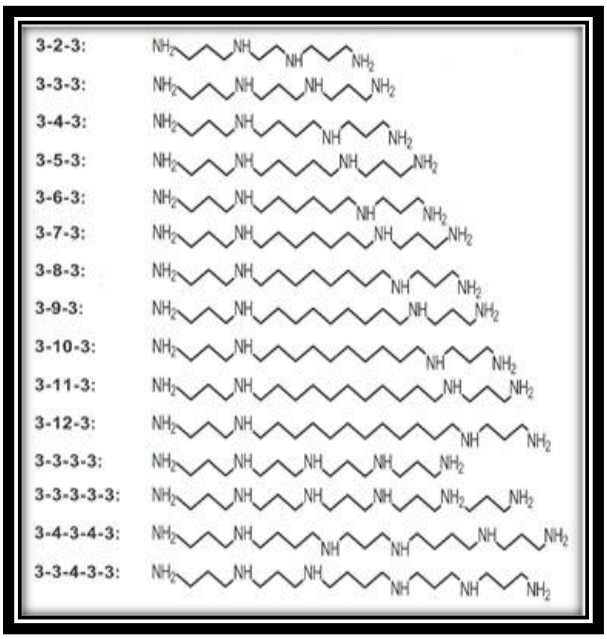
Polipleksler

En çok bilinen polipleksler; poliaminler, polietilenimin, dendrimerler, proteinler, polipeptitler ve polimerlerdir.

Poliaminler

Poliaminlerden spermidin, spermin ve bunların sentetik türevleri DNA kompaktizasyonunu meydana getiren moleküller arasında en etkili olanlar arasında gösterilmektedir (57). Poliamin ve analogları DNA kondenzasyon ve kompaktizasyon reaksiyonlarının %89'unda bunu yük nötralizasyonu olarak meydana getirmektedirler. Diğer yaklaşımlarda, katyonik poliaminlerden olan kobalt hekzamin^{+3} kullanılmaktadır. EtBr yer değiştirme deneyi (displacement assay) kullanarak poliamin homologlarının DNA'ya farklı afinite gösterdikleri ortaya çıkarılmıştır. Tetravalent poliaminlerin DNA'yı hücre içi geçiş olayında çok etkili olmamalarına rağmen, hekzaminler gibi daha yüksek valanslı poliaminler bu geçişi daha başarılı bir şekilde gerçekleştirmektedirler. Aşağıdaki Şekil

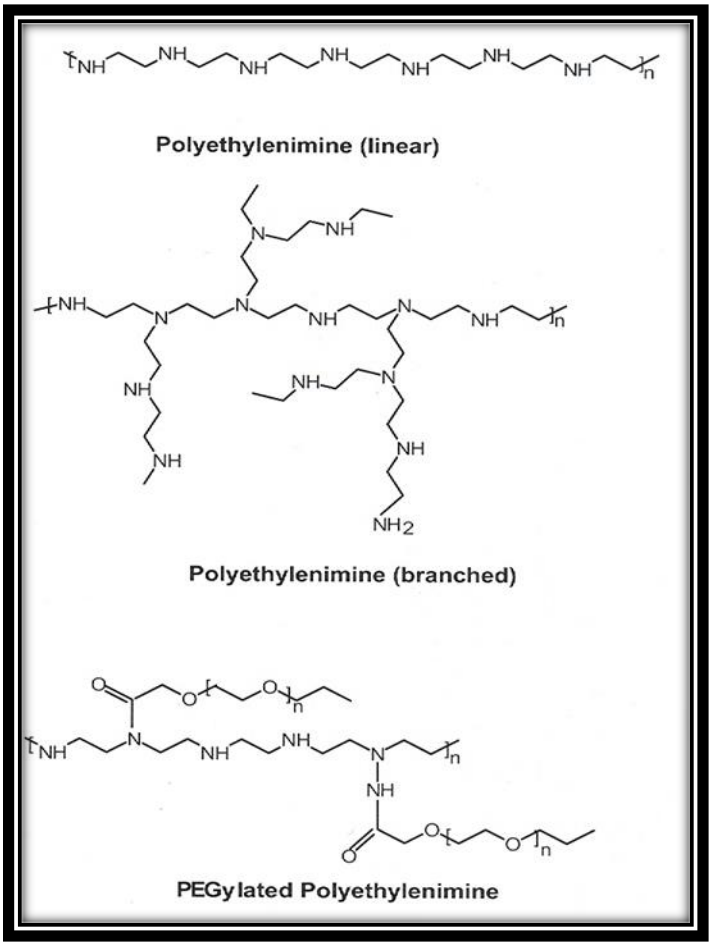
2.10'da Poliamin türevleri primer ve sekonder amino gruplarını birleştiren metilen gruplarının sayısını gösteren numalandırma sistemi ile kısaltılarak gösterilmiştir (57).



Şekil 2.10. Doğal poliamin olan sperminin '3-4-3' ve çeşitli türevlerinin kimyasal yapıları (57).

Polietilenimin

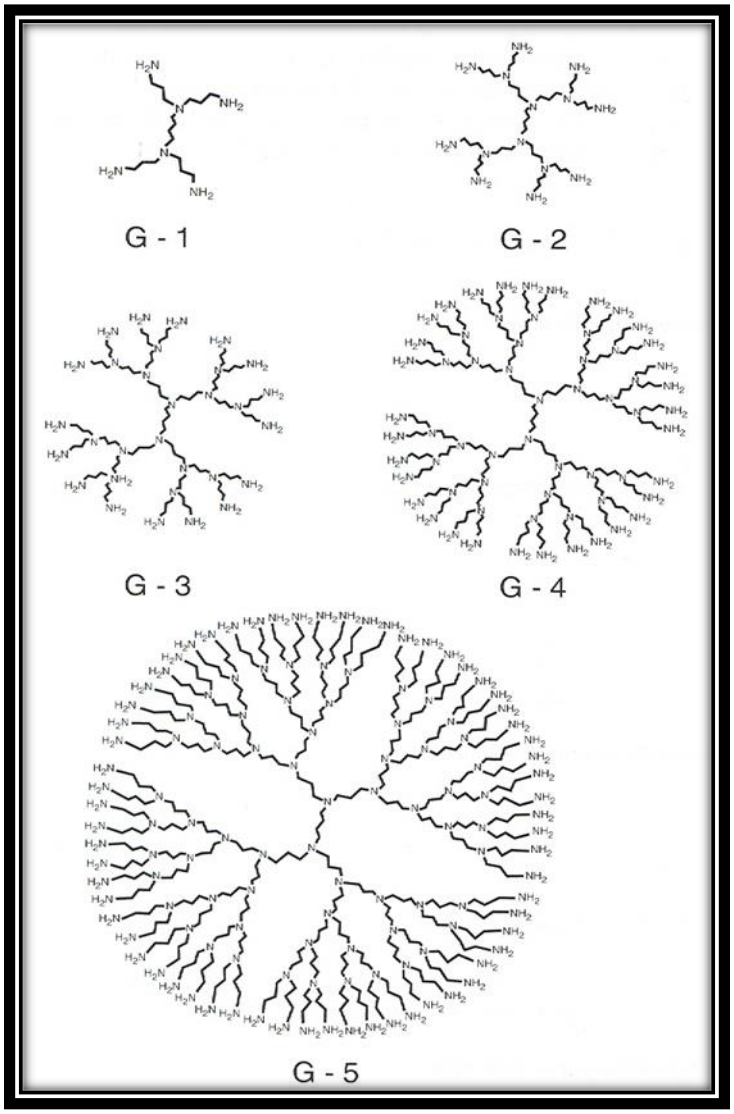
Polietilenimin (PEI) farklı hücre kültürlerinde ve hayvan modellerinde oligonükleotitlerin ve plazmid DNA'nın hücre sitozolüne geçişinde etkili rol oynayan sentetik polimerler grubunun bir bölümünü teşkil etmektedir (Şekil 2.11). Doğrusal ve zincir şeklindeki PEI DNA'yı nanoparçacıklara dönüştürmektedir. DNA kondenzasyonunda ve transfeksiyon etkinliğinde PEI'nin kullanılan şekli ve moleküler ağırlığı rol oynamaktadır. Fizyolojk pH'da PEI/DNA bileşiklerinin endozomal degradasyonu daha kolayca aşabildikleri gösterilmiştir. Ancak, bu nanopartiküllerin çok düşük olan çözünürlüğü, gen naklinde kullanımlarını kısıtlamıştır (57).



Şekil 2.11. Doğrusal, zincirli ve polietilen glikol ile konjuge edilmiş polietileniminler (57).

Dendrimerler

Poliamidoamin (PAMAM) ve polipropilenimin (PPI) dendrimerleri (Şekil 2.12) DNA nanopartiküllerini etkili bir şekilde oluşturma ve DNA naklini kolaylaştırma kabiliyetleri dikkati çekmiştir. Doğrusal ve zincirli polimerlerle kıyaslandıklarında dendrimerlerin monodispers olmaları ve kontrol edilebilen işlevsel yüzeye sahip olmaları bu moleküllerin gen taşıyıcı tasarımlarında kullanılmaları konusunu gündeme getirmiştir. Dendrimerlerin artan karmaşıklığı G1-G5 numaralandırma sistemi ile gösterilmiştir (Şekil 2.12).



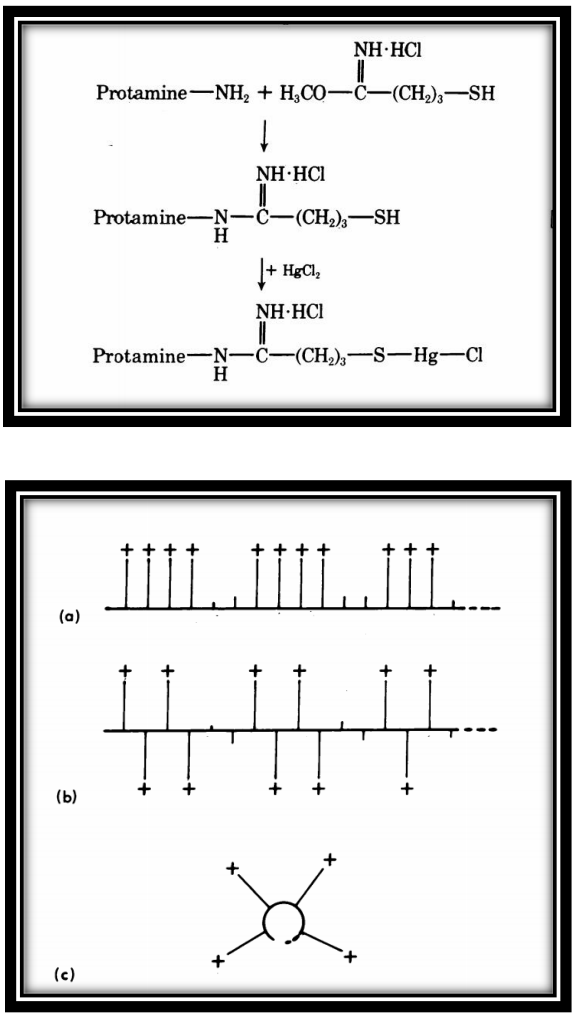
Şekil 2.12. Polipropilenimin dendrimerlerinin beş ayrı çeşidinin kimyasal yapıları (57)

Proteinler ve Polipeptitler

Hücrede DNA nanoparçacıklarının oluşumu DNA'nın histonlar ve protaminler gibi katyonik proteinler veya peptitler ile etkileşimi neticesinde gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.13 ve Şekil 2.14). Spermde ve bazı virüslerde bulunan nükleik asitin fosfodiester kısmıyla bağlanabilen arginince zengin bölgeler içeren protamin tarafından kondanze edilmektedir.

Aşağıdaki Şekil 2.13'de a ile gösterilen kısımda protaminde amino asit dizilişinin şematik çizimi gösterilmektedir. b ile gösterilen kısımda Argininin yan gruplarını ayıran alternatif

bir yapının gösterimidir. Bu şekliyle protaminin DNA ile etkileşmelere girdiği düşünülmektedir. c ile gösterilen kısım da Protaminin bir diğer olası helikal yapısıdır (58).

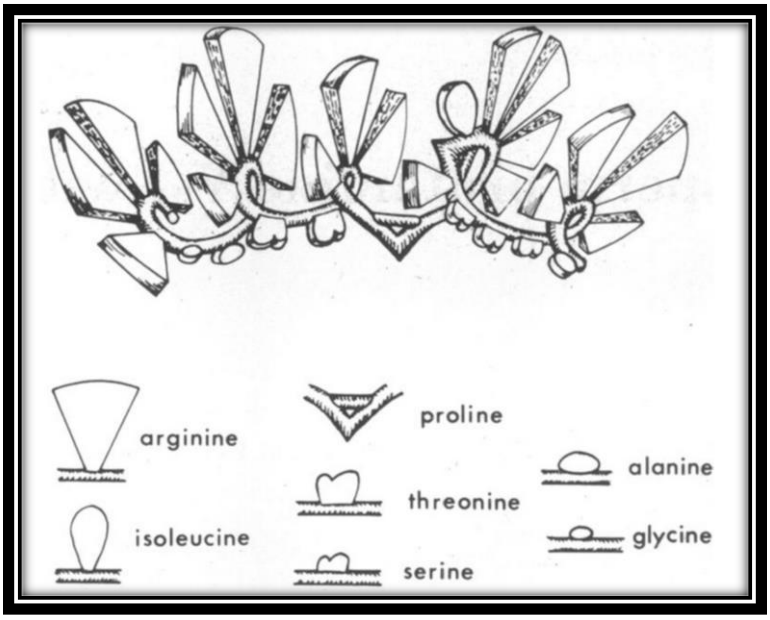


Şekil 2.13. Protamine amino asit dizilişinin şematik çizimi (58).

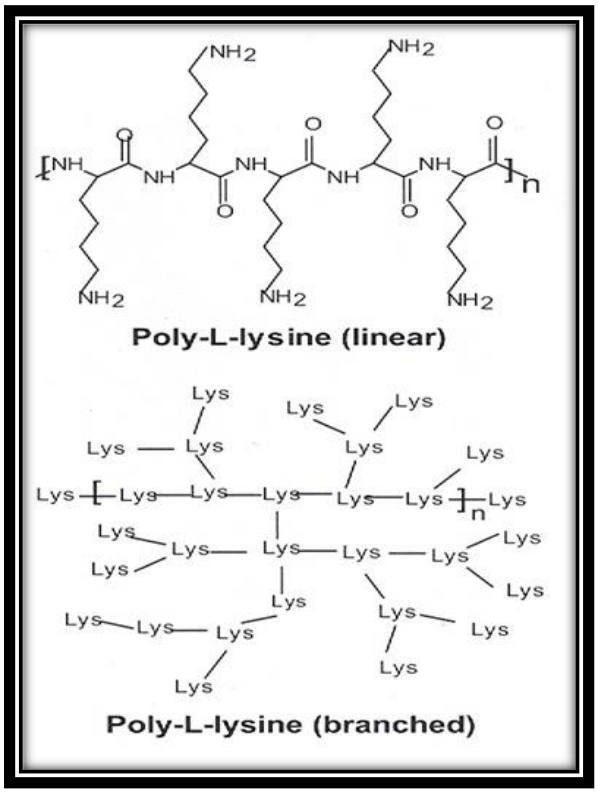
Hering protaminin (protamine (clupeine) Y-I) yapısı Şekil 2.14'de görülmektedir. Protamin aracılıyla gerçekleştirilen DNA kondenzasyonu arginin gruplarının DNA sarmalının her iki zincirini de kilitleyerek nükleik asiti transkripsiyonel olarak aktif olmayan konformasyona dönüştürmektedir.

Bir katyonik polipeptit olan, polilizin (poly-L-lysine, PLL), DNA ile etkileşmelere girip nükleik asit nanoparçacıklarının oluşumuna neden olan ek proton içeren amin gruplarını yapısında bulundurmaktadır (Şekil 2.15). Bu şekilde oluşturulan nanoparçacıkların büyüklüğü PLL yapısal özelliklerine (doğrusal veya zincirli) ve ortamın iyonik özelliklerine bağımlılık göstermektedir. DNA naklinde çok etkili olmamasına rağmen,

reseptörlere bağlanma yeteneği gen taşıyıcı potansiyelini artırmaktadır. Ayrıca, poly-L-lysine (PLL)-DNA kompleks oluşumu, DNA'yı hücresel ortamda enzimatik degradasyondan koruduğuna dair raporlar bulunmaktadır (57).



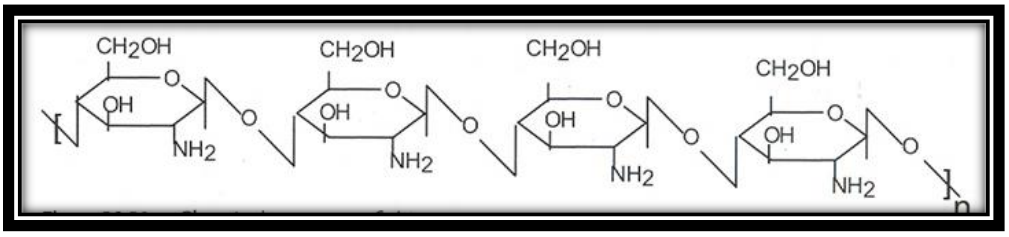
Şekil 2.14. Hering protaminin (protamine (clupeine) Y-I) yapısı (57).



Şekil 2.15. Doğrusal ve zincirli poli-L-lizinin kimyasal yapıları (57).

Polimerler

Kitosan (Chitosan) doğal bir polimer olup glikozidik bağlarla birbirleriyle bağlanan D-glikozamin ve N-asetil-D-glikozamin moleküllerini içeren iki alt birimden oluşmaktadır (Şekil 2.16). Nispeten daha az toksiktir ve DNA nanopartikül oluşmasını takiben transfeksiyon etkinliği oldukça yüksektir. Böylece, kitosan ve çeşitli türevleri gen nakli konusunda gelecek vaat eden bileşikler olarak görülmektedir.



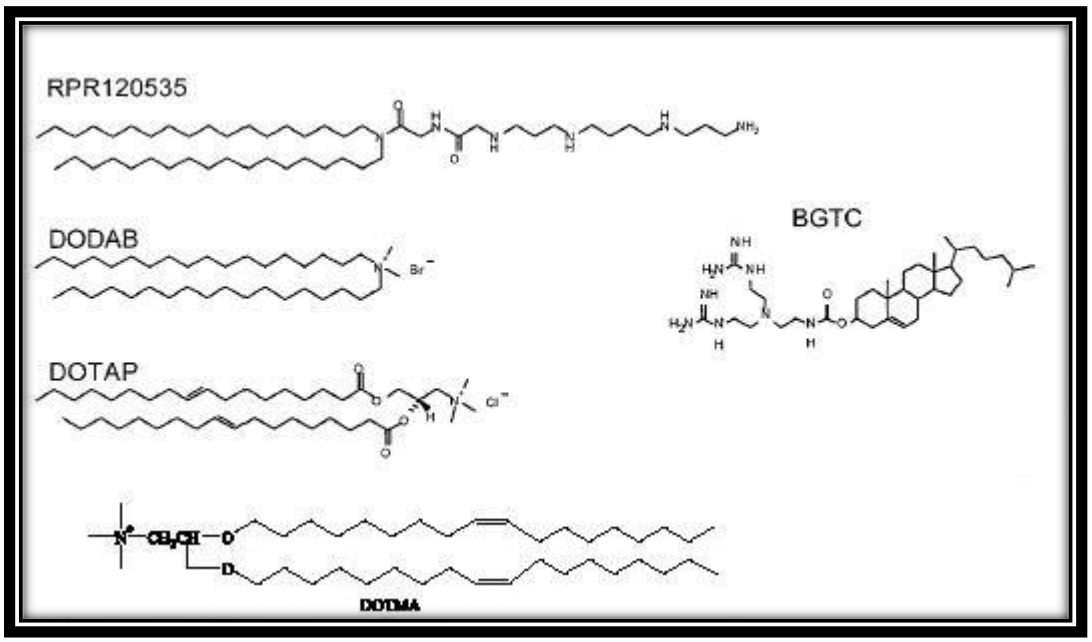
Şekil 2.16. Kitosan (Chitosan)'ın kimyasal yapısı (57).

Poli(etilen glikol) (PEG) ve poli(etilen oksit) (PEO) gibi nötr polimerler de yüksek pI'de DNA kondenzasyonuna neden olmaktadır. Bu yük taşımayan ve esnek polimerler "excluded volume mechanism" adıyla bilinen mekanizma ile etki gösterirler. DNA kondenzasyonunun stabilitesini ve transfeksiyon etkinliğini artırmak amacıyla, çoğu zaman PEG PEI, folat reseptörleri ve poli-L-lizin ile konjuge edilmektedir (57).

Lipopleksler

Gen tedavisinin klinik öncesi araştırmalarda DNA naklini başarılı bir şekilde gerçekleştiren moleküller arasında katyonik lipitler dikkati çekmektedir (33,59–62). Bu moleküller hidrofobik ve polar grup olmak üzere 2 ayrı kısımdan oluşmaktadır. DNA transfeksiyonu için çok sayıda sentetik katyonik lipit geliştirilmiştir (Şekil 2.12). Bu moleküller lipitin pozitif yüklü polar baş grubu ile DNA'nın negatif yük taşıyan fosfat grubu arasında elektrostatik etkileşmeye neden olup DNA nanoparçacıklarının oluşmasına neden olmaktadır. DNA, nanoparçacıklar ve lipitler arasında bu şekilde oluşan kompleks sayesinde, DNA'nın hücresel engelleri daha kolay aştığı ve hücre kültürü ortamında enzimatik degradasyona daha dirençli olduğu tespit edilmiştir (59). Bu nanopartiküllerin boyutları 50 ile 1000 nm arasında değişmektedir. Sıçan ve makaklarla yapılmış deneylerden elde edilmiş veriler yüksek dozlarda, birkaç defa üst üste uygulandıklarında katyonik lipitlerin akciğer patolojilerine neden oldukları görülmüştür (33,59–62). Katyonik

lipitlerden bazıları aşağıdaki Şekil 2.17'da görülen; lipopoliamin (RPR120535), dioktadesildiamonyum bromid (DODAB), dioleoiltrimetilamonyum propan (DOTAP), ve bisguanidiniyum tren kolesterol (BGTC), (N-[1-(2,3-dioleyloksi) propil]-N,N,N-trimetilamonyumklorid (DOTMA)'dır (59,63).

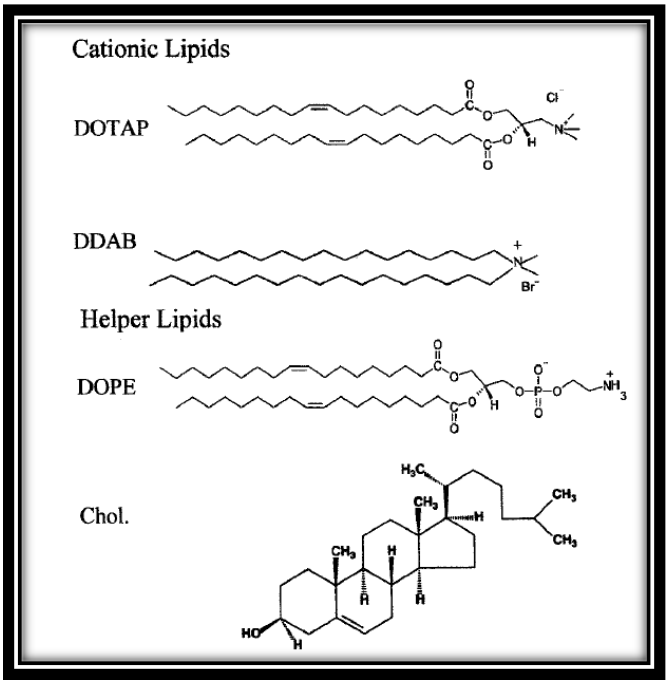


Şekil 2.17. Katyonik lipitlerden en çok bilinen örnekler: l RPR120535, DODAB, DOTAP, BGTC, DOTMA (59,63).

Polivalent Katyonik Lipitler

DOTAP ve DOTMA'nın gen naklindeki başarısını takiben, birçok başka lipit hazırlanmıştır. Aralarında, dioktadesilamidoglisilspermin (DOGS veya ddtransfektamTT) gibi yapıların da örnek olarak gösterilebileceği, polivalent katyonik lipitler yoğun ilgi çekmişlerdir. Diğer popüler örnekler DOSPA, DPPES, $(C_8)_2$Gly Sper^{3+} ve $(C_{18})_2$Sper^{3+}'dir.

Katyonik lipitler, DOGS ve DOTMA, DNA ile bağlanma mekanizması bakımından farklılık göstermektedir. DOGS'un baş grupları poliamin grubu aracılığıyla DNA'daki küçük (minör) oyuk ile etkileşmeye girmektedir. DOGS fazlalığında, DNA paketlenip, nükleozom benzeri yapı oluşmaktadır. Bundan farklı olarak, DOTMA sıvı çözeltide lipozomların meydana gelmesine neden olmaktadır. Bunlar kendiliğinden negatif yüklü DNA molekülleriyle agregatlar oluşturmaktadır.



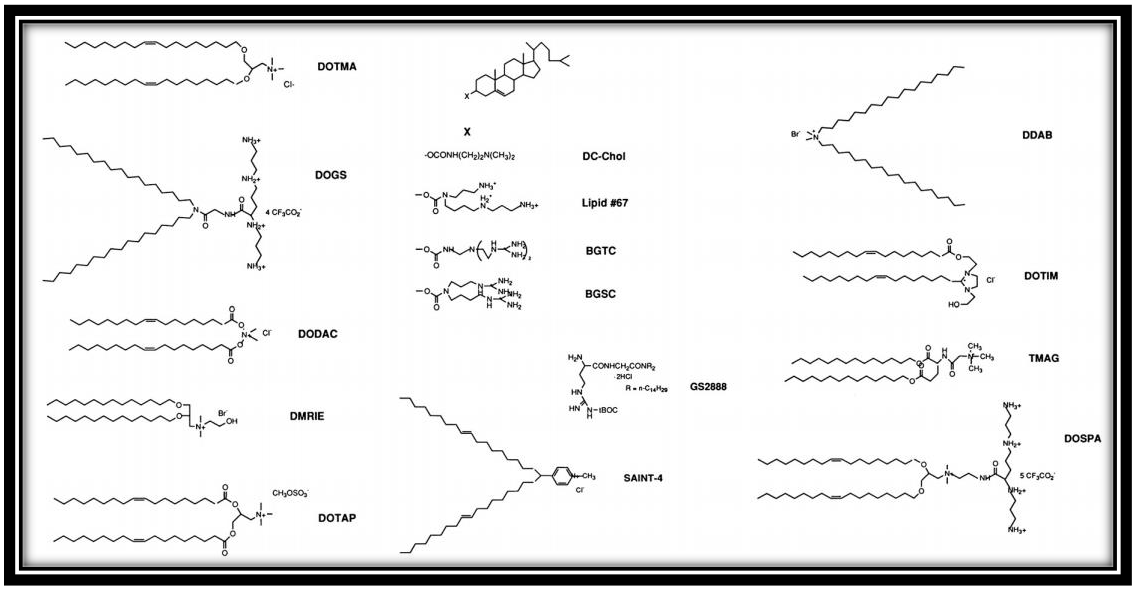
Şekil 2.18. Polivalent katyonik lipitler (9).

Nötr lipitler

Nötr lipitler genelde önemli yardımcı bileşen rolü üstlendikleri katyonik lipit formülasyonlarının bir parçasıdır. Bu bileşiklerde sıkça kullanılan üç nötr lipit dioleil fosphatidiletanolamin (DOPE), kolesterol ve dioleoil fosfatidil kolin (DOPC) 'dir. Birçok durumda, DOPE ile katyonik lipitin 1:1 oranında kullanılması en etkili transfeksiyon neticelerini vermiştir (59,63). DOPE lipit katmanlarının sabitliğini olumsuz etkilediği ve endozomal degradasyonda rol oynadığı bilinmektedir. Katyonik lipit-DNA kompleksleri, hücreye endozomal yolu takip ederek girmektedir ve DOPE'nin işlevi endozomal membranının sabitliğini bozmaktan ibarettir. Kolesterol gibi nötr lipitlerin kullanımı sayesinde, *in vivo* transfeksiyon düzeyleri yükseltilebilmiştir. Diğer lipozomlara kıyasla, kolesterol içeren lipozomlar uygulandığında birçok organda gen ekspresyon profilleri yükseltilmiştir. İnsan hepatoma hücrelerinden biri olan, $HepG_2$ ile yapılan deneylerde, DOPE içeren lipozomlar ve galaktozil türevleri ile konjüge edilmiş kolesterol içeren lipozomların daha düşük toksisite ve daha yüksek transfeksiyon etkinliğine sahip oldukları görülmüştür (57,59,63).

Transfeksiyon etkinliğindeki bu artış karaciğerin parenşimal hücrelerine spesifik asyaloglikoprotein reseptörlerine karşı yüksek afiniteleriyle açıklanmaktadır (57). Bazı

araştırmacılar, kolesterolün *in vivo* uygulandığında katyonik lipopoliamin pcTG90 ile nötr lipit olarak konjüge edilmiş DOPE'ye nazaran, DOPE'nin türevi olan, kısmen florine edilmiş gliserofosfoetanolamin (F-PE) *in vitro* ve *in vivo* gen nakil potansiyeli göstermiştir. Bu, d-florine edilmiş T lipoplekslerin *in vivo* uygulamalar için DOPE'nin etkin bir alternatifi olduğunu göstermektedir. Nötr lipitlerden gen taşıyıcı tasarımlarında bazı sıkça kullanılan örnekler: DOPE (dioleyil fosfatidiletholamin), DOPC (kolesterol ve dioleoyil fosfatidil kolin); AF-PE, kısmen fluorinated gliserofosfoetanolamindir (64).



Şekil 2.19. Nötr lipitlerden gen taşıyıcı tasarımlarında sıkça kullanılan örnekler: DOPE, DOPC, A F-PE (64).

2.2. KOMPLEKS OLUŞTURUCU OLARAK İKİ DEĞERLİ METAL KATYONLARIN (MG^{+2} VE CA^{+2}) KULLANILMASI

Bu tez çalışması fosfolipit-nükleik asit dizisi oluşumları, kinetik ve termodinamik parametreler ile ilgili bazı yeni sonuçları açıklamaktadır. Sitotoksik katyonik lipitlere alternatif olarak zwitteriyonik denilen nötral lipitlerin kullanımını vurgulayan bu araştırma, bu organize moleküler sistemlerin kompleks haline gelme özelliklerini tanımlamaktadır. Nükleik asit, lipozom boyutu ve türü, üçlü kompleksin hücre içi geçişi sırasında son derece önemli olduğundan, kompleks haline gelme özelliklerini tanımlamak önem teşkil etmektedir. Bu bağlamda üçlü kompleksin meydana gelmesinde, yoğuşmalı inorganik katyonlar, lipozom ve DNA arasındaki nanoagregatların oluşumu üzerinde durulmuştur. Bu üçlü (lipozom+DNA+Me^{+2}) tasarım için, Ca^{+2} ile yapılan transfeksiyon etkinliği

olumlu sonuçlar vermiştir. Çeşitli hücre fonksiyonlarını düzenlemedeki rolü dolayısıyla Mg^{+2}, bir yoğunlaştırma maddesi olarak seçilmiştir. Öte yandan, iyonların taşınması, amfifilik zarlara bağlanması, kısmen metal ile gerçekleşmektedir. Mg^{+2} kullanılan sentetik polimerler ile karşılaştırıldığında doğal olarak oluşan elemanı yapma, fosfat grubu transferi için iyi bir ajandır. Fosfatidilkolin, genel olarak bütün doğal fosfolipit çift tabakalarının önemli bir üyesi olduğu için, çeşitli metaller ile etkileşimini incelemek önemlidir (65).

Mg^{+2}'nin Kimyasal Uygunluğu

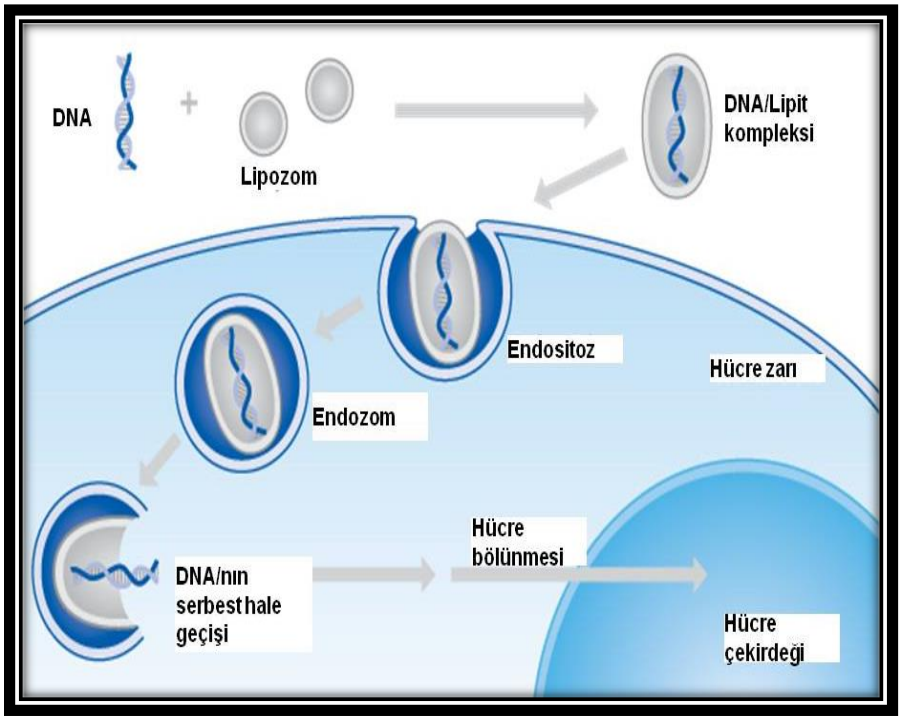
Mg^{+2}'nin kompleks oluşturmada kullanılmasının başlıca nedenleri arasında doğada çok miktarda bulunabilmesi, redoks aktivitesinin eksikliği, hekzakoordinasyon için güçlü eğilimi, uygun iyonik yarıçapa sahip olması, fizikokimyasal olarak iyi anlaşılabilmesi, küçük spin-yörünge eşleşme sabitine sahip olması yer almaktadır.

Mg^{+2}'nin Biyolojik Uygunluğu

Mg^{+2}'nin kompleks oluşturmada kullanılmasının başlıca nedenleri arasında bu katyonun biyolojik olarak da uygunluğunun yüksek olması yatmaktadır. Mg^{+2}'un, nükleik asit sabitleyici madde ve sıkıştırma ajanı olması, çeşitli hücresel olaylarda rol alması (Örneğin; zarlar aracılığıyla iyon taşıma), yüksek hücre içi derişiminde olabilmesi, fosfat grubu transferlerinde rol alması kompleks oluşturmada kullanılmasının başlıca nedenleridir (66,67).

2.3. LİPOZOM-HÜCRE ETKİLEŞİMLERİ

Aşağıdaki Şekil 2.20'de görüldüğü gibi DNA/lipit oluşumu, hücre içine fosfolipit zar yapısının uyumluluğu nedeniyle girmektedir ve hücre çekirdeğine doğru aldığı yol şematize edilmiştir (42).



Şekil 2.20. Lipitler aracılığı ile hücre transfeksiyonu (42).

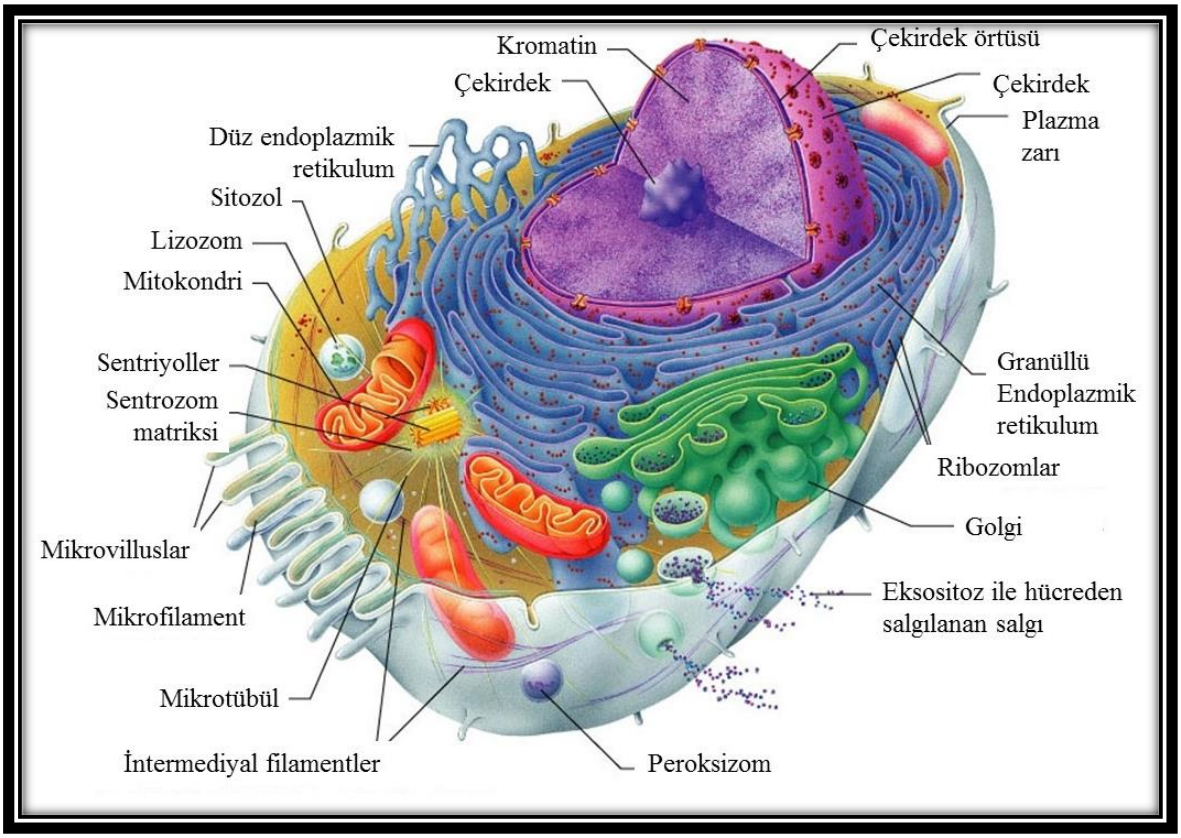
2.3.1. HÜCRE MEMBRAN YAPISI

Hücre içini dış ortamdan ve hücre içi organelleri sitoplanzmadan ayıran, hücrenin dış kısmında bulunan, molekülleri özelliklerine göre hücre içine alan veya dışarı bırakan seçici geçirgen katmandır. Hücre zarının moleküler yapısı hakkındaki kuramlar, dolaylı kanıtlara dayanır. Yağda eriyen maddeler hücre zarından kolayca geçebildiği için, 1902 yılında Overton, hücre zarının ince bir lipit tabakasından yapıldığını ileri sürmüştür. Daha sonra aynı yılda Gorter ve Grendel, hücre zarının iki lipit molekülü kalınlığında bir tabaka (bilayer) olduğunu ileri sürmüşlerdir. Geçirgenlik, yüzey gerilimi elektrik ve kimyasal özelliklerini göz önünde bulundurarak, Danielli ve Davson 1935'de hücre zarının simetrik zar modelini teklif etmişlerdir. Bu modele göre, zarın yapısında tek tabakalı iki protein yaprağı arasında lipit molekülleri vardır. Lipit moleküllerinin polar uçları (hidrofilik kısımları) dışa doğrudur ve protein tabakalarıyla örtülüdür. Moleküler yapıyla ilgili ikinci model, 1959 yılında Robertson tarafından teklif edilen asimetrik zar modelidir. Daha sonraları ortaya çıkan teori ise, Danielli-Davson'un modelidir. Danielli-Davson'a göre, lipit moleküllerinin polar, hidrofilik uçlarının koyu bölgeleri şekillendirdiği, polar olmayan, hidrofobik yağ asidi zincirlerinin açık renk bölgeleri şekillendirdiği düşünülmektedir. Bu modellerde hücre zarı, fosfolipit elementlerin kimyasal özelliğinden dolayı iki tabakalı

görülür. Bu üç tabakalı yapı, plazma zarı dışında hücrenin sitoplazmada bulunan tüm zarlı yapılarında da görülmektedir. Danielli-Davson ve Robertson modelleri, hücre zarının elektriksel ve pasif geçirgenlik özelliklerini açıklamak yeterlidir. Bununla beraber, zardaki protein elemanlarının aktif taşınmayı nasıl gerçekleştirdiğini anlamak bu modelle zordur. Danielli ve Davson modelinin, hücre zarının işleyişini tam olarak ortaya koyamamasından dolayı, yeni hücre zarı modelleri geliştirilmiştir. 1972 yılında Singer ve Nicolson tarafından hücre zarının tüm özelliklerin açıklayan bir model ileri sürülmüştür. Böylece, mozaik zar modeli ya da akışkan-mozaik zar modeli 1966 yılında Singer ve Lenard tarafından ortaya atılmasına rağmen, 1972'de yayınlanmıştır. Bu modelde fosfolipit tabakaları daha önceki modellerdekine benzer şekilde hidrofilik başları zarın yüzeyine doğru, hidrofobik kuyrukları ise, içe doğru sıralanır. Asıl farklılık proteinlerin dizilişinde görülür. Bu modelde proteinler zarın hem iç, hem dış yüzeyinde mozaik şekilde dağılırlar ve devamlı bir tabaka meydana getirmezler. Hücre zarında bulunan zar proteinleri; bu modelde yağ tabakasının her iki yüzünde olan ekstrinsik proteinler, yağ tabakasının içine gömülmüş olanlar ise; intrinsik proteinler olarak kabul edilmiştir. Bir lipit denizinde yüzen, protein ve glikoproteinlerden yapılmış, almaç denilen özel bölgelerle dışarıya açılan bir model olarak mozaik zar modeli günümüzde de geçerliliğini korumaktadır (68).

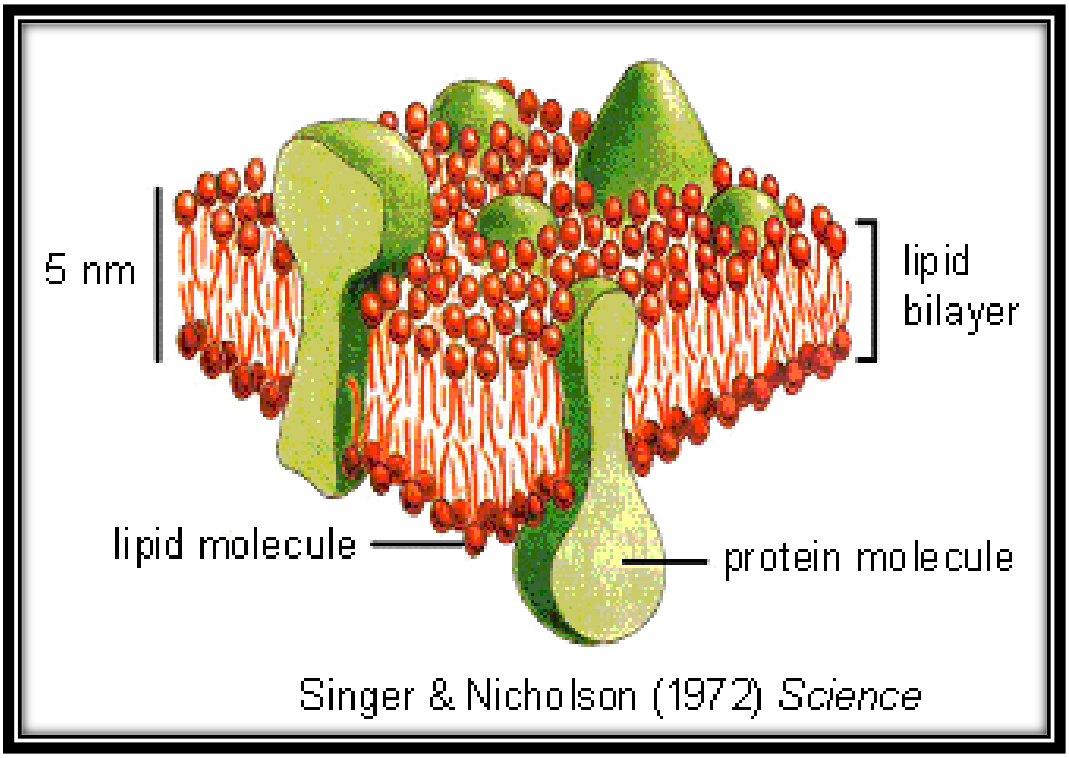
2.3.1.1. Biyomembranların İçeriği

Membranlar hücre işlevlerinin yerine getirilmesinde hayati rol oynamaktadırlar. Plazma membranı hücreyi çevreleyerek iç hacminde bulunan sitozol ile dış çevre arasındaki önemli farklılıklarını muhafaza eder. Hücre içi ortamda farklı bileşen, yapı ve işleve sahip birçok organel ve cisimcik bulunur. Organeller Şekil 2.21'de görüldüğü gibi yerine getirdikleri işlevlerine göre farklı olarak isimlendirilirler ve böylece ökaryot hücrelerde endoplazmik retikulum, golgi cismi, mitokondri, kloroplastlar ve membrana bağlı organeller olarak ayırt edilmektedir.

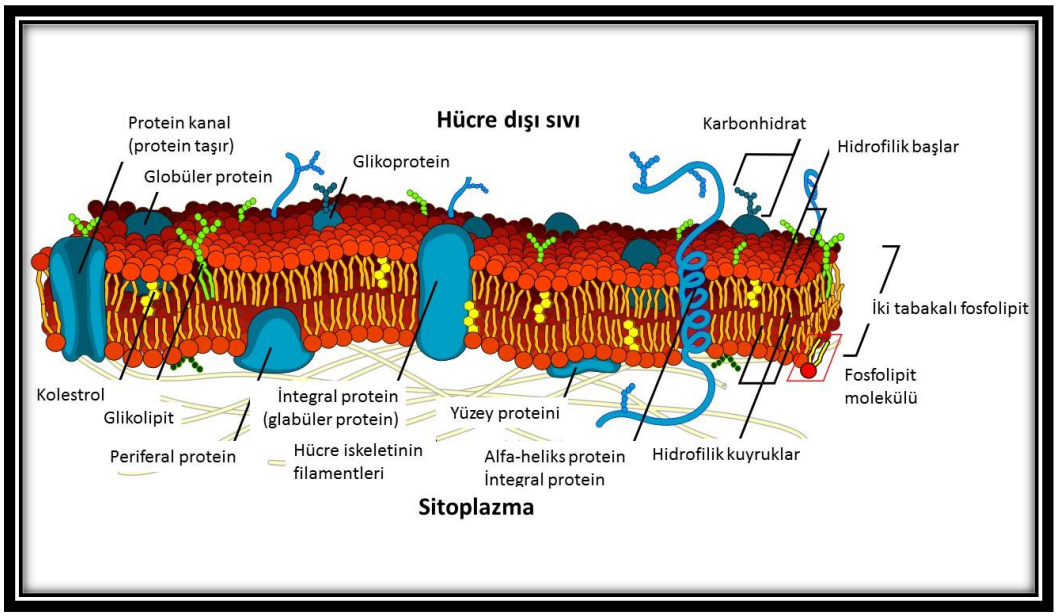


Şekil 2.21. Hücre organel yapıları (69).

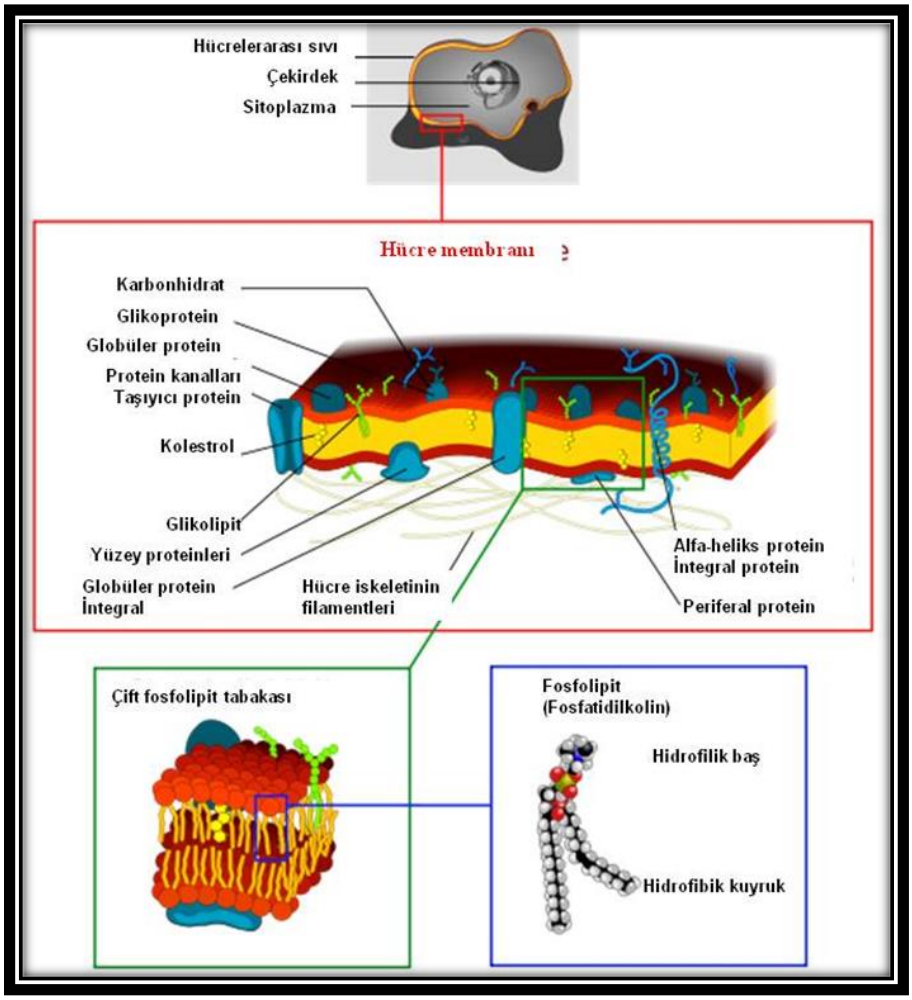
Membranlar her organelin iç hacmindeki içeriği ile sitozol arasında bulunan karakteristik farklılıkları muhafaza eder. Hücre membran yapısının kavramı Singer ve Nicholson tarafından (Şekil 2.22) teklif edilen ve sıvı-akışkan veya "fluid-mozaic" membran modeli olarak da adlandırılan çift lipit katman (lipit bilayer) yapıya dayanmaktadır. Günümüzde hücre membranı kavramı karbonhidratlar, pigmentler, antikorlar, reseptörler ve diğer proteinleri de içerecek şekilde geliştirilmesine rağmen (Şekil 2.23), hala geçerliliğini koruyan sıvı-mozaik membran modeline göre, hücre membranlarını oluşturan fosfolipitler amfipatik olup suya afinitesi yüksek olan (hidrofilik) ve sudan uzaklaştırılan (hidrofobik) kısımları içerir.



Şekil 2.22. Biyomembranların günümüzde geçerli olan Singer ve Nicholson modeli (70).



Şekil 2.23. Hücre membran yapısı (71).



Şekil 2.24. Biyomembran yapısında yer alan fosfolipitlerden tipik bir görünüm (72).

Fosfolipitler birçok hayvan hücre membran hacminin yarısını oluşturup, membranın geriye kalanının ise proteinlerden oluştuğu bilinmektedir. Fosfolipitlerdeki çift katmanlar (bilayers, Şekil 2.23) söz konusu lipitlerin bu amfipatik doğasından ve şekillerinden kaynaklanmaktadır.

Böylece, lipit molekülleri su tarafından çevrildiklerinde hidrofobik kısımlarının iç hacminde hidrofilik bağlar suya doğru yer alacak şekilde çeşitli agregatlar ve toplaşımlar (self-assemblies) meydana getirirler.

Hücre membranların çift lipit katmanları (Şekil 2.21-Şekil 2.23) fosfolipitler, kolesterol ve glikolipitler gibi üç ayrı çeşit membran lipit molekülü içermektedir. Hücre membranının iç ve dış tek katmanları (monolayers) lipit içeriği bakımından birbirinden farklıdır. Buna benzer farklı lipit karışımları ökaryotik hücrelerin çeşitli organel membranlarında da mevcuttur. Böyle bir asimetrik membran, çift lipit katman modeli söz konusu lipitlerin iki

boyutlu lipit molekülleri içinde yerleşmiş membran proteinlerin bulunduğu yapısal tasarımına dayanmaktadır. Böylece, bazı membran proteinleri işlevlerini yerine getirmek için spesifik baş gruplarına ihtiyaç duyar. Aynı şekilde su, proteinler için üç boyutlu çözücü rölü oynar ki böylece birçok enzim bu çözeltilerde aktiviteleri için seçici olarak bir metal iyona gereksinim duyar.

Biyolojik membranların temel yapısı çift lipit katmana dayanmasına rağmen, spesifik işlevlerin çoğu proteinlerce gerçekleştirilmektedir. Bu doğrultuda, membranda yer alan proteinlerin miktarı ve türü geniş sınırlar içinde değişmektedir. Sinir hücresinde aksonlarda elektrik yalıtkanlığı görevi yapan proteinler membran kütlesinin %25'den daha düşük bir miktarı oluştururken, mitokondrinin ve kloroplastlarda iç membranların enerji iletimi görevi üstlenen zarda ise yaklaşık %75'i proteindir. Genel olarak, plazma membranın içeriğinin %50'si proteinlerden oluşur. Protein moleküllere kıyasla lipit molekülleri daha küçük olduklarından her zaman hücresel ortamlarda proteinlerden daha fazla oranda lipit molekülleri bulunur. Bu oranı genelde membranlarda her proteine karşılık olarak 50 lipit molekülün bulunduğu ifadesiyle de açıklanır.

Membran proteinleri birçok işlev görür. Plazma membranında dış uyarılara sensör cevabını gerçekleştiren proteinler bulunur. Bu şekilde bu protein sensörleri veya reseptörleri bilgi taşınımında da görev yapar. Diğer membran proteinleri zarlar arasındaki iyon türevlerini meydana getirir. Bu türevler; ATP sentezinde, önceden seçilmiş maddelerin transmembran taşınımında, veya kas ve sinir hücrelerinde elektrik sinyallerin iletiminde kullanılır. Değişik işlevlerine rağmen, tüm biyolojik membranlar genel bir yapıya sahiptir ve her biri lipit ve protein moleküllerince oluşturulan ince film tabakasıdır (Şekil 2.22-Şekil 2.24). Biyolojik membranların iki boyutlu akışkanlar olduğu kavramı membranın yapı-aktivite ilişkisinin ortaya çıkarılmasında büyük bir rol oynamıştır. Ancak, membranın sadece lipit denizinde serbestçe yüzen proteinlere dayanan model olduğu ifadesinin bir hayli basitleştirilmiş olduğu ortaya çıkmıştır. Birçok hücre meydana getireceği işlevin kolaylaştırılması doğrultusunda lipit ve protein moleküllerini çift lipit katmanı üzerinde belli bir yüzeyde yoğunlaştırır. Böylece membran bileşenleri ve membran dinamiği kavramları geliştirilmiştir. Bu kavramlar, şimdiye kadar vurgulanan membran proteinlerinin öneminin yanı sıra membran lipit türlerinin oluşturduğu domenlere (lipit rafts) dikkati çekmektedir. Örneğin, birçok lipit molekülü membran proteinlerden farklı

olarak çift katmanı oluşturan iki ayrı tek katman arasında yer değiştirmektedir. Membran proteinleri ise membran içinde lateral olarak hareket eder. Sonuç olarak, hem lipitlerin hem de proteinlerin bu hareketliliği membranın çok dinamik bir yapı olduğunu ve hücre membran akışkanlığının biyolojik önemini ortaya koymuştur. Örneğin, çift katman viskozitesinin laboratuvar deneylerinde suni olarak belli bir seviyenin üzerine çıkartılarak tamamen ortadan kalktığı gözlenmiştir. Çift lipit katmanın akışkanlığı lipitlerin içeriğine ve ortam ısısına bağlıdır. Böylece, çift katmanın sıvı fazdan jel faza geçişini gösteren karakteristik donma noktasında daha kısa hidrokarbon zincirlerinin veya çift bağ içerildiğinde bu nokta daha düşüktür.

2.3.1.2. Biyolojik Membranların Sıvı Kristal Özellikleri

Biyolojik membranlar çift lipit tabakasından oluşmuşlardır. Lipitler, faz değişimi noktasında üç ayrı faz; katı faz, sıvı-kristal faz ve yüzeylerarası lipit faz adı verilen ara faz aynı anda meydana gelmektedir. Lipitlerin bu özel fizikokimyasal özelliklerinden dolayı membran geçirgenliğinde etkili olmaktadırlar.

2.3.1.2.1. Çift Lipit Katmanı

Lipit-protein çift katman hidrofobik etkileşmeler sayesinde meydana gelen bir supramoleküler yapıdır. Bu etkileşmeler molekülleri imobilize etmek için yeterince güçlü olmadıklarından çift katman fizyolojik ortamda sıvı özellikleri gösteren, aynı zamanda da yapısal olarak kristal şekilleri alabilmektedir. Söz konusu sıvı kristal fazı tüm molekülleri kapsamamaktadır. Sıvı kristal fazını oluşturan moleküller genelde uzun zincirli olup moleküler ağırlıkları 200-500 daltondan birkaç bin dalton arasında değişmektedir. Elektron Spin Rezonans (ESR) spektrometresi kullanarak ilk defa Hubbel ve McConnel çift katmanın üst ve alt kısmında bulunan lipit hidrokarbon zincirinin hareketliliğinin yüksekliğini gözlemişlerdir. Bu olay daha sonra Levine ve Seelig tarafından 2H- ve 13C-NMR spektroskopisi kullanarak teyit edilmiştir. Bu araştırmalar neticesinde yağ asitlerinin son kısmında bulunan metil gruplarının hareketli olduğu ortaya çıkarılmıştır (73).

2.3.1.2.2. Membranın Fizikokimyasal Özelliklerini Etkileyen Faktörler

Fosfolipitler, glikolipitler ve diğer basit amfifiller faz değişimi ısısı (phase transition temperature veya Tm) adı verilen bir ısı seviyesinde endotermik sıvı kristal, katı (jel) faz değişimine uğrarlar.

Lipitlerin faz değişim mekanizmaları çeşitli fizikokimyasal yöntemler kullanarak katı fazdaki çift tabakada ve lipit moleküllerin paketlemelerinde (elektron mikroskobuyla görüntülenen "grain borders") düzensizlikler ve hasarlar ortaya çıkarılarak tespit edilir. Söz konusu hasarlar doğal entropinin (düzensizliğin) ifadesi olduğundan, meydana gelme olasılığı ısının yükselmesiyle artar. Faz değişimi noktasında, defektler lipitin ilk erime noktaları olarak kabul edilirler ve bunlar akışkan lipit moleküllerinde küçük domenler oluştururlar. Bu yüzden, faz değişimi noktasında hem akışkan hem de katı domenler aynı anda (eşzamanlı) meydana gelir. Bu ısının Tm değeri üzerine yükseltildiğinde geride kalan katı faz lipitleri hızlı bir şekilde eriyip akışkan faza geçerler. Faz değişimi noktasında üç ayrı faz; katı faz, sıvı-kristal faz ve yüzeylerarası lipit faz adı verilen ara faz aynı anda meydana gelmektedir. Yüzeylerarası lipit faz, katı ve sıvı-kristal fazları arasında yer alır ve faz değişimin meydana gelmesinde en önemli rolü üstlenir.

Bu üç fazda yer alan lipitler hidrokarbon zincirleri arasında eşzamanlı olmayan paketlenme olasılıklarından dolayı, faz değişimi noktasında çift lipit tabakanın geçirgenliğinin artmasına neden olur. Faz değişim noktasının üzerinde bulunan lipitler sıvı-kristal fazda bulunur.

2.3.1.2.3. Lipit Fazlarını Etkileyen Faktörler ve Biyosistemlerdeki Önemi

Lipit faz geçişleri ortaya çıkarıldıktan sonra bu konu ayrı bir bilim dalı olarak gelişmiştir. Söz konusu geçişler fizikte "lyotropic phase transitions" olarak adlandırılan teori ile açıklanmaktadır. Bu konuyla ilgili çok iyi matematiksel ifadeler de geliştirilmiştir. Lipit fazlarını etkileyen faktörler kısaca şunlardır; çift bağların varlığı, özellikle cis-çift bağlar, CH-zincirlerinin all-trans paketlemelerine engel olmaktadır ve Tm'yi düşürmektedir. Çift bağların sayıları ve CH-zincirlerinin pozisyonları da ayrıca Tm'yi etkilemektedir. Genel olarak, Tm hidrokarbon zincirin uzunluğuna bağlı olarak değişim gösterir. Diğer etmenler arasında fosfolipit baş grubunun yükü ve konformasyonu, hidrokarbon zincirinde yer alan

karbon atomlarının sayısı, iyonik ortam ve yüzeysel pH fosfolipit çift tabaka akışkanlığını etkileyen faktörlerdir.

2.3.2. LİPOZOM (TEK KATMANLI (ULV) VE ÇOK KATMANLI (MLV) LİPİT VESİKÜLLERİ)

Lipozomlar veya veziküller üç boyutlu olmaları itibariyle doğal hücrelere benzeyen fosfolipitler gibi amfifilik (Şekil 2.25) moleküllerin kendi kendine oluşturdukları (self-assembling) yapılara sahip yuvarlak agregatlardır. Lipozomlar ilk olarak, 1960'lı yıllarda keşfedilmişlerdir (74). Yüksek biyoyararlılıkları ve çeşitli molekül ve maddelerin vezikül hacmi içinde yüksek miktarda enkapsüle edilebilmeleri bakımından, lipit vezikülleri o yıllarda mükemmel bir ilaç taşıma aracı olarak değerlendirilmişlerdir.

Lipozomların çeşitli türlerini (MLV, SUV, LUV, FRV) uygulanmakta olan birçok yöntemi kullanarak hazırlamak mümkündür (Şekil 2.26). Bu tez çalışmasında, sıklıkla kullanılan "hand-shaken vesicles preparation" yöntemi uygulanmıştır. Lipozomların herhangi bir formülasyonunu hazırlamak için lipit moleküllerini önce sıvı bir ortama aktarmak gerekmektedir. İnce tabaka lipit filmi, yuvarlak balon jojeye konulmak suretiyle bunların daha sonra sıvı ortamda çalkalanması ve çözülmesi sağlanmaktadır (Şekil 2.27 ve Şekil 2.28).

İlaç formülasyonları, gen taşıyıcıları ve kanser tedavilerinde kullanılan çeşitli farmasötik bileşenlerin enkapsülasyonu gibi alanlardaki uygulanmaları dışında, katmanlı veziküller biyomembran modelleri olarak da çok önem kazanmışlardır (9,75). Lipozomlar özellikle bağışıklık sisteminin fagositlerine yönelik ilaç hedeflendirilmesinde etkilidir.

Lipozomlara dayalı ilaç taşıyıcı sistemleri, terapötik endeksi ve biyoyararlılığı iyileştirebildikleri gibi, kontrollü salınım sistemlerinin etkinliğini artırırlar ve toksisiteyi düşürürler. Bu bileşenler, antikanser, DNA ve proteinlerin, diabet ve kardiyovasküler hastalıklara karşı ilaçların taşıyıcıları olarak kullanılmışlardır. Keşfedildiklerinden itibaren, birçok lipozomal formülasyon klinik araştırmalarda uygulanmıştır ve birkaç başarılı lipozoma dayalı ilaç formülasyonu patent olarak FDA tarafından kabul edilmiş ve ruhsatlandırılmıştır (74,76). Bunlar arasında doksorubisin (Doxil ve Myocet), daunorubisin (DaunoXome) gibi antikanser ilaçları ve mantarlara karşı kullanılan amfoterisin B

(AmBisome, Amphotect, ABELCET) formülasyonları örnek olarak verilebilir. Bu ilaçların lipozomal formülasyonları önemli ölçüde toksisiteyi düşürmüşlerdir ve etken maddelerin etkinliğini korumuş veya yükseltmişlerdir. Son yıllarda lipozomlar viral olmayan gen taşıyıcı tasarımlarında da yoğun olarak yer almakta ve uygulanmaktadır. Ancak, lipozomal ilaç ve gen taşıyıcı sistemlerinin terapötik potansiyellerine tam olarak henüz ulaşılamamıştır. Bunun nedenlerinden biri, bu taşıyıcı sistemlerle karşılaşılan birçok tasarım ve uygulama sorunlarının olmasıdır. Bu sorunlar arasında sabitlilik, salınım zamanı ve hızı, formülasyon maliyeti, kısa süren biyoyararlılık ve birçok ilaçla etkileşmelerin olmaması gibi durumlar sayılabilir. Ayrıca, hücre içinde ilaç özelliğini değişmeden koruyup, sabitliğini destekleyerek aynı zamanda söz konusu ilacın hedef dokudaki biyoyararlılığını seçici olarak artırmak çok güçtür (75).

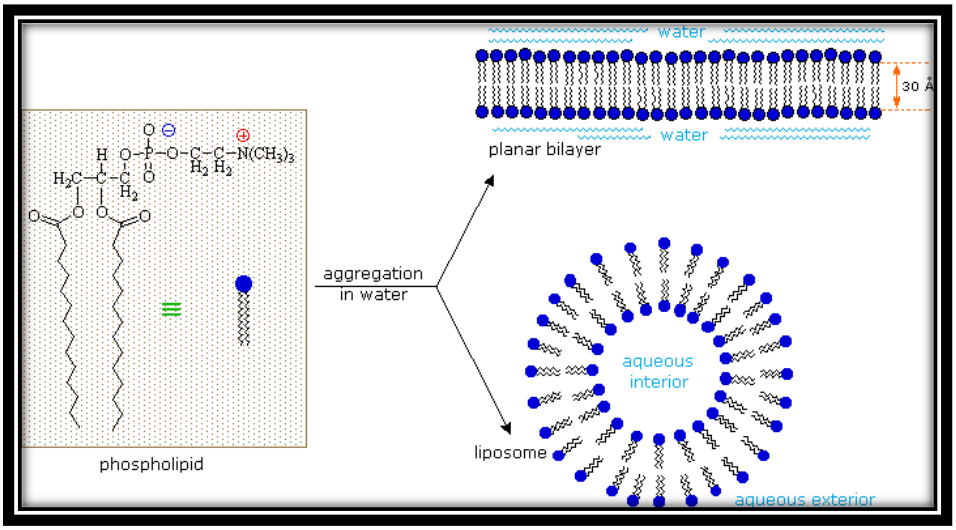
2.3.2.1. Vezikül Oluşumunun Mekanizması

Lipozomlar (lipit vezikülleri) ince tabaka lipit filmlerinin veya diğer lipit yüzeylerinin hidrasyonu sonucu oluşurlar (Şekil 2.25). Bu yapılarda sıvı kristal şeklinde bulunan lipit katmanları akışkan hale gelir. Hidrasyonla meydana gelmiş lipit katmanları, çalkalama esnasında bulundukları balon jojenin veya kabın iç yüzeyinden ayrılırlar ve daha büyük yuvarlak çok katmanlı veziküller (Large Multilamellar Vesicles, LMV) oluşur. Kenarlarda katmanın hidrokarbon kısmının su ile etkileşmeleri engellendiğinden, bu yapı termodinamik açıdan da bakılacak olursa çok sağlam ve sabittir (Şekil 2.28). Parçacıkların oluşumundan sonra boyutlarının düşürülmesi sonik enerjinin (sonication) veya mekanik enerjinin (extrusion) harcanmasını gerektirmektedir.

2.3.2.2. Lipozom Hazırlama Yöntemleri

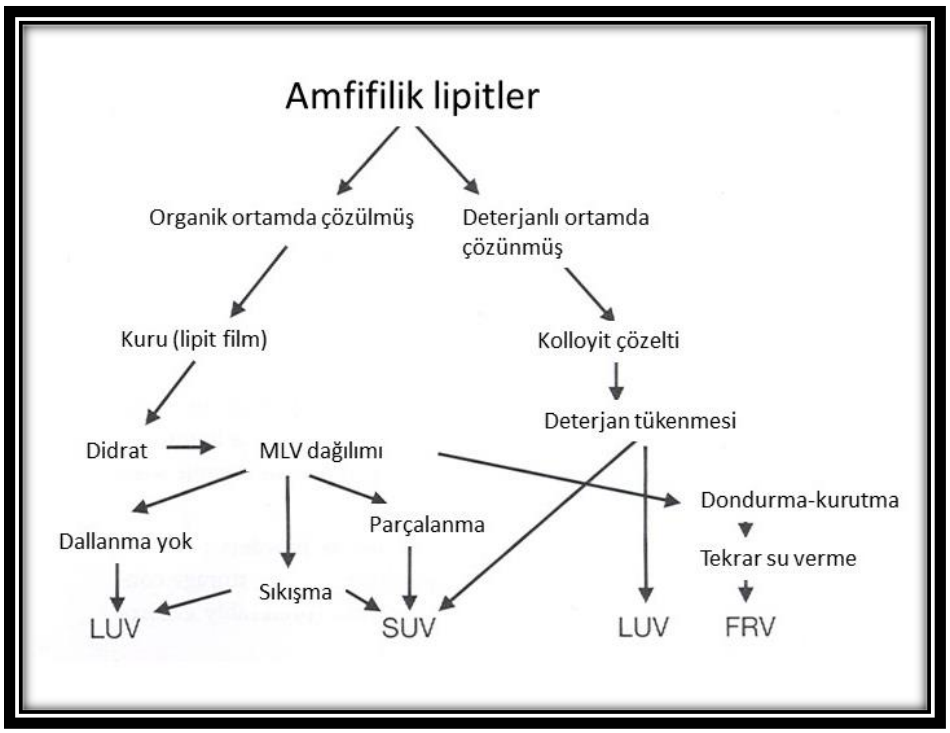
Lipit formülasyonların özellikleri lipit içeriğine (katyonik, anyonik veya nötr lipitler) bağlıdır, ancak, aynı hazırlama prosedürü tüm lipit veziküllerinin hazırlanmasında lipit türü önem taşımaksızın uygulanabilmektedir (Şekil 2.26).

Genel olarak lipozom hazırlamada izlenen yol; hidrasyon için lipitin hazırlanması, eşzamanlı gerçekleştirilen hidrasyon, çalkalama ve veziküllerin homojen dağlımının sağlanması için yapılan boyutlandırma aşamalarından ibarettir.



Şekil 2.25. Lipozomların genel yapısı (77).

Aşağıdaki Şekil 2.26'da SUV, küçük tek katmanlı vesikül; MLV, çok katmanlı vezikül; LUV, geniş tek katmanlı vezikül; FRV, dondurulmuş-kurutulmuş rehidrasyon veziküldür.



Şekil 2.26. Çeşitli lipozom formülasyonlarının hazırlama yöntemlerini özetleyen genel sınıflandırma

2.3.2.2.1. Hidrasyon İşlemi

Lipit karışımlarından oluşan lipozomları hazırlarken, lipitler ilk önce organik çözgende çözülmeli ve homojen lipit karışımının elde edilmesi için iyice karıştırılmalıdır. Genelde,

bu işlem kloroform veya kloroform-metanol karışımı kullanılarak gerçekleştirilmektedir (78). Burada amaç, lipitlerin tam olarak karışımını sağlamak için temiz lipit çözeltinin elde edilmesidir. Genel olarak, lipit çözeltileri 10-20 mg lipit/ml organik çözgen konsantrasyonunda hazırlanmaktadır. Ancak, lipit çözünürlüğü veya lipitlerin tam olarak karışımı isteniyorsa, daha yüksek konsantrasyonlarla çalışmak avantajlıdır (78). Organik çözgende lipitlerin çözülmesinden sonra, bu çözücüyü azot veya argon gazı ile uzaklaştırarak ince lipit filmi elde edilir. Daha küçük organik çözgen hacimleri ile çalışılıyorsa (<1 ml), bu işlem iyi neticeler vermektedir (78). Daha büyük organik çözgen hacimleri söz konusu olduğunda ise uzaklaştırma işlemi rotary evaporator ile gerçekleştirilir. Her iki işlem sonucunda da balon jojenin dibinde ince lipit filmi veya tabakası oluşmaktadır. Muhtemelen bu ortamda kalan organik çözgeni uzaklaştırmak amacıyla, lipit film bir gece boyunca vakum pompa ile kurutulur. Kloroform kullanımı tercih edilmiyorsa, onun yerine lipitleri tersiyer butanol veya siklohekzanda çözmek de mümkündür. Lipit çözeltisi kaplara aktarılır ve kuru buz veya kuru buz-aseton karışımıyla veya alkol (etanol veya metanol) banyosuna konularak dondurulur. Banyoda konulduğu takdirde, ani ısı değişiklerinden kaynaklanabilecek olan muhtemel kap çatlamasını engellemek için dikkat edilmelidir. Tam olarak dondurulduktan sonra, lipitin içinde bulunduğu kap vakum pompaya bağlanır ve lipit filmi kuruyuncaya kadar liyofilize edilir. Bu işlem elde edilmesi istenilen lipit hacmine göre değişir ve genelde 1 ile 3 gün arasında sürer. Bunun ardından, kurutulmuş lipit filmi bulunan balon joje vakum pompadan çıkarılır ve tekrar bir sonraki hidrasyon için dondurulmuş vaziyette muhafaza edilir.

2.3.2.2.2. Lipit Filminin Hidrasyonu

Kuru lipit filminin hidrasyonu basitçe sıvı ortamın veya tampon çözeltisinin lipitin bulunduğu balon jojeye konulup, çalkalanmasıyla gerçekleştirilir. Hidrasyon ortamının ısısı kullanılan lipitin genel jel-sıvı kristal faz geçiş ısısından (T_c veya T_m) daha yüksek olmalıdır. Bu işlemden sonra lipit süspansiyonu, bulunduğu kendi ortam ısısının söz konusu T_m'in üzerinde olacak şekilde muhafaza edilmelidir. Yüksek faz geçişine sahip lipitler için bu işlemi balon joje içinde bulunan lipitleri rotary evaporator sistemine bağlayarak vakum kullanılmaksızın gerçekleştirmek mümkündür. Daha sonra, bu balon jojeyi yine önceden lipit süspansiyon ısısının üzerinde bulunan bir ortamda ısıtılmış su banyosuna aktarılarak ve çalkalayarak lipitin hidrasyonunu gerçekleştirilip lipitlerin

akışkan fazı elde edilmiş olur. Lipit türüne bağlı olarak hidrasyon için gereken zaman değişmekte, ancak bu işlemin çalkalama ve vorteksleme zamanları ile birlikte, genelde bir saati aşmamasına özen gösterilir. Bazı durumlarda, veziküllerin boyut dağılımı ve homojeniteleri iyileştirildiğinden, bundan sonraki aşama olan vezikül boyutlandırma işlemine geçmeden önce, lipit süspansiyonu bu şekilde bir gece bekletilir.

Hidrasyon ortamını genelde lipit veziküllerin uygulama amacı tayin eder. Uygun hidrasyon ortamı; distile su, tampon çözeltileri, tuzları, ve şeker çözeltileri gibi elektrolit olmayan bileşenleri içerir. *In vivo* uygulamalar için fizyolojik osmolalitede (290 mOsm/kg) çalışmak tavsiye edilir (78). Bu gereksinimleri karşılayan genel olarak kullanılan bir çözelti; %0.9 tuz, %5 dekstroz ve %10 sükrozu içerir. Hidrasyon esnasında, bazı lipitler yapılarına özgü kompleksler oluştururlar. Yüksek düzeyde yük taşıyan lipitlerin hidrasyonları esnasında ve düşük pH'ya sahip çözeltilerde, viskoz jel oluşturdukları görülmüştür (78). Bu sorun, ortama tuzların katılması veya vezikül boyutlarının düşürülmesiyle giderilebilir. Fosfatidiletanolamin gibi hidrasyonu zor olan lipitler kendi kendine agregatlar oluştururlar. %60 fosfatidiletanolamin içeren veziküller vezikül etrafında oluşan düşük hidrasyon tabakasına sahiptir. Bu durumda bu fosfolipitten oluşan veziküller arasında uzaklaştırıcı kuvvetlerin zayıflaması sonucu birbirine çok yaklaşıp bağlanarak daha büyük agregatlar oluştururlar. Bu parçacıklar çözeltide daha büyük yayılmış flokülasyonlar olarak meydana gelir. Hidrasyonun sonucunda, büyük çok katmanlı veziküller (Large Multilamellar Vesicles, LMV) oluşur. Katmanlar arasında bulunan lipit yüzeyleri su katmanı ile çevrilidir. Aralarında oluşan mesafe lipit katmanlarındaki lipit içeriğine bağlıdır. Örneğin, polihidre katmanlar, elektrostatik uzaklaştırma neticesinde oluşan yüklü lipit katmanlarına göre birbirine daha yakın bir mesafede oluşurlar. Sabit, hidrasyonu gerçekleştirilmiş çok katmanlı veziküllerin (Large Multilamellar Vesicles, LMV) elde edilmesinden sonra, bu parçacıkların boyutları sonikasyon ve ekstruzyon gibi birçok yöntem kullanılarak düşürülür (78).

2.3.2.2.3. Lipit Süspansiyonlarının Boyutlandırılması

Lipit süspansiyonlarının boyutlandırılmasında sonikasyon ve ekstruzyon yöntemleri kullanılmaktadır.

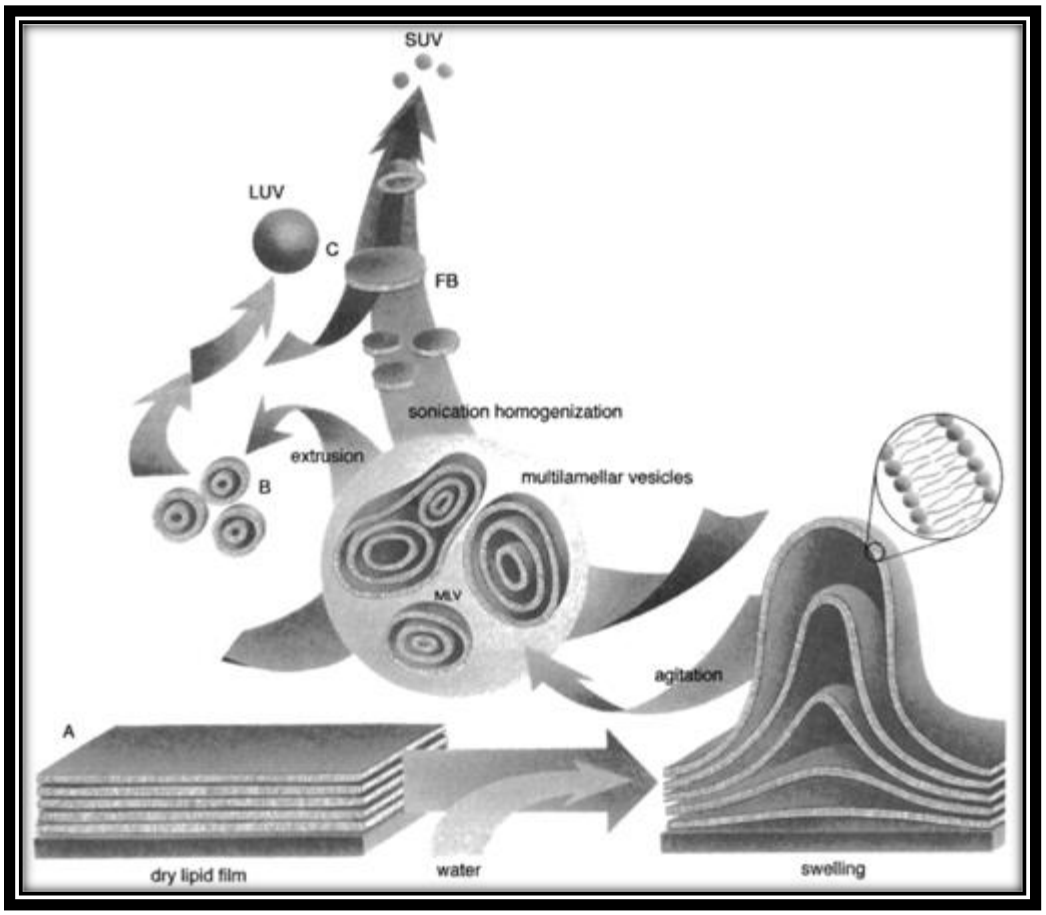
Sonikasyon

LMV süspansiyonlarının sonik enerji (sonication) kullanarak parçalanması tipik olarak çapları 15-50 nm arasında değişen küçük, tek katmanlı veziküllerin (SUV) oluşmuna neden olur. Bunu gerçekleştirmek için kullanılan cihazlar "probe tip sonicators" olarak bilinmektedir. Ancak bu yöntem tercih edilmeyen birçok yan etkilere sahiptir.Genel olarak Şekil 2.27'de görülmektedir. Sonikasyon yöntemi kullanılarak elde edilen küçük tek katmanlı veziküller sabit değildir ve zamanla agregasyonlar neticesinde çapları daha büyük olan agregatlara dönüşürler. Sonuç olarak, elde edilen lipozom formülasyonları son derece heterojendir. Ayrıca, sonikasyon lipit peroksidasyonlarına da neden olmuştur. Bu peroksidasyonları engellemek amacıyla lipozom formülasyonlarına lipit koruyucu ve antioksidan etkilerine sahip α-tokoferol (E vitamini) kullanılmaktadır. Ancak α-tokoferol (E vitamini)'nin büyük hacmi lipozomların daha sonraki boyut incelemelerini ve spektroskopik araştırmalarını çok sayıda yan sinyal verdiklerinden olumsuz olarak etkilemiştir (78). Bu yüzden günümüzde tek katmanlı lipit veziküllerinin elde edilmesinde kullanılan diğer bir yöntem olan ekstruzyon yöntemi tercih edilmektedir.

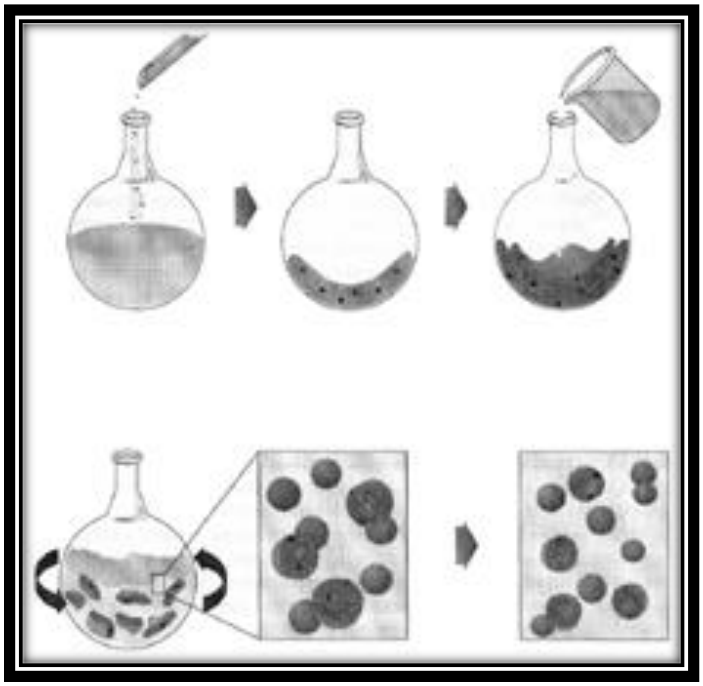
Ekstruzyon

Bu yöntemde lipit süspansiyonu önceden bilinen ve tercih edilen por büyüklüğüne sahip 2 polikarbonat filtre üzerinden 10 defa geçirilerek bu por büyüklüğüne yakın boyuttaki tek katmanlı veziküller elde edilir. Bu yöntem sayesinde ortalama olarak söz konusu tek katmanlı veziküllerin boyut dağlımı son derece homojendir. Şimdiye kadar bahsedilen tüm diğer lipozom boyutunun düşürülmesinde kullanılan yöntemlerde olduğu gibi burada da bu işlem lipitin faz geçiş derecesinin üzerinde bir değerde çalışılması gerekmektedir. Aksi takdirde, bu derecenin altında lipitlerin kuvvet altında şekil değiştirmeyen özellikte olup formunu korumalarından ve bu yüzden de polikarbonat filtresindeki porlara yapışıp tıkanmalarına neden olduklarından, bu işlem başarısızlıkla sonuçlanacaktır. 100 nm por büyüklüğüne sahip filtreden geçirildiklerinde Şekil 2.28'de gösterildiği gibi hazırlanan

MLV'ler genelde ortalama olarak çapları 120-140 nm arasında değişen büyük, tek katmanlı (large unilamellar vesicles (LUV)'i meydana getirir. Bu işlem sonucunda, elde edilen lipozomların boyutu patikül büyüklük analiz cihazıyla teyit edilir. Şekil 2.30'da çeşitli lipozom boyutları görünmektedir.

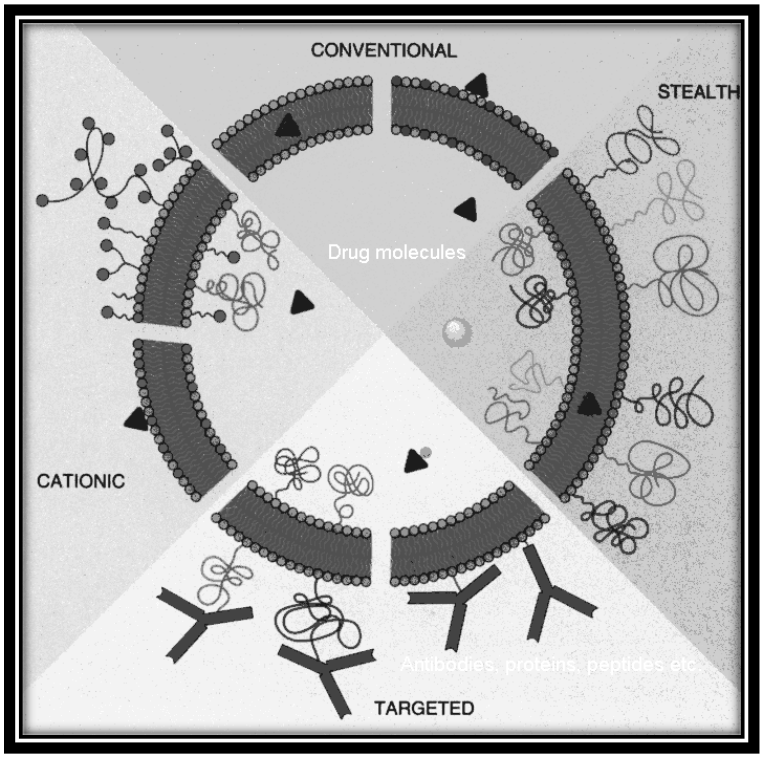


Şekil 2.27. Çok katmanlı veziküllerin hazırlanması enasında oluşan fosfolipit yapıları (79).

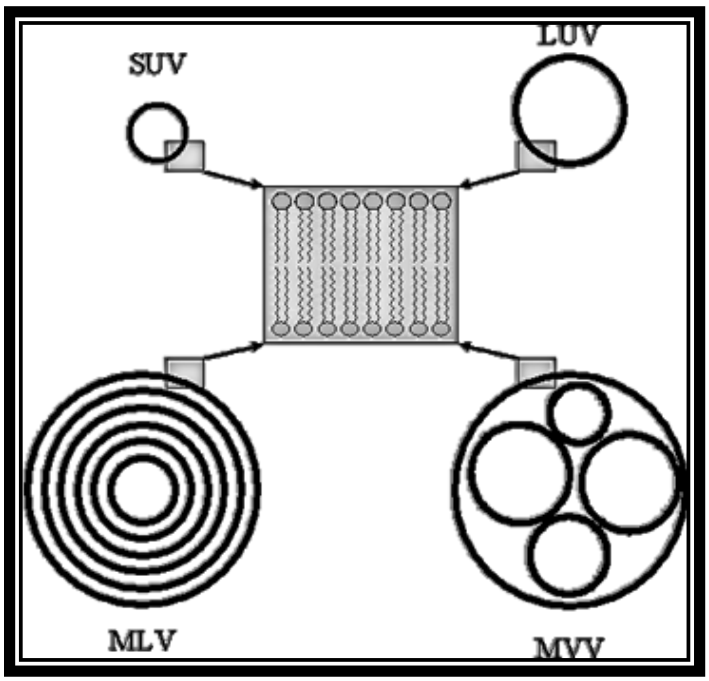


Şekil 2.28. MLV'lerin hazırlanmasındaki üç aşamanın şematik gösterimi (79).

Yukarıdaki Şekil 2.28'de ilk aşama olarak kurutulmuş ince tabaka lipitlere sıvı fazın katılıp daha sonra balon jojeyi çalkalama ve ısıtma ile içindeki lipit filmin erimesi ve çözülmesi; en son olarak da MLVlerin sütsü süspansiyonu gösterilmiştir (79). Ayrıca Şekil 2.29'da görüldüğü gibi makromoleküler enkapsülasyon amaçlı tasarlanan lipozomları göstermektedir.



Şekil 2.29. Makromoleküler enkapsülasyon amaçlı tasarlanan çeşitli lipozomlar (80).



Şekil 2.30. Çeşitli lipozom boyutları (81).

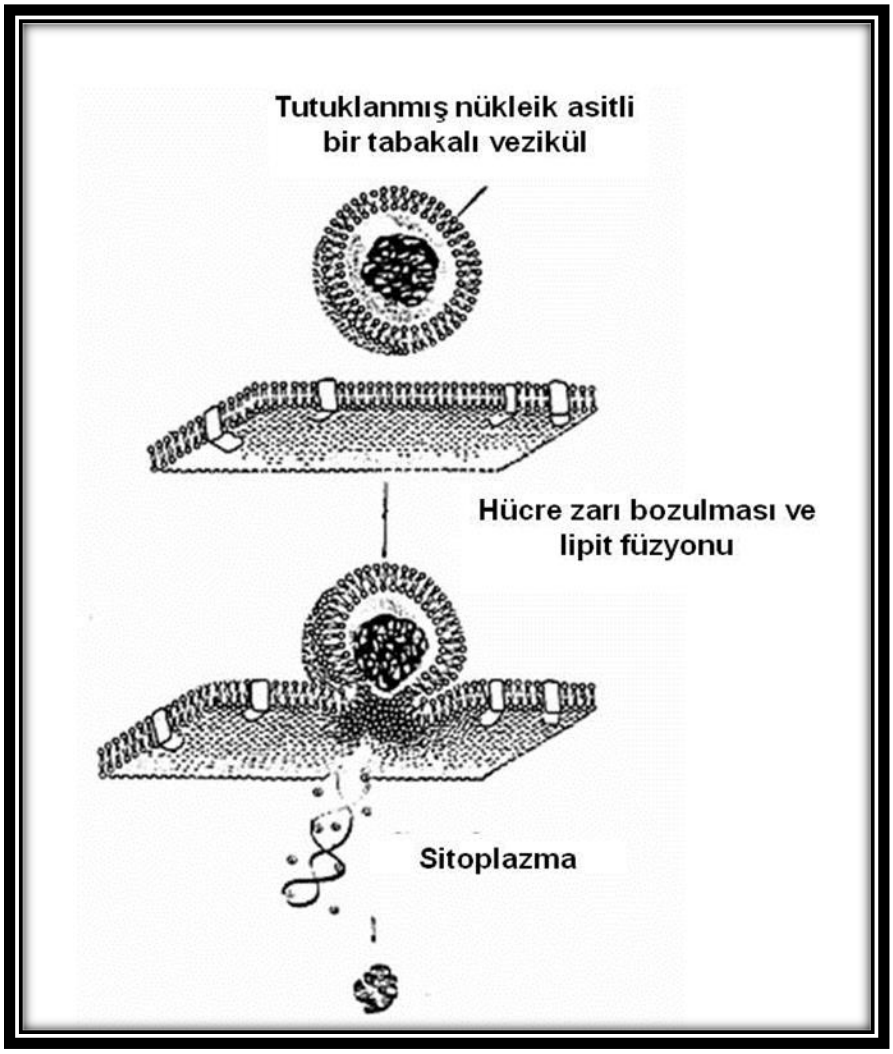
2.3.3. DNA-LİPOZOM NANOBİLEŞENLERİNİN HÜCRE İÇİ GEÇİŞ MEKANİZMASI

Tedavi amacıyla tasarlanan lipozomalara dayalı gen taşıyıcıların hücre içi akıbetlerinin araştırılması konusu henüz daha başlangıç aşamasındadır. Şimdiye kadar bahsedilen tüm önemli faktörler dışında, nükleik asitlerin konformasyonlarının belirleyici bir rol oynadığı açıktır. DNA ile lipitler arasında oluşan yeni fazlarda meydana gelen konformasyonel değişikliklerin ayrıntılı mekanizmasını ortaya çıkarmak için ve bu oluşumların transfeksiyon etkinliği üzerindeki rolünü yorumlayabilmek için, bu tez çalışmasında DNA ile yük taşımayan fosfolipitler arasında ilk temasları oluşturan makromoleküller arasındaki tanınma incelenmiştir. Bu yöntemle elde edilen veriler, daha önce aynı DNA-Mg^{+2}-fosfatidilkolin üçlü bileşiklerin oluşumunun termodinamik özelliklerinin ortaya çıkarıldığı araştırmalardaki (82,83) verilerle birleştirilerek yeni özellikler taşıyan ve daha az toksik olan bir gen aktarım tasarımı hedeflenmiştir.

DNA-lipozom bileşikleriyle ilgili yayımlanan modellerin değerlendirilmesi ile, bu araştırmada fosfolipit-Mg^{+2} ikili bileşikler ile anyonik hücre membranı arasında membran geçiş kompleksinin (membrane translocation complex) oluşması ile transfeksiyon arasındaki ilişkinin ortaya konulması ve model DNA'nın hücre içi geçişi araştırılmıştır. Bu bağlamda, yapılan ön fizikokimyasal ölçümlere dayanarak, DNA-lipozom nano oluşumlarının hücre içi akıbetleri ile ilgili ilk aşama (Şekil 2.31) nükleik asit ile MLV veya ULV lipozomlarla (lipopleks) bileşik oluşturulmasından ve yüzeysel kuvvetlerce kontrol edilen hedef hücre yüzeyine yakınlaştırılmasından ibarettir. Lipoplekslerin hedef hücre yüzeyinde bulunan negatif yüklü fosfolipitler tarafından nötralize olması ve fosfolipitlerle füzyon yapması ile bu üçlü oluşumdan (lipit/DNA/Mg^{+2}) DNA ayrılmıştır. Bunun sonucunda, daha önce yapılan floresan mikroskopik incelemelere de dayanarak, nükleik asit hacminin genişlemekte olduğu söylenebilir. Bu olay tersinirdir ve oluşan lipit fazlarının temel fizikokimyasal özelliklerine bağımlılık göstermektedir. Böylece hidrasyon, sıcaklık, basınç, yüzey gerilimi ve potansiyeli, v.s. ölçülebilen parametreler meydana gelen muhtemel vezikül yüzeyinin tahmini için kullanılabilmektedir. Çok tabakalı olmayan (non-lamellar) lipit fazların oluşumu yüksek bir olasılıktır ve bunlar transfeksiyon üzerinde çok etkilidir. Füzyonun hızı ve DNA'nın salınımı bu şekilde meydana gelen daha yüksek lipit yüzeyinden kontrol edilir. Ancak, bu aşamada bu olayda elektrostatiğin mi yoksa

hidrofobisitenin mi daha etkili olduğu açık değildir. Kurulan hipoteze göre, hücre membranının lipit içeriği, tanınma şeklinden daha önemlidir.

Bunu takiben, ikinci aşamada, lipoplekslerin hücresel alınımı akışkan hücre membranının yüzeyinde meydana gelmekte ve bunun neticesinde nükleik asitin hidrofobik nedenlerle genişlemesi söz konusudur. Üçüncü aşama, lipit-lipit, lipit-protein ve DNA-integral membran proteinleri etkileşmelerince meydana getirilen polinükleotit zincirinin membran faza girmesinden ve bu faz üzerinden geçişinden (insertion ve translocation) ibarettir. Bu bağlamda, polinükleotitlerin intraselüler geçiş yolu mekanizması ile 'cell-penetrating peptides' tarafından gerçekleştirilen membran por oluşumu mekanizmasından farklıdır. Bu aşamada oluşan yapının meydana gelmesinde hangi fizikokimyasal olaylar olduğu ve hangi kolloidal kuvvetlerin etkili olduğu ve ayrıca sayıları incelenmiş değildir. Son aşama, difüzyon aracılıyla, DNA'nın hücre içi sitozole geçişinden ibarettir. Bu aşama, hücre sitozolü nükleik asitler için kötü bir çözgen olduğundan gen transfeksiyonun etkinliğini düşürerek büyük bir engel teşkil etmektedir.



Şekil 2.31. Tek katmanlı lipozom (lipopleks) içerisinde enkapsüle edilmiş DNA'nın metal iyonlarca tetiklenen hücre içi geçişinin muhtemel mekanizması (82).

Şekil 2.31'de tek katmanlı lipozom (lipopleks) içerisinde enkapsüle edilmiş DNA'nın metal iyonlarca tetiklenen hücre içi geçişinin muhtemel mekanizması sırasıyla DNA kondenzasyonu, katlanması ve katyonlarla bileşik oluşturması, endositoza girmesi ve çekirdeğe taşınması gibi hücresel olaylar doğrultusundaki lipoplekslerin kabul edilen genel etki mekanizmalarını esas almaktadır.

Bu bağlamda, bu tez çalışmasında, polianyonik DNA, pozitif yük taşıyan deterjanlar gibi katyonik transfeksiyon ajanlarıyla, zwitteriyonik lipozomlarla hücreye hedeflendirilmesinden önce bileşik oluşturmaktadır. Bu bileşikler hücreler tarafından endositoz ile alınmaktadır. Hücre yüzeyinde bulunan negatif yüklü fosfolipitlerle tanınmanın temelini oluşturan elektrostatiğin kontrol edilmesi güçtür ve gen transfeksiyon deneyleri

istenilmeyen serum cevaplarıyla sonuçlanabilmektedir. Bunun dışında, bu tasarımda kullanılan metal iyonlar sıkça heterojen boyutlara sahip olan lipit-DNA parçacık dağılımına sebep olmaktadır. Çok sık meydana gelen MLV, terapötik genlerin intraselüler geçiş yolu üzerinde bulunan başka bir engeldir. Bu yüzden, bilim adamları lipopleks tasarımlarında elektrostatik kontrolden ziyade elektrostatik olmayan, örneğin daha zayıf olan H-bağ oluşumu üzerinde çalışmaktadır. Lipoplekslerin hücre içi akıbetleri ile ilgili geliştirilen bu araştırmanın hipotezinde tam olarak hangi mekanizmanın gerçekleşeceği, lipozomları teşkil eden fosfolipitlerin lipit türü ve içeriğine, yüklerine, boyutlarına, yüzey alanlarına, nükleik asitlerin konformasyon ve konsantrasyonlarına, kan veya serumun varlığı gibi nedenlere bağlıdır. Bu çalışmadaki model, çok etkili olan viral hücre içi geçiş mekanizmasına benzerlik gösterdiğinden, lipozom-hücre membranı füzyon yolu ile gerçekleştirilen gen transfeksiyonu tercih edilmektedir. Bu mekanizma genelde füzyonu tetikleyen ve meydana getiren ajanlar kullanılarak gerçekleştirilir. Bu tez çalışmasında, daha önce adı geçen füzyon ajanlardan farklı olarak ve açıklanan sebeplerden dolayı tercih edilmesi söz konusu olan Mg^{+2} kullanılmıştır.

2.3.3.1. Lipozom-Hücre Etkileşmeleri

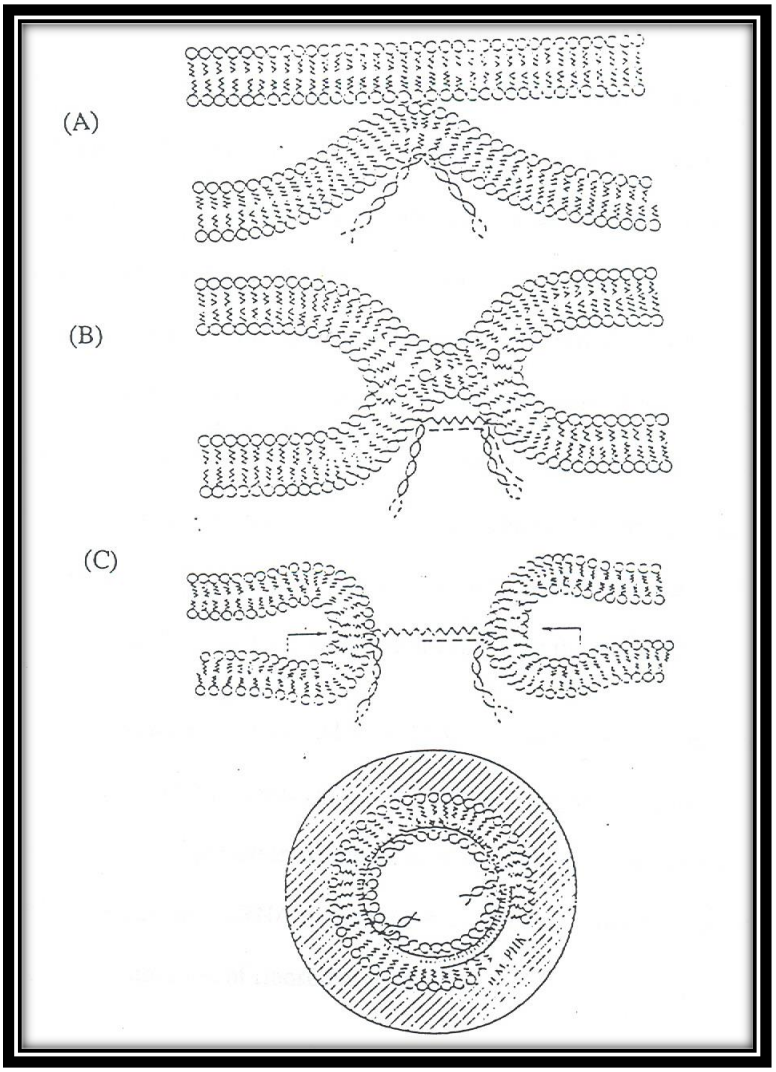
Lipozom içeriğinin hedef hücrelere transferi esnasında oluşan lipozom-hücre etkileşmelerinin moleküler mekanizmalarından 4 ayrı etki mekanizması detaylı olarak bilinmektedir (84). Bunlar sırasıyla; ilk olarak lipozomların hücre yüzeyine adsorpsiyonu ve lipozom içeriğinin ekstraselüler olarak salınımı ve bunu takip eden bu maddelerin hücreye pasif taşınmasıdır. Bunu takiben ikinci aşama, lipozomların hücre yüzeyine adsorpsyonu ve lipozomal katmandan plazma membranına lipofilik bileşenlerin seçici taşınımıdır. Üçüncü aşama, lipozomların endositotik internalizasyonu ve bunu takip eden endolizozomal yol üzerinden lipozomların hücre içi degradasyonu ve içeriklerinin intraselüler olarak salınımıdır. Dördüncü ve son aşama lipozomal membran ile plazma membran veya intraselüler olarak endozomal membranlar arasında oluşan füzyon aracılıyla lipozom içeriğinin sitoplazmaya salınımıdır. Bu 4 ayrı mekanizmadan herhangi birinin meydana gelip gelmeyeceği lipit türü, vezikül boyutu, yükü vs. fizikokimyasal parametreler gibi lipozomun özelliklerini belirleyen faktörlere bağlıdır. Bunu belirleyen diğer faktörler ise hedef hücrenin türü ve kan veya serumun varlığı gibi çevresel faktörlerdir.

Genel olarak, enjekte edilen lipozomların kanda *in vivo* ortamda karaciğerin ve dalağın doku makrofajları ve ayrıca da hepatositler tarafından saldırıya uğradıkları bilinmektedir (84). Lipozomların, bu hücrelerle reaksiyona girmeleri sonucunda hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerce meydana getirilen bu parçacıklar endositoz ve fagositoz ile sonuçlanır. Bu olay esnasında lipozomlar endositoza uğratılıp hücre membranının invaginasyonuna neden olup endozomal kompartmanlara dönüşümünü gerçekleştirmektedir. Bu endozomlar daha sonra lizozomlarla füzyon yapmakta ve bunu endozomal içeriklerinin lizozomal degredasyonu ve lipozomal içeriklerinin hücreye salınımları takip etmektedir. Rekombinasyon tehlikesinin meydana gelme olasılığı çok yüksek olduğundan, bahsedildiği gibi bu rekombinant viral gen nakli araçları son derece tehlikelidir ve dikkatlice uygulanmaktadır. Degradasyon problemi yüzünden lipozoma dayalı gen taşıyıcı tasarımları bu reseptörler üzerinden çalışan intraselüler geçiş yolunu bir şekilde engelleyebilen özelliklere sahip olmalıdırlar. Bu tez çalışmasında, bir alternatif intraselüler geçiş yolu olarak yukarıda bahsedilen lipozom-hücre etkileşmelerinin dördüncü mekanizmasını teşkil eden lipozom katmanı ile hedef hücre arasındaki muhtemel füzyon üzerinde durulmuştur. Bunu gerçekleştirmek için çok etkili olan viral proteinlere benzerlik gösteren çeşitli proteinlere veya peptidlere füzyonu meydana getiren ajanlara ihtiyaç vardır. Ancak, bazen bu proteinlerin hacimce büyük olmaları ve bu yüzden özellikle spektroskopik incelemeleri sırasında meydana gelen ve doğal olmayan olmayan sinyallerle sonuçlanmaları tekrarlanabilinir protokollerin geliştirilmesini zorlaştırmıştır. Bu bakımdan, proteinler yerine hacimce çok daha küçük, ancak doğal bileşenler olan metal iyonlar (Mg^{+2}) kullanılmıştır. Deneysel tasarımda kullanılan ve önceden fizikokimyasal özellikleri çok iyi bilinen poly-L-Lysine ve protamin sadece DNA kompaktizasyonu ve lipozomlarla temas ettiren kontroller olarak kullanılmıştır. Viral olmayan gen taşıyıcı tasarımları olarak sentetik polimerler (polipleksler) veya lipozomlar (lipopleksler) kullanılmaktadır. Polimerler yapıları itibariyle, örneğin boyut ve elektrostatik özellikler bakımından lipozomlardan çok daha fazla sentez olanakları sunmaktadır. Ancak, lipozomal sistemler fosfolipit katman içerdiklerinden füzyon olaylarını membran akışkanlığını düzenleyerek gerçekleştirdiklerinden bu mekanizma canlı sistemle daha uyumlu olarak değerlendirilmektedir ve polimerlerde görülen immün reaksiyonlara daha az neden olmaktadırlar. Günümüzde, reseptörlerce meydana getirilen ve lipozomların degradasyonlarıyla sonuçlanan yolu engellemek için araştırmalar genelde katyonik lipit ve

buna yardımcı olarak kullanılan (helpler lipit) yüksüz (nötr) lipitlerden oluşan bir lipozom gen taşıyıcıları üzerine yoğunlaşmışlardır. Katyonik lipozomlarla genin intraselüler geçişi daha kolay gerçekleşmesine rağmen, bu gen taşıyıcıları seruma enjekte edildiklerinde, düşük etkili transfeksiyon, immün cevap ve daha önemlisi sitotoksisitenin meydana geldiği klinik deneylerce tespit edilmiştir. Bu yüzden genelde katyonik lipit kısmından kaynaklanan sitotoksisiteyi engellemek amacıyla bu tür lipitleri kullanmayıp, sadece nötr lipitleri içeren bir gen taşıyıcı tasarımı üzerinde durulmuştur.

Sonuç olarak, DNA/lipit ikili oluşumunun metal iyonlarca yakın temasları sağlanarak yük taşımayan fosfolipitlerle DNA'nın kondanze bir bileşik oluşturmaları ve bu bileşiğin hedef hücre membranıyla füzyon yapması hücre içi sitozole geçişi hedeflenmiştir. Hücre içi geçişi başarılı bir şekilde gerçekleştirilen nükleik asitleri endositotik engellerden ve sitoplazmik nükleaz degradasyonundan korumak araştırmaların en büyük hedefidir. Genelde, yabancı terapötik DNA molekülünü çok az sayıda hücre almakta ve ekspresyonunu gerçekleştirmektedir. Bu şekilde hücre membranı üzerinden geçişi gerçekleştirilen nükleik asit olsa bile ve sitoplazmada sözü edilen degradasyonlardan korunabilse bile, gen transkripsyonunun meydana geldiği çekirdeğe ulaşmadan çok önce daha sitozolde veya daha sonra DNA ve lipitler oluşturdukları bileşikten ayrılmaları gerekir. Bu tez çalışmasının temelini oluşturan ve günümüzde tercih edilen lipite dayalı gen taşıyıcı tasarımı arzusu, hedeflendirme zorlukları, lipit-DNA yapıları ile ilgili belirsizlikler ve sıkça meydana gelen ve serum cevabına sebep olan heterojen bileşikler yüzünden gerçekleştirilememektedir. Ayrıca, sistematik olarak uygulandıklarında, nükleik asitler kandaki hidrofobik yapılarının ve parçacıklarının %90 oranında uzaklaştıran opsonizasyon sonucunda bozuluma uğramaktadır ve bu da lipit veziküllerinin kullanılmasını kısıtlamaktadır. Genel olarak, yük taşımayan MLV ve ULV negatif ve pozitif yüklü MLV'lere göre daha yavaş bir oluşum göstermektedir. ULV'ler MLV'lerden daha yüksek bir dirence sahiptir. Daha önemlisi, kendi başına izole moleküllerle yapılan deneyler sonucunda elde edilen neticeleri *in vivo* ortama uyarlamak son derece güçtür. Bu hücresel olaylar, araştırmada kullanılan hücre türüne, uygulanan transfeksiyon protokolüne, serumun varlığına, bileşik oluşumunu kolaylaştıran maddelerin ortamda bulunmasına ve sıcaklık gibi faktörlere bağımlılık göstermektedir. Ayrıca, lipofeksiyon protokollerinin başarılı olabilmesi uygulanan gen raportör sistemine de bağlıdır (84).

Metal iyonlarının DNA ve lipitlere bağlanma, hücre membranına bağlanma ve membrandan geçerek çekirdeğe ulaşabilme özellikleri dışında sarmala bağlanan moleküllerce gerçekleştirilen çekirdeğe DNA hedeflendirme kaabiliyetleri, çift değerli metal katyonların bileşik oluşturan DNA ile membran üzerinden geçişi gerçekleştirebildikleri nükleositoplazmik taşınım modeliyle ile de bağdaşmaktadır.



Şekil 2.32. Ökaryotik hücrelerde meydana gelen nükleik asit-çekirdek membranı arasında oluşan bileşikler ve işlevsel anlamları (85).

Söz konusu nükleik asitlerle hücre membranları arasında oluşan bileşiklerin araştırılmasında 1980'li yıllardan beri çalışmalar yapılmaktadır (Şekil 2.32) (85,86). Bu araştırmalar, özellikle yaşayan hücre düzenekleri üzerindeki ölçümlere dayanmaktadır. Nükleik asitlerle biyomembranlar arasında oluşan bileşiklerin tüm hücre türlerinde görüldüğü hususu önemle vurgulanmaktadır. Bu çalışmalarının dayanağı şu şekilde kısaca açıklanabilir. Bu konuda geliştirilen teorik modeller, daha önceki biyokimyasal verilere

dayandırılmıştır. Örneğin, bu tür bileşiklerde sadece, tek zincirli nükleik asit topolojilerine karşı duyarlılığı bulunan S1 endonükleaz aktiviteleri saptanmıştır. Söz konusu bileşikler EDTA tarafından degradasyona uğratıldığından ve EDTA ile EGTA genelde çift valanslı metal katyonları reaksiyon ortamından uzaklaştırdığından, söz konusu metal iyonların bu bileşik oluşumlarında rol oynadığı fikrinin ortaya atılmasına sebep olmuştur. Bu modeli daha da geliştirerek çift valanslı metal iyonların (Ca^{+2}, Mg^{+2} vs.) muhtemel rolünü incelemişlerdir (85). Yapılan çeşitli spektroskopik, mikroskopik, termodinamik ve hücresel ölçümlere dayanarak söz konusu nükleik asit-biyomembran etkileşmelerinin gen ifadesinde ve özellikle sinyal iletim mekanizmalarındaki rolleri ile ilgili 1983 yılında ilginç bir hipotez ortaya atmışlardır. Bu hipotez Şekil 2.32'de şematik olarak gösterilmiştir. Bu hipoteze göre, hücre çekirdek membranında ilk önce, DNA ile çekirdek membranı arasında temas sağlanmaktadır (A). Bunu takiben, ökaryotik gözenek geçici olarak oluşmaktadır (B) ve daha sonra da R-loop denilen yapı meydana gelmektedir. Son aşama olarak (C) ökaryotik çekirdek gözeneği oluşmaktadır. Söz konusu yapı membranla DNA arasında bağlanma noktalarını yüzey basınç güçlerinin etkisiyle hafifletmek suretiyle ve snRNA türlerinin oluşmasıyla gerçekleşmektedir.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Bu tez çalışması, bir gen aktarım metodu olarak kullanılan lipopleks (lipozom-genozom) yapılarının detaylı analizi ve transfeksiyon sürecindeki etkinliğinin, disiplinlerarası bir yaklaşım çerçevesinde moleküler ve hücresel düzeyde incelenmesi üzerine odaklanmıştır. Nükleik asit-hücre fosfolipit etkileşmeleri ile ilgili araştırmaların ilk yıllarında genel olarak birtakım hücresel olaylardaki nükleik asit-hücre fosfolipit etkileşmelerinin rolleri ilgiyi çekmekteydi. Gerek prokaryotlarda, gerekse ökaryotlarda birçok biyokimyasal ve biyofiziksel teori geliştirilmiştir. Örneğin, bakteri segregasyonunda ortaya çıkan nükleoid bölünmesi, plazmit replikasyonunda, mezozomların oluşmasında, ökaryotik hücre döngüsünde ve kromozom kompaktizasyonunun hücresel kontrolünde, gen ifadesinde ve özellikle transkripsiyon, translasyon ve rekombinasyon olaylarında nükleik asit membran bağlanma noktalarının önemi ortaya çıkarılmıştır (87–89). Ancak, şimdiye kadar toplanan tüm bu veriler genel bir geçerliliği olan nükleik asit-lipitvezikülü modelini geliştirmek için yeterli değildir. Bu bağlamda bu tez çalışması, hücrelere tedavi edici bir geni aktarmak üzere hazırlanan DNA-lipitvezikülü oluşumunun oluşturulması ve karakterizasyonu üzerine odaklanmıştır. Çalışmanın başlıca amacı nükleik asit-fosfolipit etkileşmelerini açıklamak olmuştur.

Nükleik asit-lipitvezikülü etkileşmelerinin çok fazla ilgi çektiği yaklaşımlar dışında, bu konudaki etkileşmelere ilgi, lipitlerle gerçekleştirilen *in vitro* transfeksiyon (lipofeksiyon) ve yeni geliştirilen gen aktarımı yöntemleriyle (surfaktanlar, mikroemülsiyonlar, katı-sıvı nanopartiküller vb sistemler) önem kazanmasından sonra özellikle artmıştır (40). Birçok araştırma merkezi bu tür etkileşmelerin temelini oluşturan nükleik asit-fosfolipit oluşumundaki yapısal değişikliklerin daha sonra gen aktarımı esnasında transfeksiyon etkinliğini nasıl etkilediği konusunun araştırılmasına yönelmişlerdir (90).

Gen tedavisi çeşitli kalıtsal, otoimmün ve kanser tedavilerinde şimdiye kadar yoğun olarak kullanılan geleneksel yöntemlere ve immünomodülasyon içeren yaklaşımlara bir alternatif olarak geliştirilmiştir (90,91). Özellikle kanser tedavilerinde kullanılan; ancak çok sayıda istenmeyen yan etkiye sahip olan çeşitli ilaç tedavilerine bir alternatif olarak gelecek vaat eden bir yaklaşım olarak dikkati çekmektedir. Bu bağlamda, terapötik gen dizilimlerini degrade olmadan serum ortamında sabit tutan ve hedef hücreye kadar götüren yeni gen

taşıyıcı formülasyonlarının geliştirilmesi gerekmektedir. Şimdiye kadar bu doğrultuda, öncellikle viral gen aktarım sistemleri geliştirilmiştir ve uygulanmıştır (92). Bu gen aktarım tasarımları çok etkili olmuştur; ancak bu tür tasarımlarda viral vektörlerin konakçı genomunda hedef dışı bir lokasyona entegrasyonu ya da hedef konakçı hücre dışındaki bir hücre tipini enfekte etme riski mevcuttur. Bu bakımdan, araştırmalar virüslerin hücre içi geçiş ve hücre genomuna entegre olma mekanizmalarını taklit edebilecek yeni ve viral olmayan yaklaşımların geliştirilmesine yönelmiştir. Bu tür tasarımlar genelde negatif yüklü olan DNA'yı pozitif yüklü moleküllerle daha kompakt hale getiren çeşitli polimerler (polipleksler) ya da lipit veziküllerinin (lipopleksler) kullanımına dayanmaktadır (93,94). Günümüzde her iki yaklaşım da yoğun olarak kullanılmaktadır. Poliplekslerin geliştirilmesinde organik sentez laboratuvarlarında çok sayıda çeşitli moleküler ağırlığa ve yüzeysel elektrostatik özelliklere sahip pozitif yük taşıyan polimer sentezlenmektedir (93,94). Diğer bir yaklaşım ise pozitif yüklü lipit veziküllerinin (lipozomlar) kullanımına dayanmaktadır (95–98). Her iki yaklaşımda da amaç yeni viral olmayan taşıyıcı sistemi geliştirmek ve bu sistem aracılığı ile terapötik nükleik asidi hedef hücreye kadar ulaştırmaktır (99). Polipleks ve lipopleks tasarımı ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Ancak söz konusu tasarımlar yeni gen aktarım taşıyıcı sistemlerinin ön formülasyon aşamasını kapsamaktadır. Bir sonraki hedef ise çoğu zaman aşılması çok zor olan hücre içi engellerin aşılmasıdır. Çünkü gerek hücre dışı ortam gerekse hücre içi ortam olarak sitoplazma viskoz olduğundan DNA için olumsuz bir çözünürlük problemini yaratmaktadır (100–102). Bu aşamaya gelinmeden önce de zaten daha serum ortamında degradasyona uğrama olasılığı yüksektir. Çünkü pozitif yüklü serum proteinleri ile yine pozitif yük taşıyan polipleksler ya da lipopleksler arasında elektrostatik olarak bağ oluşmamaktadır ve bunlar birbirini uzaklaştırmaktadır. Ayrıca, gerek poliplekslerin gerekse lipoplekslerin sitotoksisiteye yol açtıkları bilinmektedir (100–102). Bu sitotoksisiteyi düşürmek en büyük hedeflerden biridir. Sitotksisiteyi düşürmek amacıyla daha hafif pozitif yüklü polimerler, lipozomlar ya da her ikisini de içeren polilipopleksler tasarlanmaktadır. Bu bağlamda, yüzeysel yük ve elektrostatiğin kontrolü büyük önem kazanmaktadır. Bunun yanı sıra, daha sonraki aşamalarda transfeksiyon etkinliğini doğrudan etkilediklerinden taşıyıcı veziküllerin boyutu da son derece önemlidir. Bundan dolayı da söz konusu veziküllerin boyut analizleri çok önemsenmektedir. Genelde, araştırmacılar arasında 100 nm boyutunda olan lipozomlar transfeksiyon etkinliğini arttırdığı görüşü hâkim durumdadır (103).

Nükleik asit-fosfolipit etkileşmeleriyle ilgili yapılan araştırmalar, genelde gen aktarım araştırmalarının ilgi sahası içine girmektedir. Bu şekilde geliştirilen farmasötik formülasyonlar genelde katyonik polimerlere ve katyonik lipozomlara dayalı tasarımlar kullanmaktadır. Ancak, özellikle katyonik lipozomların son derece sitotoksik olmaları kullanım boyutlarını çok kısıtlamaktadır (90,98,100,104,105). Bu tez çalışmasında katyonik lipozomların yerine yük taşımayan zwitteriyonik lipozomların, Mg^{+2} aracılıyla DNA'ya bağlanıp bileşik oluşturmaları ele alınmıştır. Önerilen üçlü oluşum sistemi daha önce katyonik lipozomlarla denemiş; ancak nötral lipozomlarla denenmemiştir (106). Bu tez çalışması (zwitteriyonik lipit/DNA/Mg^{+2}) ile ilgili aktarım çalışmaları bakımından özgündür. Söz konusu üçlü bileşik oluşumunda yük taşımayan lipit vezikül ile negatif yük taşıyan DNA'yı bir araya getirilmesinde özellikle Mg^{+2}'un rolü vurgulanmıştır. Katyonik lipitlerin çok yoğun pozitif yük taşımalarından kaynaklanan yüksek sitotoksisiteden (107) dolayı bu araştırma zwitteriyonik lipitler üzerine odaklanmıştır. Zwitteriyonik denilen nötral lipitleri negatif yüklü DNA'ya bağlamak için yük yoğunluğunun uygunluğu nedeniyle Mg^{+2} kullanılmıştır. Buna benzer tasarımlardan şimdiye kadar zwitteriyonik lipit/DNA/Ca^{+2} üçlü oluşumu kullanılmış ve başarılı sonuçlar rapor edilmiştir (67). Ayrıca daha yakın zamanlarda kültür ortamında Ca'un bulunmasının transfeksiyonu yükselttiğine ilişkin raporlar bulunmaktadır (108). Bu bağlamda metal iyonlarına dayalı benzer tasarımların geliştirilmesi hususu önem kazanmaktadır. Şu ana kadar nötral lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumuna ilişkin bir rapor bulunmamaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında Mg'un bu üçlü oluşumda transfeksiyon etkinliği esas alınmıştır. Ayrıca zwitteriyonik lipit/DNA/Ca^{+2} üçlü oluşumu kullanılarak kıyaslama yapılmıştır. Bu ölçümlerden elde edilen parametrelere dayanarak geliştirilen hücre içi aktarım modellerinin bundan sonraki gen tedavisi amacıyla yapılan gen transferi çalışmalarına motivasyon teşkil etmesi amaçlanmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Kullanılan kanser hücre hatları (meme ve serviks) ve embriyonik böbrek hücresi, ATCC ve ECACC 'den alınmıştır. Hücrelerin tipleri, nereden temin edildikleri ve pasaj numaraları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hücrelerin tipleri, nereden temin edildikleri ve pasaj numaraları.

Tarih	Pasaj no	Hücre hattı	Hücre adı	Kullanılan besiyeri katalog numaraları	Ortam içeriği
17.09.2012	3	MCF-7	Meme kanseri	Hyclon, Cat.No: SH30081.01 Lot.No: AVK79251	DMEM +%10FBS + Penisilin/Streptomisin + 2mM L-Glutamin
17.09.2012	5	He-La	Serviks epiteloyit kanseri	Hyclon, Cat.No: SH30081.01 Lot.No: AVK79251	DMEM +%10FBS + %1NEAA + 2mM L-Glutamin
17.09.2012	6	HEK293	İnsan emriyonik böbrek hücresi	Hyclon,Cat.No: SH30081.01 Lot.No: AVK79251	DMEM +%10FBS + 2mM L-Glutamin

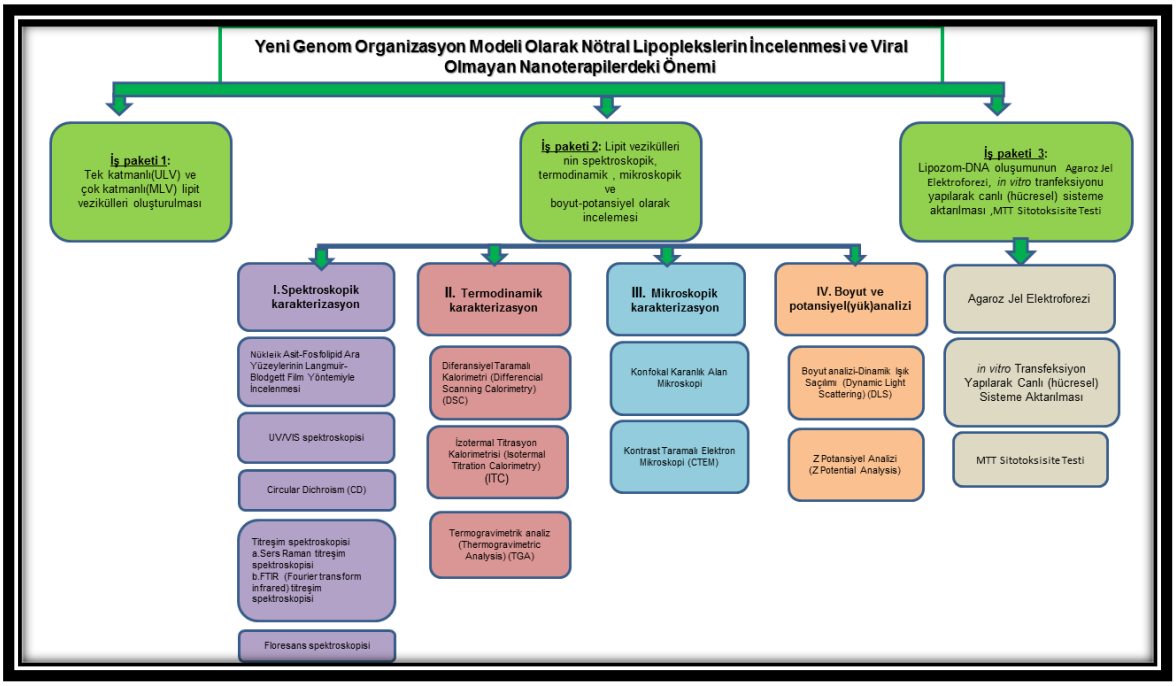
Kullanılan başlıca kimyasallardan başlıcaları; nötral lipit DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfokolin, molekül ağırlığı, 734.039, Sigma-Aldrich-25mg, Alabaster, AL, ABD)'dir. Tris-HCI (10 mM) tampon maddesi, kloroform ($CHCI_3$, Molekül ağırlığı 119.38), metanol (Invitrogen LifeTechnologies, CH_4O), etanol (Invitrogen LifeTechnologies, C_2H_6O), fosfotungistik asit çözeltisi (Sigma), magnezyum klorür ($MgCl_2 2H_2O$ susuz,C98%, Molekül ağırlığı 95,21-Sigma Aldrich-St Louis, MO, ABD), Etidyum bromür solüsyonu (EtBr, 10 ml -10 mg/ml-, Invitrogen, Cat. No. 15585, Lot. No. 0912M05351) Enfekte edilen E. coli suşu, BacteriophageT7 DNA, (39936 bp uzunluğunda 269106 dalton lineer, Geneon-Almanya) kullanılmıştır. Ayrıca yüksek molekül ağırlıklı nükleik asitlere Mg^{+2} ve lipitlerin afinitesini ortaya koymak amacıyla iki tane genomik DNA; bakteriyofaj T7 DNA (GeneOn, Germany) ve Dana timüs DNA (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA), transfeksiyonlarda topolojinin önemini vurgulamak için plasmid DNA; pUC18 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pBR322 (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) ve pCMV.GFPDH5α DNA kullanılmıştır.

Kitler Roche (Almanya) ve Invitrogen (ABD)'den temin edilmiştir. Genel laboratuvar kimyasalları, Sigma Chemical Co. (St Louis, ABD), Merck (Darmstadt, Almanya) ve AppliChem (Darmstadt, Almanya) ürünleri kullanılmıştır.

4.2. YÖNTEM

Bu araştırmanın amacı gen taşıyıcıları olarak sıkça kullanılan DNA ve nötral fosfolipitlerin tek başına ve aralarında oluşturdukları bileşenlerde ilk tanınma olaylarından yola çıkarak bu moleküllerde meydana gelen yapısal değişiklikleri ortaya çıkarmaktır ve biyofarmasötik özelliklerini ortaya koyarak bunların üretimini tasarlamaktır. Bu verilerin daha önce bilimsel literatürde bildirilmiş nükleik asit ve fosfolipitlerin hidrasyonu ile ilgili elde edilen verilerle kıyaslamak önemlidir. Örneğin, bu neticeler daha sonra lipite dayalı gen taşıyıcı tasarımlarının biyofarmasötik gerekçelere dayanarak fizikokimyasal profillerini çıkarmak ve nükleotit dizilişine duyarlı olan veya olmayan tek ve çift zincirli nükleik asit kromatografisinde kullanılabilir. Esas Langmuir-Blodgett tek katmanla gerçekleştirilen yüzey basınç ölçümlerine geçilmeden önce ön incelemeler yapılmıştır. Bu yaklaşımlar uyarınca ilk önce bir formülasyonunun ön fizikokimyasal özellikleri iyi bir şekilde incelenmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda, ilk önce DNA-fosfolipit bileşik oluşumunun ön yüzey kimyasal, kolloidal, fizikokimyasal ve biyofiziksel incelenmesi yapılıp tek katman ölçümlerine geçilmiştir.

Şekil 4.1. Kullanılan yöntemlerin şema ile gösterimi.ki bu tez çalışmasında kullanılan yöntemlerin şema ile gösteriminde lipit vesikülleri oluşturulduktan sonra, üçlü oluşumun (Lipit/DNA/Mg^{+2}) spektroskopik, termodinamik, mikroskopik, boyut-potansiyel olarak incelemesi yapıldıktan sonra hücresel sisteme aktarılması ile ilgili yöntemler uygulanmıştır. Kullanılan makine-techizat listesi ek-7'de verilmiştir. Deneysel tasarımın daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla, tez çalışmasının amaç ve kapsamına uygun olarak kullanılacak olan yöntemlerle ilgili kısa bilgiler aşağıda verilmiştir. Daha sonra tezin temelini teşkil eden lipozom ölçümleriyle ilgili ayrıntılı deneysel protokollere yer verilmiştir.

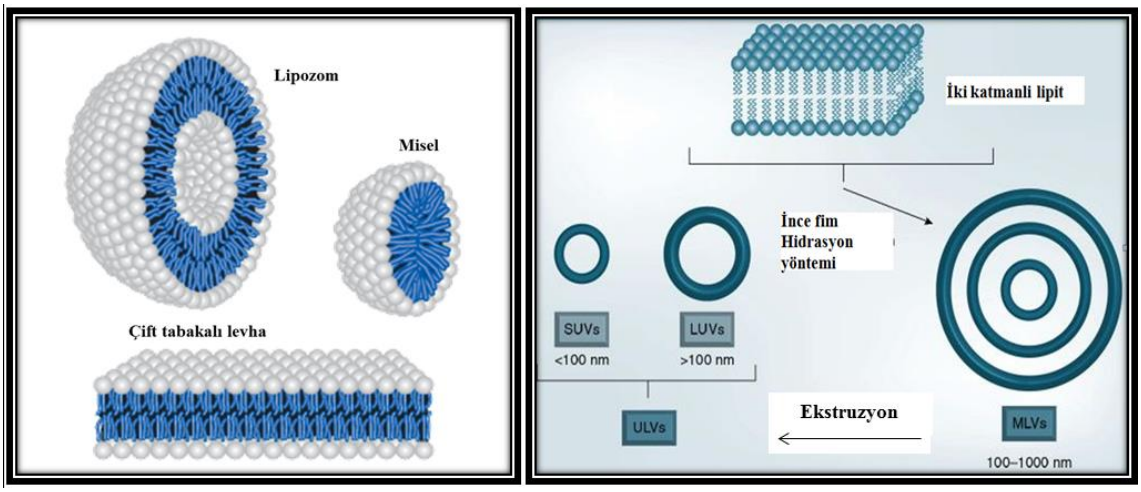


Şekil 4.1. Kullanılan yöntemlerin şema ile gösterimi.

4.2.1. TEK KATMANLI (ULV) VE ÇOK KATMANLI (MLV) LİPİT VESİKÜLLERİ OLUŞTURULMASI

Lipozomlar veya lipit veziküller üç boyutlu olmaları itibariyle doğal hücrelere benzeyen fosfolipitler gibi amfifilik moleküllerin kendi kendine oluşturdukları (self-assembling) yapılara sahip yuvarlak agregatlardır. Bu bakımdan doğal hücrelere iyi bir yaklaşımı teşkil ederler. Yüksek biyoyararlılıkları ve çeşitli molekül ve maddelerin vezikül hacmi içinde yüksek miktarda enkapsüle edilebilmeleri bakımından, lipit vezikülleri ayrıca bir ilâç taşıma aracı olarak değerlendirilmişlerdir.

Lipozomların çeşitli türlerini (MLV, SUV, LUV, FRV) uygulanmakta olan birçok yöntemi kullanarak hazırlamak mümkündür. Aşağıdaki Şekil 4.2'deki farklı büyüklükte ve farklı lamelli lipozomlar: SUV: Bir katmanlı küçük vezikül; LUV: Bir katmanlı büyük vezikül; MLV: Çok tabaklı vezükül; ULV: Bir tabakalı vezikül'dür.



Şekil 4.2. Lipozom yapısı (42) ve lipozomların çeşitli türleri (MLV, SUV, LUV) (108).

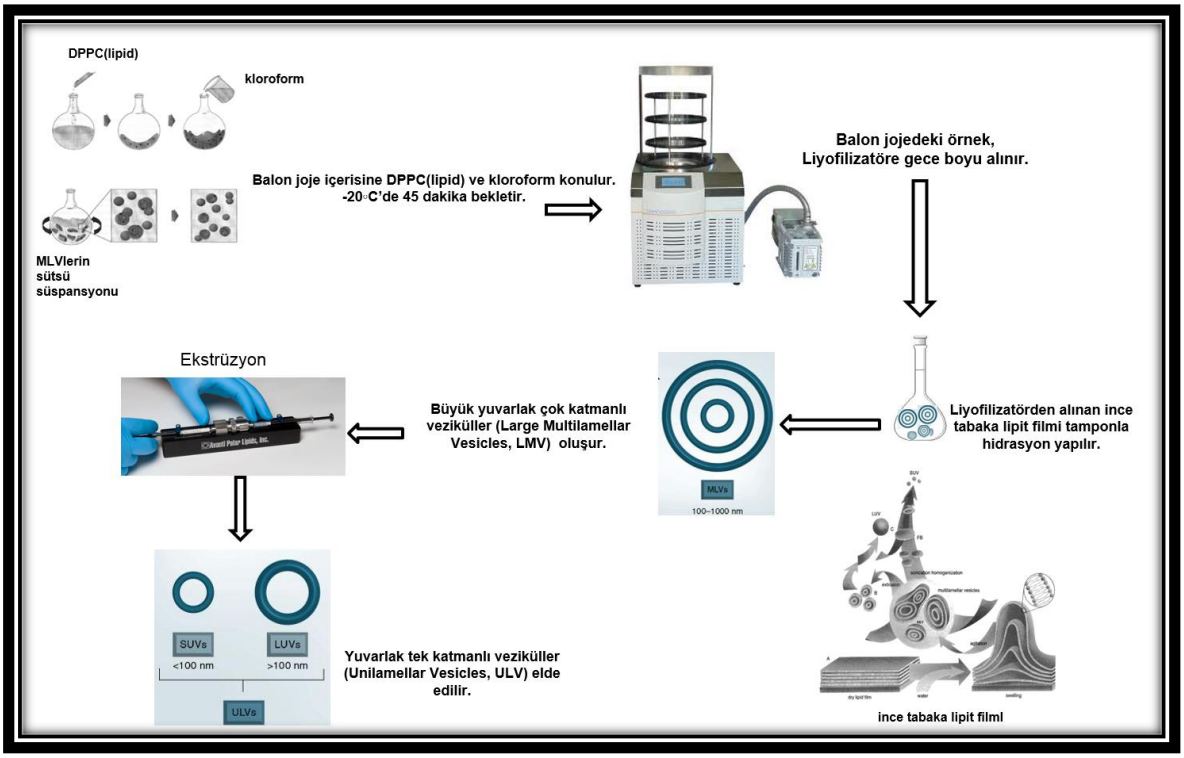
Bu araştırmada, çok popüler bir yöntem olan "hand-shaken vesicles preparation" yöntemi uygulanmıştır. Lipozomların herhangi bir formülasyonunu hazırlamak için lipit moleküllerini önce sıvı ortama aktarmak gerekmektedir. Daha sonra, ince tabaka lipit filmi yuvarlak balon jojeye konulmak suretiyle, sıvı ortamında çalkalanması ve çözülmesi sağlanmaktadır.

Lipozomlar (lipit vezikülleri) ince tabaka lipit filmlerinin veya diğer lipit yüzeylerinin hidrasyonu ile oluşturulmuştur. Bu yapılarda sıvı kristal şeklinde bulunan lipit katmanları akışkan hale getirilmiştir. Hidrasyonla meydana gelmiş lipit katmanları çırpma ve çalkalama esnasında bulundukları balon jojenin veya kabın iç yüzeyinden ayrılırlar ve daha büyük yuvarlak çok katmanlı veziküller (Large Multilamellar Vesicles, LMV) oluşmaktadır. Kenarlarda katmanın hidrokarbon kısmının su ile etkileşmeleri engellendiğinden, bu yapı termodinamik açıdan da bakılacak olursa çok sağlam ve sabittir. Parçacıkların oluşumundan sonra boyutlarının düşürülmesi sonik enerjinin (sonikasyon) veya mekanik enerjinin (ekstruzyon) harcanmasını gerektirmektedir. Genel olarak, uygulamayı amaçladığımız prosedür hidrasyon için lipitin hazırlanması, eşzamanlı gerçekleştirilen hidrasyon, çırpma ve çalkalama ve veziküllerin homojen dağlımının sağlanması için yapılan boyutlandırma aşamalarından ibarettir. Lipitler ilk önce kloroformda çözülüp homojen lipit karışımının elde edilmesi için iyice karıştırılmıştır. Lipit çözeltileri 10-20 mg lipit/ml kloroform konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Bu şekilde çözülen fosfolipit süspansiyonu azot gazı ile uzaklaştırılarak ince lipit filmi elde edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan çok katmanlı lipozomlar daha sonra birçok deneyde

kullanıldığından, söz konusu işlem rotary evaporator ile gerçekleştirilmiştir. Böylece balon jojenin dibinde ince lipit filmi veya tabakası oluşturulmuştur. Balon jojede kalan organik çözgeni tamamen uzaklaştırmak amacıyla, bu film bir gece boyunca vakum pompa ile kurutulmuştur. Bu işlemden sonra lipit uygun tamponlarla sulandırılıp, kaplara aktarılmıştır ve sıvı azot tankına konularak dondurulmuştur. Bu işlem birkaç defa tekrarlanarak lipozom-DNA karışımının "freze-thawing" işlemi uygulanmıştır. Bu işlem elde edilmesi istenilen lipit hacmine göre değişmektedir. Daha sonra, kurutulmuş lipit filmi bulunan balon joje vakum pompadan çıkarılır ve tekrar bir sonraki hidrasyon için dondurulmuş vaziyette muhafaza edilmiştir. Kuru lipit filminin hidrasyonu, basitçe sıvı ortamın veya tampon çözeltinin lipitin bulunduğu balon jojeye eklenip çalkalanması ile gerçekleştirilmiştir. Hidrasyon ortamı kullanılan lipitin genel jel-sıvı kristal faz geçiş ısısından (T_m) daha yüksek ısı ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonra lipit emülsiyonu, bulunduğu kendi ortam ısısının söz konusu minimum sıcaklığının (T_{min}) üzerinde olacak şekilde muhafaza edilmiştir. Yüksek faz geçişine sahip lipitler için bu işlemi balon joje içinde bulunan lipitleri rotary evaporator sistemine bağlayarak vakum kullanılmaksızın gerçekleştirmek mümkündür. Daha sonra, balon joje yine önceden lipit süspansiyon ısısının üzerinde bulunan bir ısı ortamında ısıtılmış su banyosuna aktarılıp, çalkalanılarak lipitin hidrasyonu gerçekleştirilmiş, lipitlerin akışkan fazı elde edilmiştir. Lipit türüne bağlı olarak hidrasyon için gereken zaman değişmekte, ancak bu işlemin çalkalama ve vorteksleme zamanları ile birlikte, genelde bir saati aşmamasına özen gösterilmiştir. Bazı durumlarda, veziküllerin boyut dağılımı ve homojeniteleri iyileştirildiğinden, bundan sonraki aşama olan vezikül boyutlandırma işlemine geçilmeden önce, lipit süspansiyonu bu şekilde bir gece bekletilmiştir. Hidrasyon ortamını genelde lipit veziküllerin uygulama amacı tayin etmektedir. Uygun hidrasyon ortamı, distile su, tampon çözeltileri, tuzları, ve şeker çözeltileri gibi elektrolit olmayan bileşenleri içermektedir. Hidrasyon esnasında, bazı lipitler yapılarına özgü kompleksler oluşturmaktırlar. Hidrasyon sonucunda, büyük çok katmanlı veziküller (Large Multilamellar Vesicles, LMV) oluşturulmuştur. Katmanlar arasında bulunan lipit yüzeyleri su katmanı ile çevrilidir. Hidrasyonu gerçekleştirilmiş çok katmanlı veziküllerin elde edilmesinden sonra, bu parçacıkların boyutları ekstruzyon yöntemi kullanılarak düşürülmüştür. Bu yöntemde lipit süspansiyonu önceden bilinen ve tercih edilen gözenek büyüklüğüne sahip iki polikarbonat filtre üzerinden 10 defa geçirilerek bu çapa yakın boyuttaki tek katmanlı veziküller elde

edilmiştir. Farklı gözenek boyutlara sahip polikarbonat filtreler mevcuttur. Böylece elde edilecek olan tek katmanlı veziküllerin (Large Unilamellar Vesicles LUV) boyutlarını önceden kontrol etmek mümkündür. Bu yöntem sayesinde söz konusu tek katmanlı lipit vezikülleri ortalama olarak homojen boyutta elde edilmiştir. Şimdiye kadar bahsedilen tüm diğer lipozom boyutunun düşürülmesinde kullanılan yöntemlerde olduğu gibi burada da bu işlem lipitin faz geçiş ısı derecesinin üzerinde bir değerde çalışılması gerekmektedir. Bu işlem sonucunda, elde edilen lipozomların boyutu boyut analizi cihazıyla (particle sizer) teyit edilmiştir.

Bu şekilde her zaman deney öncesi taze olarak hazırlanan farklı boyuta sahip tek katmanlı veziküller daha sonraki fizikokimyasal incelemelerde kullanılmıştır. Lipozomların LUV (tek tabakalı lipit vesikülü) türlerini hazırlamak için "hand-shaken vesicles preparation" yöntemi uygulanmıştır. Yuvarlak balon jojeye, ince tabaka lipit filmi (DPPC, Dipalmitoylphosphatidylcholine, Sigma-Aldrich, 25 mg) ve PCMV.GFP DH5α (0.1 µg DNA/µl) plazmid DNA'sı eklenmiştir. Daha sonra birkaç damla kloroform ilave edilerek oluşturulan sıvı ortamda lipit filminin çalkalanması ve çözülmesi sağlanmaktadır. Balon jojedeki bu sütsü karışım -20 ºC'ye alınır. 45 dakika kadar burada bekletilip, inkübasyon sonrası liyofilizatörde gece boyu bırakılmıştır. 24 saat sonra liyofilizatörden alınan ince tabaka lipit filmi distile su ile 1 ml'ye hidrasyon yapılmıştır. Böylece plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV (çok tabakalı lipit vesikül)'ler elde edilmiştir. Daha sonra ekstruder aleti kullanılarak plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV (tek tabakalı vesikül)'ler elde edilmiştir. Bu yöntemde lipit süspansiyonu önceden bilinen ve tercih edilen por büyüklüğüne sahip 2 polikarbonat filtre üzerinden 10 defa geçirilerek bu por büyüklüğüne yakın boyuttaki tek katmanlı veziküller elde edilmiştir. Bu yöntem sayesinde ortalama olarak söz konusu tek katmanlı veziküllerin boyut dağılımı son derece homojendir. 100 nm por büyüklüğüne sahip filtreden geçirildiklerinde MLV genelde ortalama olarak çapları 120-140 nm arasında değişen büyük, tek katmanlı (Large Unilamellar Vesicles LUV)'i meydana getirir. Bu işlem sonucunda, elde edilen lipozomların boyutu particle sizer cihazıyla teyit edilmiştir. Bu ortalama partikül boyutu ayrıca lipit içeriğine bağlıdır ancak son derece tekrarlanabilir bir prosedürdür. Aşağıdaki Şekil 4.3'de lipit filminden tek katmanlı (ULV) ve çok katmanlı (MLV) lipit vesiküllerinin oluşturulması şematize edilmiştir.



Şekil 4.3. Lipit filminden tek katmanlı (ULV) ve çok katmanlı (MLV) lipit vesiküllerinin ekstruzyon yöntemiyle oluşturulması.

Lipozom-DNA Komplekslerin (Lipoplekslerin) oluşturulması için uygulanacak protokol

Lipozom-DNA komplekslerinin (lipoplekslerin) oluşturulması; 60 µl 5x dekstroz, 154 µl steril H_2O ve 86 µl lipozom çözeltileri 50 ml'lik cam tüplerde karıştırılıp, 10 saniye boyunca bu karışım vortekslenmiştir. 40 µl 5x dekstroz, 60 µl steril H_2O ve 100 µl plazmid DNA 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpte karıştırılmış ve bu işlemin yapılması sırasında çok dikkatli olunmuştur. Bu noktada vortekslemeden kaçınılmıştır. Bu seyreltilmiş lipozom çözeltisi karıştırıldığı esnada çok dikkatlice damla miktarları olarak seyreltilmiş, DNA çözeltisi ilave edilmiştir. Bu işlem için 1000 µl'lik pipet ucu kullanılmıştır. Genel olarak, 200 µl'lik DNA çözeltisinin aktarılması, 5-10 saniyede yapılması gerekmektedir. Bu oluşum 10-15 dakika boyunca oda sıcaklığında bırakılmıştır.

DNA-lipozom Oluşumunun Ortaya Çıkarılması

DNA-lipozom oluşumunun meydana geldiğini göstermek için Agaroz Jel Elektroforezi, Elektron Mikroskopisi (TEM), Floresan Spektroskopisi, Termal Analiz (DCS ve ITC), FTIR, Raman ve CD spektroskopileri gibi yöntemler kullanılmıştır.

Lipit vezikülün iç hacmindeki DNA'nın konformasyonu Elektron Mikroskopisi (TEM) ile ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen görüntülerin geçerliliği özellikle nükleik asit seviyesinde FTIR, Raman ve CD spektroskopileri ile teyit edilmiştir. DNA'dan kaynaklanan lipozomlar arası füzyon olayları floresan spektroskopisi ile takip edilmiştir. Fosfolipitlerde ve nükleik asitteki faz değişimleri termal analiz (DSC) ile gerçekleştirilmiş ve bu sistemlerin termodinamik özellikleri ortaya çıkarılmıştır. Lipozom-DNA bağlanma kinetiği ITC yöntemi ile hesaplanmıştır.

Lipit vezikül içindeki DNA'nın topolojisi ve konformasyonu son olarak enzimatik olarak da teyit edilmiştir. Bunun için sadece tek sarmala karşı duyarlı olan DNAse-I ve S1-endonükleaz enzim protokolleri uygulanmıştır. Bu denemelerle lipozom içindeki DNA'nın tek sarmal şeklinde olup olmadığı bu enzimlerce ortaya çıkarılmıştır.

4.2.2. LİPİT VESİKÜLLERİNİN SPEKTROSKOPİK KARAKTERİZASYONU

Lipit vesiküllerinin spektroskopik incelemeleri ile makromolekül-ligand bağlanma afinitesi ve kinetiği hakkında bilgiler elde edilir. Bazı durumlarda belli bir membran kromoforun ve çevresindeki moleküllerin absorbsyon spektrumunda meydana gelen spektral değişikliklerinin söz konusu olduğunda kromoforun tek başına gösterdiği konformasyon değişikliğinden ziyade, tüm toplam spektrumdaki değişikliklerin ölçülmesi daha uygundur. Bu işlem çift ışınlı spektrofotometre ile yapılmaktadır. Bu yöntemle meydana gelen tepkimelerin kinetiğinin ölçülmesi elektron taşıyıcılarının indirgenme-oksitlenme olaylarına bağlı olduğu gibi, nükleer manyetik rezonans (NMR), Elektron Spin Rezonans (ESR) ve termodinamik yöntemlerinden farklı olarak moleküllerin konformasyonu hakkında çok kısıtlı bilgiler vermektedir. Ancak, bu yöntemi kullanarak makromolekül-ligand bağlanma afinitesi ve kinetiği hakkında çok önemli bilgiler edinebilmektedir.

4.2.2.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin UV/Visible spektroskopisi ile incelenmesi

Ultraviyole ve görünür ışık (UV-Visible) absorpsiyon spektroskopisi ile bir ışın demetinin bir örnekten geçtikten veya bir örnek yüzeyinden yansıtıldıktan sonraki azalmasının ölçülmektedir. Işığın şiddetinin azalması absorplamanın arttığını göstermektedir. Örneğin derişimi belirli bir dalgaboyundaki absorpsiyonu ölçülerek bulunmaktadır. UV-Visible spektroskopi genellikle çözeltideki moleküller veya inorganik iyon ve komplekslerin ölçümünde kullanılmaktadır. Birçok molekül UV veya görünür dalgaboylarını absorplar ve farklı moleküller farklı dalga boylarını absorplamaktadırlar. Bir absorpsiyon spektrumu molekülün yapısını gösteren birçok absorplama bantlarından oluşmaktadır. Lipozomların UV/VIS spektroskopik incelemeleri neticesinde dipalmitoylfosfatidilkonin (DPPC) ile nükleik asitler arasında ilk tanınma olaylarının kinetik profilleri gösterilip oluşan supramoleküler bileşenlerin sekonder yapısal değişiklikleri hakkında veriler elde edilmiştir. İkili ve üçlü kompleksler halinde örnekler hazırlanarak (109) ölçümler alınmıştır. Perkin Elmer Lambda 35 UV-VIS spektrofotometre ile yapılan ölçümler Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde yapılmıştır.

4.2.2.2. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin Dairesel Dikroizm (Circular Dichroism, CD) ile incelenmesi

Dairesel dikroism (CD) spektroskopisi, sol ve sağ yönde dairesel polarize ışınlar tarafından herhangi bir molekülde meydana gelen absorbsyon farklılıklarını ölçmektedir. Bu farklılıklar molekül yapısındaki asimetrilerden meydana gelmektedir. Çeşitli proteinlerin ve nükleik asitlerin, özellikle heliks yapılarının ortaya çıkarılması konusunda, ikincil yapısal değişiklikleri ile ilgili araştırmalarda kullanılması çok uygundur.

CD sinyali toplu halde bulunan bir örneğin ortalama moleküler konformasyonu hakkında çok önemli bilgiler vermektedir. Bu özellikleriyle CD spektroskopisi, NMR ve ESR veya floresan spektroskopik yaklaşımlarında olduğu gibi makromoleküllerin baz veya fonksiyonel gruplarının oryantasyonları hakkındaki bilgilerden ziyade, reaksiyon ortamının değiştiğinde (örneğin; reaksiyon ısısının veya biyomakromoleküllere herhangi bir ligandın bağlandığında) herhangi bir makroskopik yapısal değişikliğin meydana gelip gelmediğini ortaya çıkarmaktadır. Söz konusu ligandlar arasında bu tez çalışmamızda da ele alınan

nükleik asit ve fosfolipit molekülleri en önemli grubu teşkil etmektedir. CD spektroskopik ölçümlerinde X-Ray kristalografisinde olduğu gibi biyolojik örneğin oryantasyonunun sağlanması gerekmemektedir. Bu tür yapısal biyolojik araştırmalarda, biyomakromoleküllerin yapılarını ortaya çıkarılmasında, günümüzde yoğun olarak ESR (EPR) ve NMR spektroskopilerine paralel olarak X-Ray kristalografisi uygulanmaktadır. Bu yaklaşımlar sayesinde biyomoleküllerin üç-boyutlu yapıları hakkında çok önemli bilgiler elde edilmektedir. Özellikle NMR spektroskopik ve X-Ray kristalografik ölçümlerden incelenmekte olan biyomakromoleküllerle ilgili elde edilen atomik koordinatlar daha sonra moleküler modelleme (örneğin; MOLSCRIPT, AMBER veya Monte Carlo veya Markov zincirleri moleküler modelleme programları ile yerleştirmede yapısal araştırmalar) yaklaşımlarında uygulanıp, biyomolekülün yapısı hakkında son derece önemli modeller geliştirilmektedir. Ancak, bu çok hassas yöntemler beraberinde birçok yapılması zor olan hususları da getirmektedir. Örneğin, ESR spektroskopisi (özellikle saturation-transfer ESR versiyonu) sadece paramanyetik özellikler taşıyan yapılarda uygulanmaktadır. Paramanyetik özelliği taşımayan durumlarda suni nitrospi etiketler adı verilen etiket moleküller sisteme katılmaktadır. Bu da sinyalin kaydedilmesini sağlar, ancak sistemi doğal durumdan çok uzaklaştırmaktadır. NMR spektroskopisi ve X-ray kristalografisi için ise yüksek saflıkta hazırlanan büyük miktarlarda biyolojik örneğin hazırlanmasına ihtiyaç vardır. X-Ray kristalografisinde elde edilen biyolojik molekül kristallerinin büyütülmesi ve çoğaltılması da zor bir işlemdir. Buradan elde edilen atomik koordinatlarının moleküler modelleme yaklaşımlarıyla yerleştirme boyutuna ulaştırılması için ise çok pahalı bilgisayar programlı moleküler modellere ihtiyaç vardır. Tüm bu hususları göz önünde bulundurarak, daha ucuz ve aynı düzeyde ikincil yapılarla ilgili önemli bilgiler veren alternatif yaklaşımların uygulanması çok daha rasyoneldir. Adı geçen yaklaşımlara kıyasla CD spektroskopisi çok daha az miktarlarda örnek gerektidirdiği gibi elde edilen veriler son derece önemlidir. CD spektroskopik görüntülemeleri sırasıyla nükleik asitler ve fosfolipitler üzerine uygulanmıştır. İkili ve üçlü kompleksler halinde örnekler hazırlanarak (109) ölçümler alınmıştır.

4.2.2.3. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin floresan spektroskopisi ile incelenmesi

Bir molekülün floresan özellik gösterebilmesi için UV veya görünür alandaki ışımayı soğurması gerekir. Soğurumun yüksek oluşuna göre yayılan floresanın şiddeti de o kadar yüksek olur.

Moleküllerin floresan yayma özelliklerinden geliştirilen moleküler floresan spektroskopisi yöntemi ile eser miktarlardaki birçok organik ve anorganik maddelerin kalitatif ve kantitatif analizi yapılabilmektedir.

Floresanın uygulama alanlarını biyokimya, farmakoloji, fotofizik, fotokimya, analitik kimya, petrol araştırmaları, çevresel araştırmalar oluşturmaktadır. Ayrıca floresan spektrometreden günümüzde ham petrol karakterizasyonunda, polimerlerin yapılarının tayininde, protein yapısı ve protein antikor etkileşimlerinin incelenmesi gibi konularda faydalanılmaktadır. Çözgenin polarlığı floresan şiddetinde çok önemlidir. Çünkü floresana etki eden geçişlerin enerjileri çözgen polaritesiyle değişmektedir.

Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü'nde flurimetre (RF-5301PC Spectrofluorophotometer SHIMADZU) ölçümleri yapıldı. Doğal floresan aminoasit ve lipitlerde bulunmamaktadır. Sinyal elde etmek için floresan etiket (EB: Etidium bromide) kullanılmıştır. İkili ve üçlü kompleksler halinde örnekler hazırlanarak (109) ölçümler alınmıştır.

4.2.2.4. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin titreşim spektroskopisi ile incelenmesi

Lipozomların titreşim spektroskopisi (FT-IR ve Raman) ile Mg^{+2} varlığında lipit türleri (MLV,ULV) ile DNA arasında oluşan bileşiklerde ilk tanınma olayları ve bu oluşumda rol oynayan fonksiyonel grupların ortaya çıkarılmaları incelenmiştir. Bu ölçümler tüm spektrum çekimleri ve direkt ölçüm yöntemi uygulayarak gerçekleştirilmiştir. FT-IR spektroskopisinde geniş su bantları önemli engel teşkil ettiğinden özellikle Raman spektroskopisinin uygulanması büyük önem kazanmaktadır.

4.2.2.4.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin FT-IR (Fourier Transform Infrared) kızılötesi titreşim spektroskopisi ile incelenmesi

Kızılötesi (IR) absorbsiyon spektroskopisi bir tür titreşim spektroskopisidir; IR ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından soğurulmaktadır. Matematiksel Fourier dönüşümü spektroskopisinde ışıma şiddeti, zamanın bir fonksiyonu olarak alınır. Her dalga boyunda ayrı ayrı tarama gerekmeksizin hızlı ve yüksek çözünürlükte spektrumlar elde edilebilir. Bu yöntem ile, moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak; katı,sıvı,gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, iki bileşiğin aynı olup olmadığı, yapıdaki bağların durumu,bağlanma yerleri ve yapının aromatik ya da alifatik olup olmadığı belirlenebilir. Ayrıca biyokimyasal olarak; karbonhidrat, fosfolipit, aminoasit ve proteinlerin yapı analizlerinde belirleyicidir. FTIR-ATR (Attenuated Total Relectance), absorpsiyon bantlarının dalga boyunda azalma meydana getirilerek daha az emekle ve örnek kalınlığından bağımsız olarak soğurganlığı çok fazla olabilen farklı maddelerin spektrum analizlerine olanak sağlamaktadır. ATR Tekniği polimer, köpük, tekstil, boya, sır gibi kaplama maddelerin analizlerinde oldukça etkindir. Tek Tabaka Sıyırma Açısı Speküler Reflektans (Monolayer Grazing Angle Specular Reflectance), Speküler reflektans, parlak veya yarı mat bir örnek yüzeyinden kaynaklanan yansıma kullanılarak yüzey analizinin gerçekleştirildiği, non-destrüktif bir analiz yöntemidir. Tek tabaka sıyırma açısı speküler reflektans aparatı, hava/sıvı ara yüzeyindeki tek tabakaların FTIR karakterizasyonu ve yansıtıcı yüzeylerde sıyırma insidans açısı ölçümleri için kullanılmaktadır. Tek tabaka modunda sürfaktantlar, proteinler, polimerler ve membran yapısındaki fosfolipitler gibi tek tabaka sistemler incelenebilirken, sıyırma insidans açısı ölçümleri ile silikon devre levhası yüzeyleri gibi yansıtıcı yüzeylerdeki ince film kaplamaları analiz edilebilmektedir.

Bir titreşim spektroskopisi olan FTIR spektrometresi kompleks oluşumu esnasında tepkimeye giren biyomakromoleküllerin sekonder yapıları ve fonksiyonel gruplar hakkında bilgiler vermektedir. Nükleer manyetik rezonans (NMR), elektron spin rezonans (ESR) ve floresan spektroskopisi vb gibi yöntemlerin aksine çok fazla örneğe gereksinim duyulmadığı bu ölçüm yöntemi ayrıca çok hacimli etiket moleküllerinin katılmasını gerektirmemektedir ve saçılmadan kaynaklanan artefaktlar da burada engellenmektedir. Ayrıca, FTIR spektrometresi katı ve sıvı fazda bulunan örneklerle çalışma fırsatı da

sunmaktadır. Bu ölçümler Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Bu ölçümlerde tüm spektrum çekimleri ve direkt ölçüm yöntemi uygulayarak gerçekleştirilmiştir. İkili ve üçlü kompleksler halinde örnekler hazırlanarak (109) ölçümler alınmıştır.

4.2.2.4.2. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin SERS Raman saçılım spektroskopisi ile incelenmesi

Bir titreşim spektroskopik yaklaşımı olarak SERS Raman spektroskopisi moleküllerin radyasyonunu takiben gözlenen moleküler titreşimlerin ölçülmesine dayanmaktadır. Bu yöntem, örneğin kolesterolün fosfolipit jel-sıvı kristal faz geçişi üzerindeki etkisinin araştırılmalarında uygulanmaktadır. Raman spektroskopisi ayrıca Fe-S taşıyan proteinlerde (örneğin transferinde) Fe-S karşılıklı etkileşmeleri veya hem proteinlerdeki porfirin-protein etkileşmeleri, veya çeşitli organik moleküllerinde (örneğin, karotenoidler, vitaminler, antibiyotikler, steroidler ve polisakkaridler) C-C titreşimleri ile ilgili çok önemli bilgiler vermiştir. Son yıllarda Raman spektroskopisi membranların yüzeysel özelliklerinin araştırmalarında da yoğun olarak kullanılmaktadır. İkili ve üçlü kompleksler halinde örnekler hazırlanarak (109) ölçümler alınmıştır.

4.2.3. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN TERMODİNAMİK KARAKTERİZASYONU

Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin termodinamik karakterizasyonu; diferansiyel taramalı kalorimetri (Differencial Scanning Calorimetry) (DSC), izotermal titrasyon kalorimetri (Isothermal Titration Calorimetry) (ITC) ile yapılmıştır.

4.2.3.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin diferansiyel taramalı kalorimetri (Differencial Scanning Calorimetry,DSC) ile incelenmesi

Lipit vezikülleri ince tabaka film (thin-film) yöntemine göre hazırlanmıştır. Bunun için, lipit ve DNA stok çözeltileri kloroform ile hazırlanıp, bunlardan istenilen miktarlar balon jojelere aktarılmıştır. İyi bir karışım elde etmek için bunlar vortekslenip, N_2 gazı ile evaporasyonları gerçekleştirilmiştir. Böylece balon jojenin iç cam yüzeyine ince tabaka lipit film oluşturulmuştur. Bu film gece boyunca vakum desikatör ile muamele edilmiş ve böylece son kloroform kalıntı miktarları da uzaklaştırılmıştır. 1ml saf su veya ilgili tampon

(SSC, TRIS veya HEPES) ile balon jojeye aktarılıp 1 dakika boyunca vortekslenmiştir. Balon joje daha sonra söz konusu lipitin faz değişim ısı noktasından daha yüksek bir sıcaklığa ayarlanan sonikatörde tutulup, 5-10 dakikalık bir süreyle sonikasyon uygulanmıştır. Daha sonra bu balon joje çalkalanan su banyosuna 37°C'de 1 saat boyunca bırakılmış ve böylece iyi bir DNA-lipit karışımı hazırlanmıştır. DSC ölçümleri Perkin-Elmer Pyris Marka DSC cihazı ile Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarında yapılmıştır. Referans olarak hermetik kapanabilinen boş alüminyum kaplar kullanılmıştır. Lipit konsantrasyonu olarak 20 mg/ml kullanılmış ve bundan 10 µl lipozom süspansiyonu hermetik alüminyum kaplara konulup, kaplar böylece kapatılmıştır. Termogramlar gösterilen sıcaklık aralığında (20-100°C) elde edilmiş ve faz diagramları çizilmiştir. Bu termal analizden sonra DNA-lipozom bileşiklerinin oluşum kinetiği izotermal titrasyon kalorimetrik ölçümlerle incelenmiştir.

4.2.3.2. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin izotermal titrasyon kalorimetri (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) ile incelenmesi

Lipozomların izotermal analizi, ITC ile Lipozom/DNA/Mg^{+2} üçlü bileşiklerinin bileşik hale gelmelerinin termodinamik ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümler Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. DSC ve ITC yöntemleri Gibbs serbest enerji (ΔG) değişimi, entropi (ΔS) ve entalpi (ΔH) gibi çok önemli termodinamik parametrelerinin doğrudan hesaplanmasını mümkün hale getiren yöntemlerdir.

Lipit vezikülleri ile farklı konformasyona ve topolojiye sahip nükleik asit türleri arasında oluşan bileşenlerinin oluşum termodinamiği ve kinetiğinin ortaya çıkarılması amacıyla bu iki termal analiz yaklaşımı uygulanmıştır. Söz konusu iki yöntem (DSC, ITC) farklı bilgiler vermektedir. DSC ölçümleri reaksiyon termodinamiği hakkında bilgiler verirken ITC ise reaksiyon kinetiği konusunda bilgiler vermektedir. Bu bakımdan birbirine paralel olarak uygulanmaları gerekmektedir. İkili ve üçlü kompleksler halinde örnekler hazırlanarak (109) ölçümler alınmıştır.

4.2.3.3. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin termogravimetrik analiz (Thermogravimetric Analysis, TGA) ile incelenmesi

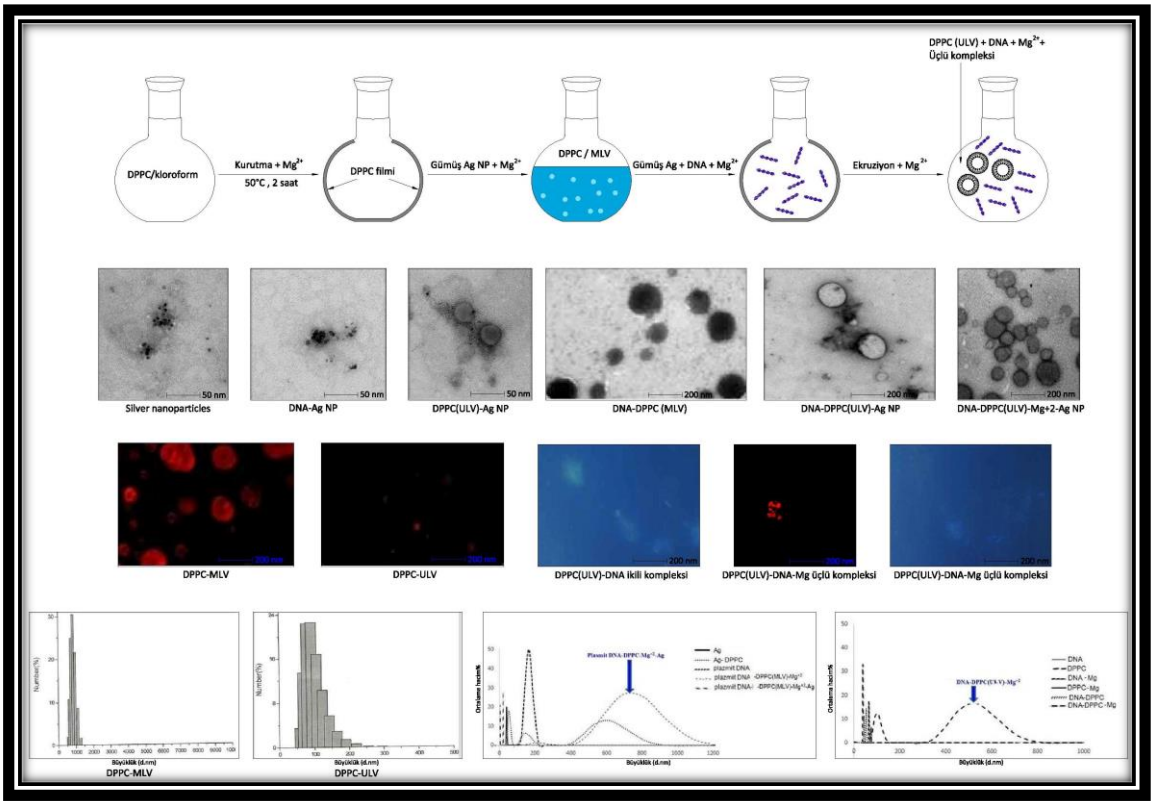
Termogravimetrik analiz, ağırlığın yani örneğin kütlesinin, numunenin sıcaklığına ya da zamana göre ölçümüdür. Örnekler genel olarak sabit sıcaklık değerinde ısıtılır ya da sabit bir sıcaklıkta tutulur. TGA kontrollü örnekle doğrusal olmayan sıcaklık programları da kullanılabilir. Ayrıca TGA deneylerinde ortamın hava koşulları, reaktif, durağan ya da oksitleyici olabilmesinden dolayı dikkate alınmalıdır.

Alternatif olarak, TGA eğrilerinin birinci türevi zaman ya da sıcaklığa bağlı olarak kullanılabilir. Bu değerler de kütle değişimini gösterir. Bu eğrilere DTG (Difansiyel Termal Analiz) eğrileri adı verilir. TGA ölçümünün sonunda kütlenin ya da % kütlenin zamana ya da sıcaklığa karşı grafiği TGA eğrileri olarak görüntülenebilir.

Kütle değişikliği, örneğin birkaç farklı yoldan malzeme kaybıyla ya da onu saran ortamla reaksiyona girmesiyle oluşmaktadır. Bu oluşumda TGA eğrilerinde bir adım şeklinde ya da DTG eğrilerinde bir doruk noktası şeklinde oluşur. TGA eğrilerine ek olarak diğer eğrilerin bir çoğu bazı hedefleri yorumlayabilmek için kullanılır. Birinci türev (DTG eğrisi, kütlenin değişim hızı) verir. DTA eğrisi ise DSC (İzotermal Titrasyon Kalorimetre)'ye benzer olayları endotermik, ekzotermik olayları yorumlayabilmek için) kullanılır.

4.2.4. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN MİKROSKOBİK KARAKTERİZASYONU

Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin mikroskopik karakterizasyonu konfokal ve kontrast taramalı elektron mikroskopi (CTEM) ile yapılmıştır. Ekstruzyon yöntemiyle oluşturulan tek katmanlı ve çok katmanlı lipit vezikülleri Mg^{+2} ve DNA ile ikili ve üçlü kompleksler oluşturularak Şekil 4.4'de gösterildiği gibi CTEM ve konfokal mikroskopi ile görüntülenip, daha sonra boyut-potansiyel ölçümleri ile teyit edilmiştir.



Şekil 4.4. Ekstruzyon yöntemiyle tek katmanlı ve çok katmanlı lipit vezikülleri oluşturulması, üçlü oluşumunun CTEM ve konfokal mikroskopi ile görüntülenip, boyut analizi ile doğrulanması

4.2.4.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin konfokal mikroskopi ile incelenmesi

Konfokal mikroskop, floresan mikroskobun gelişmiş bir modelidir. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop araştırmacılara floresan veya yansıtıcı problar ile işaretlenmiş kemik, beyin ve diğer benzeri dokuların oldukça kalın kesitleri, gelişmekte olan embriyolar gibi küçük organizmalar ve bütün haldeki hücre örnekleri ile çalışma imkanı sağlamaktadır. Bu teknoloji araştırmacılara ulaşılabilecek en yüksek ışık mikroskobu çözünürlüğü ile hücre altı yapılar, fonksiyonları ve hücre/organizma yapısının temiz bir şekilde görüntülenmesini sağlamaktadır.

Bu işlem tek veya çoklu işaretlenmiş örneklere uygulanmaktadır. Konfokal mikroskobun avantajı tek bir plandan gelen ışığı toplayabilmesidir. Objektifteki optiklerin optimal kullanımı için bir lazer ışını gönderilir. x-y yansıtma mekanizması ile bu ışın tarama ışınına çevrilir ve objektif lensi yardımıyla floresan işaretlenmiş örnek üzerindeki tek bir küçük noktaya odaklanır. Yansıtılan lazer ışını ve örnek tarafından yayılan floresan ışık karışımı

aynı objektif ile tutularak dikroik ayna ile bir fotodedektör üzerine odaklanır. Floresan işaretlenmiş örnek tarafından yayılan ışık fotomultiplier tüpe gönderilirken yansıtılan ışık dikroik ayna ile ayrıştırılır. Fotodedektör önünde bulunan konfokal açıklık örnek üzerindeki tek bir noktadan yayılan floresan ışığın toplanmasını sağlar. Bu şekilde odaklanan noktanın etrafından yayılan ışığın toplanması azaltılır. Bu özellikle kalın kesitlerle çalışırken önemlidir. Konfokal açıklığın ortasına odaklanan nokta konfokal spot olarak tanımlanır. Sonuç olarak taranan örnek yüksek çözünürlükte görüntülenir. Optik kesit alma xy düzleminde veya xz, yz dikey düzlemlerinde gerçekleştirilebilir. x ve y düzlemlerinin yanısıra z ekseninde tarama fokal planın yandan görüntülenmesi etkisini yaratır. Ayrıca gerçek 3 boyutlu veri setleri toplanabilir. Fokal düzlemlerden elde edilen optik kesit katmanları tekrar üst üste yapılandırılarak 3 boyutlu görüntü üretilir(110). Üçlü oluşumun (lipit/DNA/(Mg^{+2}) özelliklerini belirlemek amacıyla; Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarında, Zeiss LSM 510 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop ölçümleri, görüntü analizi, işlenmesi ve bu görüntülerin 3 boyutlu yapılandırabilmesi için gerekli yazılım paketi ile yapılmıştır.

LSM 510 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop sisteminde 3 lazer kaynağı bulunmaktadır. Lipozomlar konfokal görüntüleme amacıyla Nil kırmızısı (Nile Red) boyası ile boyanmıştır ve karanlık alan konfokal mikroskopi uygulanmıştır (110).

4.2.4.2. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin kontrast taramalı elektron mikroskopi (CTEM) ile incelenmesi

Geçirimli elektron mikroskobu malzemelerin mikroyapı ve kristal yapılarının belirlenmesinde eşzamanlı olarak görüntüleme ve kırınım tekniklerini kullanabilen bir malzeme karakterizasyon yöntemidir. Örneklerden birkaç nanometre boyutlu olanlardan bile hem morfolojik hem de kristalografik bilgilerin alınmasını olanaklı kılar. Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda, inorganik malzemelerin yüksek çözünürlüklü incelemeleri için Jeol 2100F 200kV RTEM cihazı, polimerik ve biyolojik malzemelerin incelemeleri için FEI 120kV CTEM cihazı kullanılmıştır.

Geçirimli elektron mikroskop görüntü oluşumu, saçılan bir elektron demetini, incelenecek örneğin ortasında, numune hazırlama yöntemleriyle oluşturulmuş bir deliğin etrafındaki ışın demetine geçirgen incelikteki bir alandan geçirmek suretiyle ya numunenin altından

doğrudan geçen ışınları, ya da malzemenin çeşitli düzlemlerinden Laue şartlarına uygun olarak kırınım yapanları inceleme esasına dayanır. Sırasıyla aydınlık alan ve karanlık alan görüntüleme olarak adlandırılan bu yöntemler ile numunelerde mikron altı boyutlu oluşumların incelenmesi, kristal hatalarının incelenmesi, farklı fazlar mevcut ise bu fazların mikroyapı ve kristal yapı belirlenmesi, ikinci faz parçaları ve ana faz arasındaki oryantasyon ilişkilerinin tespiti yapılabilmektedir (111).

Yüksek çözünürlüklü kafes görüntüleme (High resolution lattice imaging) milyon kat büyütme mertebelerinde atomik düzlemlerin izdüşümlerini görüntülemede kullanılan daha ileri bir inceleme tekniğidir. Yüksek Açılı Alansal Karanlık Alan detektörü kullanılan Taramalı-Geçirimli Elektron Mikroskop (STEM) modunda ise Taramalı-Geçirimli Elektron Mikroskop Aydınlık Alan (STEM BF) ve Yüksek Açılı Halkalı Alan Karanlık Alan (HAADF) görüntüleri elde edilebilir. Bu görüntülerin eldesinde büyütme lenslerindeki hatalardan etkilenmemiş, sadece tarama sargıları yardımıyla elde edilen ışın kullanılarak bir görüntü oluşturulduğundan daha iyi ayırma gücüne sahip görüntü eldesi mümkündür.

Klasik kırınım görüntüleri yanında, yüksek açılı hüzme kırınımı (CBED) ise malzemelerin kapsamlı kristalografik analizinde (nokta ve uzay guruplarının belirlenmesi) kullanılabilen bir başka kırınım tekniğidir. Modern elektron mikroskoplarda analitik karakterizasyon için vazgeçilmez donanımlar olan Enerji Saçılım Spektroskopisi (EDS) ve Elektron Enerji Kaybı Spektroskopisi (EELS) mevcuttur. Bu donanımlar elektron demetinin numuneyle etkileşimi sonunda açığa çıkan, sırasıyla, karakteristik X ışınlarını ve enerji kaybeden (inelastik) elektronların enerji kaybı dağılımlarını kullanarak element analizi amacıyla kullanılmaktadırlar. Enerji Filtrelemeli Görüntüleme (EFTEM) ise enerji kaybetmemiş (elastic) ve enerji kaybetmiş (inelastik) olarak saçılmış elektronlardan oluşmuş görüntülerdeki farklı saçılma unsurlarını birbirinden ayırarak görüntü kontrastının iyileşmesini sağlar. CTEM cihazı özel lens konfigürasyonu sayesinde düşük kontrast veren numunelerden maksimum kontrast elde etmek için dizayn edilmiştir. CTEM'in 20 kV ile 120 kV arasında değişen hızlandırıcı voltaj ile hızlı bir geçiş ile çalışabilmesi biyolojik ve polimerik örneklerde elektron demeti hasarını azaltmak için ideal bir özelliktir. Mikroskopta aydınlık alan, karanlık alan ve seçilmiş alan kırınım görüntülemesi yöntemleri kullanılabilmektedir. Ayrıca tomografi opsiyonu yardımıyla numuneden farklı

eğme (tilt) açılarıyla alınan görüntüler Xplore 3D programı ile birleştirilerek numunenin üç boyutlu görüntüleri elde edilebilmektedir.

TEM numune hazırlama yöntemleri metalik, toz, polimerik ve biyolojik örnekler için farklıdır. Metalik hacimli numune ilk etapta mekanik yöntemlerle 3 mm çapında 100 μm kalınlığında bir diske dönüştürülür ve ardından elektron geçirgenliğine uygun bir delik açılması için ya elektroparlatma ya da iyonla inceltme yöntemlerinden biri uygulanır. Toz örnekler ependorf içinde uygun sıvıda süspansiyona alınır ve homojen bir şeklide dağılana kadar ultrasonik banyoda tutulduktan sonra mikropipet ya da şırınga yardımıyla ızgara üzerine 5-10 μL damlatılıp kurutulur. Numune kabul kriterlerinde belirtilen uygun boyutlarda (minimum 5 mm kalınlıkta) getirilmiş hacimli polimerik örnekler ise ultramikrotomda elmas bıçak ile oda sıcaklığı ya da düşük sıcaklıklarda 100 nm kalınlığında kesitler alınarak incelenmektedir. Fiksasyon, dehidrasyon, gömme, kesit alma ve boyama gibi işlemlerden geçmiş biyolojik örneklerin ızgara üzerinde hazır getirildiği takdirde mikroskopik incelemeleri yapılmaktadır.

MLV ve ULV'lerin morfoloji ve boyut analizi 0.34 nm çözünürlükte ile 80 kV hızlandırıcı voltajla çalışan Tecnai G2 Ruh Biotwin cihazı (FEI, ABD) kullanılarak, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkez Laboratuvarında çalışılmıştır. İkili ve üçlü kompleksler halinde örnekler hazırlanarak (109) ölçümler alınmıştır. Gümüş nanopartikülleri CTEM ile çalışma sırasında eklenmiştir. Her örnek, 3 eşit parçaya bölünerek, ayrı ayrı, üç CTEM grid uygulanmıştır. Filtre kağıtları kullanarak, CTEM gridlerden örneklerin fazlası alınmıştır. Izgaralar görüntülemedan bir gece önce kurutulmaya bırakılmış (111), örnekler 1:10 hacimsel oranında damıtılmış su içinde seyreltilmiştir. Negatif boyama % 2, seyreltilmiş, arasında bir kısım (ağırlık/hacim) fosfotungistik damıtılmış su içinde asit (PTA) ve 60 saniye sonra, PTA fazlası başka bir filtre kağıdı kullanılarak uzaklaştırılmıştır.

4.2.5. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN BOYUT VE POTANSİYEL ANALİZİ

Lipit vesikülleri ve oluşturulan üçlü bileşenlerin boyut ve potansiyel olarak incelemeleri; dinamik ışık saçılımı (DLS) ve z-potansiyel analizi ile yapılmıştır.

4.2.5.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin dinamik ışık saçılımı (Dynamic Light Scattering, DLS) ile incelenmesi

Malzemelerdeki sağlamlık, kimyasal reaktiflik, opaklık, akışkanlık gibi özellikler ve malzeme mukavemeti, malzemelerin içindeki tane boyu karakteristiklerine bağlıdır. Küçük tanelerin boyutlarını ölçmek için Mie Teorisi kullanılır. Mie Teorisi ışığın ortam içerisinde tane boyu etrafındaki hem kırılmasını hem de geçirgenliğini dikkate alır. Mie modelini kullanabilmek için hem örneğin hem de ortamın kırılma İndislerinin bilinmesi gerekmektedir. ODTÜ, Merkez Laboratuvarında DLS ölçümleri Malvern Mastersizer 2000 ile yapılmıştır (112).

4.2.5.2. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin z-potansiyel analizi ile incelenmesi

Genozomların hücre içi geçişleri, taşıyıcı sistemlerin yüksek pozitif yükü ile hücre zarının negatif yükü arasında oluşan etkileşmelerden kaynaklanan özgün olmayan bir mekanizma olduğundan, katyonik taşıyıcı/plazmid DNA bileşiklerinin Z-potansiyel ölçümleri transfeksiyonlarda büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, *in vitro* ortamda bu bileşiklerin katyonik yükü, hedef olmayan başka hücrelerle ve negatif yük taşıyan diğer hücresel yapılarla etkileşmelerinin moleküler mekanizmalarını tayin etmektedir. Bu bağlamda, hedef hücrelerde *in vitro* ve *in vivo* koşullarda yüksek transfeksiyon etkinliklerinin elde edilmesi doğrultusunda, bu katyonik yüklerin optimize edilmesi gerekmektedir. Katyonik taşıyıcı/plazmid DNA bileşiklerinin parçacık boyutu bu tür ortamlarda hedef hücrelere yönelik iyileştirilmiş serum özelliklerine sahip gen aktarım sistemlerinin tasarlanmalarında büyük önem taşımaktadır (112). Özellikle, *in vivo* ortamda biyodağılım, gen ifadesinin düzenlenmesi ve toksisite olaylarını doğrudan etkilediğinden, parçacık boyutunun iyi kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu araştırmada, yeni geliştirilen nötral lipozom/Mg^{+2}/plazmid DNA üçlü gen aktarım sisteminin parçacık boyutu ve z-potansiyel parametrelerinin karakterizasyonları yapılmıştır.

4.2.6. NÜKLEİK ASİT-FOSFOLİPİT ARA YÜZEYLERİNİN LANGMUİR-BLODGETT FİLM YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ

Langmuir-Blodgett cihazı NIMA Technology Ltd (The Science Park, Coventry CV4 7EZ, İngiltere; Model 112D) ürünüdür. Söz konusu cihaz 40 cm^2 esas alanı, 2 elektromekanik olarak hareket ettirilen bariyer, yüzey basınç sensörü, inverted mikroskopisi için safir pencere sistemi, kepçe (dipper) mekanizması ve bilgisayara bağlı software versiyon 5.16 içermektedir. Tek katmanların yüzeysel temizliği kriteri olarak bariyer testi uygulayarak 3 ayrı tekrardan elde edilen izotermler arasındaki farkın ±0.1 mN/m'den daha fazla olmamasına dayanmaktadır. DNA ile zwitteriyonik lipittek katmanlar arasındaki ilk tanınma olaylarını açıklandığı üzere Langmuir-Blodgett tek katman yöntemiyle yapılmıştır (113).

Ara yüzey ölçümleri bigisayar kontrollü Langmuir film cihazı (Nima Technology, Coventry, İngiltere) ile yapılmıştır. Üzerine teflondan üretilmiş olan dikdörtgen kısım ve bariyerler monte edilerek izotermler çekilmiştir. Yüzey basınç (π) Wilhelmy yöntemi ile ölçülmüştür. Konteyner ultra saf su ile doldurulmuş ve üzerine önceden belirlenen derişimlerde sırasıyla fosfolipit ve nükleik asit çözeltileri istenilen oranlarda damlatılmıştır.

Tüm ölçümler 35°C kontrollü olarak gerçekleştirilmiştir. Tek katmanların yüzeysel temizliliği kriteri olarak bariyer testi uygulayarak 3 ayrı tekrardan elde edilen izotermler arasındaki farkın ±0.1 mN/m'den daha fazla olmamasına dayanmaktadır.

DPPC filmler 50 µl önceden hazırlanan orandaki lipit stok çözeltiden (1 mg/ml $CHCl_3$) hava/su arayüzeye (air/water interface) damlatılarak hazırlanmıştır. Kloroformun buharlaşmasından sonra (20 dk) lipit filmi yavaşça sıkıştırılmıştır ve şekildeki lateral basınç seviyesi elde edilmiştir. DNA bağlanma ölçümleri için, DNA dispersiyonu saf suda elde edilmiş olup, (1.50 mg/ml) 50 µl olarak lipit tek katman üzerine damlatılmıştır. Langmuir film cihazı ile DNA'nın afinitesinin belirlendiği ölçümler Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde yapılmıştır.

Langmuir-Blodgett ölçüm yönteminin esasları kısaca şöyle özetlenebilir. Monomoleküler katmanların (tek katman, monolayer) incelenmesi, biyolojik zarlarda yer alan bileşiklerin işlevleri hakkında çok önemli yapı-aktivite bilgilerini verdiği gibi, tek katman yüzeysel

basıncı, incelenmekte olan molekülün lipit tek katmanda işgal ettiği moleküler alanı, bu moleküler alanın yüzeysel basınç üzerindeki etkisi hakkında da bilgiler vermektedir. Bu düzenek böylece molekülün biyomembran yüzeyinde ve hacminde nasıl paketlendiği konusunda da bilgiler vermektedir. Bu yaklaşım, yeni farmakolojik formulasyon-biyomembran etkileşmelerinin yeni modellerinin de geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Membran ortamında başka maddelerle karışım içinde bulunan bileşiklerin karışımdaki tek tek özelliklerini, stereokimyasını ve etkileşme enerjilerini, suda çözünen bileşiklerin lipitlere karşı gösterdikleri afinitelerini de ortaya çıkarmak mümkündür. Tek katman yöntemi çok katmanlı oryante edilmiş (oriented multilayers) sistemlerinin ve içeriği ve topolojisi önceden belirlenen membran sistemlerinin oluşumunun temelini oluşturmaktadır. Tek katman yöntemini ayrıca daha pratik amaçlarla, örneğin ortam saflılığının tayininde ve kontrolünde, ekolojik uygulamalarda ve son yıllarda elektrokimyasal sensör ve biyosensör teknolojisinde mikroçiplerin orientasyonu ve toplaşımı için mikroelektronik sanayide de kullanılmaktadır.

Gaz-sıvı sınırında oluşan yüzeysel basınç veya pozitif serbest enerji yüzeyler arasında bu sınırın oluşturulmasının temelini teşkil etmektedir. Bu gibi yüzey sınırlarının yüzeysel basıncı γ; $\gamma=\Delta F/\Delta S$ olarak ifade edilir. Burada ΔF; serbest enerjinin değişimi, ΔS ise; yüzey alanının değişimidir. Yüzeyler arasında oluşan serbest enerjinin ortaya çıkmasını sıvı moleküllerinin hacimsel olarak (sub-phase) fazlar arasındaki sınıra taşınmaları için yapılan işe benzetilebilir. Bu taşınımın gereksinimi, subfazda belli bir molekül üzerinde diğer moleküller tarafından uygulanan ve etkili olan güçlerin kompanse edilmeleri, yüzeyler sınırında bulunan bir moleküle ise sadece ara faz tarafından çekim güçlerinin etkili olduğundan ortaya çıkmaktadır. Yüzeyler arasındaki kompanse olmayan güçlerin katmandaki derinlikleri su moleküllerin etkileşme özelliklerine göre tayin edilir. Çeşitli iyonların yokluğunda, söz konusu güçler Van der Waals etkileşme güçleridir ve bunların yoğunluğu moleküller arasında mesafenin yedi katı (x7) kadar orantısal olarak azalır. Böylece, kompanse edilmeyen etkileşmelerin alanı veya bölgesi birkaç molekül çapından fazla değildir.

Gibbs denklemine göre, faz ayrımındaki adsorpsyonu için yüzeysel dansite parametresi şu şekilde ifade edilir:

$$\Gamma=-[a/(RT)].(\delta\gamma/\delta a).$$

Burada Γ – maddenin yüzeysel dansitesi, a –subfazda maddenin aktivitesidir.

Eğer uygulanan madde yüzeyler arasında birikirse, o zaman δγ/δa negatiftir, çünkü örneğin lipitler için yüzey arasındaki adsorpsiyon ölçülebilen yüzeysel basıncın düşmesine neden olmaktadır. Bu durumda γ0-γ farkı (burada γ0-"saf" su yüzeyinde oluşan yüzeysel basınçtır; γ-örneğin lipit için yüzeyler arasında adsorbsyonundan sonra oluşan yüzeysel basınçtır) adsorbe edilmiş plakanın yüzeysel basıncı olarak tayin edilir. Faz sınırlarında oluşan tek katmanın yüzeyinde ortaya çıkan basıncın yüzeysel basınca eşit olduğu bir plaka olarak da düşünülebilir:

$$YB= \gamma Su-\gamma çözelti$$

Burada YB-yüzeysel basınç; γSu ve γçözelti – suyun ve çözeltinin yüzeysel gerilimleridir.

Yüzeysel gerilimin ölçümlerinde su veya sıvı çözeltilerinin yüzeyine dikdörtgen şeklinde küçük bir plaka temas ettirilmektedir. Bu plaka, organik çözeltilerin önceden belli bir muameleyle uzaklaştırıldığı platin malzemesinden üretilir. Ancak, bunun yanı sıra, cam ve diğer malzemeler de ölçüm amacına göre kullanılmaktadır. Faz ayrımının sınırında bu plakaya yüzeysel gerilim kuvvetleri etkilidir.

Bu kuvvetler sayesinde plakanın sıvı yüzeyine teması sağlanmaktadır ve bu kuvvetin şiddetini mekanik kuvveti elektrik sinyaline dönüştürebilen ve mekanotron adı verilen bir cihazla ölçülmektedir. Plakanın ölçülen kütlesi şu şekilde tayin edilir:

$$wtoplam = wplâka+\gamma.cos\theta p,$$

Burada γ-çözeltinin yüzeysel gerilimi; p-plakanın boyutu; wplaka – plakanın gerçek kütlesi.

Yüzeyler sınırında çok az miktarda maddenin uygulandığında, γ çözelti veya su subfazının yüzeysel gerilimine eşittir. Yüzeyler arası ayrımının alanının azaldığında, toplam düşmektedir.

Lipit tek katmanlarının izoterm eğrilerinde yüzey sınırında yer alan moleküllerin oriyentasyonlarındaki değişikliklerin göstergesi olan yapısal değişiklikleri de görmek mümkündür. Uzun hidrokarbon zincirin ucunda iki hidrofil grubu içeren moleküller için örneğin floresan işareti olarak yoğun kullanılan 16 (9-antroiloksi)-palmitik asidin durumunda olduğu gibi, bu lipit ile oluşturulan tek katmanın kondanze olmasıyla, ölçülen izoterm eğrisinin türevinin (slope, eğiminin) de değiştiği bilinmektedir. Söz konusu değişiklik, oluşan yüzey sınırında bu işaretin hidrofil gruplarından biri olan COOH grubunun yer değiştirmesi ve tüm molekülün tek katmandaki konformasyonunun hareketliliği ile açıklanmaktadır. Yüzey basıncın düşük olduğu durumlarda, bu molekül yüzey sınırında su ile en uçtaki COOH grubunun ve antranil döngüsüne komşu olan CO grubunun temas yapacak şekilde yerleşir. Bu yaklaşım, özellikle Langmuir-Blodgett tek katman ve floresan mikroskopik araştırmalarda yoğun olarak uygulanmaktadır.

Yukarıda yer verilen Langmuir-Blodgett yüzey basınç ölçümleri hücre zarı lipitlerini modelleyen dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) ile model nükleik asitler arasında oluşan 2 boyutlu kendi kendine toplaşımların (self-assembly) yapıların karakterizasyonu amacıyla uygulanmıştır. Söz konusu yüzey kimyasal yöntem bu tür biyolojik self-assembly oluşumların incelenmesinde kullanılan en iyi yaklaşımı teşkil etmektedir ve neticelerin yorumlanması çok iyi çalışan ve geçerliliği tartışılmaz olan fizikokimyasal teorilere dayanmaktadır. Bu ölçümlerimizde sırasıyla saf olarak ve ligandla bağlanmamış kontrol olarak kullanılan DPPC, dana timus DNA ve bunların aralarında oluşturdukları ikili (DPPC-DNA) ve Mg^{+2} tarafından oluşturulan üçlü (DPPC/DNA/Mg^{+2}) bileşiklerin yüzey kimyasal analizleri gerçekleştirilmiştir. Poisson-Boltzman ve Gibbs teorileri doğrultusunda negatif yüklü nükleik asitler önceden oluşturumuş DPPC lipit tek katmanları üzerine ve altına hidrofobik güçler tarafından yerleşmektedir. Söz konusu ikili oluşumların işgal ettiği alan 55 A^2/molekül başınadır. Söz konusu oluşumlarda elektrostatik güçlerin bir rolü yoktur. Ancak üçlü DPPC/DNA/Mg^{+2} yüzey yapılarının oluşturulmasında elektrostatik güçler rol oynamaktadır. Yük taşımayan DPPC molekülleri üzerinde hidrofobik güçlerce yerleştirilen negatif yüklü nükleik asitler Mg^{+2} katyonları sayesinde elektrostatik olarak da çok daha sabit üçlü sistemi oluşturmaktadır. Bu üçlü bileşiklerin işgal ettiği alan 75 A^2/molekül başına karşılık olan bir alan oluşturmaktadır. Sisteme kolesterolün etkisi de incelenmiştir. Doğal hayvan hücrelerinin biyolojik zarlarının bir parçası olarak bu tür incelemelerde kolesterolün katılması önemlidir. Kolesterol molekülünün elektrostatik yükü

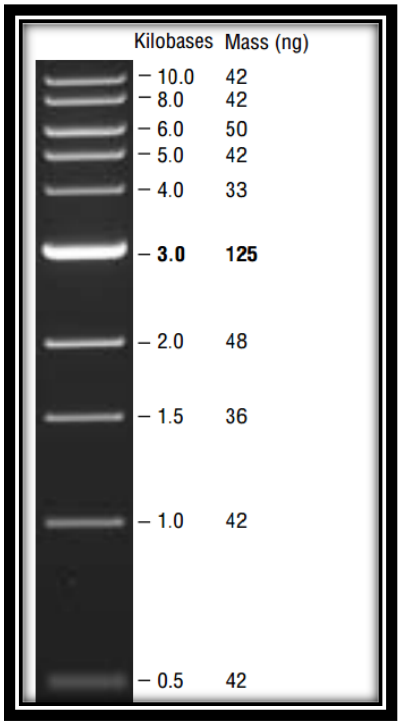
zwitteriyoniklere yaklaştığı için yükünden ziyade sahip olduğu hacmiyle sisteme etki etmektedir. Biyolojik zarlarının akışkanlığını düzenleyen bir belişen olarak ele alınan sisteme kolesterolün katıldığında çok hacimli bir molekül olarak üçlü sistemin işgal ettiği moleküler alan daha da artmaktadır. Bu ölçümler sayesinde ele alınan biyomakromoleküller arasında kendi kendine toplaşımların (self-assembly) oluştuğu gösterilmiştir. Wilhemy plate'e dayalı yüzey gerilim ölçüm sistemini kullanarak Langmuir-Blodgett düzeneği üzerinde bu üçlü oluşumların (lipit/DNA/Mg^{+2}) meydana getirilmesi gösterilmiştir.

4.2.7. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ

Lipit vesilüllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin bütünlüklerini göstermek amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. % 1'lik agarose/EtBr jel hazırlanmıştır. Örnekler, içerisinde 1X TBE bulunan elektroforez tankında (Scie-PlasHU10W) koşulmuştur. 1 kb DNA ladder kullanılmıştır. Yükleme tamamlandıktan sonra örnekler 75 V'da 45 dakika yürütülmüştür. Yürütülen örnekler, UV görüntüleme sistemi; Syngene Gene Genius Bio İmaging System'e aktarılmıştır. UV görüntüleme sisteminde GeneSnap 6.08.04 yazılımı ile UV ışık altında görüntülenerek elde edilen örneklerin %1'lik agaroz jel görüntüsü bütünlük açısından değerlendirilmiştir.

Agaroz jel elektorforezi yapmak için; 1X TBE buffer, 5X jel yükleme tamponu, agarose, ddH_20 kullanılır. 1 kb'dan küçük DNA fragmenleri için 1-2 % agarose/EtBr jel hazırlanırken, 1 kb'dan büyük (11 kb'a kadar) DNA fragmenleri için 0.8 -1% agarose/EtBr jel hazırlanmalıdır.

1000 baza kadar olan DNA fragmentlerinin moleküler ağırlığını belirlemek için Şekil 4.5'deki New England Biolabs (ABD) 1 kb DNA Ladder (NEB, Cat≠N3232S) moleküler ağırlık belirteci kullanılmıştır.



Şekil 4.5. 1 kb DNA molekül ağırlığı belirteci (114).

% 1'lik Agarose/EtBr Jel Hazırlanması

% 1'lik 30 ml'lik jel hazırlamak için 0,3 g agaroz (Sigma, A5093), hassas terazi (Shimadzu BX320H) ile tartılıp, erlene konulmuştur. 30 ml TBE 1X erlene eklenir. Hafifçe çalkalanıp, mikrodalga fırına (Vestel) konulmuştur. Buharlaşmayla kaybolacak sıvı seviyesini görmek amacıyla erlendeki sıvı seviyesi cam yazarla işaretlenmiştir. Mikrodalga fırın örnek kaynamaya başlayana kadar yüksek ayarda çalıştırılmıştır. Aralıklarla erlen mikrodalgadan çıkarılıp, çalkalanmıştır. Kaynama başladıktan sonra mikrodalganın ayarı düşürülmüştür. Tamamen eriyene kadar çalkalanarak ısıtılmıştır. Mikrodalgadan alınan erlenin içine su kaçmamasına dikkat edilerek, ısısı musluk suyu altında jelin donmamasına özen gösterilerek düşürülmüştür. Buharlaşmayı önlemek amacıyla mikrodalgadan çıkar çıkmaz EtBr eklenmemesine özen gösterilmiştir. 1µL EtBr, agaroz jel kabininin içinde ilave edilmiştir. EtBr eklendikten sonra çalkalayarak tüm çözeltiye dağılması sağlanmıştır. Çözelti, tepsiye (tray) yavaşça dökülüp, uygun tarak yerleştirilip ve polimerleşmesi için en az 15-30 dakika beklenmiştir (jelde kabarcık kalmamasına dikkat edilmiştir).

Hazırlanan %1'lik agaroz jel, içerisinde 1X TBE bulunan elektroforez tankına (Scie-PlasHU10W) yerleştirilmiştir. Jeldeki ilk kuyuya 1 kb DNA ladder yüklenmiştir. 5 µl

örnek, 1 µl 6X Loading Dye ile karıştırıldıktan sonra pipet yardımıyla jeldeki diğer kuyu(lara) yüklenmiştir. Jele yükleme yapılırken yüklemenin yapıldığı kuyularda hava kabarcığı olmamasına ve yüklenen boya-jel karışımının kuyulardan taşmamasına dikkat edilmiştir. Yükleme tamamlandıktan sonra örnekler 75 V'da 45 dakika yürütülmüştür ve görüntülenmek üzere UV görüntüleme sistemine (Syngene Gene Genius Bio İmaging System) aktarılmıştır.

UV görüntüleme sisteminde (Syngene Gene Genius Bio İmaging System) GeneSnap 6.08.04 yazılımı ile UV ışık altında görüntülenerek elde edilen örneklerin %1'lik agaroz jel görüntüsü bütünlük açısından değerlendirilmiştir.

Örneklerin Agaroz Jelde Yürütülmesi

Jel tanka yerleştirilip, tank jelin üstünü kapatacak kadar TBE 1X'le doldurulmuştur. Küçük bir parça parafilm alınıp, örneklerden 2'şer µL parafilm üstüne koyulmuştur. 5X yükleme tamponundan 1X olması için örnek başına 2 µL eklenmiştir. Toplam örneğin 10 µL olması için, 6 µL ddH_20 eklenmiştir. Karışım jele yüklenmiştir. Sonuçları karşılaştırmak amaçlı, jele bir de marker yüklenmiş, 75 V'da 45 dakika yürütülmüştür.

Agaroz Jelde Yürütülen Örneklerin Görüntülenmesi

Süre bitiminde jel alınıp, görüntüleme cihazı; Gene genius'un kapağı açılıp, jel yerleştirilmiştir. Görüşü sağlamak amacıyla upper white modu kullanılmıştır. Gerekirse zoom yapılmıştır. Kapak kapatılıp, transluminatöre tıklanıp, görüntü fotoğraflanmıştır.

4.2.8. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücre kültürlerinin, idame ettirilmesi için hücre hatları tripsinlenmiş, deneyler için uygun hücre yoğunluklarının belirlenmesi için hücre sayımı yapılmış ve daha sonraki çalışmalar için hücreler dondurulmuş, dondurulan hücreler çözülerek deneyler yapılmıştır.

Hücre hatlarının idamesi ve uygun hücre yoğunluklarının belirlenmesi

DSMZ (Leibniz Institude DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Culture)'den elde edilen insan embriyonik böbrek hücreleri (Hek293 kat:ACC305) ve insan meme kanseri hücreleri (MCF-7, kat:ACC115) ve serviks epitel kanseri hücreleri

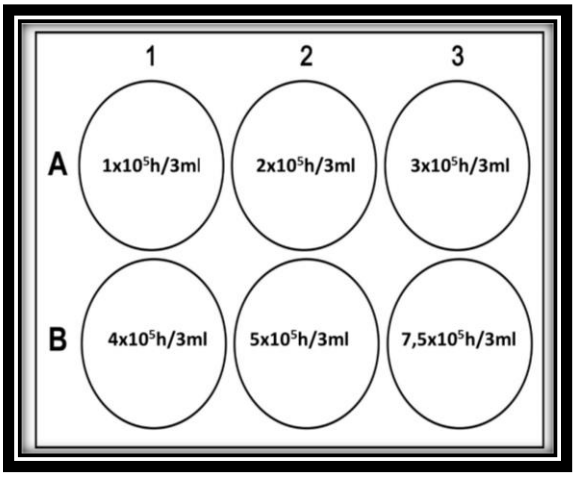
(He-La, kat:ACC57) %10 fetal bovin serum (invitrogen) içeren ve 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin eklenmiş Dolbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM, Hyclone SH30081.01) besiyerinde, gaz yoğunluğu %5 CO_2, sıcaklığı 37 ºC olan inkübatörde idame ettirilmiştir. Kullanılan hücre hatlarının özellikleri ek-6'da verilmiştir. Aşağıdaki Çizelge 4.2'de, hücre hatlarının idamesi için kullanılan besiyerleri hakkında bilgiler verilmiştir.

Çizelge 4.2. Hücre hatlarının idamesi için kullanılan besiyerleri

Hücre hattı	**Hücre adı**	**Kullanılan ortam numaraları**	**Ortam içeriği**
MCF-7	Meme kanseri	Hyclon, SH30081.01	DMEM +%10FBS +Penisilin/Streptomisin + 2mM L-Glutamin
He-La	Zenci serviks epiteloyit kanseri	Hyclon, SH30081.01	DMEM +%10FBS + %1NEAA + 2mM L-Glutamin
HEK293	İnsan emriyonik böbrek hücresi	Hyclon, SH30081.01	DMEM +%10FBS + 2mM L-Glutamin

Hücreler inkübatörden çıkarılıp, mikroskop altında kontrol edilmiştir. Su banyosu +37 °C'ye ısıtılıp, besi yerleri ve PBS +4°C' den çıkarılıp, su banyosuna devrilmeyecek şekilde yerleştirilmiştir. Su banyosunun sıcaklığının +37°C'ye kadar yükselmesi beklenmiştir. Laminar kabin, çalışılmak üzere hazırlanmıştır. Besi yerleri ve PBS su banyosundan çıkarılıp kuru bir kağıt havlunun üzerinde alkolle iyice silinmiştir. Kabin içerisine alınan şişelerin kapağında sarılı olan parafilm kabin içerisinde çıkarılıp, kapak tekrar alkolle silinmiştir. İnkübatörden çıkarılan hücreler kabin içerisine alınmıştır. Petriler hafif içe doğru eğimli olacak şekilde tutulup kapakları açılmıştır ve içerisindeki besi yeri petrinin çeperinden olacak şekilde aspire edilmiştir. 10ml PBS petrinin çeperinden eklenmiştir ve kapağı kapatıldıktan sonra petri nazikçe sallanmıştır. PBS aspire edilip ve böylece ölü hücreler ortamdan uzaklaştırılmış olmaktadır. Ölü hücrelerden arınmış olan 100ml'lik petri içerisine 10 ml besi yeri konulup, hücreler inkübatöre kaldırılmıştır.

Aşağıdaki Şekil 4.6'da görüldüğü gibi $6x10^5$h/3ml hücre yoğunluğu ile çalışılmaya karar verilmiştir.



Şekil 4.6. Hek293 ile 6 kuyulu plate'de çalışılacak hücre sayısının belirlenmesi

Aşağıdaki Çizelge 4.3'de, hücre hatlarının uzun ve kısa süreli testler için belirlenen hücre yoğunlukları hakkında bilgiler verilmiştir.

Çizelge 4.3. Hücre hatlarının uzun ve kısa süreli testler için belirlenen hücre yoğunlukları

Hücre hattı	Uzun süreli testler için belirlenen hücre yoğunluğu	Kısas üreli testler için belirlenen hücre yoğunluğu
MCF-7	1000h/200ul	1500h/200ul
He-La	500h/200ul	1500h/200ul
Hek293	750h/200ul	1500h/200ul

Meme kanseri MCF-7 ve serviks kanseri He-La hücre hattı yeterince yedeklenerek kaldırılmıştır. Çalışılacak uygun hücre yoğunluklarının belirlenmesi için 96 kuyulu petrilere her kuyuya 1500 hücre/200µl'den 100hücre/200 µl'ye kadar seyreltilerek ekim yapılmış, uzun ve kısa süreli testlerde kullanılacak hücre yoğunlukları belirlenmiştir.

4.2.8.1. Hücre hatlarının tripsinlenmesi ve sayımı

İnkübatörden çıkarılan hücrelerin besi yerleri aspire edilip, 10ml PBS ile yıkanmıştır. PBS aspire edilerek ölü hücreler uzaklaştırılmıştır. 1 ml tripsin-EDTA solusyonu petrinin her yerine gelecek şekilde ilave edilmiştir. Hücreler inkübatöre kaldırılıp, 1-2 dakika kadar beklenmiştir. İnkübatörden çıkarılan hücreler mikroskopta incelenmiştir. Kalkmış olan hücrelerde fazlaca agregatlar varsa petrilere nazikçe vurularak yapışan hücrelerin birbirlerinden ayrılması sağlanmıştır. Hücreler 10 ml besi yeri içerisinde falkon tüplere toplanmıştır. Soğutmalı santrifüjde +4ºC'de 1500 rpm de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Pelleti almamaya dikkat ederek süpernatant kısmı alınıp, hücrelerin üzerine 10 ml

tamamlayacak şekilde yeni besi yeri ilave edilmiştir. Thoma lamına yaklaşık 200-300 µl kadar karıştırılarak hücrelerden konularak sayım yapılmıştır. Thoma lamında sayım sonucu A x SF x 10.000 formülü ile hesaplanmıştır. Burada A = 16 büyük karede sayılan hücre adedi, SF ise seyreltme faktörüdür. 10.000 ise 0,1 mm^3' deki sayım sonucunu 1 ml' deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir (1 ml = 1 cc = 1 cm^3 = 10,000 X 0,1 mm^3). Hücre sayımında seyreltme (dilüsyon) besi yeri ile yapılmıştır. Ölü hücrelerin sayımında daha parlak görünenler ölü hücrelerdir. Bu sırada pasaj için petriler hazırlanmıştır. Petrilerin altlarına hücre tipi, pasaj numarası, besi yerlerinin adı, tarih ve deneyi kim yaptıysa o kişinin adı yazılmıştır. Petrilere yeni besi yerleri ilave edilmiştir. Hücreler birkaç defa pipetaj yapılarak (petri çeperine çarptırarak) tüm hücrelerin toplanması sağlanmıştır. Hücreler hazırlanmış olan petrilerin içerisine yayılıp, inkübatöre kaldırılmıştır.

4.2.8.2. Hücre hatlarının dondurulması

İnkübatörden çıkarılan hücrelerin besi yerleri aspire edilip, 10ml PBS ile yıkanır. PBS aspire edilerek ölü hücreler uzaklaştırılmıştır. 1-1,25ml tripsin petrinin her yerine gelecek şekilde ilave edilmiştir. Hücreler inkübatöre kaldırılıp, 2 dakika kadar beklenmiştir. Falcon tüpüne her petri başına 10 ml gelecek şekilde besi yeri konulmuştur. İnkübatörden çıkarılan tripsinlenmiş hücreler 10 ml besi yeriyle birkaç defa pipetaj yapılarak toplanmıştır. Toplanmış hücreler falcon tüpündeki besi yerine eklenmiştir. Falcon tüpü +4ºC'de 4000 rpm'de 5 dakika santirfüj edilmiştir. Bu sırada freezing buffer hazırlanmıştır. Falcon tüpü içerisine %70 besi yeri, %20 FBS (fetal bovin serum) ve %10 DMSO (dimetilsülfoksit) konulmuştur. Cryo tüplerin üzerlerine hücre adı pasaj numarası ve dondurulma tarihi ve kimin yaptığı yazılarak tüpler hazırlanmıştır. Hücreler 5 dakika sonra santirfüjden çıkarılmıştır. Santrifüj edilmiş hücreler tüpün dibinde çökmüş olarak (pellet) görülmüştür. Falcon tüpünün içerisindeki besi yerinin tamamı pellet oynamayacak, hücreler zarar görmeyecek şekilde nazikçe aspire edilmiştir. Daha önceden hazırlanmış olan freezing buffer dipte çökmüş olan hücrelerin üzerine eklenmiştir ve birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin besi yerinde iyice dağılmaları sağlanmıştır. Freezing buffer içerisindeki hücreler 1'er ml olacak şekilde cryo tüplere yerleştirilip ve tüplerin ağzı iyice kapatılmışır. Tüpler Mr frosty kabına konulup ve kabın ağzı iyice kapatılarak -80°C'ye

kaldırılmıştır. Böylece hücreler şoklanmadan kademeli olarak dondurulmuştur. Ertesi gün hücreler -80°C'den -196°C'lik ortama (azot tankına) kaldırılmıştır.

4.2.8.3. Dondurulmuş hücrelerin çözülmesi

-196°C'de cryo tüp içerisinde bekleyen hücreler azot tankından çıkarılıp, +37°C' ye kadar yükselen su banyosunun içerisinde hücreler çözülmüştür. 100 ml'lik petri içerisine hazırlanmış olan besi yeri kompleksi 10 ml olacak şekilde yayılmıştır. Çözülmüş olan hücreler besi yeri içerisine her yere gelecek şekilde yayılıp, petri inkübatöre kaldırılmıştır. Ertesi gün taze besi yeri eklenmiştir.

4.2.9. HÜCRE HATLARINDA LİPİT VESİKÜLLERİNİN (MLV VE ULV) MTT SİTOTOKSİSİTE TESTİ İLE ANALİZİ

Lipit vesikülleri (MLV ve ULV) uygulandıktan sonra MTT (3 - [4,5 - dimetiltiazol-2-il] - 2,5-difenil tetrazolyum bromür) kit ile canlı hücre yoğunluğu belirlenmiştir. Lipoplekslerin IC_{50} (Half Maximal Inhibitory Concentration) değerleri hesaplanmıştır. IC_{50} *in vitro*'da etkisi araştılan madde ya da sistemin %50 inhibisyon etkisi için gereken konsantrasyonudur. Deneyin esası; MTT testi ile formazan oluşumuna bağlı olarak hücre yaşayabilirliğinin ölçülmesidir. MTT, sarı renkli olup, hücrelere aktif olarak absorbe olur ve mitokondriyal redüktaz enzimi ile suda çözünmeyen mor renkli formazana indirgenir. Oluşan bu renkli çözeltinin miktarı 500-600 nm dalga boylarında ölçüm yapılarak hesaplanmıştır. Bu olay sadece canlı hücrelerde gerçekleşebildiği için bu test, hücre canlılığının ölçütü olarak alınmıştır. MTT kit, canlı hücrelerdeki mitokondriyal aktivite fonksiyonunu spektrofotometrik olarak ölçerek, canlı hücre sayısını belirlemek için tasarlanmıştır. Genel olarak, toksik etkisi bilinmeyen bileşiklerin, toksik etkilerinin *in vitro* belirlenmesi, bir boya ile boyandıktan sonra canlı kalan hücrelerin sayılmasıyla gerçekleştirilmiştir. MTT sistemi, mitokondriyal dehidrojenaz ile canlı hücre aktivitesini ölçmek için bir araçtır. 96 kuyulu petri(ler) da, her kuyuda 100 µl'de $6x10^3$ hücre (MCF7) olacak şekilde ekim yapılmıştır. Petri(ler) 37°C, %5 CO_2 olan inkübatöre kaldırılmıştır. 96 kuyulu petrilere hücre ekiminden 24 saat sonra, laminar kabine alınıp, toksik etkisini araştıracağımız madde(ler) ilave edilmiştir. Kültürlerin bulunduğu petri(ler) tekrar CO_2 inkübatörüne kaldırılmıştır. 48 saat sonra, MTT bazlı *in vitro* sitotoksisite testi uygulanmaya başlanmıştır. Kit içerisindeki 15 mg'lık MTT[M5655] şişesi içerisindeki

madde, 3 ml dengeli tuz çözeltisi, PBS (Phosphate Buffered Saline) ile kendi şişesinde çözülür (çözüldüğünde, sarımsı bir rengi olmalıdır). Laminar kabin içerisine, hücre kültürlerinin bulunduğu 96 kuyulu petri(ler) çıkarılmıştır. Her bir kuyu için kültür ortamı hacminin %10'u olacak şekilde 10'ar µl PBS'le hazırlanıp MTT[M5655] eklenmiştir. 96 kuyulu petri(ler)daki kültürler, hücrelerin tipi ve boyutlarına bağlı olarak 2-4 saat boyunca CO_2 inkübatörü içerisinde bekletilmiştir (Daha önce yaptığım *in vitro* sitotoksisite testinde (SRB), 4 saat inkübe edilmiştir). 2 saatlik inkübasyon süresi genellikle yeterlidir ancak hücre tipi, yoğunluğu ve durumuna göre uzatılmıştır. Karşılaştırma yapılacağından inkübatörde tutulan kuluçka sürelerinin aynı (tutarlı) olması önemlidir. 4 saatlik kuluçka süresinden sonra kuyulardaki besi yerleri aspire edilmiştir. 96 kuyulu petri(ler)daki her kuyucuğa özgün hacimlerine eşit miktarda (100 µl kadar) MTT çözündürme solüsyonu [M-8910] ilave edilmiştir. Bu solüsyon eklendiğinde formazan kristalleri (sulu çözeltiler içinde çözünmez olan mor formazan kristalleri) meydana gelmiştir. Bir döner çalkalayıcı üzerine 96 kuyulu petrileri yerleştirerek nazik karıştırma ile çözünme arttırılabilir. Bazen, özellikle de yoğun kültürlerde, nazikçe yukarı ve aşağı pipetleme tamamen MTT formazan kristalleri eritmek için gerekli olabilir.

Çok kuyulu petriler için 690 nm dalgaboyunda arka plan ölçümü yapılmıştır. Spektrofotometrik olarak 570 nm dalgaboyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Deneyler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

4.2.10. HÜCRELERİN TRANSFEKSİYONU

Escherichia coli K12 DH5α Hücrelerinin pCMV.GFP İle Transforme Edilmesi

Transfeksiyon öncesi, kompetan *E.coli, DH5α bakterisine pCMV.GFP* bakteri plasmidi transforme edilip, kültür hazırlanmıştır. Büyük miktarda bakteri kültüründen Endofree QIAfilter Plazmid Maxi kit (Qiagen) ile plazmid DNA'sı izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra pCMV.GFP DH5alpha Plazmid DNA'sının miktar tayini yapılmıştır.

Kompetan E.coli'ye Plazmid DNA İle Transformasyonu

400 ml LB Agar mikrodalga fırında çözdürülüp (Yaklaşık 15 dk), su banyosu 42°C'ye ayarlanmıştır. Mikrobiyoloji odasındaki bench ve kullanılacak malzemeler alkolle silinip temizlenmiştir. Klima kapatılıp, ateş yakılmıştır.

Petri kapları ateş başında açılmıştır. Antibiyotik eklenmeyecek olan 5 adet Petri kabının yanları kalem ile işaretlenmiştir. Easypete 25 ml'lik serolojik pipet takılıp, işaretlediğimiz her bir petri kabına 20'şer ml LB Agar dökülmüştür. Kalan 300 ml LB Agar'a 300 µl Ampisilin eklenip ve köpürtülmeden çalkalanmıştır. Easypet'e yeni 25 ml'lik serolojik pipet takılıp, 12 Petri kabına 20'şer ml LB Agar dökülüp, petriler donmaya bırakılmıştır. Ateş söndürülüp ve klima açılmıştır.

Donmuş olan petrilerden daha sonra kullanılacak olanlar parafilmlenmiştir ve +4 ºC ye kaldırılmıştır. Plazmid DNA'sı -20 °C den, süper kompetan hücreler de -80 °C den çıkarılmıştır. Liyofilize olarak gelen plazmid DNA'sına 20 µl ampül su eklenip, pipetlenip, buza konulmuştur. Super kompetan hücrelerden 50 µl alınıp ve 20-20-10 µl olmak üzere üç eppendorfa bölünmüştür. Hücreler spin-down edilmiştir. 1 µl sulandırılmış plazmid 20'şer µl süper kompetan hücre bulunan eppendorflara eklenmiştir (Plazmid konstrasyonu 1 µg/1 µl olmalıdır, kalan Plazmid DNA -20 °C de saklanmalıdır). Eppendorf yavaşça parmakla vurularak karışıtırılmıştır (pipetleme işlemi yapılmamıştır). Eppendorflar 30 dk buz üstünde inkübasyona bırakılmıştır. Tam olarak 30 sn süreyle 42 °C de su banyosuna bırakılmıştır. Karıştırılmamaya özen gösterilmiştir. 30 sn sonunda eppendorflar 42 °C den alınır ve buz üstüne konulmuştur.

Eppondorflara oda sıcaklığında bulunan SOC medium'dan 200 µl eklenmiştir (SOC medium zengin besiyeri olduğu için kontamisyon riskine çok dikkat edilmelidir). Eppendorflar 37 °C, 225 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır (hücreler 1 saatte iki defa bölündükleri için hem plazmid kaybı olmaz hem de bu sürede tüm hücreler plazmid ile transforme olur). Çalkalamalı inkübatörde 1 saat boyunca inkübasyona bırakılan eppendorflar alınıp, petri kaplarına hücre adı, plazmid adı, kişi adı ve tarih yazılmıştır.

Negatif kontrol için plazmid içermeyen hücreler antibiyotik olan, pozitif kontrol için aynı hücreler antibiyotik olmayan petrilere ekilmiştir. Diğer plazmid içeren hücreler antibiyotik içeren besi yerlerine ekilmiştir. Ekim Drigalski adlı cam baget ile yayma yoluyla yapılmıştır. Ateş kapatılıp, petri kapları ters olarak gece boyu 37 °C de inkübasyona bırakılmıştır.

Büyük miktarda bakteri kültüründen Endofree QIAfilter Plazmid Maxi kit (Qiagen) ile plazmid DNA'sı izolasyonu

P1'e RNaz eklenmiş olup olmadığı kontrol edilir. Eklenmemişse RNase A solusyonu Buffer P1 e eklenmiştir. RNase A kullanılmadan önce spin yapılmıştır. Her P1 şişesi için bir vial Rnase A kullanılıp ve son konsantrasyon 100 µg/ml olarak ayarlanmıştır. Buffer P2'de düşük sıcaklıklara bağlı olarak SDS çökeltisi olup olmadığı kontrol edilmiştir. Eğer gerekiyorsa SDS 37°C de bir süre bekletilerek çözdürülmüştür. Buffer P3'e +4°C de ön soğutma uygulanmıştır. Buza konulup, isteğe bağlı olarak; Buffer P1 e LyseBlue reaktifi eklenip ve kullanılmadan önce karıştırılmıştır. Lyse Blue kullanılmadan önce spin edilmiştir. Her bir P1 şişesi için bir vial LyseBlue kullanılmışır böylece 1:1000 dilüsyon sağlanmıştır. Lyseblue etkili bir lizis için iyi bir identifikasyon sağlamaktadır.

Yapılışı; bakteriler 6000g x de 15 dk 4°C de santrifüj edilerek toplanmıştır. Süpernatant erlenmayere alınıp, 50 ml falkonları havlu peçeteye ters çevirilmiştir. LB uzaklaştırılmıştır. Not: Laboratuvarımızda bitki grubuna ait olan Beckman Coulter Allegra X-15R Centrifuge Marka soğutmalı santrifüj kullanılmıştır. Maximumda 5000 g santrifüjleme yapılabilmektedir. Not: Eğer bu noktada protokole devam edilmeyecekse hücreler –20°C de dondurulup saklanabilmektedir. Daha sonra yine bu basamaktan itibaren protokole devam edilebilir.

Buffer P1'den 10 mL çekilir ve 100 ml lik kültüre eklenmiştir. Pellet iyice dağılana kadar vortexlenip veya pipetaj yapılmıştır. İstenirse 100 mL kültür 50 mL'lik 2 falcon tüpüne paylaştırılabilir. Suş değiştikçe pipet değiştirilmiştir. 10 ml Buffer P2 eklenip, 4-6 kez tüp ters düz edilerek iyice karıştırılıp ve oda ısısında (15–25°C) 5 dk inkübe edilmiştir. (Bu aşamada bakteriler patlamaktadır). Not: Bu aşamada vortexleme yapılmaz; çünkü genomik DNA parçalanabilir. Bu adımda lizat viskoz olmalıdır. İnkübasyon 5 dk dan uzun tutulmamıştır. Kullanımdan sonra Buffer P2'nin CO_2 kaynaklı asidifikasyondan etkilenmemesi için derhal kapağı kapatılmıştır. Buffer P2 eklenince Buffer P1'deki LyseBlue den dolayı hücre süspansiyonu maviye dönmüştür. Karıştırma, homojen renkli karışımı sağlamıştır.

İnkübasyon sırasında QIAfilter Cartridge hazırlanır. 10 ml soğutulmuş Buffer P3 lizata eklenip ve 4-6 kez tüp ters düz edilerek iyice karıştırılmıştır. Not: Bu aşamada presipitasyon artmıştır. Buffer P3 eklendikten sonra hücre süspansiyonu beyaz renk alıp, daha az viskoz hale gelmiştir. Viskozite azalana kadar iyice karıştırılmıştır. Presipite

materyal genomik DNA, proteinler, hücre debrisi ve KDS içermektedir. Lizat silindir QIAfilter Cartridge'e dökülmüştür. Oda ısısında 10 dk inkübe edilmiştir. Plunger takılmamıştır (Bu 10 dk sürecinde proteinler, genomik DNA, deterjan içeren çöküntü solusyonun üstüne çıkıp ve tabaka oluşturmuştur). 10 ml Buffer QBT eklenip, QIAGEN-tip 500'ü dengelenip, yerçekimiyle kolonun boşalması beklenmiştir (damlaması kesilene kadar beklenmiştir). Not: Enjektörler 250 mL'lik erlenlere yerleştirilip ve her bir enjentöre 10 mL Buffer QBT eklenmiştir. (= Equilibrium Buffer) Kolonu ıslatıp ve dengelemiştir.

QIAfilter Cartridge'ın altaki kapağı yavaşça çıkarılıp, şırınga yavaşça daldırılarak lizat daha önceden dengelenmiş QIAGEN-tip'e filtre edilmiştir. Lizat yer çekiminin etkisiyle akmıştır. QIAGEN-tip 30 ml Buffer QC ile 2 kez yıkanmıştır. (30 ml Buffer QC eklenip akması bitince tekrar 30 ml Buffer QC eklenmiştir). Not: İlk Yıkama ile kontaminantlar uzaklaştırılmıştır. İkinci yıkama ise özellikle büyük kültür hacimlerinde veya bakteri zincirlerinde çok fazla karbonhidrat üretiliyorsa etkili olacaktır. Kolonlar 50 ml lik falkona yerleştirilip, 15 ml Buffer QF eklenmiştir. Bu aşamadan önce ependorf tüpler hazırlanıp (1,5 ml). DNA 10.5 ml (0.7 volumes) oda ısında isopropanol ile presipite edilmiştir. 2-3 kez ters düz edilerek karıştırılıp, hazırlanan ependorflara 1,5 ml olarak bölünmüştür. Ependorf tüpleri ≥15000xg (17000 rpm) de 30 dk 4°C de santrifüj edilmiştir. Süpernatant pipetle dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Pellet çok kaygan olduğu için dikkat edilmelidir. DNA pellet 5 ml oda ısısındaki %70 ethanol ile yıkanmıştır. 1-1.5ml ethanol eklenip, ≥15,000 x g (17000 rpm) 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant pellete dokunulmadan pipetle dikkatlice uzaklaştırılmıştır. İkinci 1ml yıkamada aynı olan örnekler yıkanarak birbirine aktarılıp ve tek eppendorf tüpünde toplanmıştır. Yine ≥15,000 x g (17000 rpm) 10 dk 4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant pellete dokunulmadan pipetle dikkatlice uzaklaştırılmışır. Kalan alkolü almak için spin yapılır ve kalan alkol ince uçlu pipet ucu ile alınmıştır. Not: %70'lik alkol presipite tuzları uzaklaştırır ve izopropanolun yerini alarak DNA yı daha kolay çözülür hale getirmiştir. Pellet 5–10 dk kurutulup, pellete uygun olabilecek miktarda enjeksiyonluk su veya TE ile çözülmüştür. Eppendorf tüpleri pelletin çözünmesi için ağzı parafilmlenerek rack ile beraber +4ºC'de 1 gün bekletilmiştir.

pCMV.GFP DH5alpha Plazmid DNA'sının Spektrofotometrik Analizi ve Miktar Tayini

Bakteri kültüründen Endofree QIAfilter Plazmid maxi kit (Qiagen) ile izole edilen PCMV.GFP DH5α Plazmid DNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000) aracılığı ile gerçekleştirilmiştir.

PCMV.GFP DH5α Plazmid DNA miktar sonucu ng/µl şeklinde elde edilmiştir. DNA 260 nm dalga boyunda, protein 280 nm dalga boyunda, fenol ve diğer bileşikler ise 230 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. Bu doğrultuda PCMV.GFP DH5α Plazmid DNA'sının saflığı değerlendirilirken A260/280 ve A230/280 oranları dikkate alınmıştır. PCMV.GFP DH5α Plazmid DNA için 260/280 oranının~1,8 olması gerekmektedir. A260/ A230 oranının ise 1,8-2,2 aralığında olması beklenmektedir.

Agaroz Jel Elektroforezi için pCMV.GFP DH5α Plazmid DNA Konsantrasyonun Ayarlanması

Agaroz jel elektroforezi için kullanılacak, konsantrasyonları belirlenen PCMV.GFP DH5α Plazmid DNA örnekleri 0,5 µg/µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

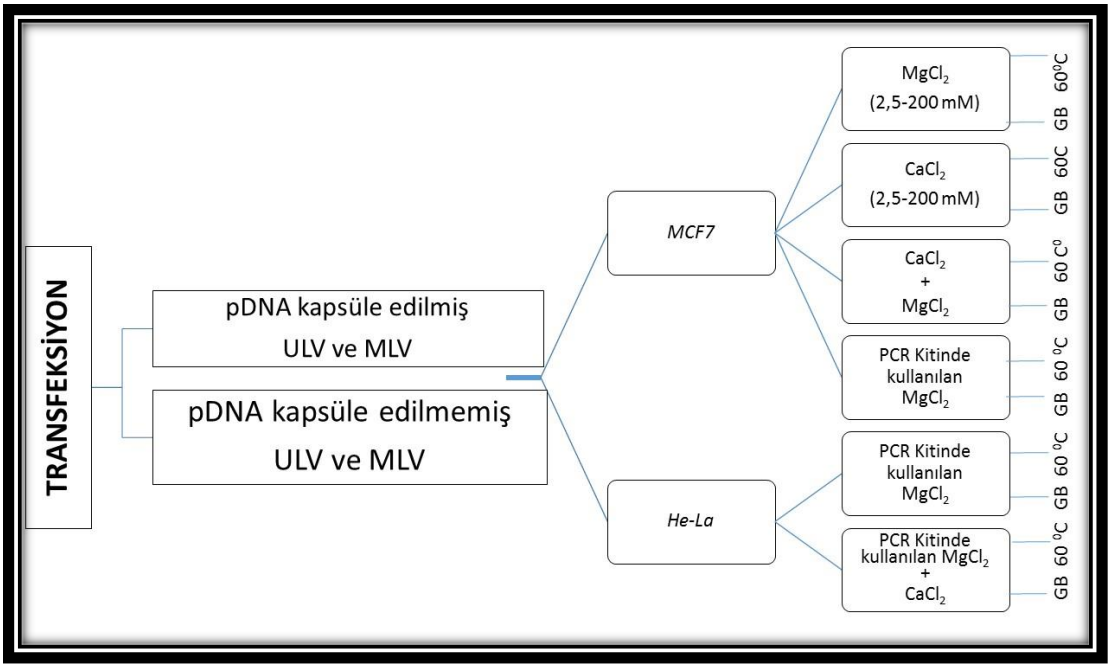
4.2.10.1. Transfekte edilecek lipit vesiküllerinin (ULV ve MLV) hazırlanması

Hücrelere transfekte edilecek olan ULV, MLV, DNA kokteylleri Çizelge 4.4'de belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Mg^{+2} ve Ca^{+2} 2,5-200 mM konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Plazmid DNA'sı 2 µg kullanılmıştır. Kokteyllerin hazırlanmasında 2 farklı kondisyon gerçekleştirilmiştir. Taloda belirtilen kondisyonlar; +4 ºC'de gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücrelere transfekte edilmek için hazır hale gelmiştir. Bir de 30 dakika boyunca 60 ºC'de inkübe edilerek hücrelere uygulanmıştır.

Çizelge 4.4. Transfekte edilecek lipit vesiküllerinin (ULV ve MLV) hazırlanması

TRANSFER EDİLECEK LİPİT VEZİKÜLLERİNİN (ULV) ve MLV) HAZIRLANMASI						
Lipit vezikülü	Kullanılan DRNA	Deney düzeneğinde kullanılan iyonlar	Deney düzeneğinde kullanılan derişim	Karışımın gece boyu inkübasyonu	Karışımın 60 ^{0}C ve 30 dakikada inkübasyonu	DNA'nın lipit veziküline kapsulasyon durumu
ULV	Plazmid DNA (2µg)	Mg^{+2}	2,5-200 mM	+	+	-
ULV	Plazmid DNA (2µg)	Ca^{+2}	2,5-200 mM	+	+	-
ULV	Plazmid DNA (2µg)	Mg^{+2} + Ca^{+2}	Mg^{+2} (2,5-200 mM) + Ca^{+2} (5 mM)	+	+	-
MLV	Plazmid DNA (2µg)	Mg^{+2}	2,5-200 mM	+	+	-
MLV	Plazmid DNA (2µg)	Ca^{+2}	2,5-200 mM	+	+	-
MLV	Plazmid DNA (2µg)	Mg^{+2} + Ca^{+2}	Mg^{+2} (2,5-200 mM) + Ca^{+2} (5 mM)	+	+	-

Hücrelere transfekte edilecek olan ULV, MLV, DNA kokteylleri ile yapılan deneylerin şeması aşağıdaki Şekil 4.7'deki gibidir.



Şekil 4.7. Transfekte edilecek lipit vesikülleri (ULV ve MLV) ile yapılan deneyler

DOTAP lipozomal transfeksiyon ajanı kullanarak HEK-293 hücrelerinin pCMV.GFP plazmidi ile transfeksiyonu

Hücrelere transfekte edilecek olan ULV, MLV, DNA kokteylerinin kontrol grubu olarak DOTAP lipozomal transfeksiyon ajanı kullanılmıştır. Transfeksiyondan bir gün önce (16-22 saat), HEK-293 hücreleri tripsinlenir, sayılır ve uygun sayıda ekilir. (6-well plate için, $6x10^5$ HEK-293/kuyu/3 ml medium) HBS hazırlanır. TE içindeki plazmid DNA'sı buz üzerinde eritilir, buz üzerine konur. HBS oda ısısında olmalıdır.

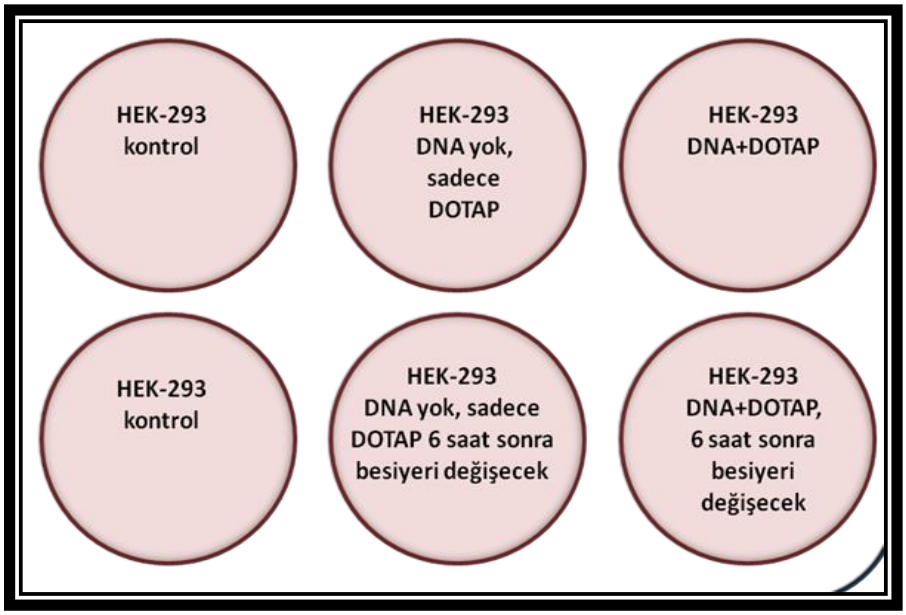
HBS hazırlanması (HEPES-buffered saline: 20 mM HEPES cell culture grade, 150 mM NaCl, pH 7.4)

876 mg NaCl, 90 ml otoklavlanmış çift distile su içinde çözülür, üzerine 2 ml 1 M HEPES(Lonza, 17-737E) eklenir, pH'sı 7.4 e ayarlanır. Filtreden geçirilir. Eğer pH'sı 7.35-7.45 civarında çıkarsa, tekrar hazırlanır, pHmetre elektrodu konmamış olur. Filtreden geçirilir. Tartım ve pH ayarlanması hariç tüm basamaklar laminar kabin altında yapılır. Solüsyon kullanılmadığı zaman $+4^oC$'da, kullanılacağı zaman da 2 saat önce oda ısısına çıkarılır.

Çizelge 4.5'te gösterildiği gibi eppendorf tüpü içinde 2.5 µg plazmid DNA'sı 25 µl HBS içinde seyreltilir (tüp A), plazmid DNA'sı 0.1 µg DNA/µl son konsantrasyonuna getirilmiş olur. 1.65 mg/ml pCMV.GFP plazmid stoğu kullanılmıştır. Başka bir eppendorf tüpünde 35 µl HBS üzerine 15 µl DOTAP eklenir (tüp B). Tüp A içeriği tüp B içine son derece nazik biçimde defalarca iyice pipetlenir, kesinlikle vorteks santrifüj kullanılmaz, tüp çeperine bırakılmaz. 15 dakika oda ısısında oynatmadan inkübe edilir (laminar kabin içinde). bulanıklaşma olursa önemli değildir, transfeksiyon verimini etkilemez. Şekil 4.8'de gösterildiği gibi, bir gün önce ekilen hücreler inkübatörden çıkarılır, besiyeri aspire edilir, PBS ile yıkanır, aspire edilir ve hücrelerin üzerine 2 ml normal besiyeri eklenir. 15 dakika inkübasyon sonrası eppendorf tüp içindeki transfeksiyon karışımı hücrelerin üzerine damla damla eklenir, ardından 15 saniye dairesel olarak yavaşça karıştırılır, inkübatöre konur. 6 saat sonra tablodaki kuyuların besiyeri aspire edilir, yerine taze besiyeri eklenir. 24-48-72. saatlerde GFP sinyali, ölü hücre miktarı bakımından değerlendirilir.

Çizelge 4.5. DOTAP lipozomal transfeksiyon ajanı kullanarak HEK-293 hücrelerinin pCMV.GFP plazmidi ile transfeksiyonu

ÖRNEK ADI	TÜP A	TÜP B	İNKÜBASYON SÜRESİ
HEK-293 kontrol			Değişime gerek yok, 24-48-72. saatlerde analiz
HEK-293-DNA+DOTAP	35 µl HBS	35 µl HBS+15 µl DOTAP	Değişime gerek yok, 24-48-72. saatlerde analiz
HEK-293-DNA+DOTAP	23,5 µl HBS + 1,5 ul p DNA	35 µl HBS+15 µl DOTAP	Değişime gerek yok, 24-48-72. saatlerde analiz
HEK-293-DNA+DOTAP	35 µl HBS	35 µl HBS+15 µl DOTAP	6. saat sonu besiyeri aspire edilir, besiyeri ile yıkanır, üzerine dotapsız DNAsız normal besiyeri eklenir, inkübe edilir.24-48-72. saatlerde analiz
HEK-293-DNA+DOTAP	23,5 µl HBS + 1,5 ul p DNA	35 µl HBS+15 µl DOTAP	6. saat sonu besiyeri aspire edilir, besiyeri ile yıkanır, üzerine dotapsız DNAsız normal besiyeri eklenir, inkübe edilir.24-48-72. saatlerde analiz



Şekil 4.8. DOTAP lipozomal transfeksiyon ajanı kullanarak HEK-293 hücrelerinin pCMV.GFP plazmidi ile transfeksiyonu

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

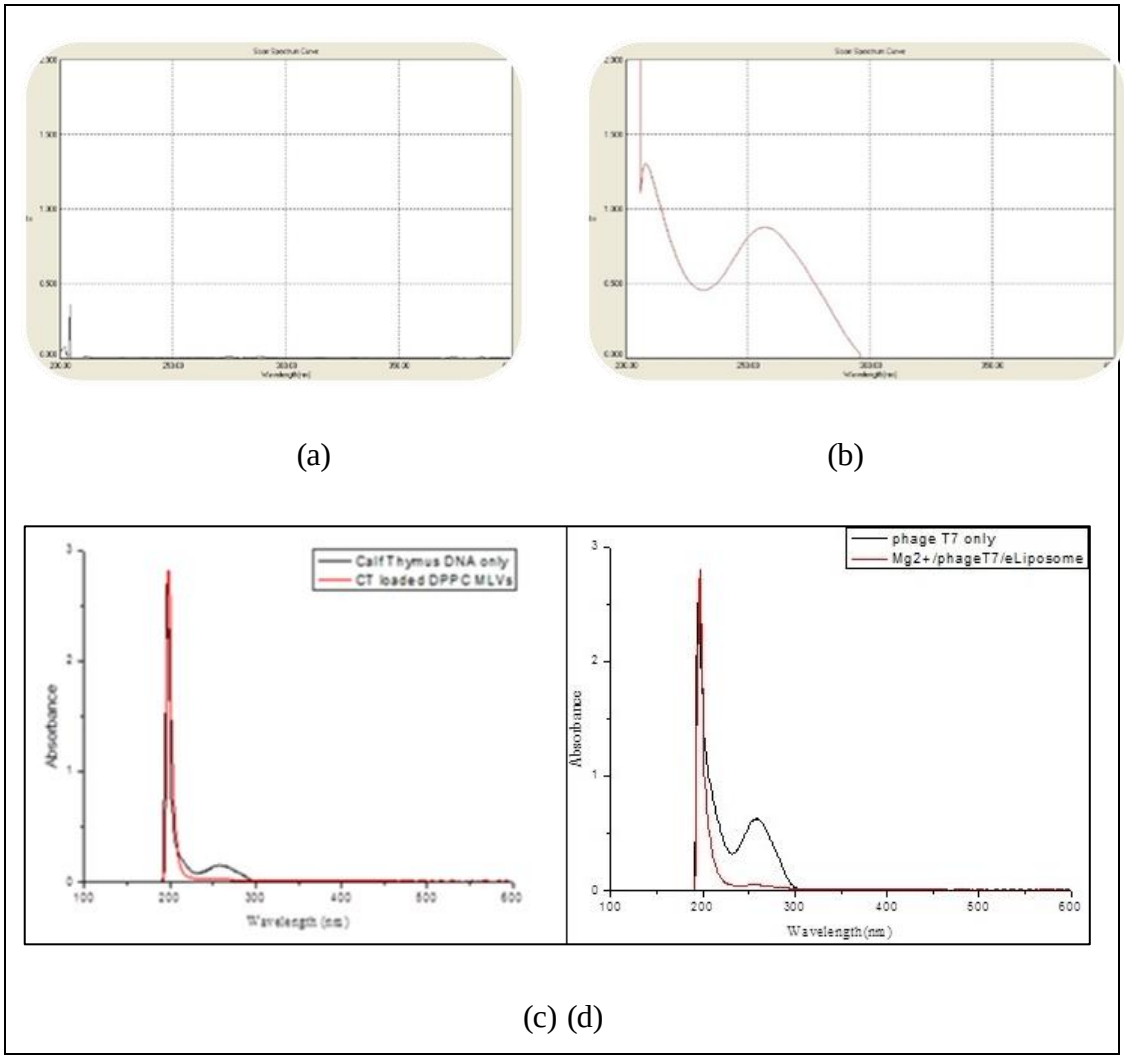
Lipit vesikülleri ve oluştururan ikili ve ülçü oluşumların spektroskopik, termodinamik, mikroskobik, boyut-potansiyel ve transfeksiyon özellikleri ile ilgili ölçümler yapılıp, sonuçlar yorumlanmıştır.

5.1. LİPİT VESİKÜLLERİNİN SPEKTROSKOPİK KARAKTERİZASYONU SONUÇLARI

Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin spektroskopik karakterizasyonu UV/Visible, Dairesel dikroizm (CD), floresan, FT-IR, Sers-Raman spektroskopik ölçümleri ile araştırılmıştır. UV/Visible, floresan ve FT-IR spektroskopileri ile ölçüm sonuçları aşağıda verilmiştir. Dairesel dikroizm (CD), Sers-Raman spektroskopik ölçümleri sırasıyla ek-1 ve ek-2'de verilmiştir.

5.1.1. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN UV/VISIBLE SPEKTROSKOPİSİ İLE İNCELENMESİ SONUÇLARI

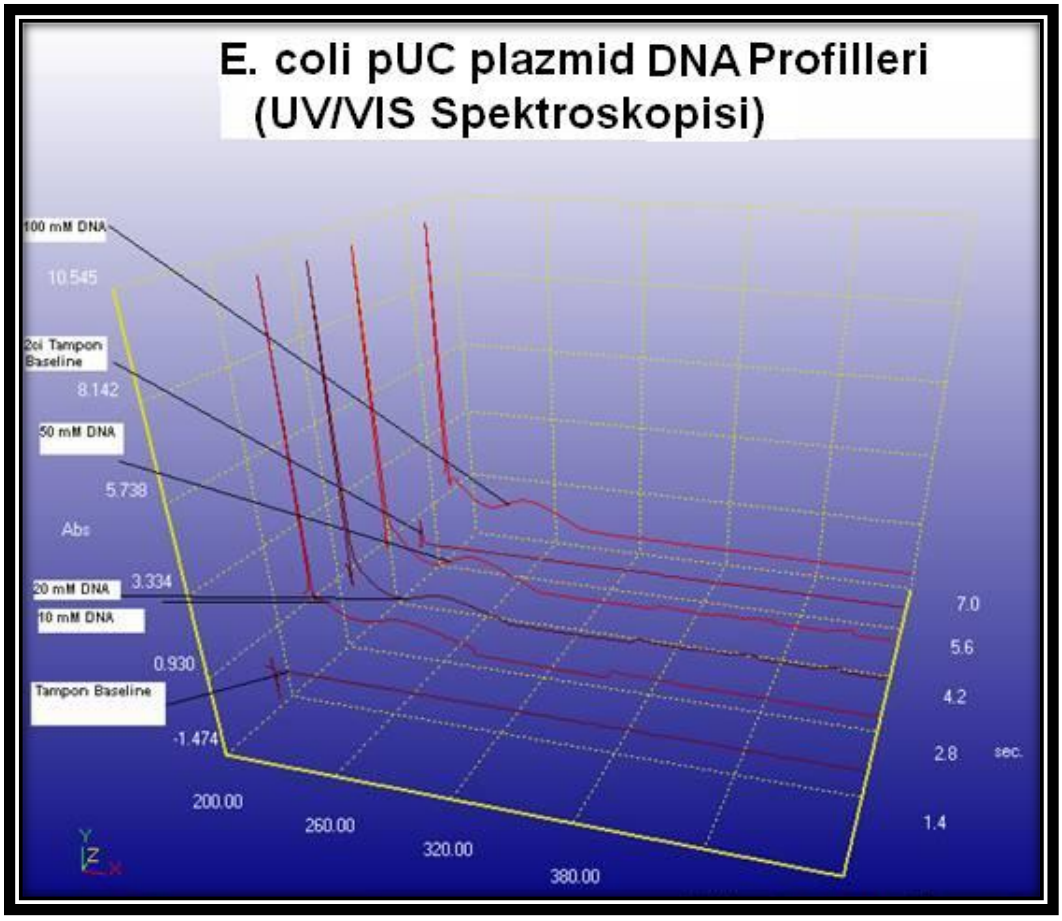
Aşağıdaki Şekil 5.1'de panel a'da gösterilen tampon çözeltinin spektrumu, panel b'de tek başına bağlanmamış DNA'nın spektrumu, panel c'de Mg^{+2} varlığında DPPC(MLV) ile bağlanmış DNA'nın üçlü kompleks spektrumunu belirtmek amacıyla dana timus DNA siyah çizgi ile ve dana timus DNA ile yüklenmiş tek katmanlı lipozomlar kırmızı çizgi ile gösterilirken; Panel d, Mg^{+2} varlığında DPPC (ULV) ile bağlanmış DNA nın üçlü kompleks spektrumunu göstermektedir. Spektrumlar incelendiğinde, Mg^{+2} katyonlarınca meydana getirilen DPPC-ULV lipozomlara karşı bakteriyofaj DNA'ların daha yüksek bir afiniteyle bağlandıkları ortaya çıkarılmıştır.



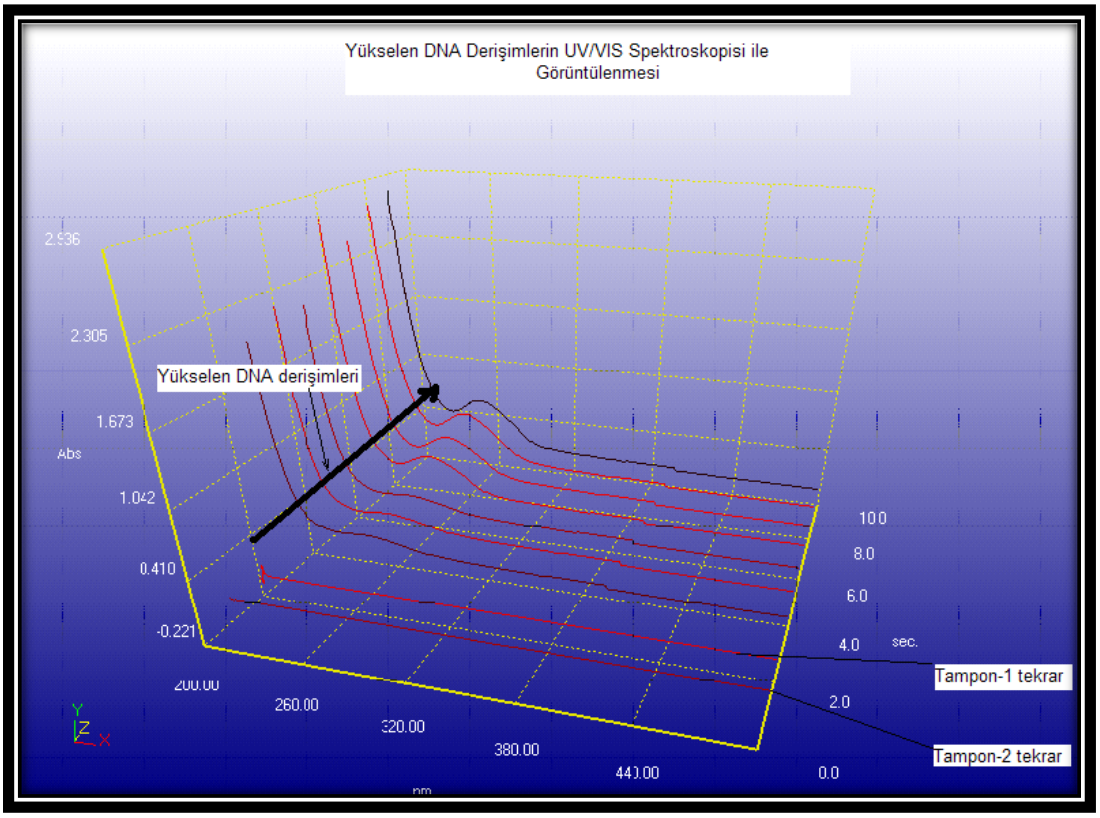
Şekil 5.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin UV/Visible spektroskopisi ile gösterilmesi

UV/VIS spektroskopik ölçümlerinde nükleik asit olarak *E. coli* plazmid DNA (pUC) kullanılmıştır. Kullanılan tampon Tris-HCl; pH=7.5 olup, absorbansı Şekil 5.2'de (a) ile gösterilmiştir. Şekil 5.2'de ise kullanılan *E. coli* plazmid DNA (pUC) UV/VIS spektroskopik özellikleri gösterilmiştir. Yine Şekil 5.3'da çeşitli *E. coli* pUC plazmid DNA profilleri gösterilmiştir. Bu analizlerde nükleik asit derişimi optimize edilmiştir ve tekrarlanabilirlik bakımından en iyi derişim seçilmiştir. Şekil 5.4'de biyolojik hücre zarlarının en önemli temsilcisi olan Dipalmitoylfosfatidilkonin (DPPC) ile nükleik asitler arasında ilk tanınma olayların kinetik profilleri gösterilmiştir. Mg^{+2} yokluğunda DPPC-çok katmanlı vezikül (Multilamellar Vesicles, MLV)-plazmid DNA etkileşmeleri görülmektedir. Yük taşımayan DPPC-MLV ile negatif yüklü plazmid DNA arasında bağ,

10 mM Mg^{+2} ilavesiyle oluşturulmuştur (Şekil 5.5). Çeşitli Mg^{+2} derişimlerinde farklı molar oranlarında DPPC-çok katmanlı veziküllerle (MLV) plazmid DNA arasında oluşan bileşenler sekonder yapısal profilleri gösterilmiştir (Şekil 5.6-Şekil 5.7). Böylece, metal iyonun katkısını ortaya çıkarmak amacıyla Mg^{+2} titrasyonları ortaya çıkarılmıştır. Bu UV/VIS spektroskopik incelemeler neticesinde Dipalmitoylfosfatidilkonin (DPPC) ile nükleik asitler arasında ilk tanınma olayların kinetik profilleri gösterilip oluşan supramoleküler bileşenlerin sekonder yapısal değişiklikleri hakkında bilgiler elde edilmiştir.

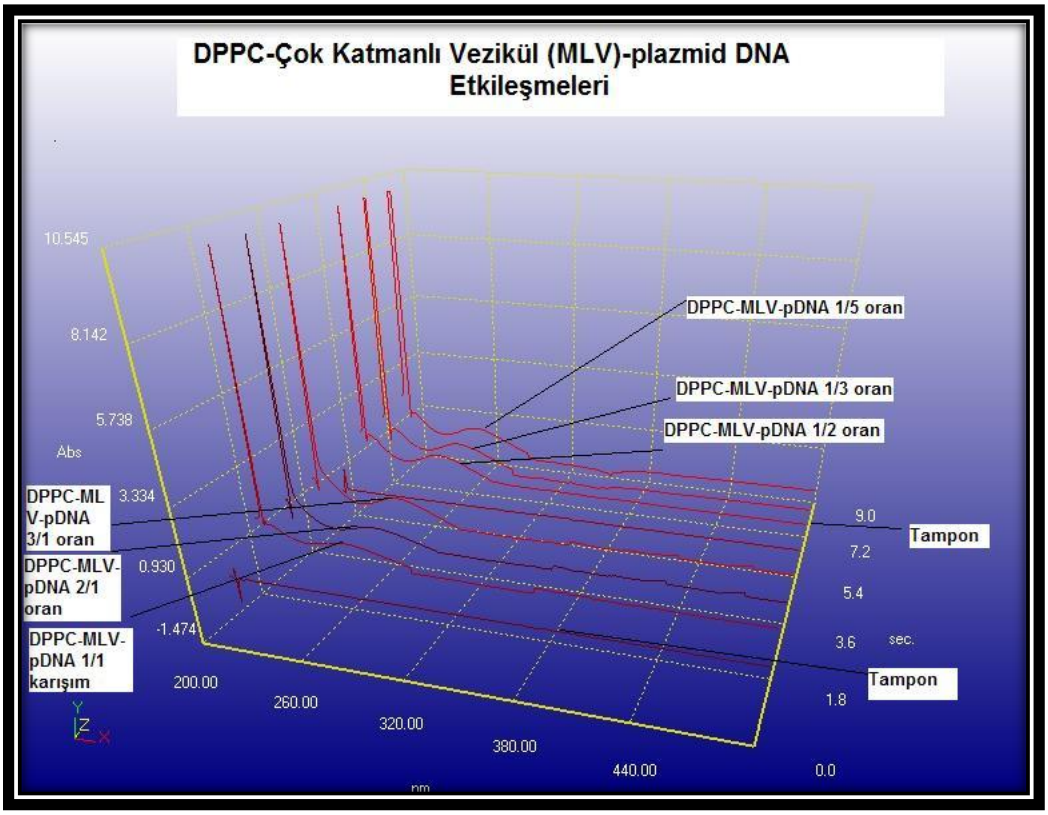


Şekil 5.2. Çeşitli *E. coli* pUC plazmid DNA profilleri



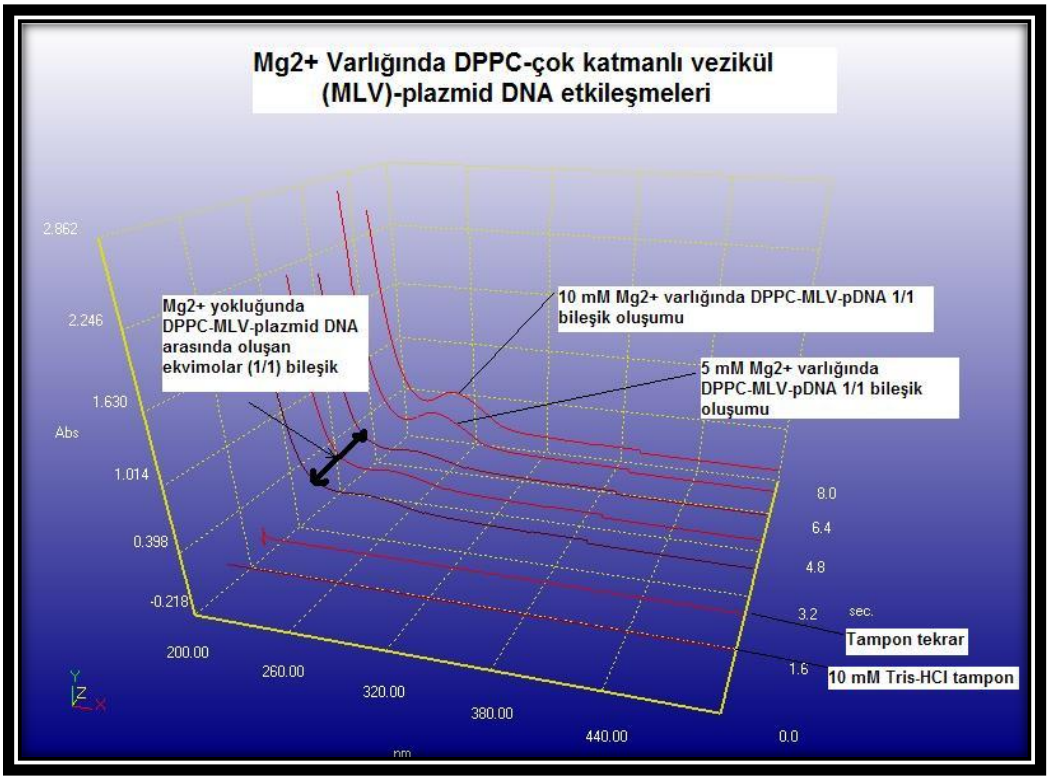
Şekil 5.3. Yükselen plazmid DNA (15 mM *E. coli* pUC plazmid) tipik UV/VIS spektrumu

Yukarıdaki Şekil 5.3'da E.coli pUC plazmidinin derişimi 15 mM yükseltilerek spektrumlar belirlenmiştir.



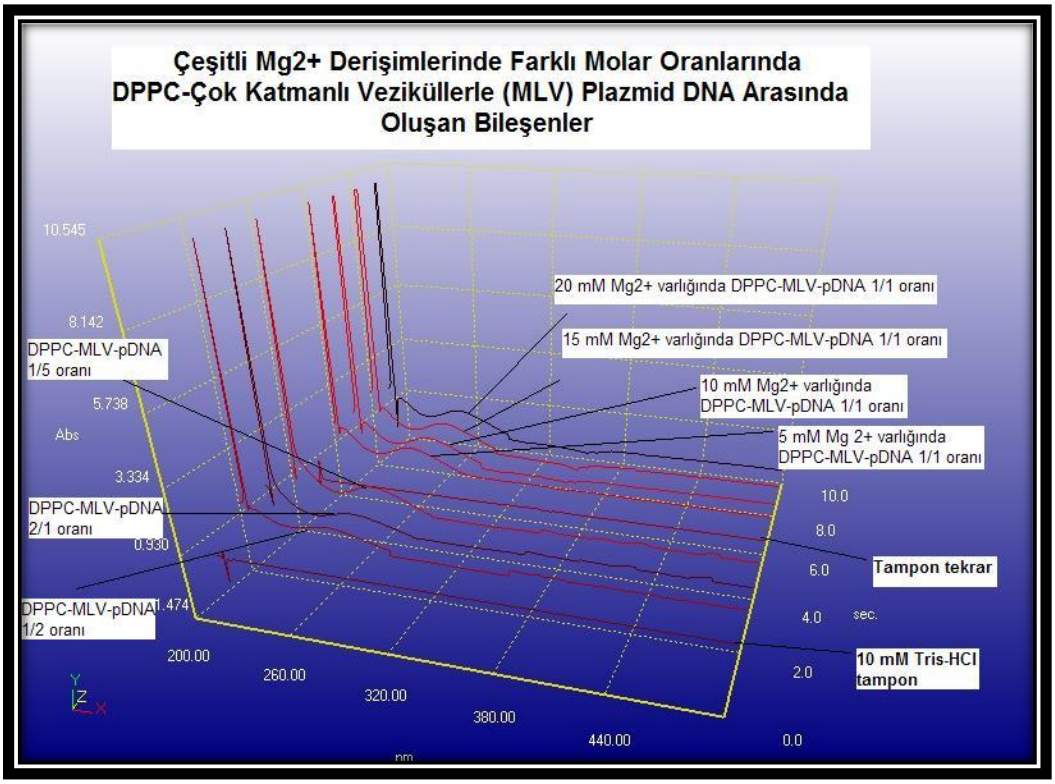
Şekil 5.4. Mg^{+2} yokluğunda DPPC-çok katmanlı vezikül (MLV)-plazmid DNA etkileşmeleri UV/VIS spektrumu

Yukarıdaki Şekil 5.4'de tampon sistemi olarak 10 mM Tris-HCl kullanılmıştır.

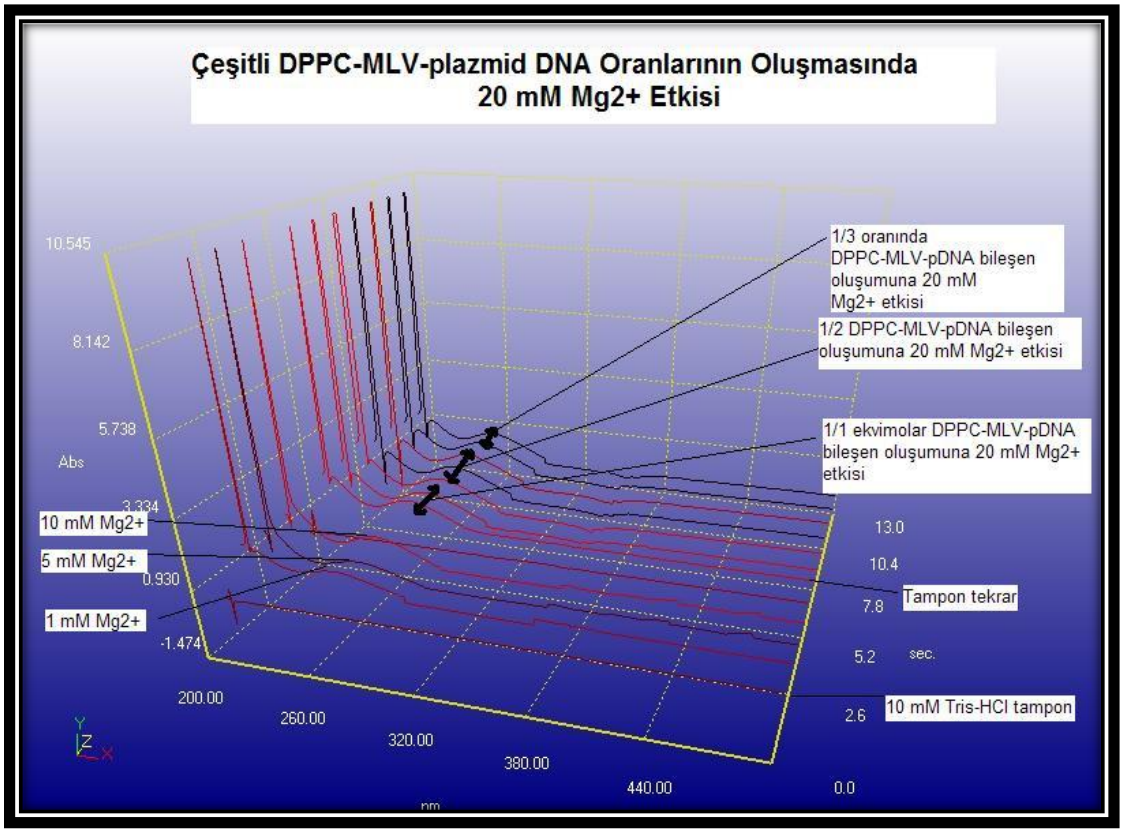


Şekil 5.5. DPPC-çok katmanlı vezikül (MLV)-plazmid DNA etkileşmeleri UV/VIS spektrumu

Yukarıdaki Şekil 5.5'de 10 mM Tris-HCl kullanılmıştır. Yük taşımayan DPPC-MLV ile negatif yüklü plazmid DNA arasında bağ, 10 mM Mg^{+2} ilavesiyle oluşturulmuştur.



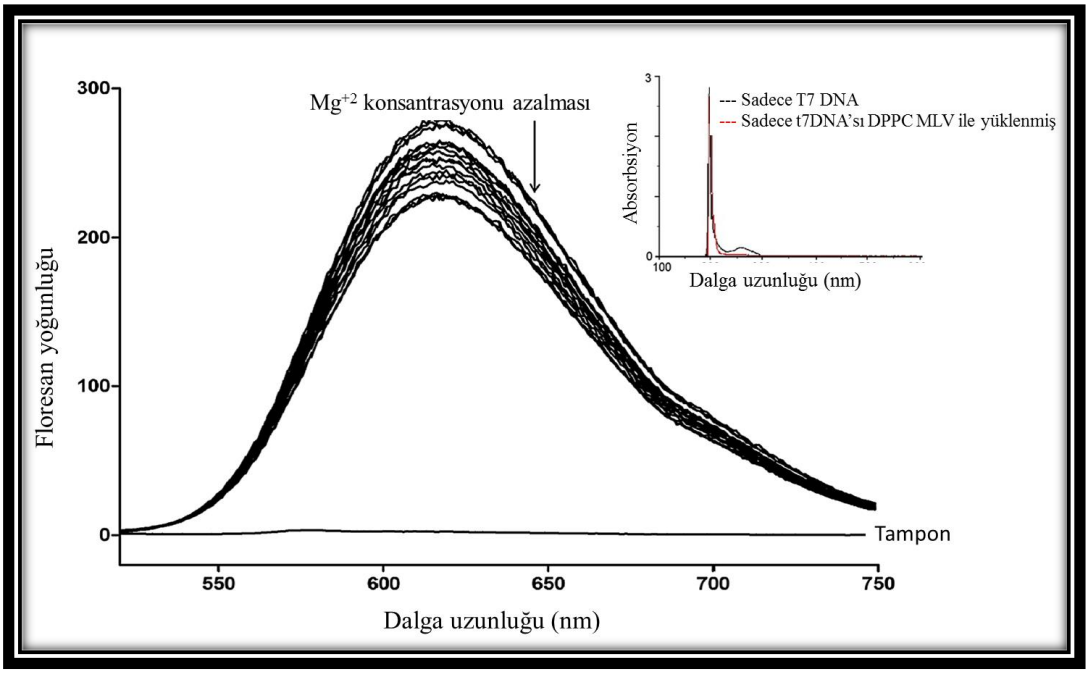
Şekil 5.6. Çeşitli Mg^{+2} derişimlerinde farklı molar oranlarında DPPC-çok katmanlı veziküllerle plazmid DNA arasında oluşan bileşenler UV/VIS spektrumu



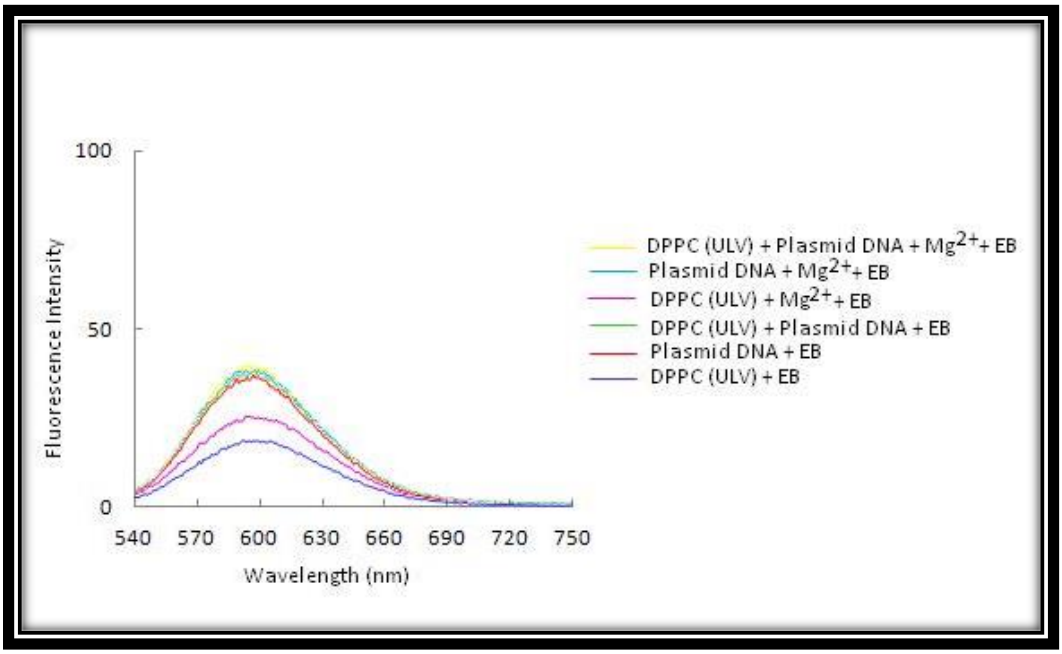
Şekil 5.7. Çeşitli oranlarda oluşturulan DPPC-MLV-plazmid DNA bileşenleri üzerine 20 mM Mg^{+2} etki UV/VIS spektrumu

5.1.1.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin floresan spektroskopisi ile incelenmesi sonuçları

Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin floresan spektroskopisi ile yapılan ölçümleri Şekil 5.8'da gösterildiği gibi Mg^{+2} konsantrasyonunun azalmasıyla üçlü oluşumun yaydığı floresan ışıma azalmıştır.



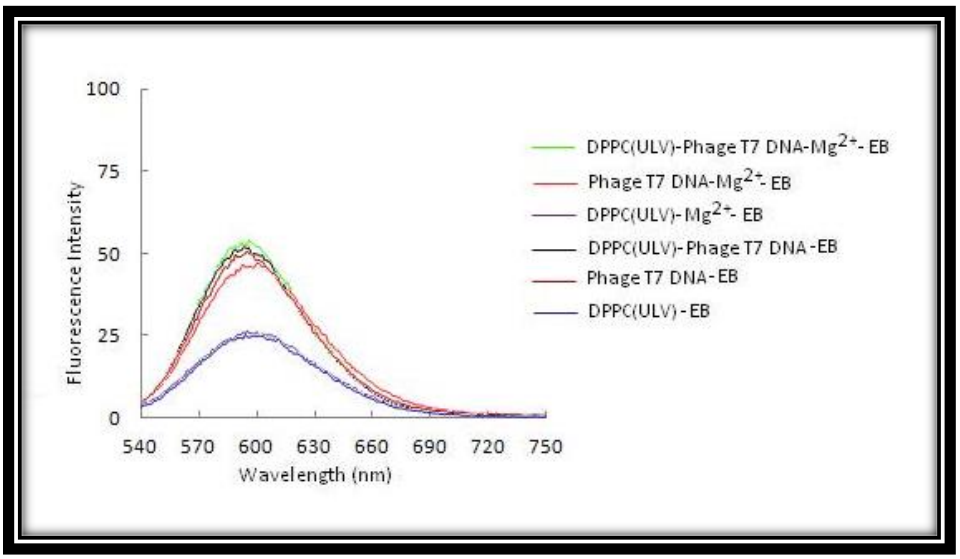
Şekil 5.8. Oluşturulan üçlü bileşenlerin floresan spektroskopisi ile ölçüm grafiği.



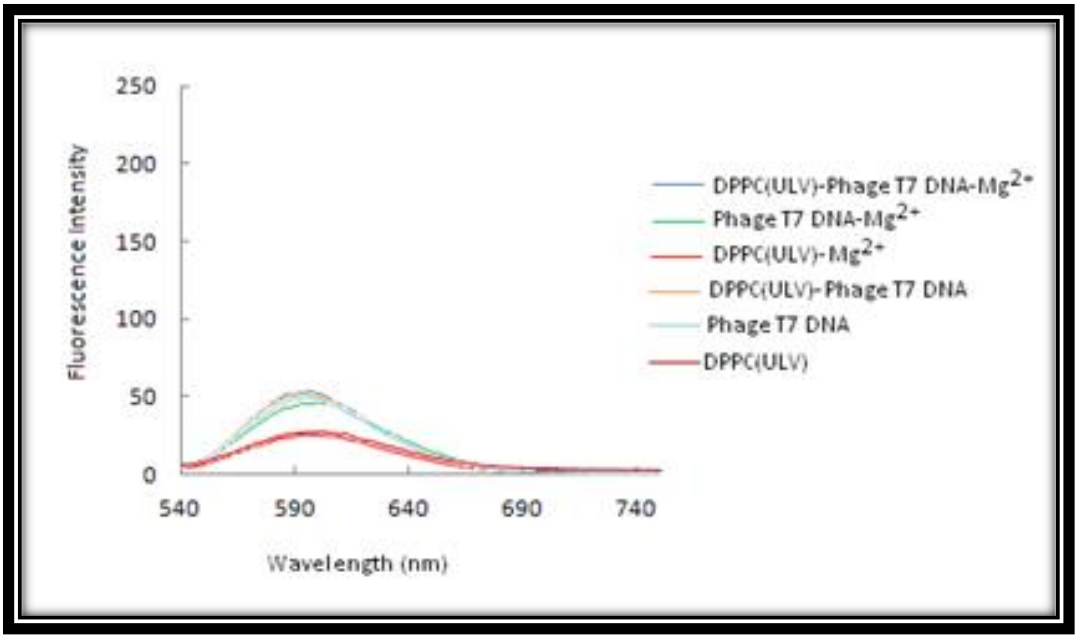
Şekil 5.9. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin floresan spektroskopisi sonuçları.

Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin floresan spektroskopisi ile ölçümü yapılırken her iki ölçümde de EB var fakat yukardaki Şekil 5.9'de daha az konsantrasyonda EB kullanılmıştır. EB olmazsa düz bir çizgi görülmesi beklenmektedir.

Şekil 5.10'de ULV ile oluşturulan ikili ve üçlü oluşumların sabit EB varlığında yaptığı ışımalar gözlenirken, Şekil 5.11'de EB miktarının azaltılmasıyla aynı ölçümler yapılmıştır.

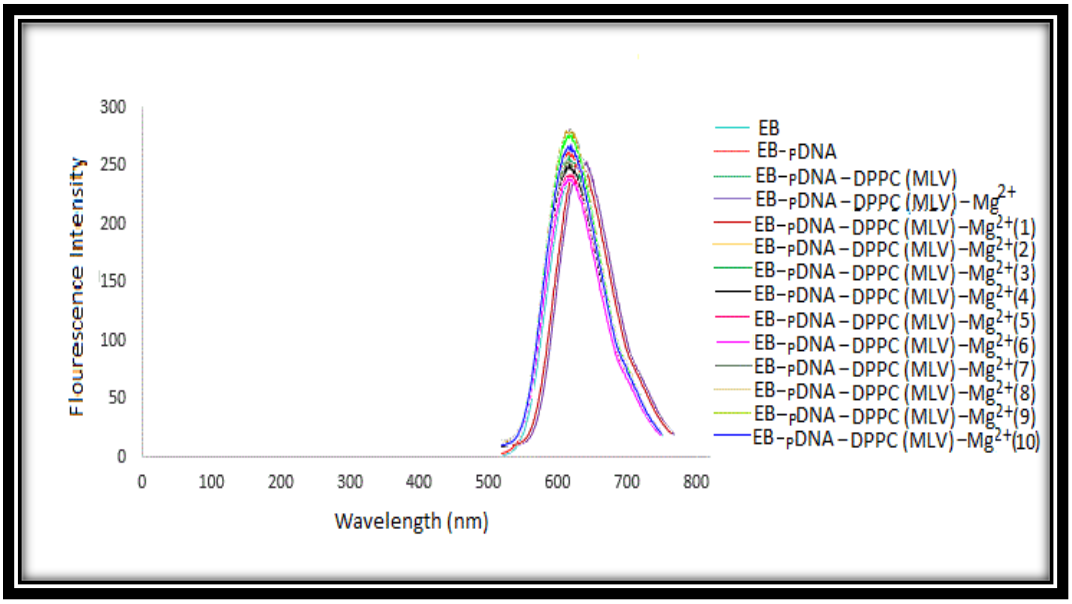


Şekil 5.10. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin floresan spektroskopisi sonuçları.



Şekil 5.11. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin kullanılan EB miktarına bağlı olarak floresan spektroskopisi.

Şekil 5.12'de Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin floresan spektroskopisi ile ölçümünde kullanılan Mg^{+2}, her defasında 25 mM arttırılarak ölçüm yapılmış, Mg^{+2} konsantrasyonunun belirleyici olmadığını gösterilmiştir.



Şekil 5.12. Artan Mg^{+2} miktarına bağlı olarak lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin floresan spektroskopisi ile ölçüm grafiği

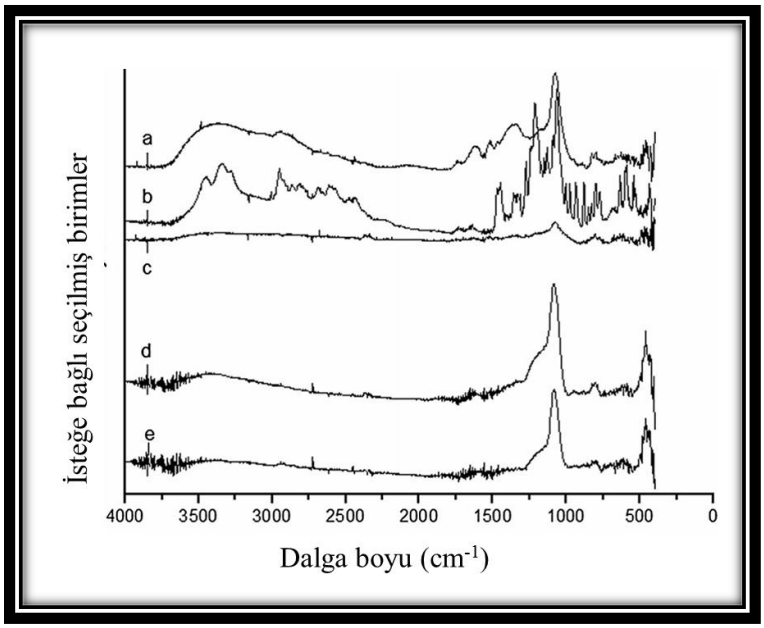
Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin dairesel dikroizm (Dairesel dikroizm, CD), ile spektroskopik karakterizasyon ölçüm sonuçları ekte verilmiştir.

5.1.1.2. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin titreşim spektroskopisi ile incelenmesi sonuçları

Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin titreşim spektroskopisi ile incelenmeleri FT-IR (Fourier Transform Infrared) kızılötesi ve Sers Raman titreşim spektroskopisileri ile yapılmıştır. FT-IR (Fourier Transform Infrared) kızılötesi spektroskopisi ile ölçüm sonuçları aşağıda belirtilmiştir. Sers Raman titreşim spektroskopileri ile ölçüm sonuçları ek-2'de verilmiştir.

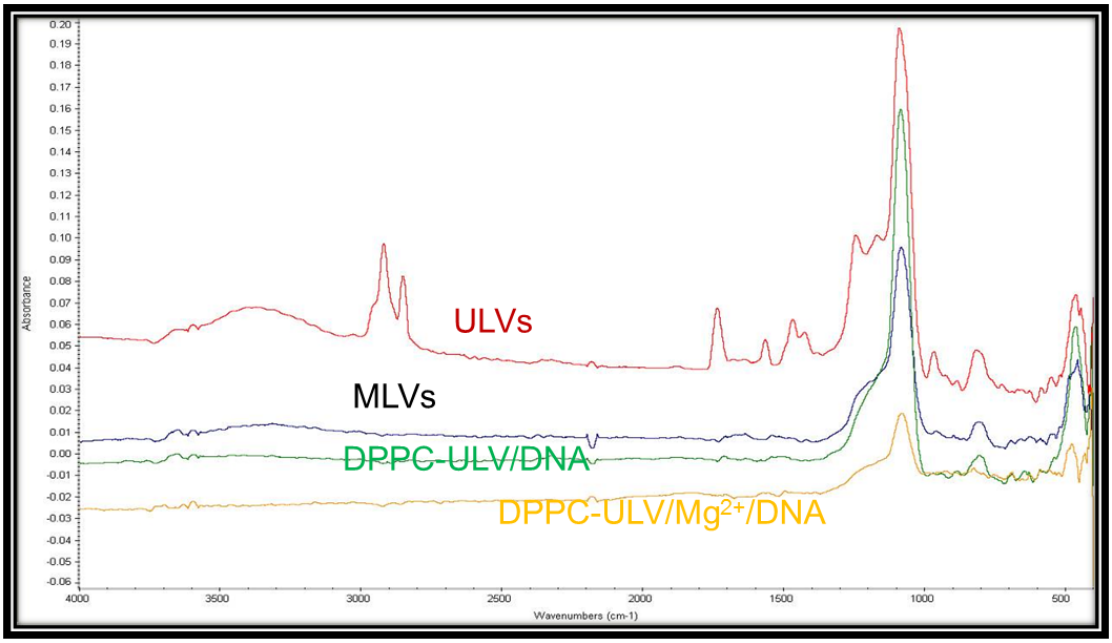
5.1.1.2.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin FT-IR (Fourier Transform Infrared) kızılötesi titreşim spektroskopisi ile incelenmesi sonuçları

DNA-lipit(MLV) parçacıklarının ve bileşenlerinin ayrı frekans bölgelerinde FTIR spektroskopisi ile ölçümleri yapılmıştır. Aşağıdaki Şekil 5.13'de a ile gösterilen kısımda MLV/T7 FajDNA ikili oluşumlarının, b ile gösterilen kısımda MLV'lerin, c ile gösterilen kısımda MLV/Mg^{+2} ikili oluşumlarının, d ile gösterilen kısımda MLV/Mg+2/T7 DNA üçlü oluşumunun ve e ile gösterilen kısımda T7 faj DNA FTIR spektrumları gösterilmektedir.



Şekil 5.13. (a) MLVs–T7 FajDNA binary (b) MLV (c) MLV–Mg^{+2} d MLV–Mg^{+2}–T7 DNA üçlü kompleks ve (e) T7 faj DNA FTIR spektrumları.

Şekil 5.14'de DPPC MLVs (siyah çizgi) ve DPPC ULVs (kırmızı çizgi) oluşumların ayrıştırılmasının FTIR analizinin toplam spektrumlarını göstermektedir. Yeşil renkli spektrum Mg^{+2} içermeyen DPPC-ULV/DNA ikili kontrol spektrumudur. En alttaki sarı renkli spektrum DPPC-ULV/Mg^{+2}/DNA üçlü bileşiklerinin spektrumudur.

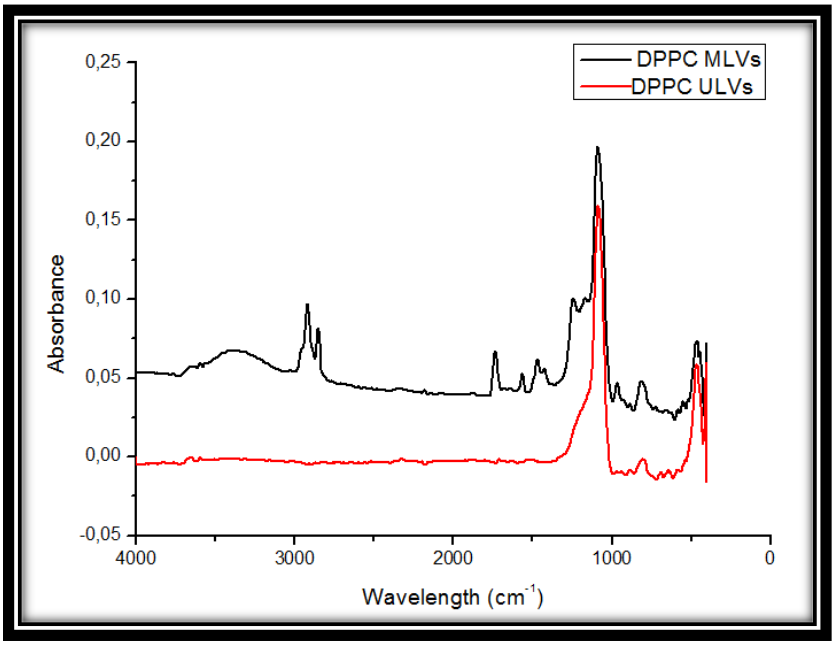


Şekil 5.14. DNA/lipit(ULV) ve Mg^{+2} parçacıkların ve bileşenlerinin FTIR spektroskopisi ile ölçümleri.

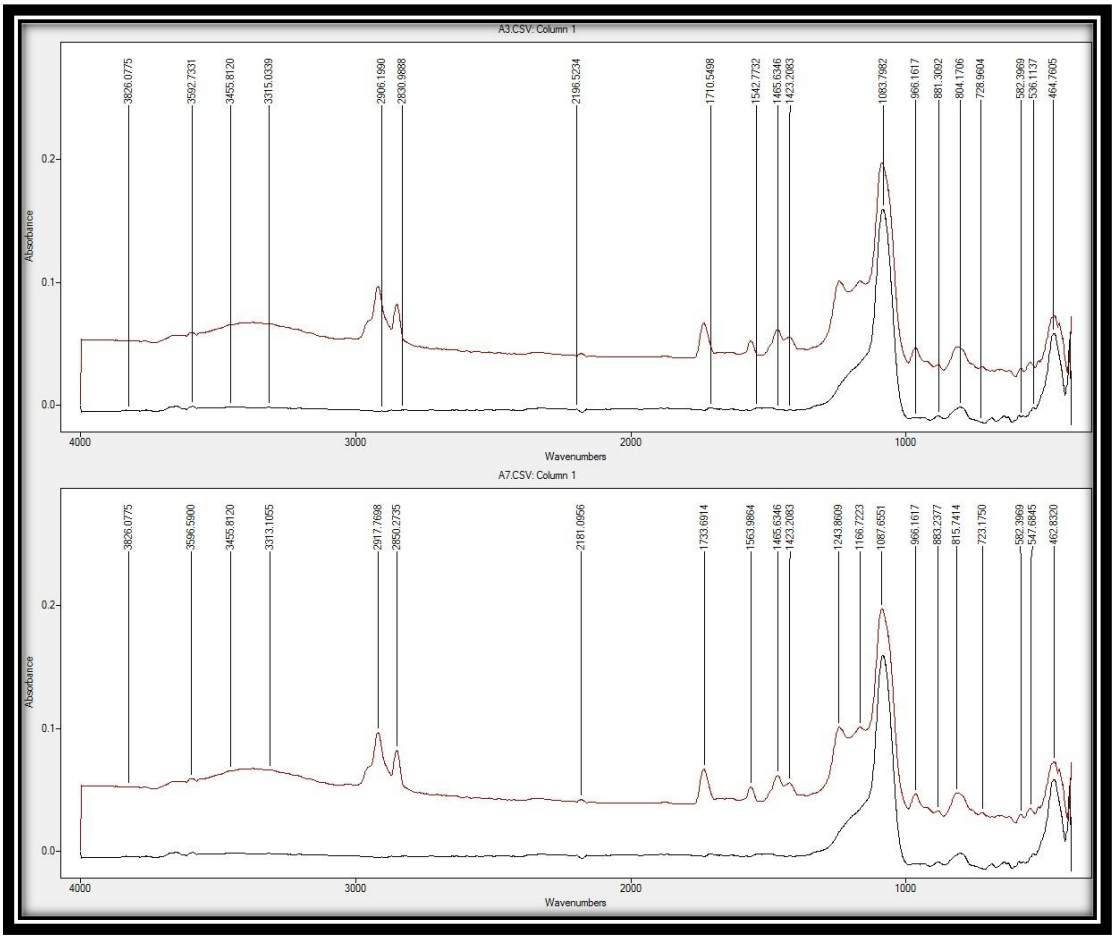
1750-1650 cm^{-1} bölgesinde 1738 cm^{-1} ve 1675 cm^{-1} daha belirgin bantlar görülmektedir. Söz konusu bantlar dana timus DNA'da daha da belirgindir. Bunlardan ilki timine özgü C2=O, diğeri ise C4=O ve C5=C6 bağ sinyalleridir. 3400 cm^{-1} bant B-sarmalı hidrasyona uğratan su moleküllerinin O-H titreşim bantıdır. 1100 cm^{-1} bant PO_2 simetrik titreşim frekansıdır. Çok ilginç olarak 1200 cm^{-1} yer alan PO_2 simetrik titreşim frekansıdır ve plazmid DNA ile poly(A)'da bulunmayıp sadece dana timus DNA'da görülmektedir. Bu sonuç her üç nükleik asidin farklı topolojiye sahip olduklarının göstergesidir. Bu amaçla bu araştırmada kullanılmışlardır, başka bir deyişle ele alınan DNA/Mg^{+2}/lipit bileşiklerinin bu tür farklı nükleik asit konformasyonlarına karşı bağlanma afinitelerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Nükleik asitlere özgü 1000 cm^{-1} ile 700 cm^{-1} bölgesinde birçok daha düşük frekanslı bant görülmektedir. Bunlar genelde P-O, C-O ve N-H titreşimlerden kaynaklanmaktadır. Yapılan ölçümlerde nükleik asitlerin B-şeklinde oldukları 1236 cm^{-1}, 1086 cm^{-1}, 1064 cm^{-1} ve 956 cm^{-1} 'deki piklerden kanıtlanmaktadır (Şekil 5.14).

Yapısal değişiklikler spektroskopik olarak gözlemlenmektedir. Genelde DNA'nın fosfat grubu üzerinden bağ yapılmaktadır. 2.pikler su bantıdır. İlk bantlar fosfat grubu üzerinden bağ yapıldığını göstermektedir.

Dana timus DNA'nın saflığı nanodrop spektrofotometrede Absorbance $_{260}$ / Absorbance $_{280}$ = 1.8 oranı olarak elde edilmiştir. Daha sonra farklı çözeltileri 150 mM NaCl diiyonize suda hazırlanmıştır. 20 µl dana timus DNA (77 ng/µl) çözeltisi hafifçe vorekslenerek 1.5 ml tek katmanlı lipozom emülsiyonuna katılmıştır (~0.1 mM). Bu karışım 30 dakika, 25 °C'de inkübe edilmiştir. MLV ve ULV oluşumları FTIR spektroskopisiyle gösterilmiştir (Şekil 5.15).

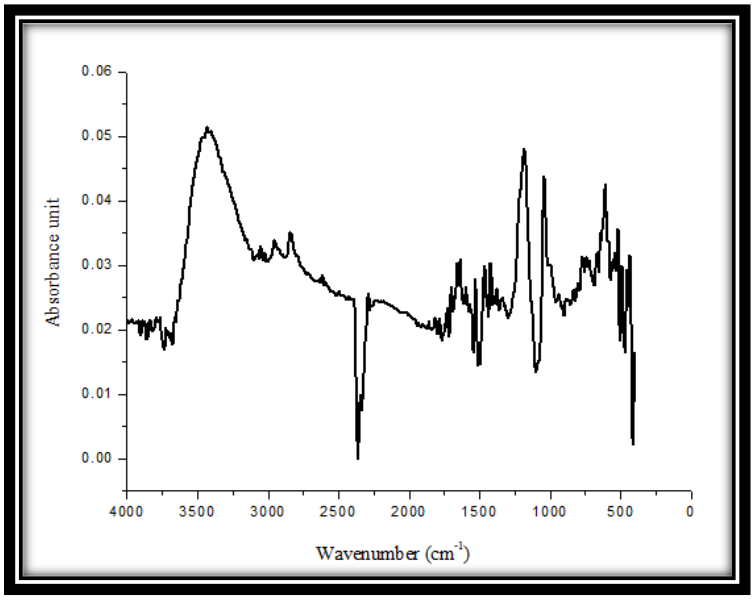


Şekil 5.15. DPPC-MLV (siyah çizgi) ve DPPC-ULV (kırmızı çizgi) oluşumların ayrıştırılmasının FTIR analizi (Nicolet 6700 FTIR).

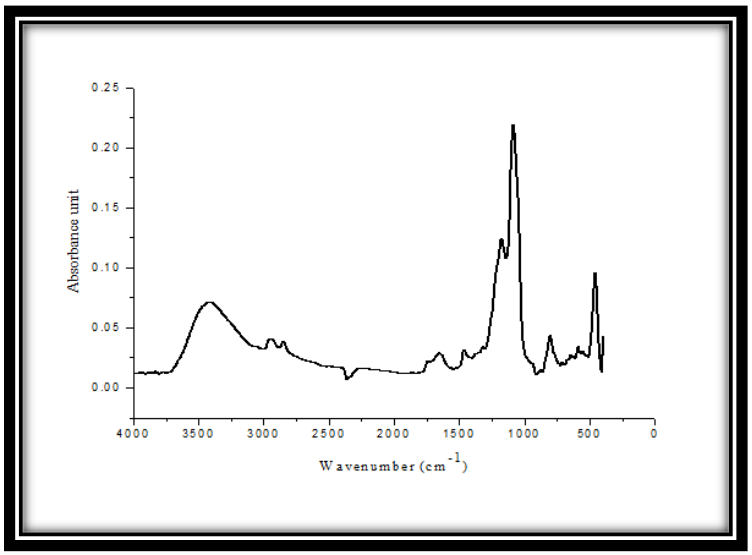


Şekil 5.16. DPPC-MLV (siyah çizgi) ve DPPC-ULV (kırmızı çizgi) oluşumların ayrıştırılmasının FTIR analizinin tüm frekansları.

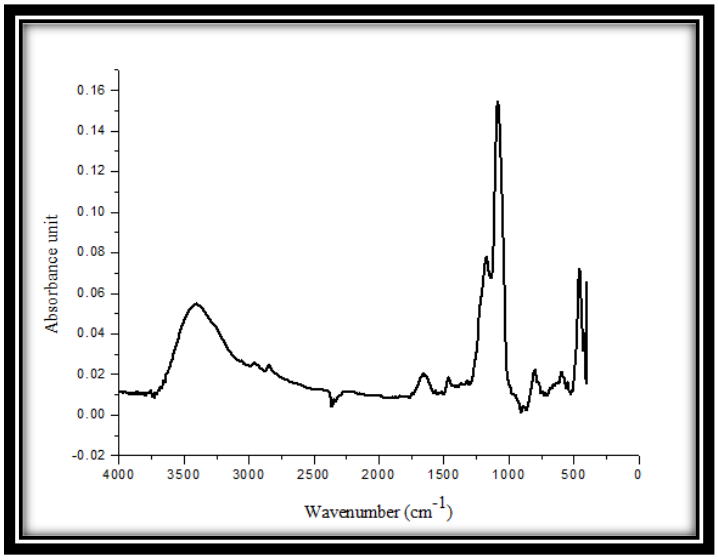
Şekil 5.16'de görüldüğü gibi MLV'lere özgü birçok titreşim bantı ve özellikle 3400 cm^{-1} bölgeye özgü su bantı, CH ve CH_2 bantları ULV süspansiyonunda görülmemektedir. ULV süspansyonunun FTIR spektrumunda sadece fosfat ve karbonil grubu titreşim frekans bantları görülmektedir. Şekil 5.17'da DPPC-ULV-Bakteriyofaj T7 ikili oluşumunun, Şekil 5.18'de tek başına DPPC/ULV veziküllerinin, Şekil 5.19'de DPPC-ULV/Mg^{+2} ikili oluşumunun, Şekil 5.20'de ekimolar DPPC-MLV/Mg^{+2}/Bakteriyofaj T7 DNA üçlü bileşiklerinin, Şekil 5.21'de Bakteriyofaj T7 DNA'nın tek başına ve ligandla bağlanmamış FTIR spektrumları gösterilmiştir.



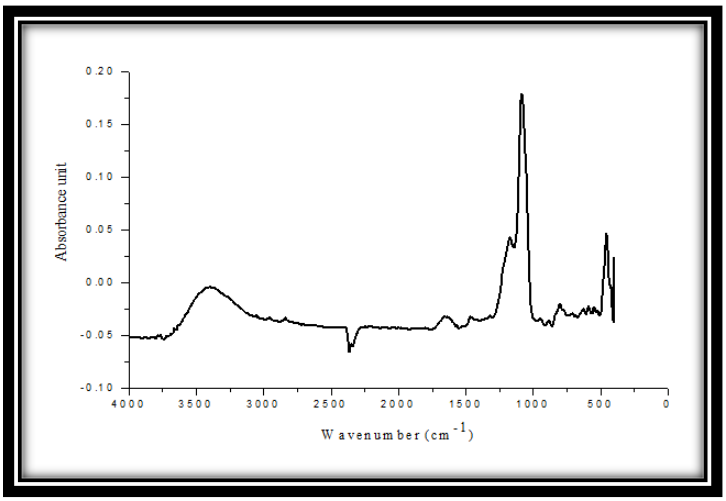
Şekil 5.17. DPPC-ULV/Bakteriyofaj T7 ikili oluşumunun FTIR spektrumu.



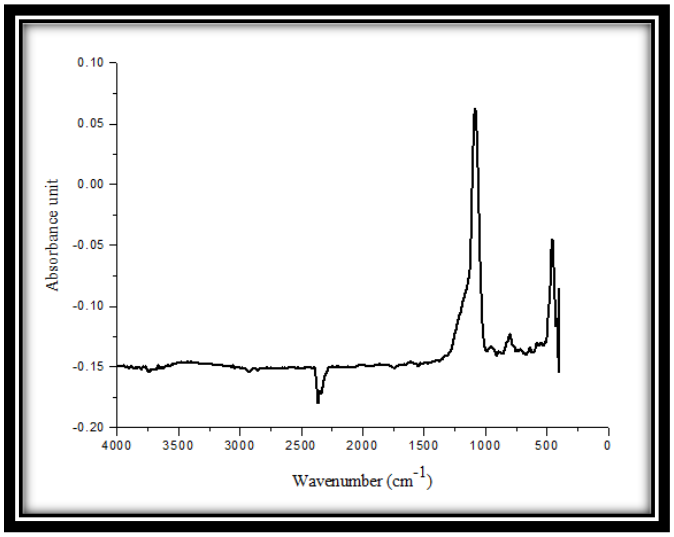
Şekil 5.18. Tek başına DPPC-ULV veziküllerinin FTIR spektrumu.



Şekil 5.19. DPPC-ULV/Mg^{+2} (1:1) ikili oluşumunun FTIR spektrumu.



Şekil 5.20. Ekimolar DPPC-MLV/Mg^{+2}/Bakteriyofaj T7 DNA (1:1:1) üçlü bileşiklerinin FTIR spektrumu.



Şekil 5.21. Bakteriyofaj T7 DNA'nın tek başına ve ligandla bağlanmamış FTIR spektrumu.

FTIR ölçüm spektrumları ölçümleri, dairesel dikroizm spektroskopisinden elde edilen konformasyonel değişiklikleri teyit etmektedir.

UV/VIS spektroskopisi, oluşan yapıların kinetiği ve sekonder yapısal değişiklikleri konusunda bilgiler vermektedir. Ancak, oluşan yapılarda hangi fonksiyonel grupların yer aldığı ve önem taşıdığı konusunda güçsüz kalmaktadır. Bu nedenle, bu fonksiyonel grupları ortaya çıkarmak amacıyla Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) uygulanmıştır. pDNA tipik IR spektrumları görülmektedir. Bu IR spektroskopik ölçümleri sayesinde çeşitli plazmid DNA, genomik DNA ve homopolimer gibi farklı topolojiye sahip nükleik asitlerin genel fonksiyonel grupları moleküler düzeyde ortaya çıkarılmıştır.

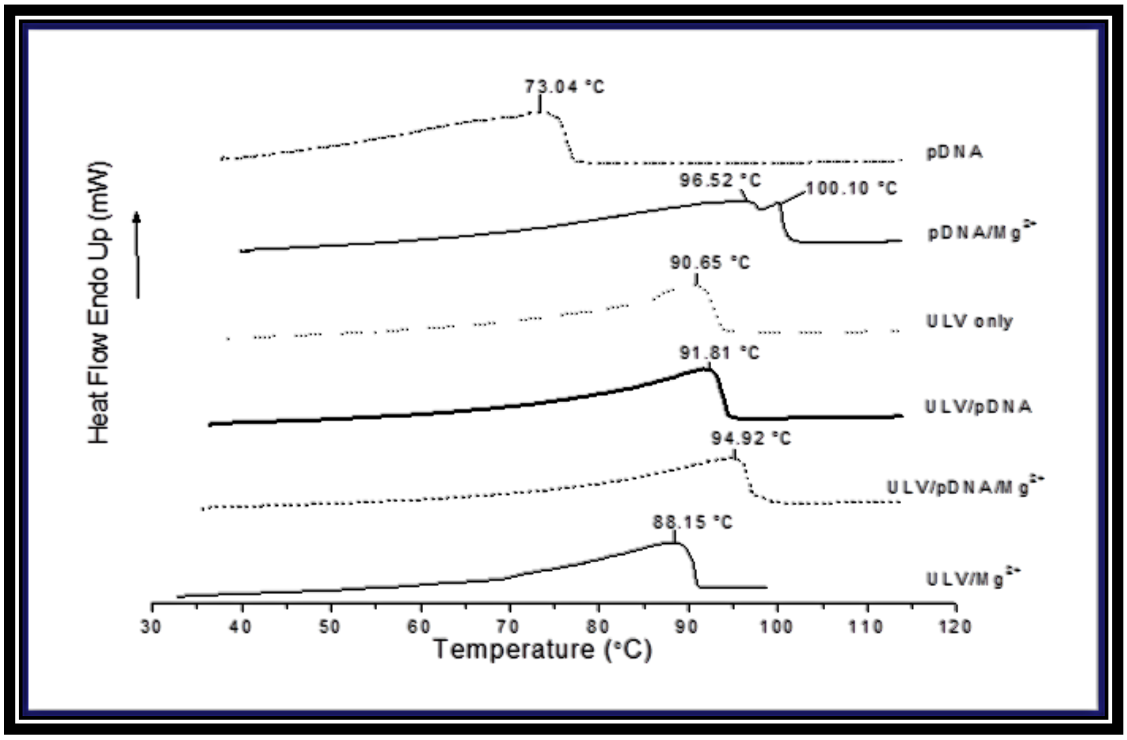
Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin Sers Raman titreşim spektroskopisi ile ölçümleri yapılmıştır. Bulgular ek-2'de verilmiştir.

5.1.2. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN TERMODİNAMİK KARAKTERİZASYONU SONUÇLARI

Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin termodinamik karakterizasyonu diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), termogravimetrik analiz (TGA) ve izotermal titrasyon kalorimetri (ITC) ile yapılmıştır. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ölçüm bulguları aşağıda verilmiştir. Termogravimetrik analiz (TGA) ve izotermal titrasyon kalorimetri (ITC) ölçümleri sırasıyla ek-3 ve ek-4'te verilmiştir.

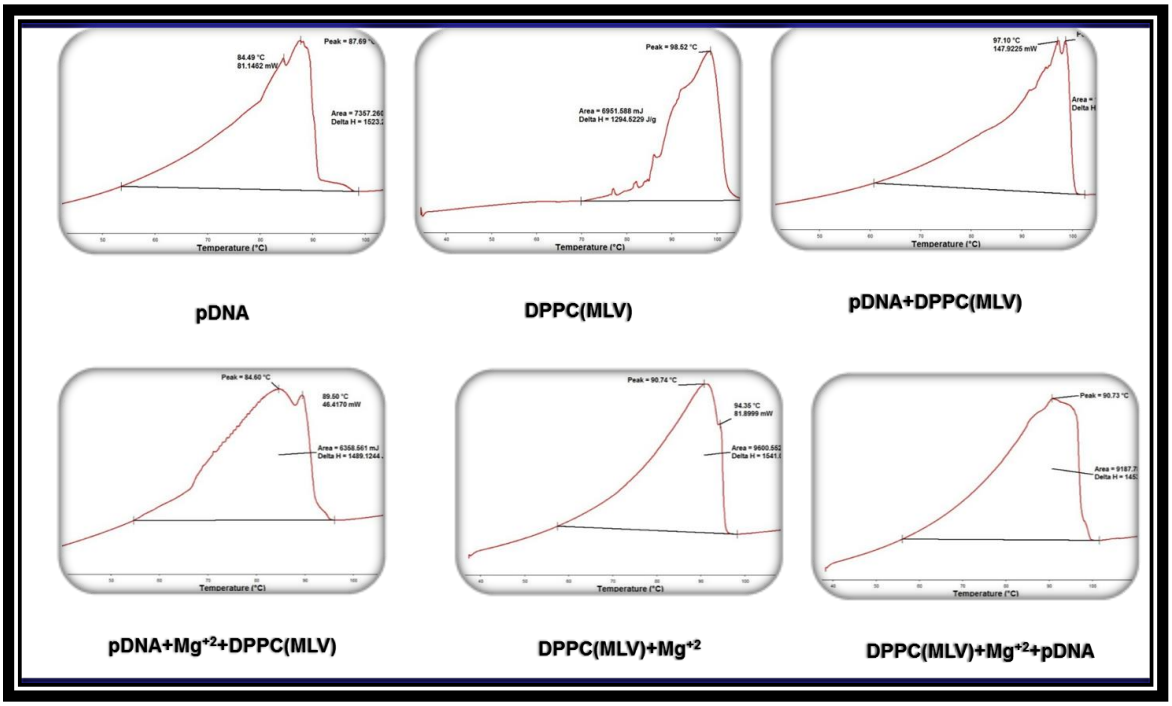
5.1.2.1. Lipozomların ve oluşturulan üçlü bileşenlerin diferansiyel taramalı kalorimetri (Differencial Scanning Calorimetry, DSC) ile incelenmesi sonuçları

Şekil 5.22'de görüldüğü gibi 1-6 numaralı örnekler için grafiğin yükseltisinde değişim yok. Ayrıca transfeksiyon deneylerinde de Mg^{+2} konsantrasyonunun çok etkili olmadığı gözlendi.

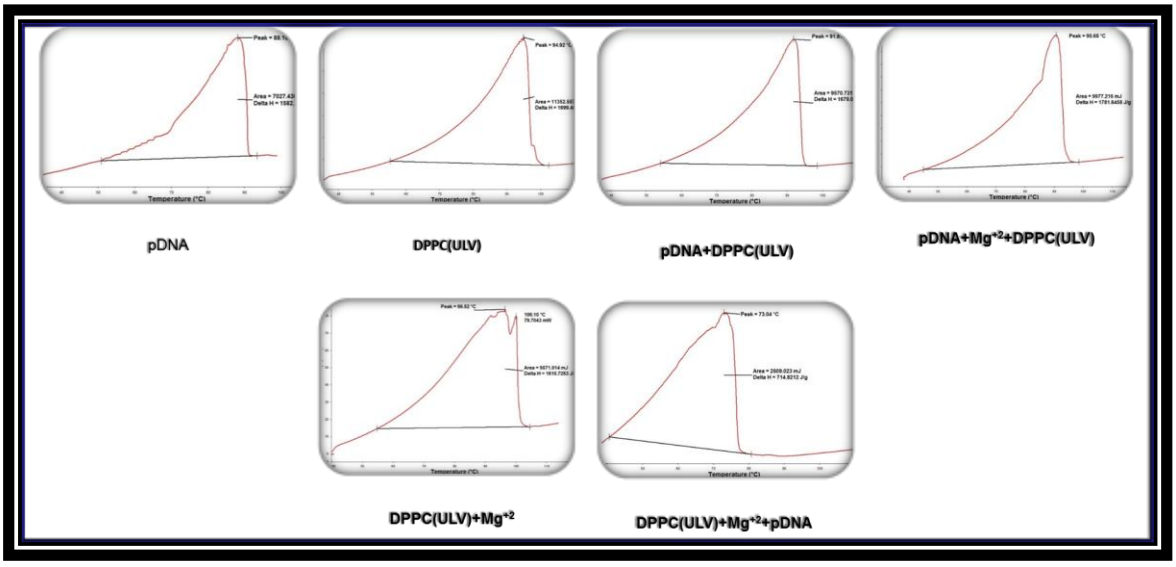


Şekil 5.22. pDNA/Mg^{+2}, ULV/Mg^{+2}, ULV/pDNA, ULV/pDNA/Mg^{+2}, ULV, pDNA bileşenlerinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) ölçümleri.

Aşağıdaki Şekil 5.23'de görüldüğü gibi DPPC(MLV)/DNA/Mg^{+2} kompleksinde sıcaklığın 42˚C'den 80˚C'ye arttığı açıkça görülmektedir. Bu durum Mg^{+2}'un termal sabititeyi arttırdığını göstermektedir. Üçlü kompleks meydana geldikçe termal sabitide yüksek değerlere doğru gitmektedir. Endotermik sonuç veren bir tepkime olduğu için pikler aşağı doğru görülmektedir.



Şekil 5.23. Oluşturulan ikili ve üçlü bileşenlerin (DPPC-MLV/DNA/Mg^{+2}) diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ile ölçümleri.



Şekil 5.24. Oluşturulan ikili ve üçlü bileşenlerin (DPPC-ULV/DNA/Mg^{+2}) diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ile ölçümleri.

Şekil 5.24'de görülen ölçümlerin de gösterdiği gibi tek başına plazmid DNA'nın erime noktası olan 73.04°C→88.15°C yüksek derecelere doğru kayma sadece Mg^{+2} katıldığında görülmektedir. Bu bulgu, önerilen üçlü sistemin yüksek bir termodinamik sabitliliğine sahip olduğunu göstermektedir.

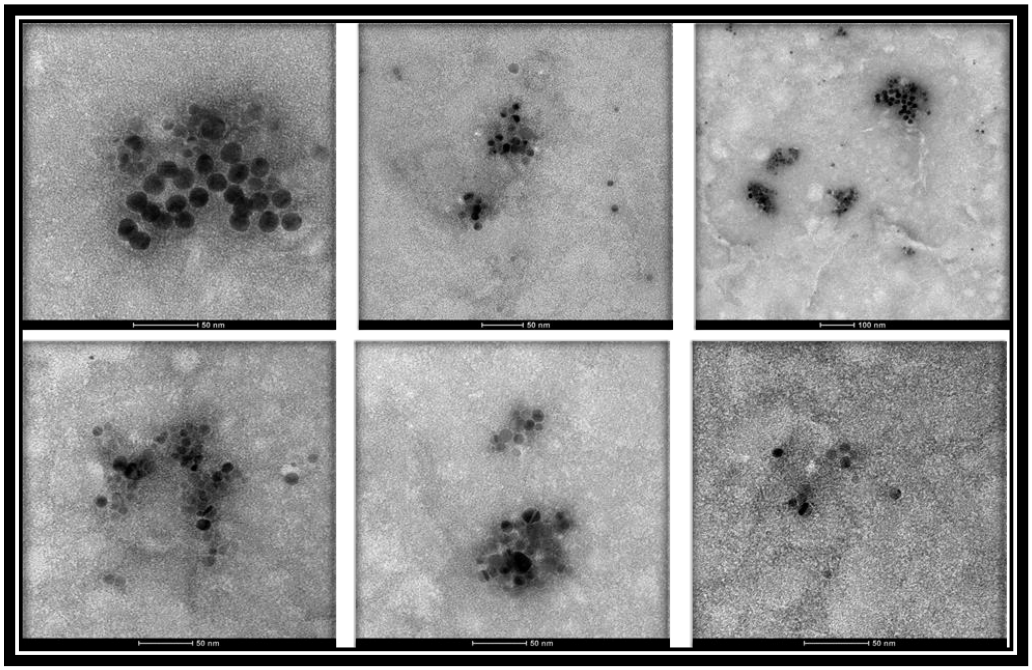
Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin termodinamik karakterizasyonu, termogravimetrik analiz (TGA) ve izotermal titrasyon kalorimetri (ITC) ile de yapılmıştır. Bulgular ekte verilmiştir.

5.1.3. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN MİKROSKOBİK KARAKTERİZASYONU SONUÇLARI

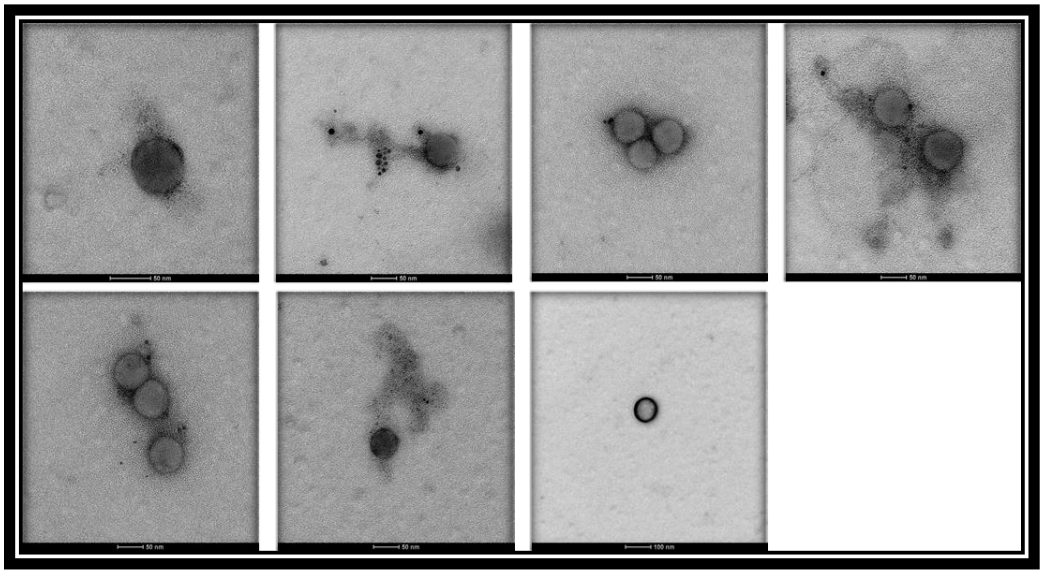
Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin konfokal mikroskopi ve CTEM (kontrast taramalı elektron mikroskopi) ile incelenmiştir. CTEM (kontrast taramalı elektron mikroskopi) ile alınan görüntüler, aşağıda verilmiştir. Konfokal mikroskopi bulguları ek-5'te verilmiştir.

5.1.3.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin kontrast taramalı elektron mikroskopi (CTEM) ile incelenmesi sonuçları

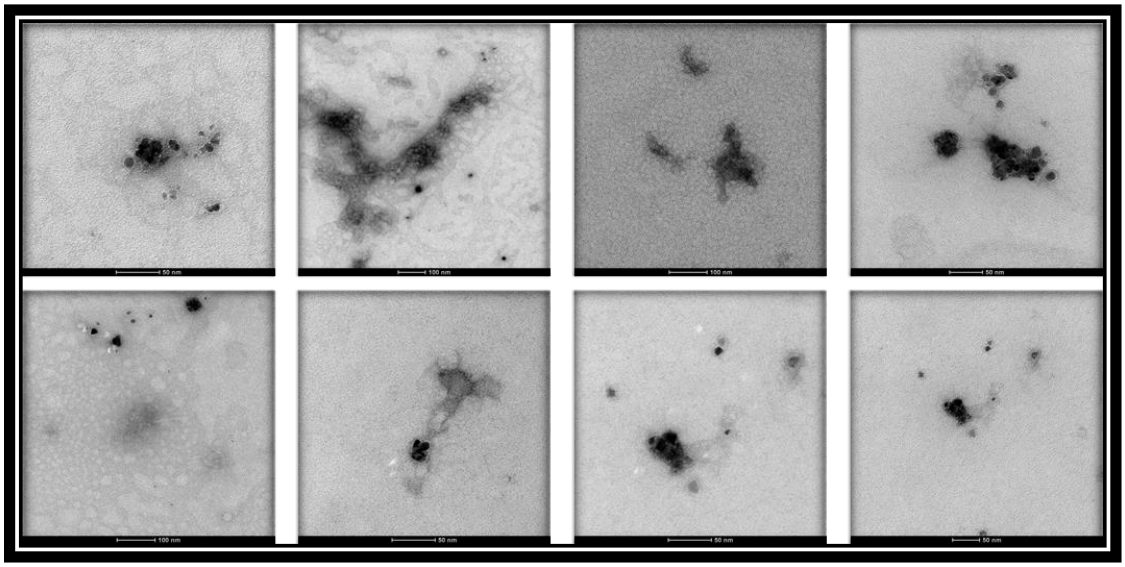
MLV ve ULV'lerin morfoloji ve boyut analizi,0.34 nm çözünürlükte ile 80 kV hızlandırıcı voltajla çalışan Tecnai G2 Ruh Biotwin cihazı (FEI, ABD) kullanılarak, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkez Laboratuvarı'nda kontrast taramalı elektron mikroskopi (CTEM) ölçümleri yapılmıştır. Aşağıdaki Şekil 5.25'de Ag nanopartiküllerinin, Şekil 5.26'de DPPC(ULV)/Ag nanopartikülü ikili oluşumunun, Şekil 5.27'da pDNA/Ag nanopartikülü ikili oluşumunun Şekil 5.28'de pDNA/DPPC(ULV)/Ag nanopartikülü üçlü oluşumunun, Şekil 5.29'de pDNA/DPPC(ULV)/Mg^{+2}/Ag nanopartikülü kompleksinin taramalı elektron mikroskobu ile farklı alanlardaki görüntüleri incelenmiştir. Şekil 5.30'da DPPC (MLV) örneklerinin, Şekil 5.31'da pDNA/DPPC (MLV) örneklerinin, Şekil 5.32'de pDNA/DPPC(MLV)/Mg^{+2} örneklerinin taramalı elektron mikroskobu ile iki tekrarlı görüntüleri alınmıştır.



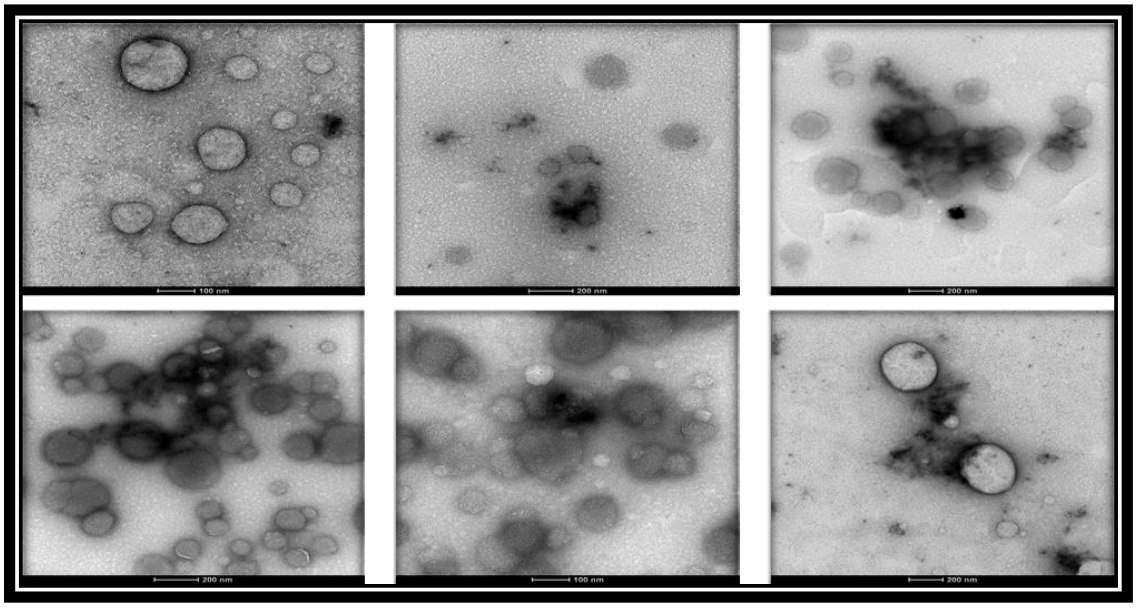
Şekil 5.25. Ag nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (TEM, Transmission Electron Microscope) görüntüsü.



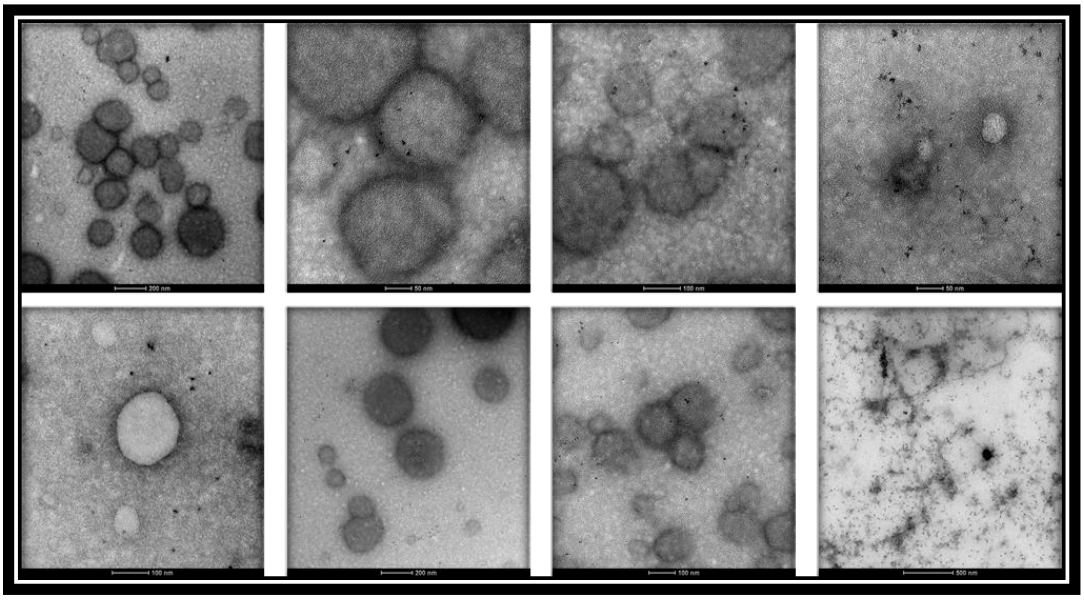
Şekil 5.26. DPPC(ULV)/Ag nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (CTEM) görüntüsü.



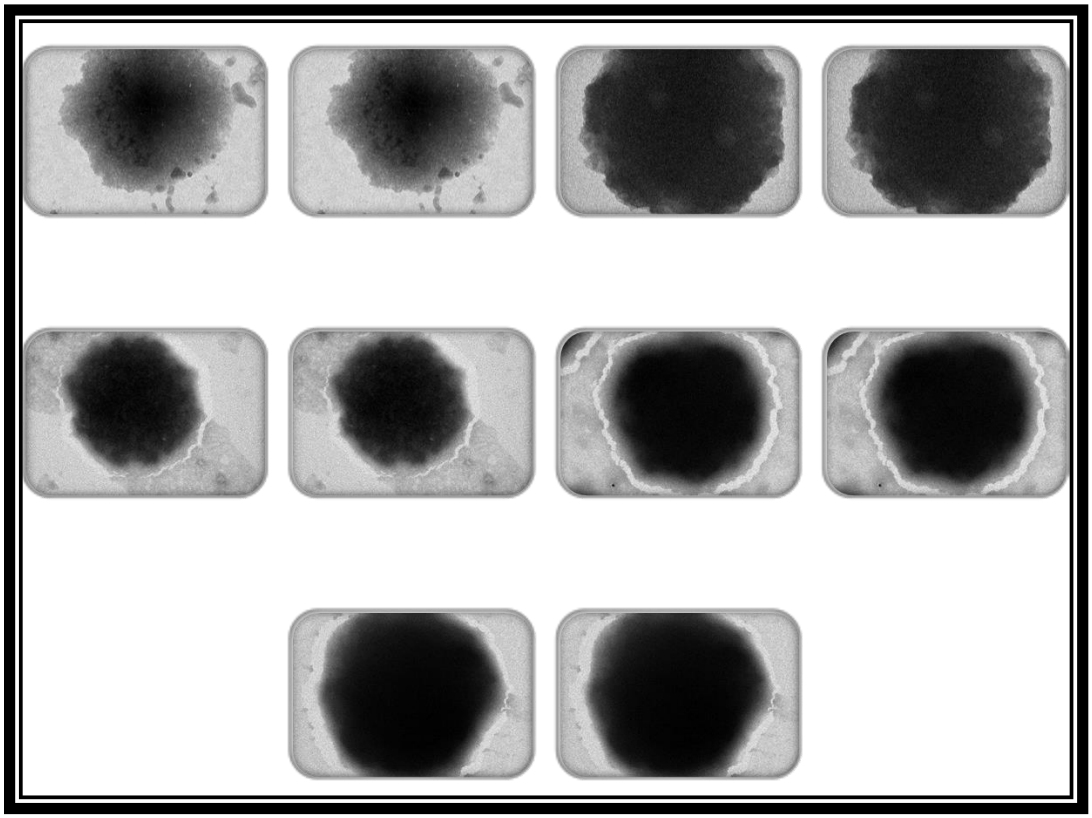
Şekil 5.27. pDNA/Ag nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (CTEM) görüntüsü.



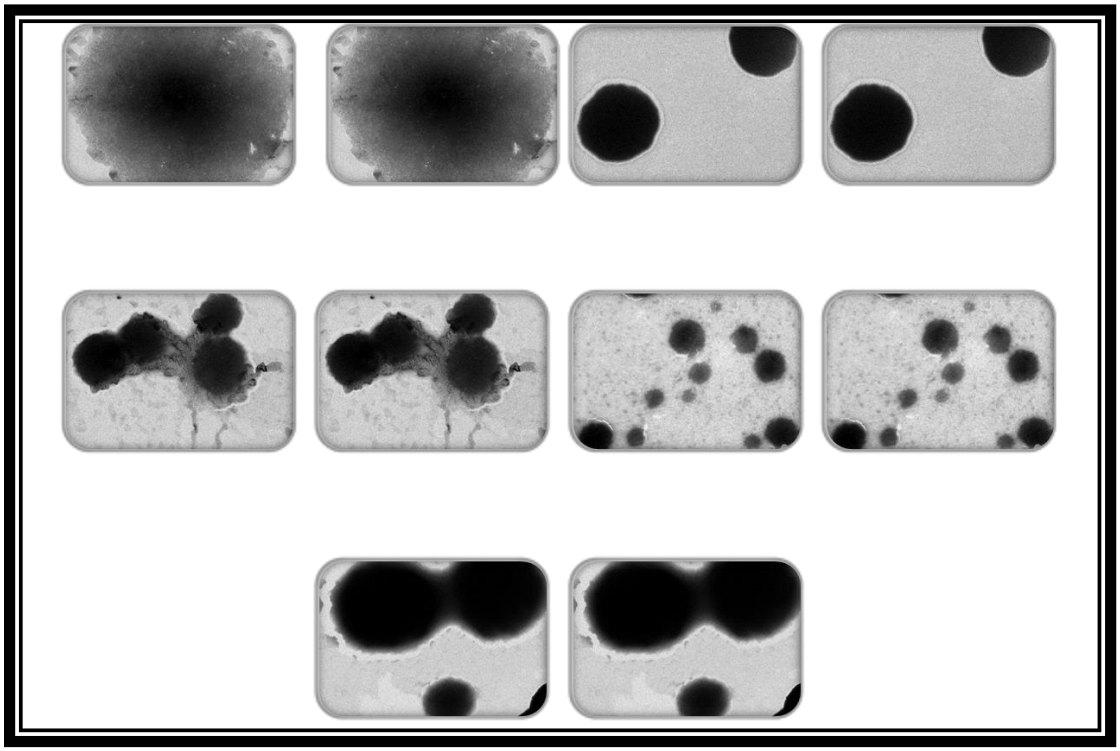
Şekil 5.28. pDNA/DPPC(ULV)/Ag nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (CTEM) görüntüsü.



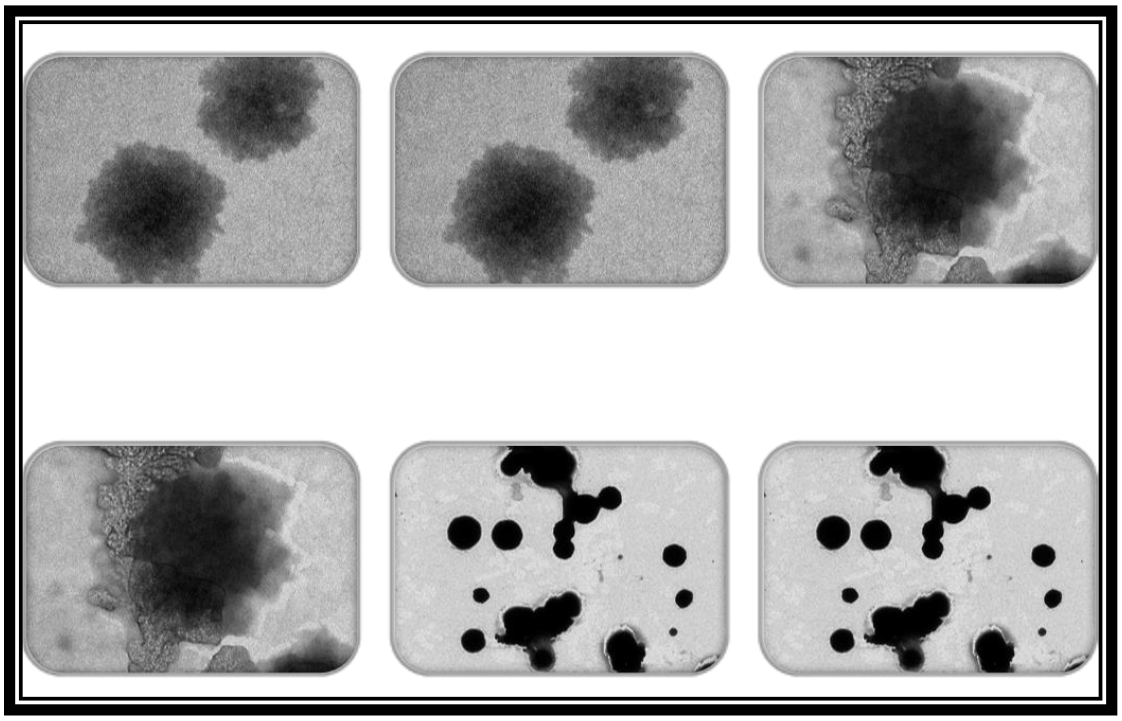
Şekil 5.29. pDNA/DPPC(ULV)/Mg^{+2}/Ag nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (CTEM) görüntüsü.



Şekil 5.30. DPPC (MLV) örneklerinin taramalı elektron mikroskobu (CTEM) görüntüsü.



Şekil 5.31. pDNA/DPPC (MLV) örneklerinin taramalı elektron mikroskobu (CTEM) görüntüsü.



Şekil 5.32. pDNA/DPPC(MLV)/Mg^{+2} örneklerinin taramalı elektron mikroskobu (CTEM) görüntüsü.

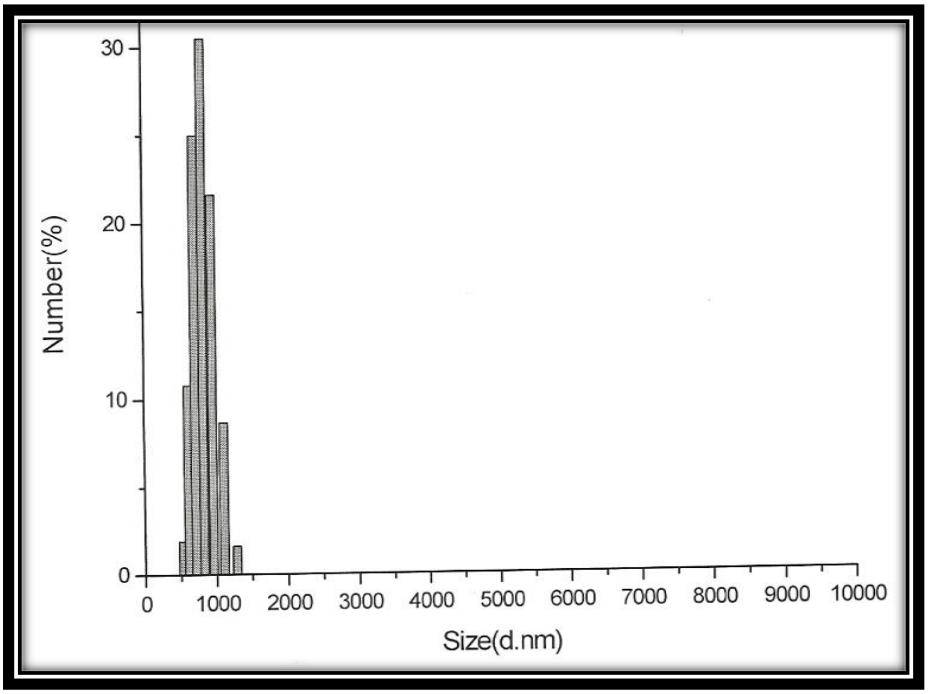
Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin konfokal mikroskopi ile gösterilen bulguları ekte verilmiştir.

5.1.4. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN BOYUT VE POTANSİYEL ANALİZİ SONUÇLARI

Lipit vesikülleri ve oluşturulan üçlü bileşenleri dinamik ışık saçılımı (Dynamic Light Scattering, DLS) ve Z-potansiyel analizi ölçümleriyle boyut ve potansiyel olarak incelenmiştir.

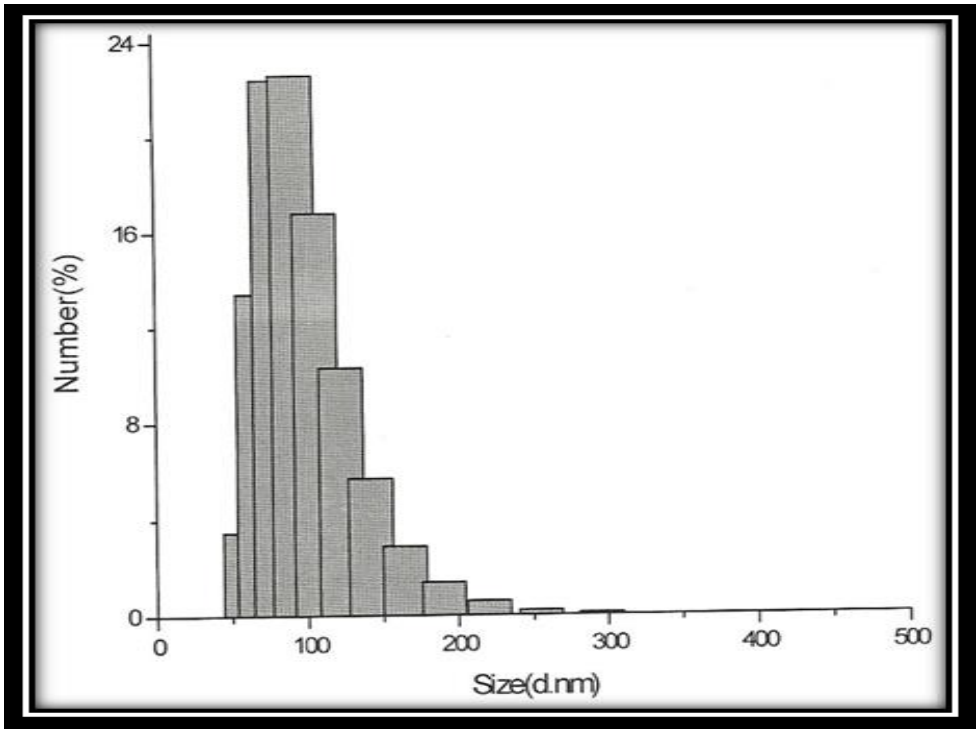
5.1.4.1. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin dinamik ışık saçılımı (Dynamic Light Scattering, DLS) ile incelenmesi sonuçları

Aşağıdaki Şekil 5.33'de MLV yapıları çok sayıda ve farklı boyutlarda bulunmaktadır. Oluşturdukları süspansiyon 250 nm – 1000 nm arasında değişmektedir ve son derece heterojendir.



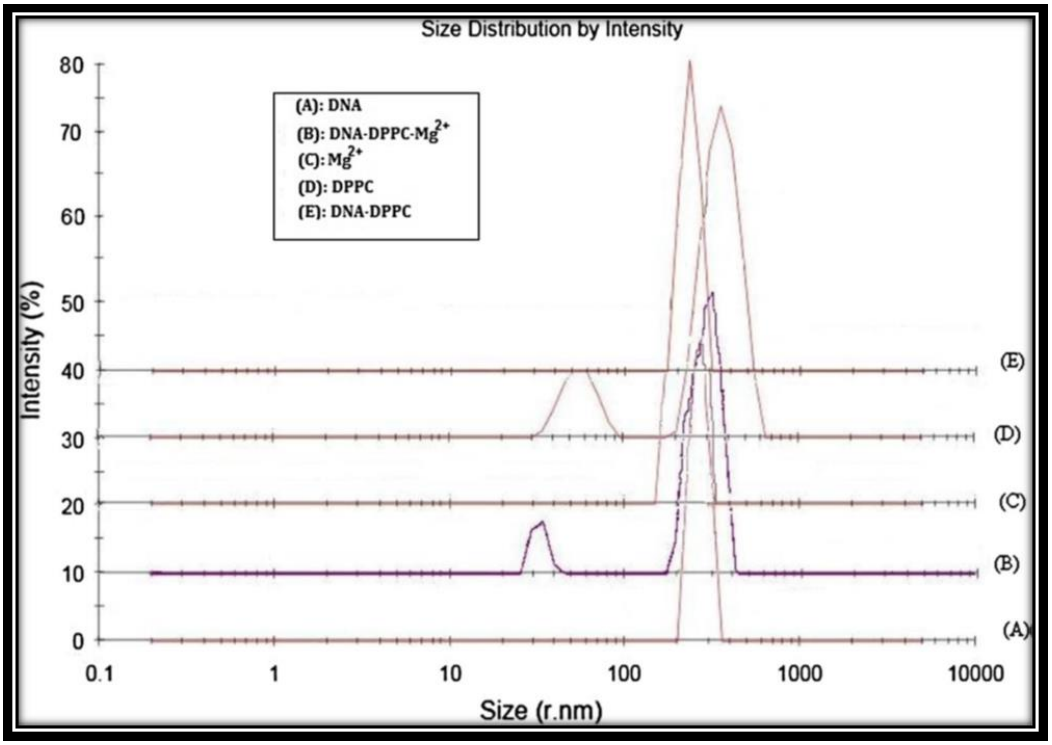
Şekil 5.33. DPPC (MLV) boyut analizi.

Aşağıdaki Şekil 5.34'de ULV'lerin oluşturdukları süspansiyon 50 nm–300 nm arasında değişmektedir ve son derece heterojendir.

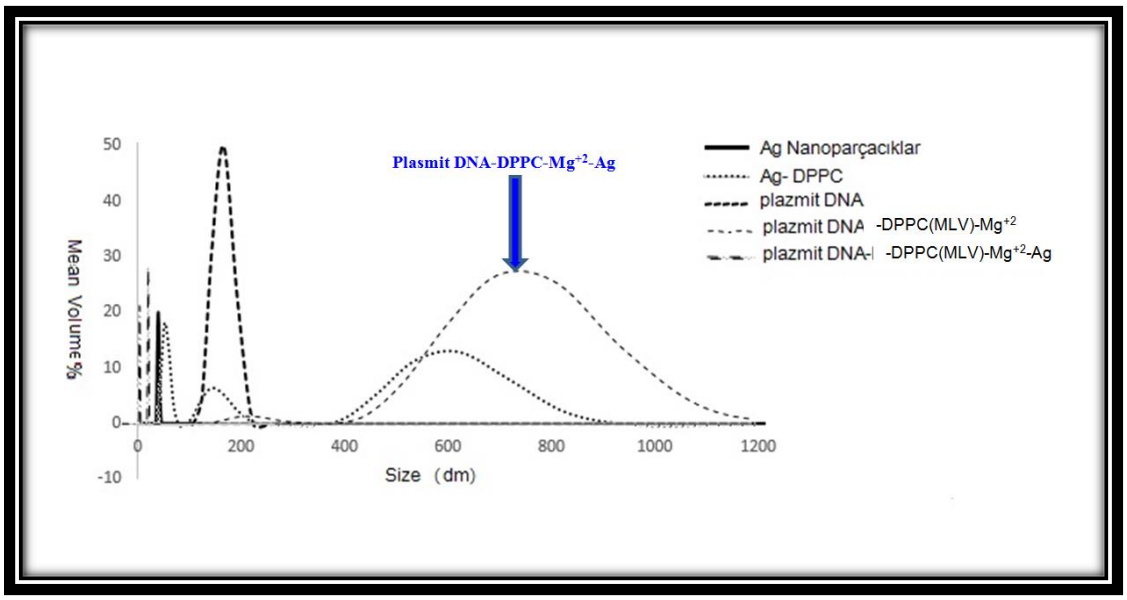


Şekil 5.34. DPPC (ULV) boyut analizi.

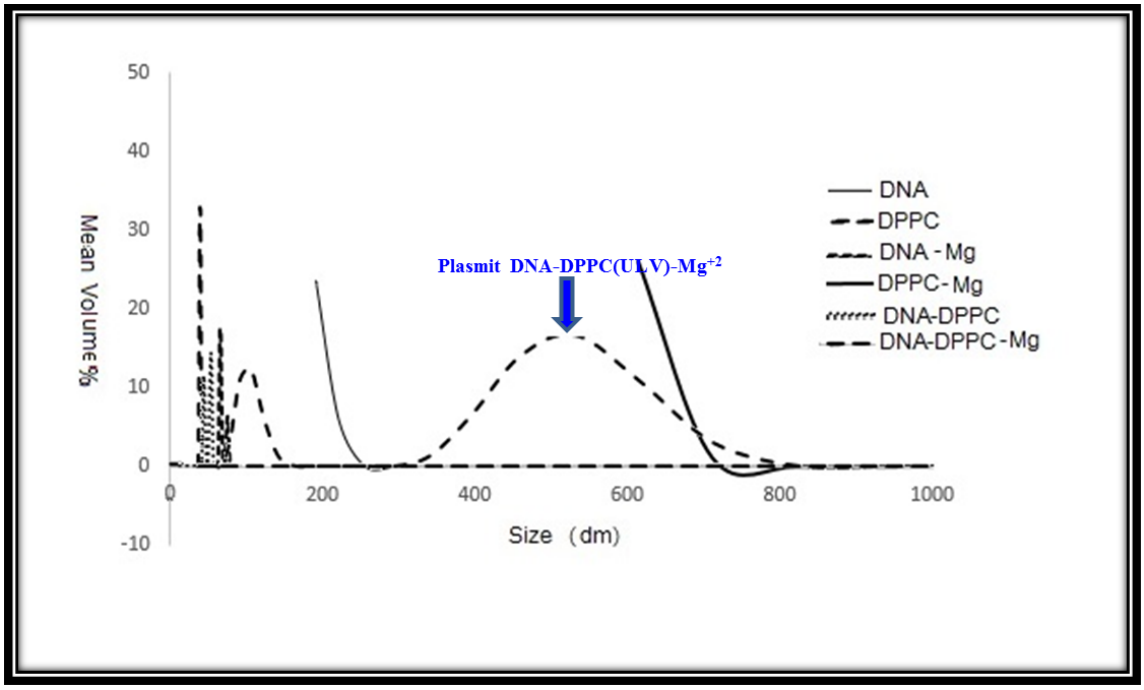
Aşağıdaki Şekil 5.35'de veriler, bağlanmamış ve ligand bağlı ikili ve üçlü kompleks büyüklüğü dağılımları açısından gösterilmiştir. Benzer araştırmalarda önerildiği gibi parçacık büyüklük profilleri, farklı zaman aralıklarında farklı DNA/lipit örnekleri üzerinde yapılan dört ölçümün ortalamasıdır (115). Şekil 5.36'de MLV vesikülleri ve oluşturulan üçlü bileşenleri, Şekil 5.37'da ULV vesikülleri ve oluşturulan üçlü bileşenleri DLS analizi ile gösterilmiştir.



Şekil 5.35. Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü kompleksler oluşturan serbest ve ligand bağlı moleküllerin parçacık boyutu analizi.



Şekil 5.36 MLV lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin DLS analizi ile gösterilmesi.

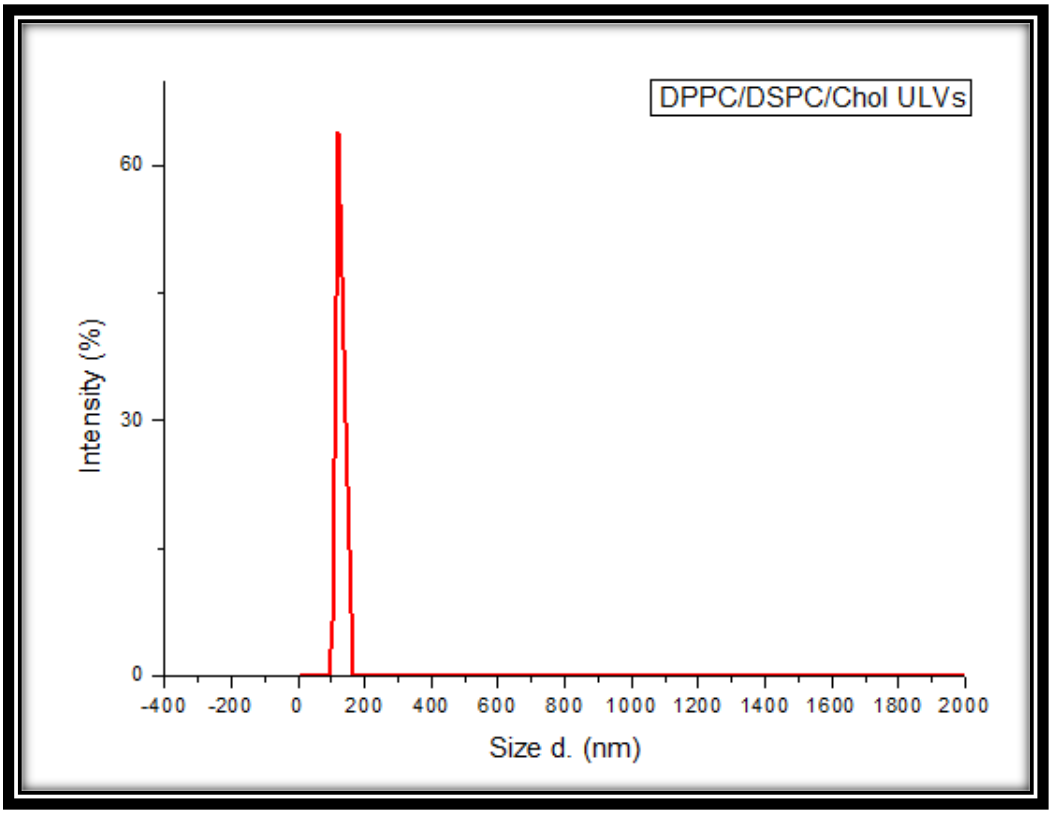


Şekil 5.37. ULV lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin DLS analizi ile gösterilmesi.

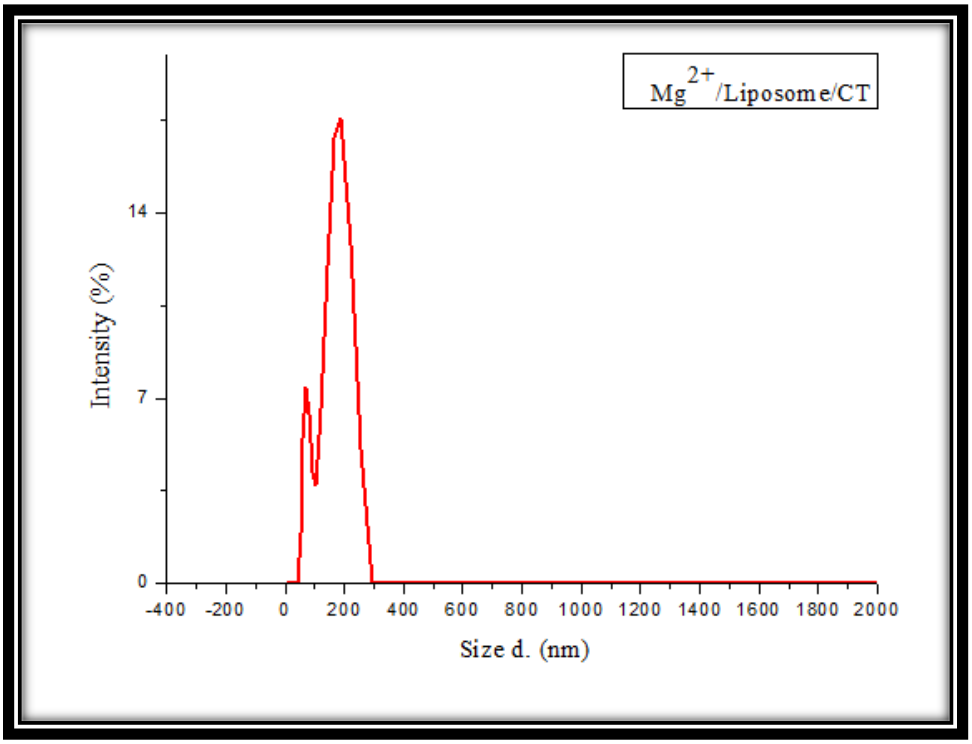
5.1.4.2. Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin Z-potansiyel analizi ile incelenmesi sonuçları

Lipit vesikülleri ve oluşturulan üçlü bileşenleri z-potansiyel analizi ile incelenmiştir. Şekil 5.38'de DPPC/DSPC/Chol karışımında oluşan tek katmanlı veziküllerin (ULV) toplamda 14 defa ölçüm alınmıştır. Ortalama olarak 127.2 nm boyut ölçümü alınarak MLV'lerden ekstruzyon sonrası elde edilen ULV'lerin beklenen boyutta olduğu doğrulanmıştır. Şekil 5.39'de Mg^{+2}/lipozom(ULV)/dana timus DNA üçlü oluşumunun toplam 14 defa ölçümü alınmış, ortalama olarak 175.9 nm boyut ölçümü elde edilmesi üçlü toplaşımın bir arada olduğunu göstermiştir. Şekil 5.40'da Mg^{+2}/lipozom(ULV)/phage T7 DNA üçlü oluşumunun toplam 14 defa ölçümü alınmış, ortalama olarak 149.1 nm boyut ölçümü elde edilmesi üçlü toplaşımın bir arada olduğunu göstermiştir. Şekil 5.41'de DPPC(ULV)/DSPC/Chol karışımından oluşan sistemin 100 nm'deki z-potansiyel dağlımı görülmektedir. Şekil 5.42'de Mg^{+2}/lipozom/phage T7 DNA üçlü oluşumunun bir araya geldiği 175 nm'deki z-potansiyel dağlımı ile görülmektedir. Şekil 5.43'de Mg^{+2}/lipozom/dana timus DNA üçlü oluşumunun bir araya geldiği 145 nm'deki z-potansiyel dağılımı ile görülmektedir. Şekil 5.44'de MLV'lerin büyüklüğü Zeta potansiyel ölçümlerinde ortalama 749.3 nm olarak belirlenmiştir Şekil 5.45'de DPPC(ULV)

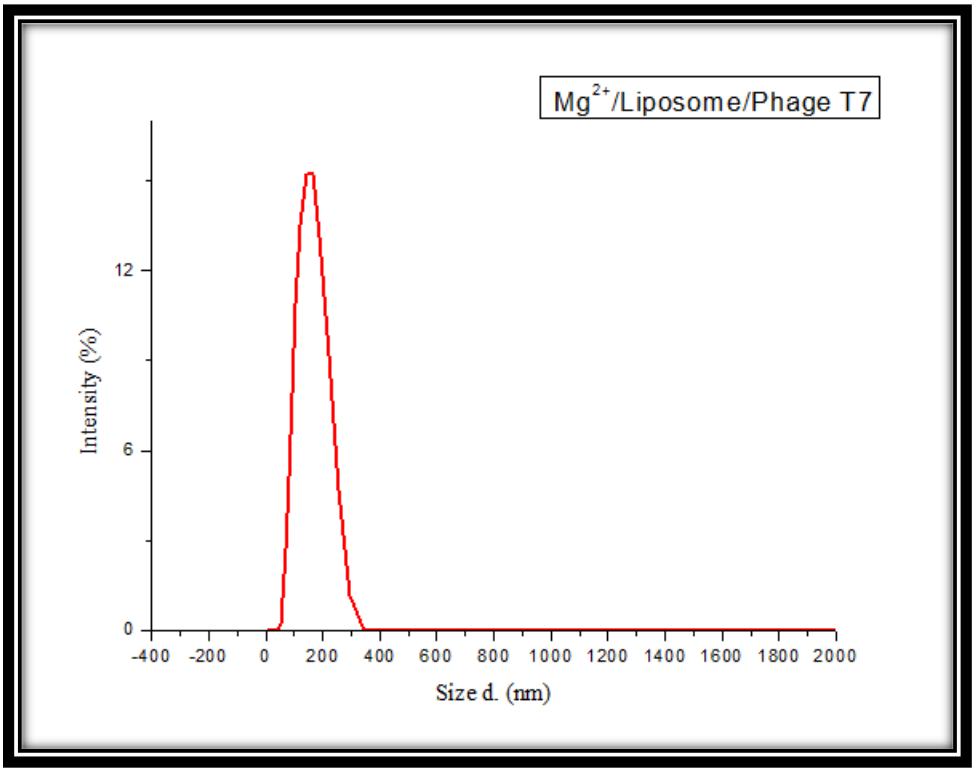
lipozomların boyut dağılımı, toplam 10 defa ölçüm alınarak ortalama 100 nm olarak z-potansiyel dağılımı ile belirlenmiştir.Şekil 5.46'de 1 hafta bekletilen DPPC(ULV) lipozomların boyut potansiyel dağılımı, toplam 10 defa ölçüm alınarak oratalama 266 nm olarak z-potansiyel dağılımı ile belirlenmiştir. Bu durum zamanla lipit vesiküllerindeki boyut değişimini doğrulamıştır.



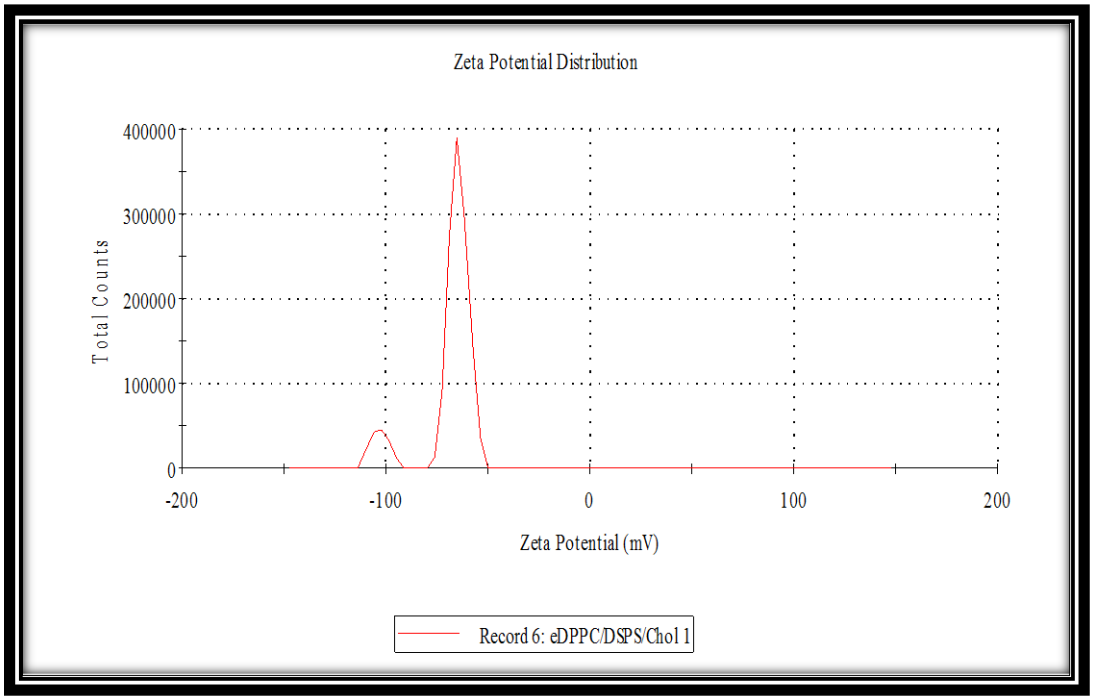
Şekil 5.38. DPPC/DSPC/Chol karışımında oluşan tek katmanlı veziküllerin (ULV) z-boyut dağılımlarının gösterilmesi.



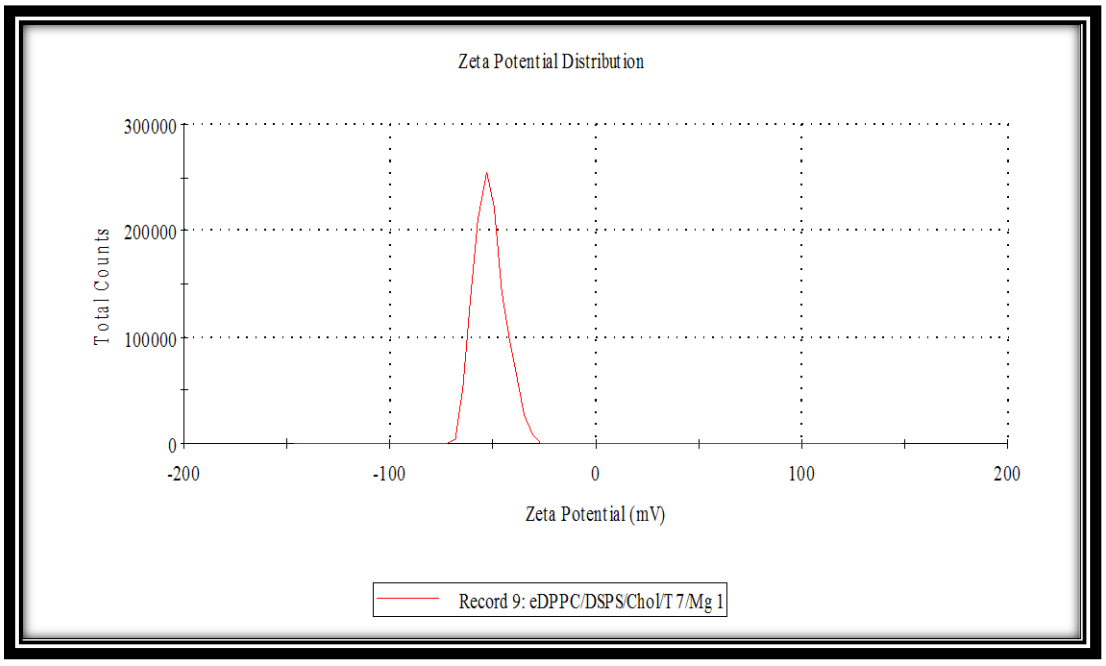
Şekil 5.39. Mg^{+2}/lipozom/dana timus DNA üçlü oluşumun zeta-boyut dağılımının gösterilmesi.



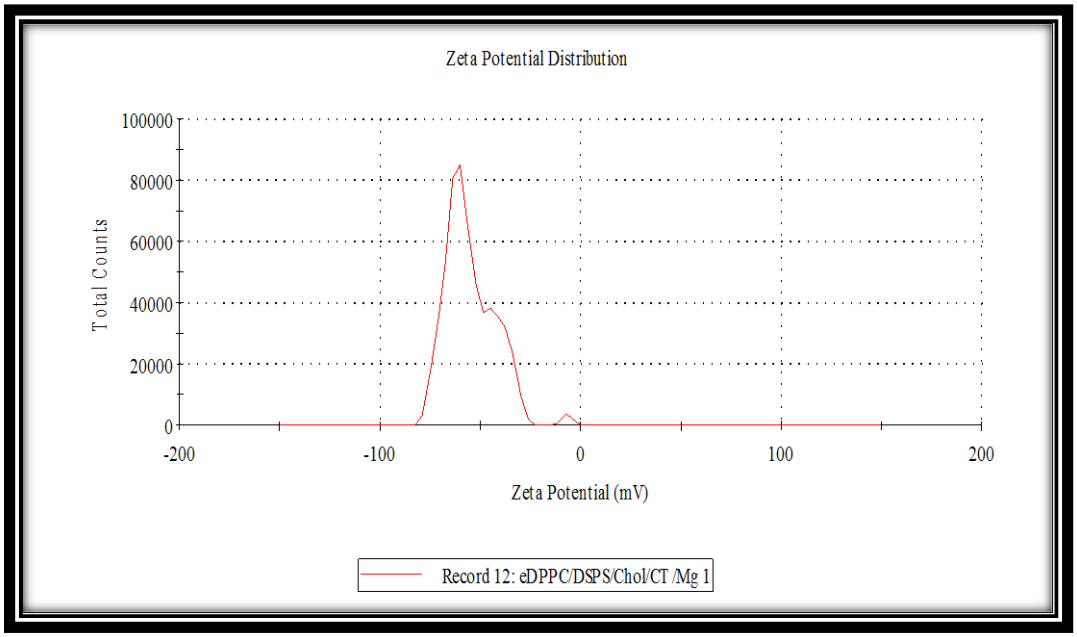
Şekil 5.40. Mg^{+2}/lipozom/phage T7 DNA üçlü oluşumunun z-boyut dağlımının gösterilmesi.



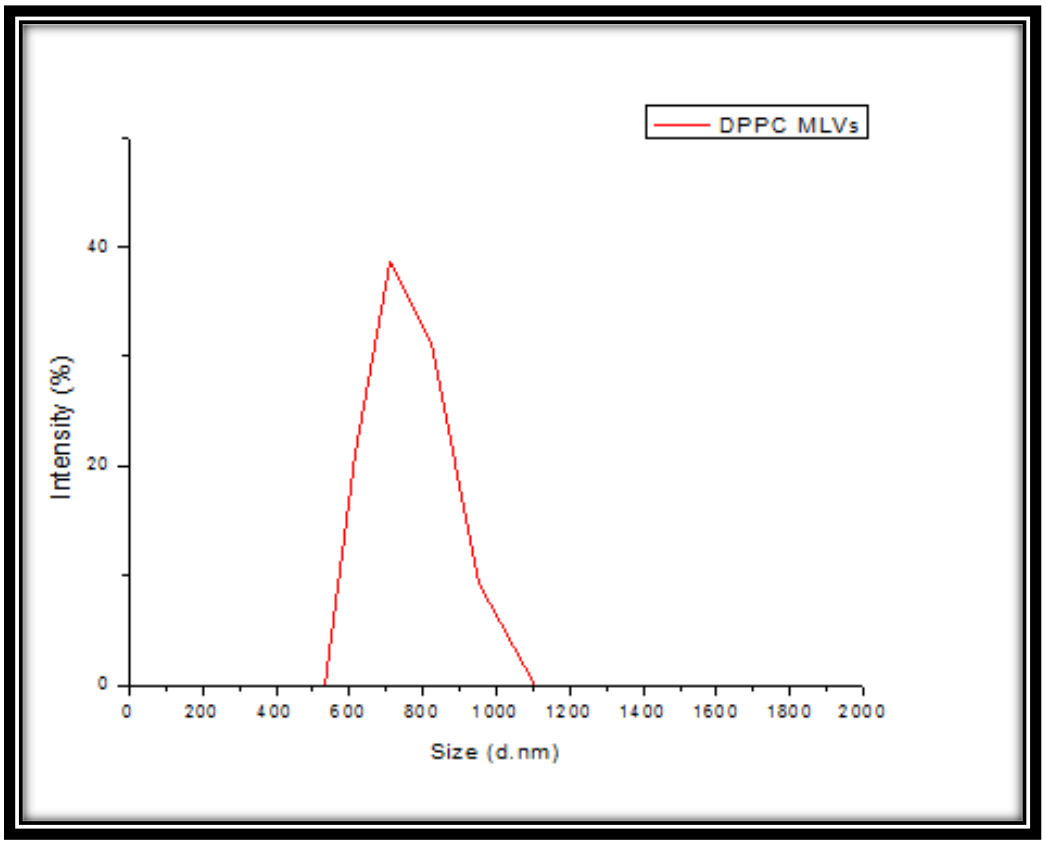
Şekil 5.41. DPPC(ULV)/DSPC/Chol karışımından oluşan sistemin z-potansiyel dağlımının gösterilmesi.



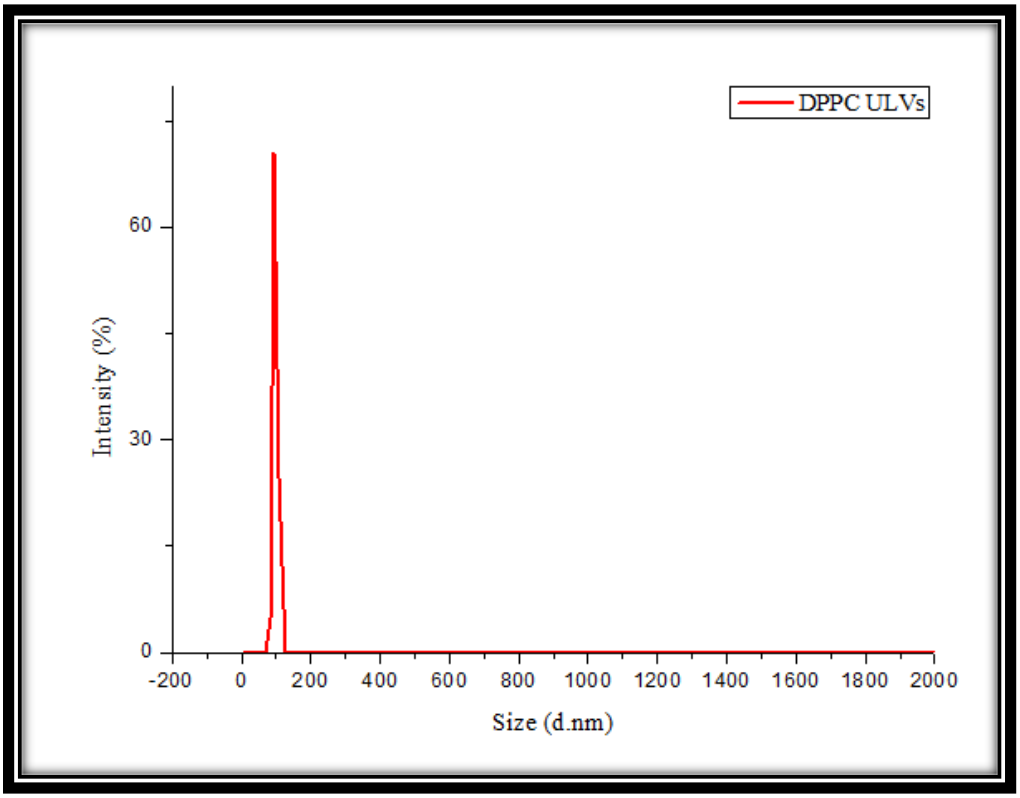
Şekil 5.42. Mg^{+2}/lipozom/phage T7 DNA üçlü oluşumunun z-potansiyel dağlımının gösterilmesi.



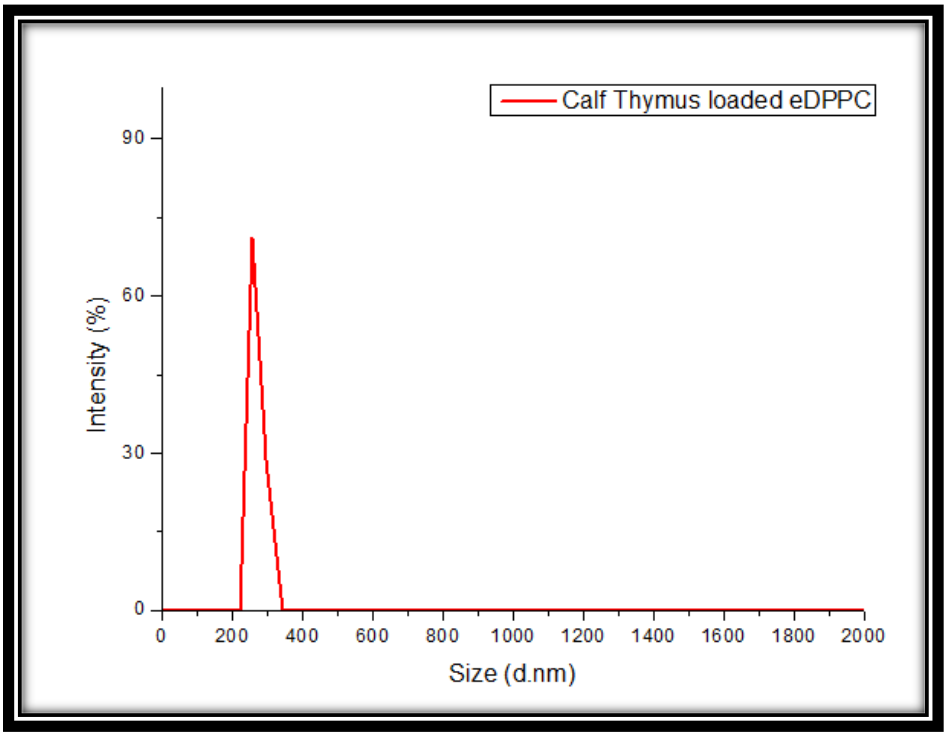
Şekil 5.43. Mg^{+2}/lipozom/dana timus DNA üçlü oluşumunun z-potansiyel dağılımının gösterilmesi.



Şekil 5.44. DPPC(MLV) Zeta potansiyel ölçümlerinin gösterilmesi.



Şekil 5.45. DPPC(ULV) lipozomların boyut dağılımının gösterilmesi.

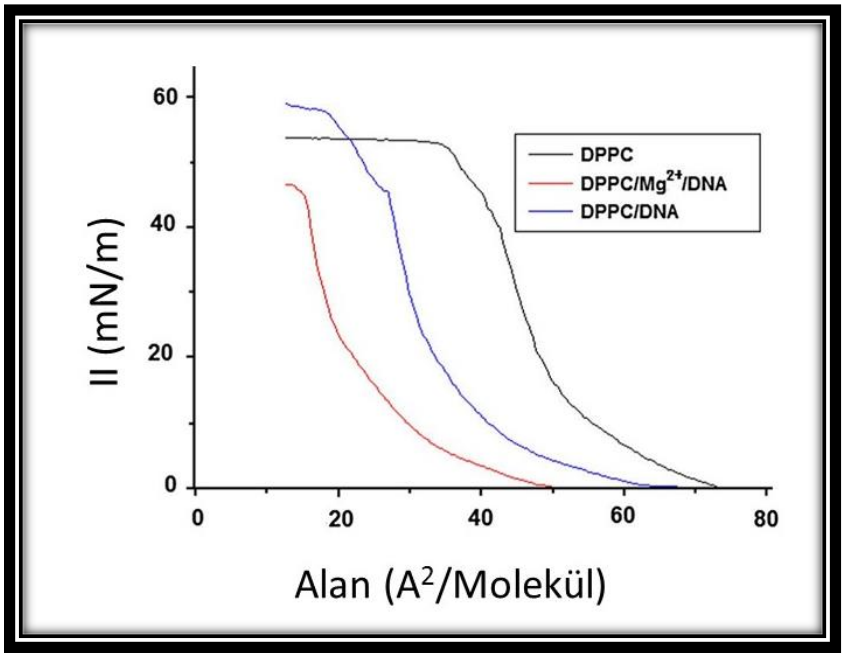


Şekil 5.46. 1 hafta bekletilen DPPC(ULV) lipozomların boyut dağılımının gösterilmesi.

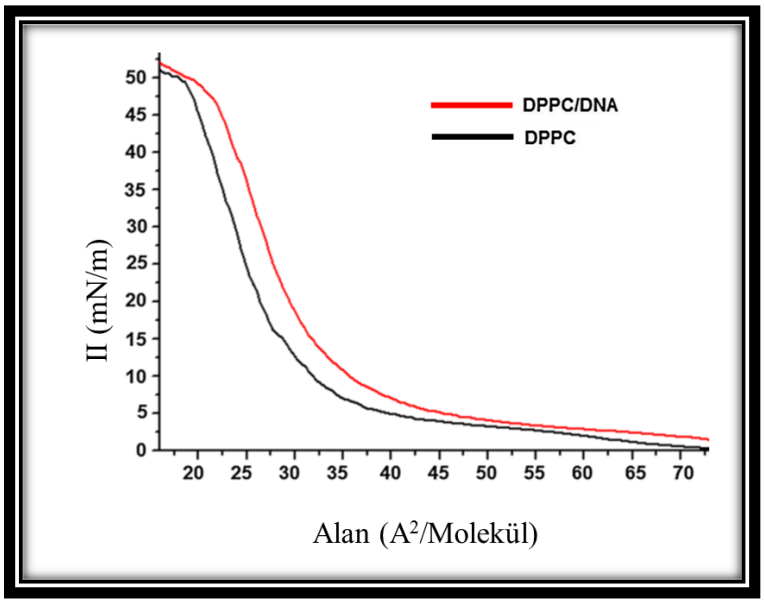
5.1.4.3. Nükleik asit-fosfolipit ara yüzeylerinin Langmuir-Blodgett film yöntemiyle incelenmesi bulguları

Monomoleküler katmanların (tek katmanların=monolayer) incelenmesi, biyolojik zarlarda yer alan bileşiklerin işlevleri hakkında, yapı-aktivite bilgilerini verdiği gibi, tek katman yüzeysel basıncı, incelenmekte olan molekülün lipit tek katmanda işgal ettiği moleküler alanı, bu moleküler alanın yüzeysel basınç üzerindeki etkisi hakkında da bilgiler vermektedir. Bu düzenek böylece molekülün biyomembran yüzeyinde ve hacminde nasıl paketlendiği konusunda da bilgiler vermektedir. Bu yaklaşım böylece, yeni farmakolojik formülasyon-biyomembran etkileşmelerinin yeni modellerinin de geliştirilmesine de katkıda bulunmaktadır. Membran ortamında başka maddelerle karışım içinde bulunan bileşiklerin karışımdaki tek tek özelliklerini, sterokimyasını ve etkileşme enerjilerini, suda çözünen bileşiklerin lipitlere karşı gösterdikleri afinitelerini de ortaya çıkarmak mümkündür. Tek katman yöntemi çok katman odaklı (oriented multilayers) sistemlerin, içeriği ve topolojisi önceden belirlenen membran sistemlerinin oluşumunun temelini oluşturmaktadır. Langmuir-Blodgett yüzey basınç ölçümleri hücre zarı lipitlerini modelleyen Dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) ile model nükleik asitler arasında oluşan 2 boyutlu kendi kendine toplaşımların (self-assembly) yapıların karakterizasyonu amacıyla uygulanmıştır.

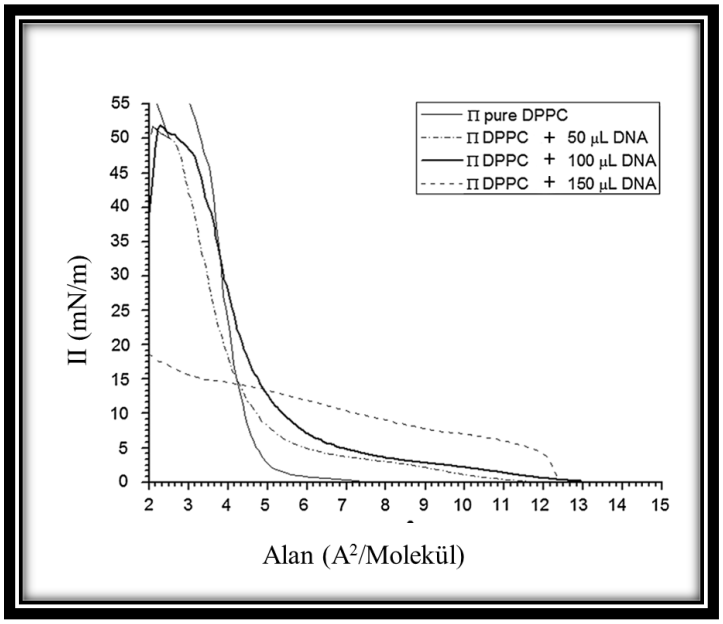
Wilhemy plate'e dayalı yüzey gerilim ölçüm sistemini kullanarak Langmuir-Blodgett düzeneği üzerinde bu üçlü bileşiklerin meydana getirilmesi Şekil 5.47-Şekil 5.58'de gösterilmiştir. DPPC ve T7 faj DNA ile ikili karışım ve Mg^{+2} ile oluşan üçlü komplekslerin yüzey basınç alanı (p-A) bağlanmamış izotermleri görülmektedir.



Şekil 5.47. Langmuir-Blodgett düzeneği üzerinde bu üçlü bileşiklerin (DNA/Lipit/Mg^{+2}) meydana getirilmesi



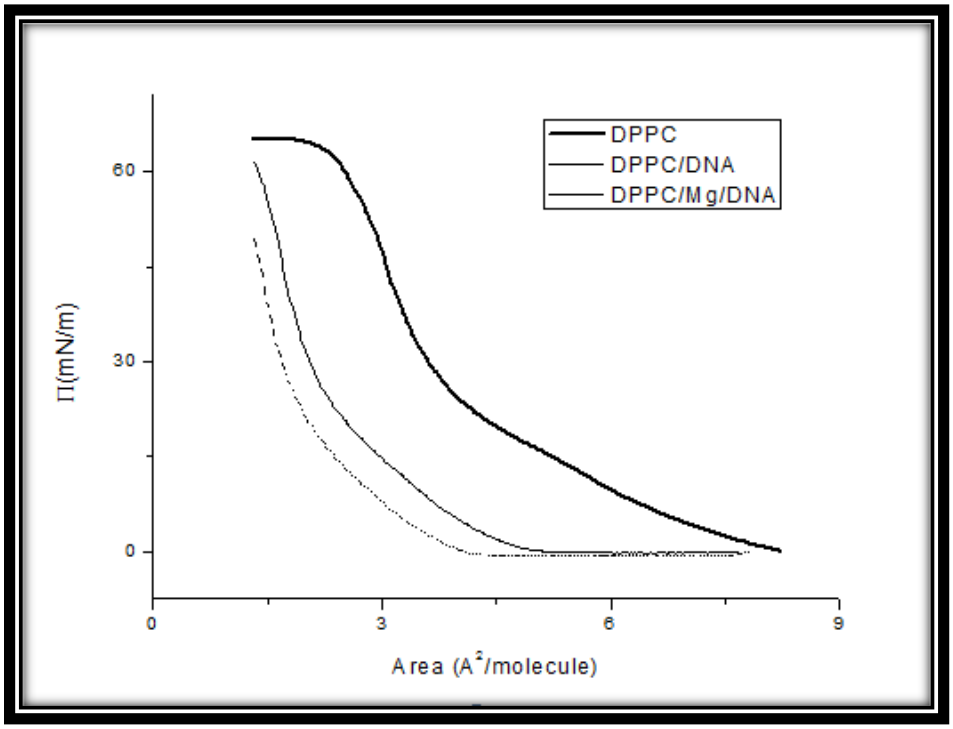
Şekil 5.48. DPPC ve dana timus DNA ile ikili kompleksin Langmuir-Blodgett ile elde edilen yüzey basıncı alan izotermleri.



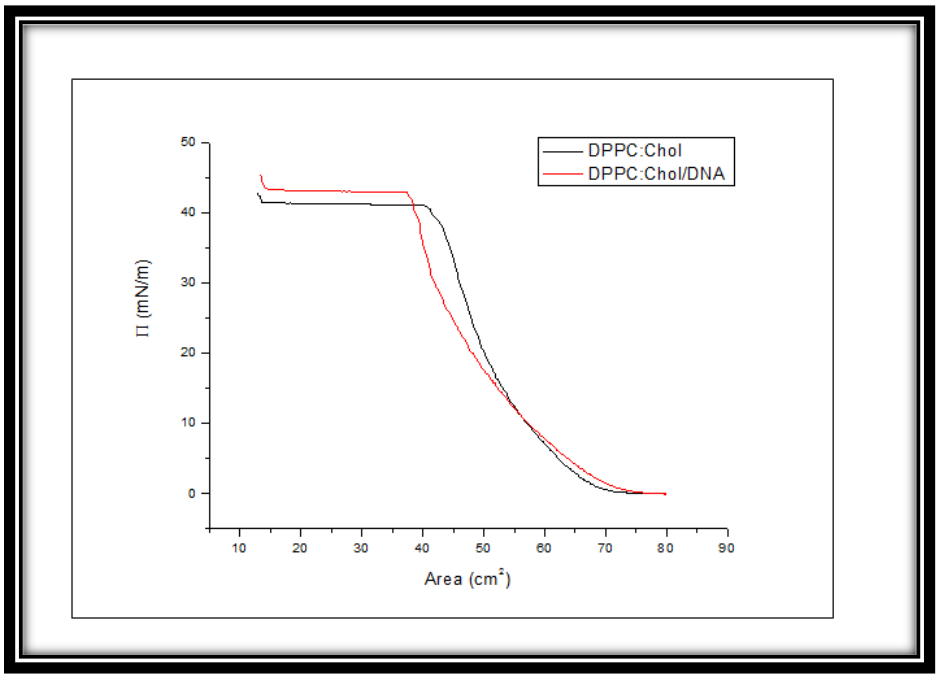
Şekil 5.49. Lipit /DNA, Langmuir-Blodgett ile elde edilen yüzey basınç alanı izotermleri.

Langmuir-Blodgett (Langmuir-Blodgett The Science Park, Coventry CV4 7EZ, İngiltere; Model 112D) film oluşturulması ve yüzey basınç ölçümleri şu şekilde gerçekleştirilmiştir; üzerine teflondan üretilmiş olan bariyerler monte edilerek izotermler çekilmiştir. Yüzey basınç (P) Wilhelmy yöntemi ile ölçülmüştür. Konteyner ultra saf su ile doldurulmuş ve üzerine önceden belirlenen derişimlerde sırasıyla fosfolipit ve nükleik asit çözeltileri istenilen oranlarda damlatılmıştır. Tüm ölçümler 35°C kontrollü olarak gerçekleştirilmiştir. Tek katmanların yüzeysel temizliği kriteri olarak bariyer testi uygulayarak 3 ayrı tekrardan elde edilen izotermler arasındaki farkın ±0.1 mN/m'den daha fazla olmamasına dayanmaktadır.

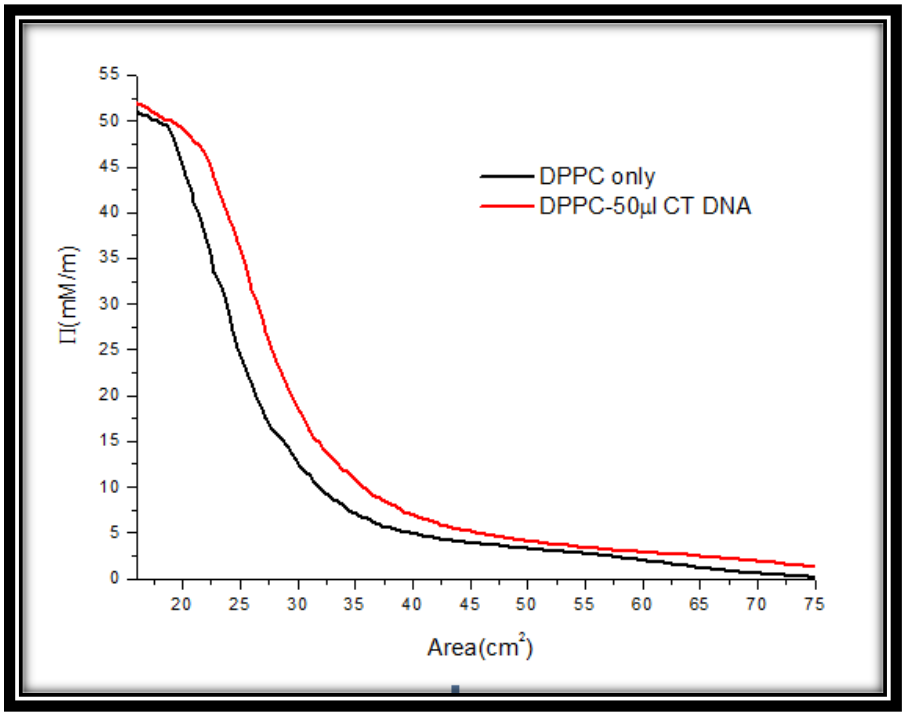
DPPC filmler 50 μl önceden hazırlanan orandaki lipit stok çözeltiden (1 mg/ml $CHCl_3$) hava/su arayüzeye (air/water interface) damlatılarak hazırlanmıştır. Kloroformun buharlaşmasından (yaklaşık 20 dk) sonra lipit filmi yavaşça sıkıştırılmıştır ve aşağıda gösterilen lateral basınç seviyesi elde edilmiştir. DNA bağlanma ölçümleri için, DNA dispersiyonu saf suda elde edilmiş olup, (1.50 mg/ml) 50 μl olarak lipit tek katman üzerine damlatılmıştır. Ara faz nominal rezistansı 18.0 MΩ.cm'ne sahip ultra saf su (pH 5.5) ile elde edilmiştir. 50,100 ve 150 uL hacim/ml ile 0.5 mg/ml DNA, sıkıştırılmış DPPC tek tabaka altına enjekte edilmiştir. Deneyler kontrollü ortamda 22±1°C'de gerçekleştirilmiştir. Kullanılan lipit derişimi; 1.5 mg/mL (kloroform ile hazırlanmıştır)'dir.



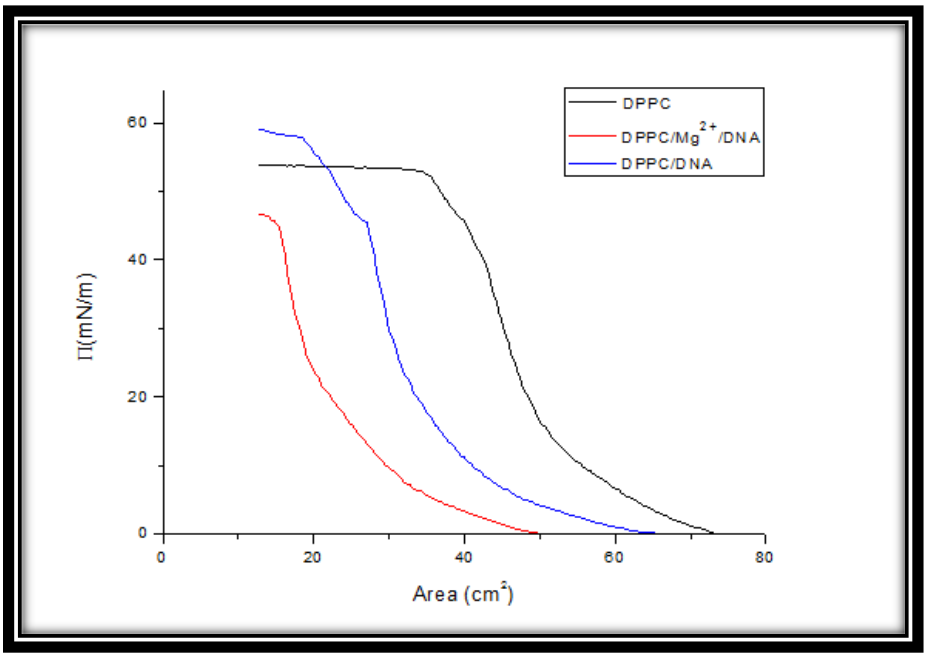
Şekil 5.50. Hava/su ara yüzeylerde oluşturulan DPPC ve DPPC/dana timus DNA/Mg^{+2} tek katmanların π-A izotermleri.



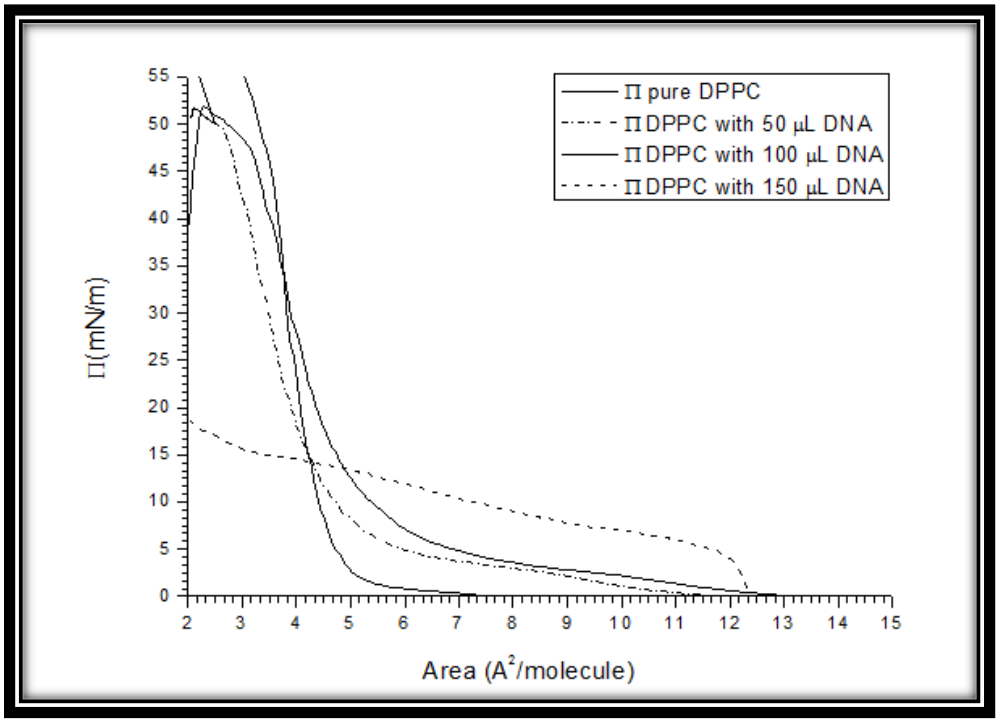
Şekil 5.51. Hava/su ara yüzeylerde oluşturulan DPPC/kolesterol ve DPPC/Kolesterol/ DNA tek katmanların π-A izotermleri.



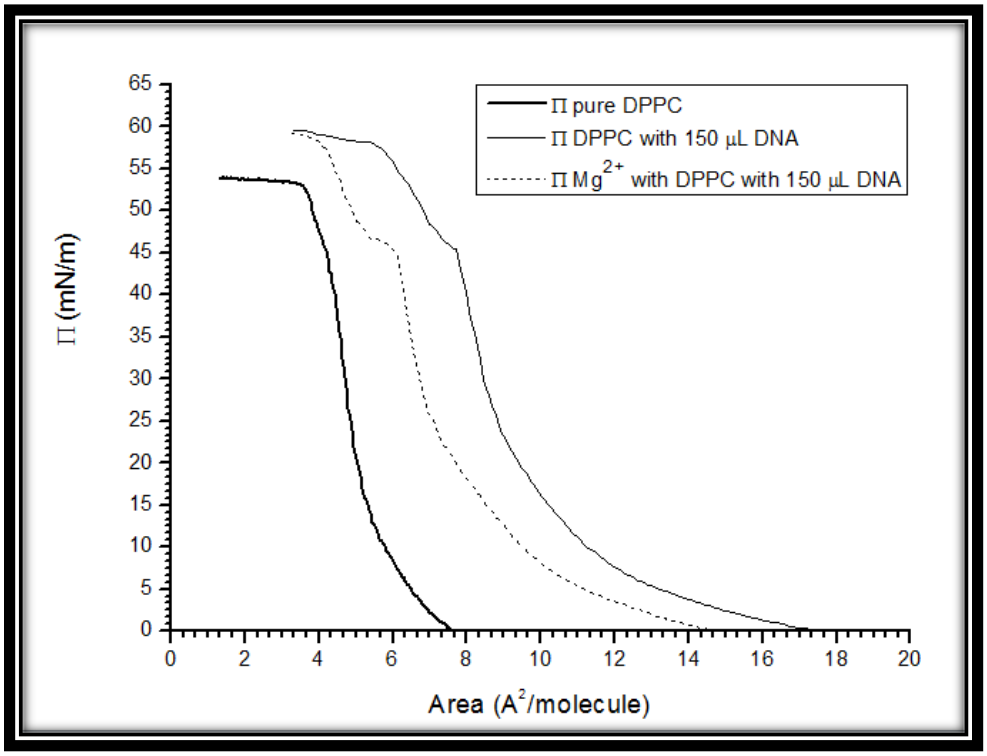
Şekil 5.52. Hava/su (air/water interphase) ara yüzeylerde oluşturulan DPPC ve DPPC/dana timus DNA/ tek katmanların π-A izotermleri.



Şekil 5.53. Hava/su ara yüzeylerde oluşturulan DPPC; DPPC/DNA ikili bileşik ve DPPC/dana timus DNA/Mg^{+2} üçlü bileşiklerin tek katmanların π-A izotermleri.

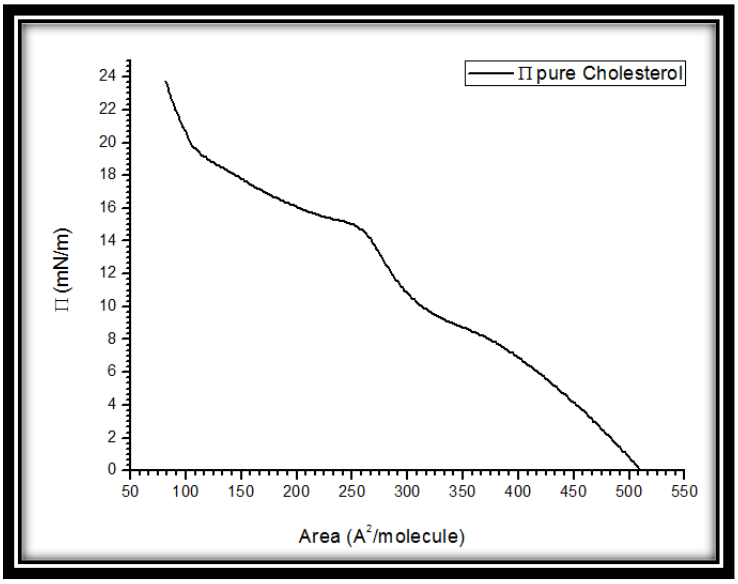


Şekil 5.54. Hava/su ara yüzeylerde oluşturulan saf ve ligandla bağlanmamış DPPC ve DPPC/dana timus DNA ikili bileşiklerin π-A izotermleri.

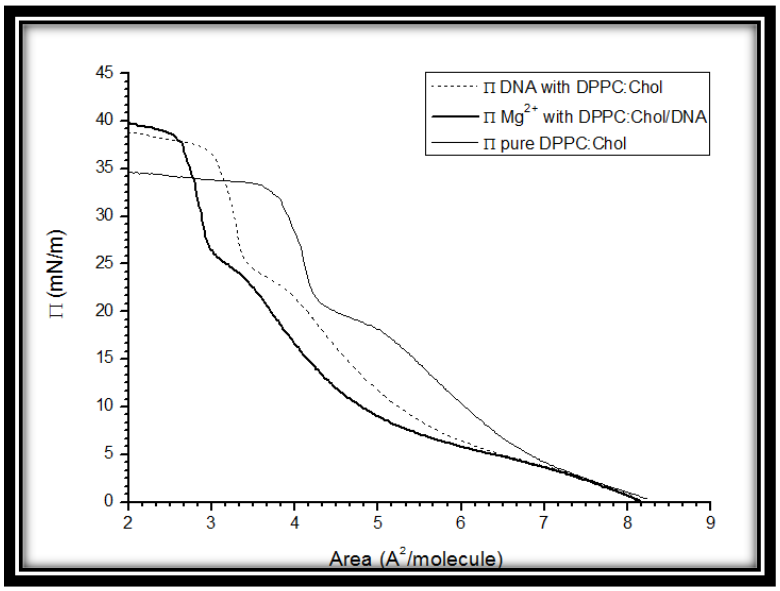


Şekil 5.55. Hava/su ara yüzeylerde oluşturulan saf ve ligandla bağlanmamış DPPC ve DPPC/dana timus DNA ikili bileşiklerin ve Mg^{+2}/DPPC/DNA üçlü bileşiklerin π-A izotermleri.

150 µL 0.5 mg/ml DNA önceden oluşturulan DPPC tek katman üzerine damlatılmıştır. Daha sonra, 150 µL, 0.1 mg/mL $MgCl_2$ bu ikili karışıma uygulanmıştır. Deneyler kontrollü ortamda 22±1°C'de gerçekleştirilmiştir. Kullanılan lipit (DPPC) derişimi; 0.1 mg/mL/kloroform'dur. Kullanılan çift valanslı metal iyon ($MgCl_2$) derişimi; 0.1 mg/mL(ultrsaf su)'dir.



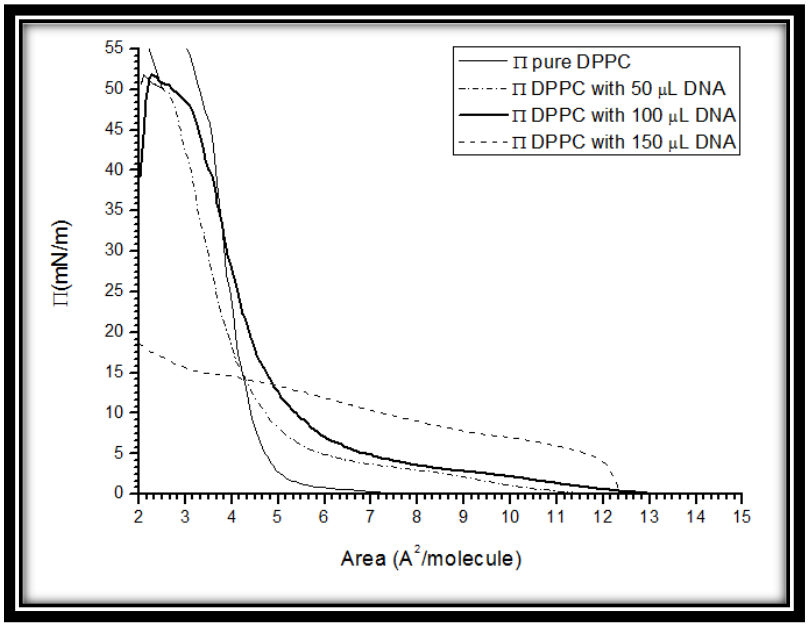
Şekil 5.56. Hava/su ara yüzeylerde oluşturulan kolesterol tek katmanın π-A izotermi.



Şekil 5.57. Hava/su ara yüzeylerde oluşturulan DPPC/Kolesterol, DPPC/Kolesterol/DNA ve Mg^{+2}/DPPC:Chol/DNA ara yüzey izotermleri.

Şekil 5.57 ve Şekil 5.58'de görülen ölçümlerde farklı derişimlerin ve farklı tampon sistemin etkileri incelenmiştir. HEPES tampon (pH 5.5) kullanılmıştır. 50,100 ve 150 µL

0.5 mg/ml DNA (HEPES Tampon) DPPC tek katmanın altından enjekte edilmiştir. Deneyler kontrollü ortamda 22±1°C'de gerçekleştirilmiştir. Ara faz nominal rezistansı 18.0 MΩ.cm'ne sahip ultra saf su (pH 5.5) ile elde edilerek kullanılmıştır. Kullanılan lipit (DPPC) derişimi; 0.1 mg/mL/kloroform'dur. Kullanılan çift valanslı metal iyon ($MgCl_2$) derişimi; 0.1 mg/mL(HEPES tampon)'dir.



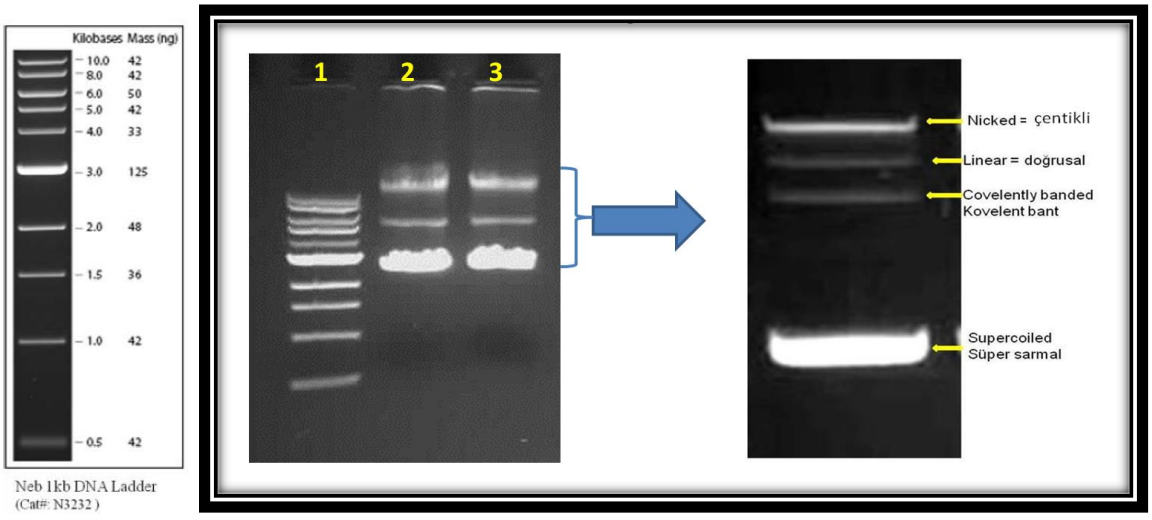
Şekil 5.58. Hava/su ara yüzeylerde DPPC/dana timus DNA ikili bileşiklerin π-A izotermleri.

Lipit tek katmanlarının izoterm eğrilerinde yüzey sınırında yer alan moleküllerinin oriyentasyonlarındaki değişikliklerin göstergesi olan yapısal farklılıkları da görmek mümkündür. Uzun hidrokarbon zincirin ucunda iki hidrofil grubu içeren moleküller için örneğin floresan işareti olarak yoğun kullanılan 16 (9-antroiloksi)-palmitik asidin durumunda olduğu gibi, bu lipit ile oluşturulan tek katmanın kondanze olmasıyla, ölçülen izoterm eğrisinin türevinin (slope, eğiminin) de değiştiği bilinmektedir. Söz konusu değişiklik, oluşan yüzey sınırında bu işaretin hidrofil gruplarından biri olan COOH grubunun yer değiştirmesi ve tüm molekülün tek katmandaki konformasyonunun hareketliliği ile açıklanmaktadır. Yüzey basıncın düşük olduğu durumlarda, bu molekül yüzey sınırında su ile en uçtaki COOH grubunun ve antranil döngüsüne komşu olan CO grubuna temas yapacak şekilde yerleşir. Bu yaklaşım, özellikle Langmuir-Blodgett tek katman ve floresan mikroskopik araştırmalarında yoğun olarak uygulanmaktadır.

Yukarıdaki Şekil 5.47-Şekil 5.58'de görüldüğü gibi Poisson-Boltzman ve Gibbs teorileri doğrultusunda negatif yüklü nükleik asitler önceden oluşturumuş DPPC lipit tek katmanları üzerine ve altına hidrofobik güçler tarafından yerleşmektedir. Söz konusu ikili oluşumların işgal ettiği alan 55 A^2/molekül'dür. Söz konusu oluşumlarda elektrostatik güçlerin bir rolü yoktur. Ancak üçlü DPPC/Mg^{+2}/DNA yüzey yapılarının oluşturulmasında elektrostatik güçler rol oynamaktadır. Yük taşımayan DPPC molekülleri üzerinde hidrofobik güçlerce yerleştirilen negatif yüklü nükleik asitler Mg^{+2} katyonları sayesinde elektrostatik olarak da çok daha sabit üçlü sistemi oluşturmaktadır. Bu üçlü bileşiklerinin işgal ettiği alan 75 A^2/molekül'dür. Sisteme kolesterolün etkisi de incelenmiştir. Doğal hayvan hücrelerinin biyolojik zarlarının bir parçası olarak bu tür incelemelerde kolesterolün katılması önemlidir. Kolesterol molekülünün elektrostatik yükü zwitteriyoniklere yaklaştığı için yükünden ziyade sahip olduğu hacmiyle sisteme etki etmektedir. Biyolojik membranların akışkanlığını düzenleyen bir bileşen olarak ele alınan sisteme kolesterol katıldığında çok hacimli bir molekül olarak üçlü sistemin işgal ettiği moleküler alan daha da artmaktadır. Bu ölçümler sayesinde ele alınan biyomakromoleküller arasında kendi kendine toplaşım (self-assembly) oluştuğu gösterilmiştir.

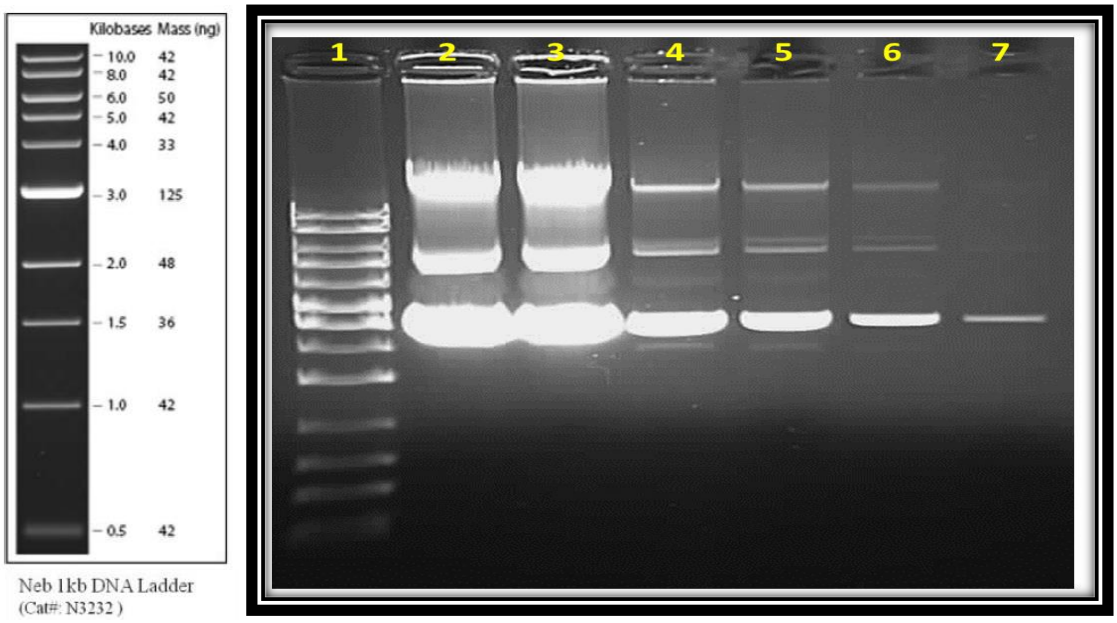
5.1.5. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ SONUÇLARI

Aşağıdaki Şekil 5.59'de PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sının agaroz jel elektroforezindeki bant yapıları gösterilmiştir. 1.kuyu;1 kb ladder, 2.kuyu; 0,5µg/5µl, 3.kuyu; 0,5µg/5µl PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı içermektedir.



Şekil 5.59. 1 kb ladder ve PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sının temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü ve oluşan bantlar.

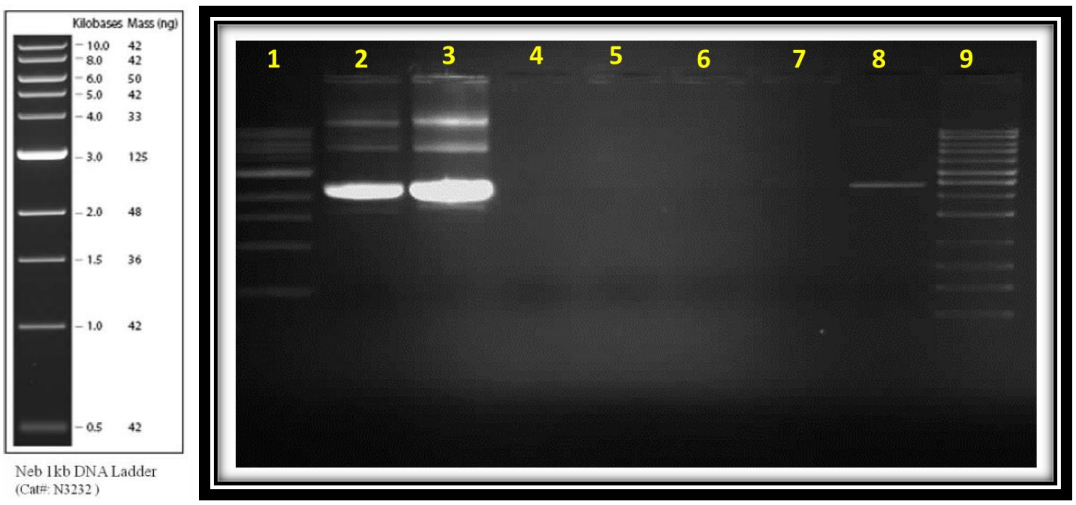
Şekil 5.60'da giderek azalan miktarlarda PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'larının Ag nanopartikül varlığında agaroz jel elektroforezindeki temsili görünürlüğü üzerine etkisi gösterilmiştir. PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA miktarındaki azalmaya bağlı olarak bant kalınlığı azalmıştır. Her bir kuyucuktaki örnek içeriği şu şekildedir; 1.Kuyu;1 kb Ladder (5µl), 2.Kuyu; Pl.DNA(1µg/5µl) + ddH2O (5 µl), 3.Kuyu; Pl.DNA(1µg/5µl) + Ag nanopartikülü (5µl), 4.Kuyu: Pl.DNA(0,1µg/5µl) + Ag nanopartikülü (5µl), 5.Kuyu: Pl.DNA(0,05 µg/5µl) + Ag nanopartikülü (5µl), 6.Kuyu: Pl.DNA(0,02 µg/5µl) + Ag nanopartikülü (5µl), 7.Kuyu: Pl.DNA(0,01µg/5µl) + Ag nanopartikülü (5µl)'dür.



Şekil 5.60. 1-0,1-0,05-0,02-0,01 µg PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'larının, Ag nanopartikül varlığında temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

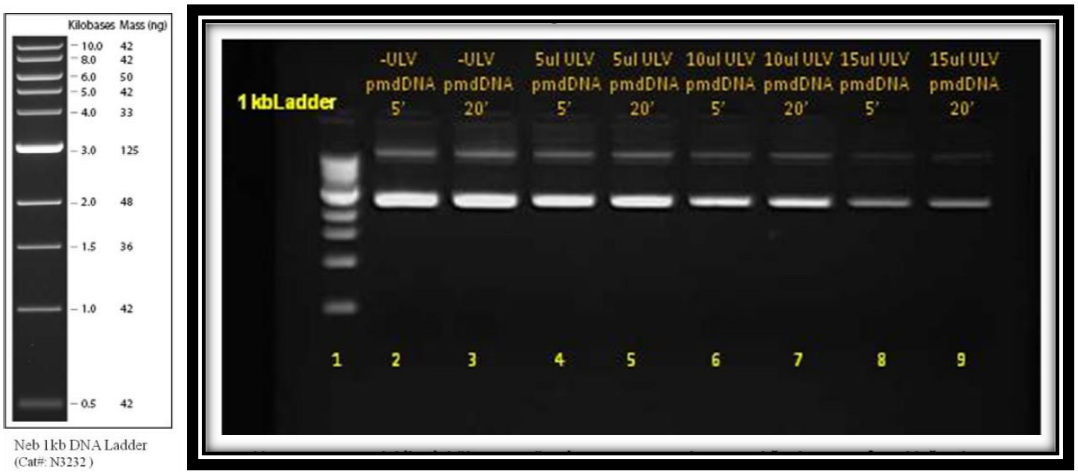
Aşağıdaki Şekil 5.61'de her bir kuyucuktaki örnek içeriği şu şekildedir; 1.Kuyu; 1 kb Ladder (5µl), 2.Kuyu; Pl.DNA(0,25 µg/6µl) + ddH_2O (6 µl), 3.Kuyu; Pl.DNA(0,5 ug/6µl) + ddH_2O (6 µl), 4.Kuyu; Pl.DNA kapsüle edilmiş MLV (1µl) + ddH_2O (11 µl), 5.Kuyu; Pl.DNA kapsüle edilmiş MLV (2µl) + ddH_2O (10 µl), 6.Kuyu; Pl.DNA kapsüle edilmiş MLV (3µl) + ddH_2O (9 µl), 7.Kuyu; Pl.DNA kapsüle edilmiş MLV (4µl) + ddH_2O (8 µl), 8.Kuyu; Pl.DNA kapsüle edilmiş MLV (5µl) + ddH_2O (7 µl), 9.Kuyu; 1 kb Ladder (5µl)'dir. Şekil 5.61'de 4, 5, 6, ve 7. kuyucuklarda kapsülasyondan dolayı bant görülmezken; PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV miktarının

artışına bağlı olarak kapsüle edilen plasmid DNA'sının kapsüle edilemeyen bir kısmının görünür hale gelmesinin agaroz jel elektroforezindeki temsili görüntüsü gösterilmiştir.



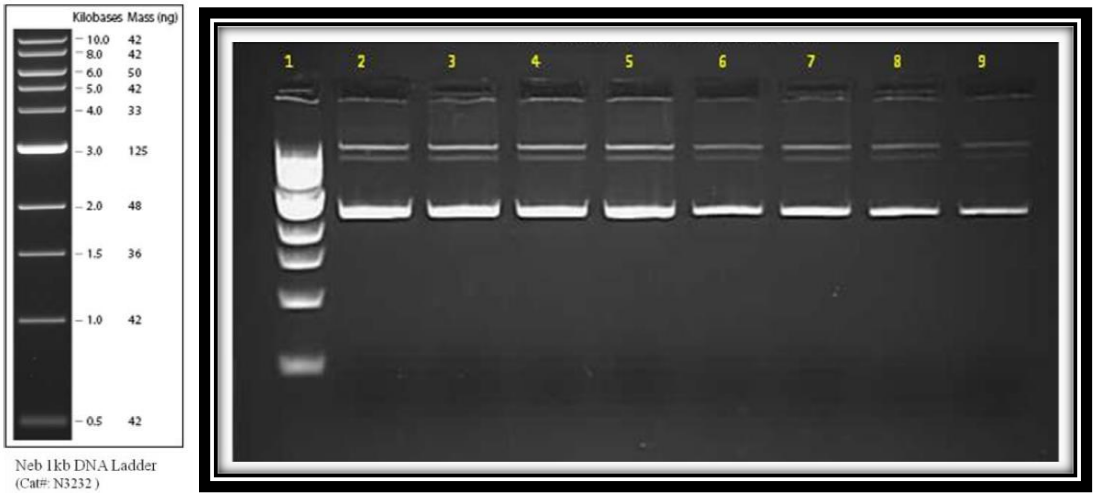
Şekil 5.61. 0,25 µg ve 0,5 µg PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı ve 1-5 µl MLV'lerin temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

Aşağıdaki Şekil 5.62'de PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı miktarı sabit tutularak farklı inkübasyon sürelerinde (5 ve 20 dakika), ULV miktarının arttırılmasıyla plasmid DNA'sının kapsüle olmasına bağlı olarak agaroz jel elektroforezindeki temsili görüntüsünde bant görünürlüğü azalmıştır. Her bir kuyucuktaki örnek içeriği şu şekildedir; 1.Kuyu; 1 kb Ladder (5µl), 2.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5µl) + 5'inkübasyon, 3.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5µl) + 20'inkübasyon, 4.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5µl) + ULV(5 µl) + 5'inkübasyon, 5.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5µl) + ULV(5 µl) + 20'inkübasyon, 6.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5µl) + ULV(10 µl) + 5'inkübasyon, 7.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5µl) + ULV(10 µl) + 20'inkübasyon, 8.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5µl) + ULV(15 µl) + 5'inkübasyon, 9.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5µl) + ULV(15 µl) + 20'inkübasyon örneklerini göstermektedir.



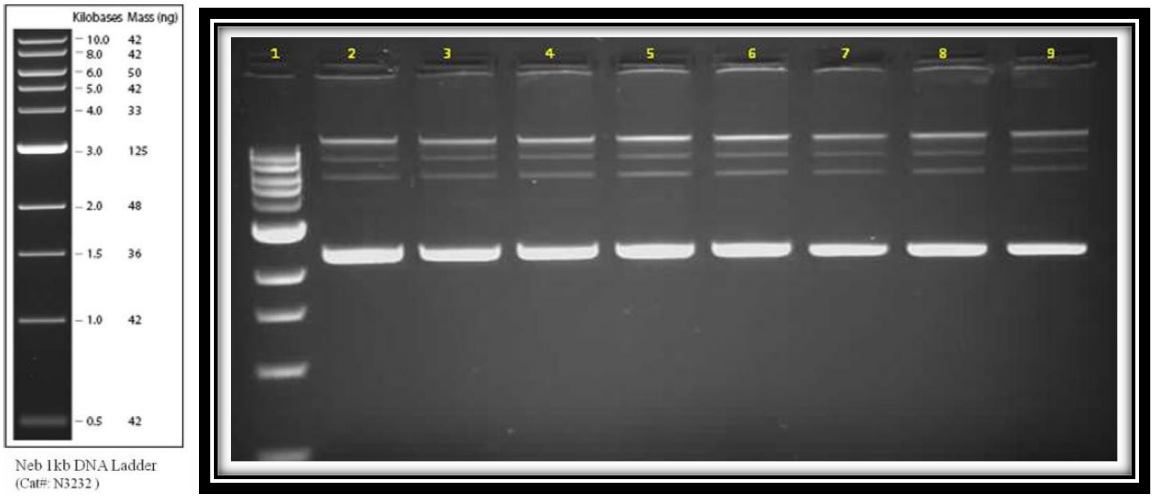
Şekil 5.62. 5 ve 20 dakika inkübasyon süresi ve 5, 10, 15 µl ULV varlığında ve Mg^{+2} yokluğunda ULV-plazmid DNA temsili agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Aşağıdaki Şekil 5.63'de aynı miktarda PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı ve aynı inkübasyon süresi varlığında ortamda Mg^{+2} metal katyonu yokken artan ULV miktarının üçlü kompleks oluşumunda etkisinim olmadığı temsili agaroz jel elektroforezi ile gösterilmiştir. Her bir kuyucuktaki örnek içeriği şu şekildedir; 1.Kuyu; 1 kb Ladder (5µl), 2.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + 0'inkübasyon, 3.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + ULV(2,5 µl) + 75'inkübasyon, 4.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + ULV(5 µl) + 75'inkübasyon, 5.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5µl) + ULV(10 µl) + 75'inkübasyon, 6.Kuyu; Pl.DNA(0,25 µg/5 µl) + 0'inkübasyon, 7.Kuyu; Pl.DNA(0,25 µg/5 µl) + ULV(2,5 µl) + 75'inkübasyon, 8.Kuyu; Pl.DNA(0,25 µg/5 µl) + ULV(5 µl) + 75'inkübasyon, 9.Kuyu; Pl.DNA(0,25 µg/5 µl) + ULV(10 µl) + 75'inkübasyon örneklerini göstermektedir.



Şekil 5.63. 75 dakika inkübasyon süresi ve 2,5, 5, 10 µl ULV varlığında ve Mg^{+2} yokluğunda, 0,25 µg ve 0,5 µg plazmid DNA'larının temsili agaroz jel elektroforez görüntüsü.

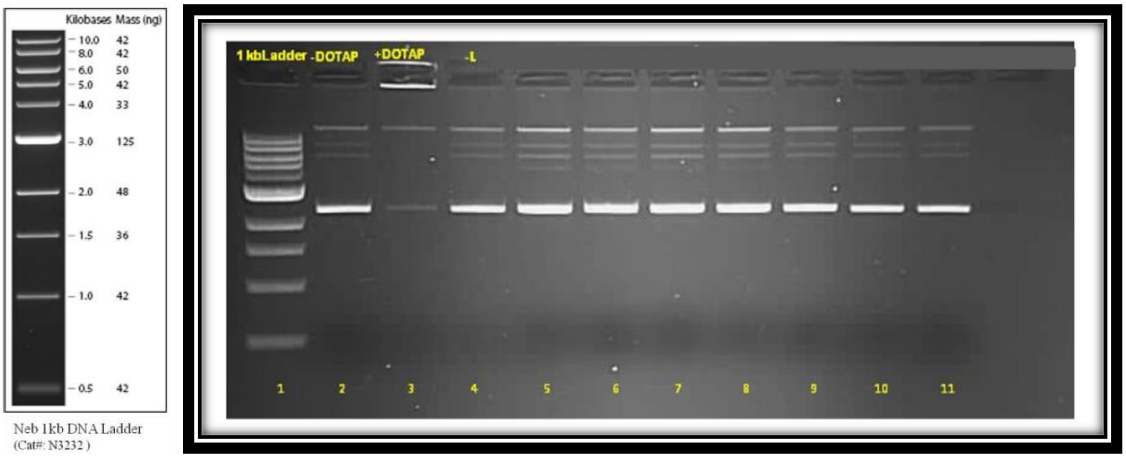
Aşağıdaki Şekil 5.64'de aynı miktarlarda PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı ve ULV varlığında, Mg^{+2} bulunmazken inkübasyon süresinin arttırılmasının (60, 120, 180, 240 dakika) üçlü kompleks oluşturmada etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Her bir kuyucuktaki örnek içeriği şu şekildedir; 1.Kuyu; 1 kb Ladder (5µl), 2.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + 0'inkübasyon, 3.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + ULV(5 µl) + 60'inkübasyon, 4.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + ULV(5 µl) + 60'inkübasyon, 5.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + ULV(5 µl) + 120'inkübasyon, 6.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + ULV(5 µl) + 120'inkübasyon, 7.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + ULV(5 µl) + 180'inkübasyon, 8.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + ULV(5 µl) + 180'inkübasyon, 9.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + ULV(5 µl) + 240'inkübasyon örneklerini göstermektedir.



Şekil 5.64. 1, 2, 3, ve 4 saat inkübasyon süresi ve 5 µl ULV varlığında ve Mg^{+2} yokluğunda, 0,5 µg plazmid DNA'sının temsili agaroz jel elektroforez görüntüsü.

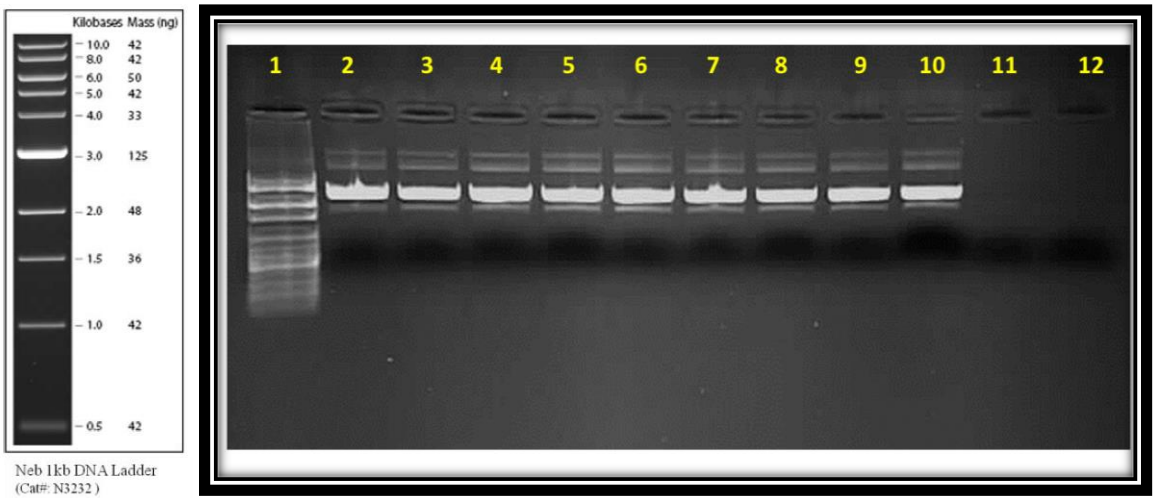
Aşağıdaki Şekil 5.65'de 3. kuyucukta katyonik lipozomlara dayalı DOTAP transfeksiyon reaktifi kullanılarak plasmid DNA'sının kapsüle olduğu gösterilmiştir. Aynı miktarlarda ULV ve PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı bulunan kuyucuklarda (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) farklı Mg^{+2} konsantrasyonlarının kullanımının üçlü kompleksi oluşturmada etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Her bir kuyucuktaki örnek içeriği şu şekildedir; 1.Kuyu; 1 kb Ladder (5µl), 2.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5µl) - DOTAP negatif kontrol, 3.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + DOTAP, 4.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl), 5.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5µl) + 2,5mM Mg^{+2}(1µl) + ULV (7 µl), 6.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + 5mM Mg^{+2}(1µl) + ULV (7 µl),

7.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + 10mM Mg^{+2}(1µl) + ULV (7 µl), 8.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + 25mM Mg^{+2}(1µl) + ULV (7 µl), 9.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + 50mM Mg^{+2}(1µl) + ULV (7 µl), 10.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + 100mM Mg^{+2}(1µl) + ULV (7 µl), 11.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + 200mM Mg^{+2}(1µl) + ULV (7 µl) örneklerini göstermektedir.



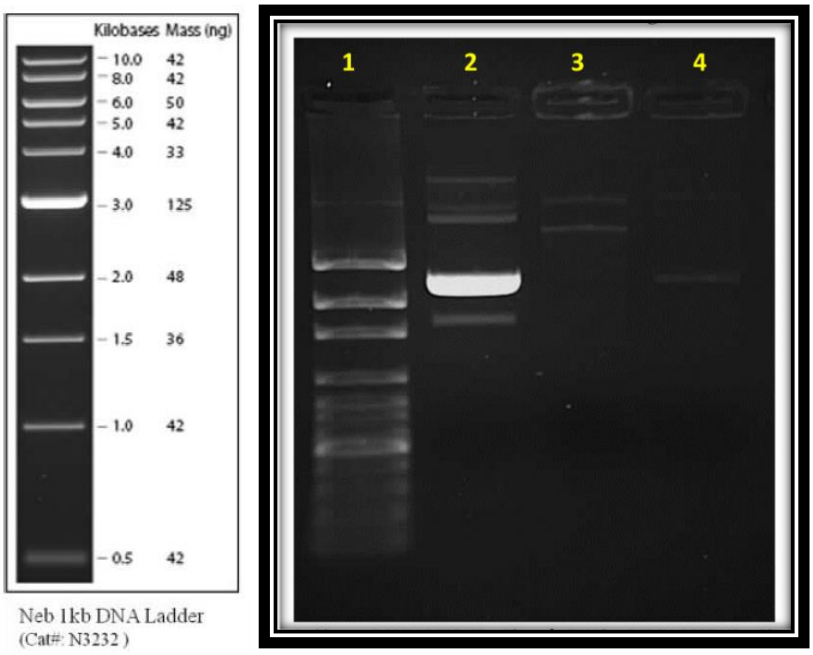
Şekil 5.65. DOTAP enkapsülasyon kontrolü (2. ve 3. Kuyular). 0,5 µg PCMV.GFPDH5α plazmid DNA, ULV ve 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 mM Mg^{+2} eklenmesinin etkisinin temsili agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Aşağıdaki Şekil 5.70'de ortama lipit vesikülü konulmadan PCMV.GFPDH5α aynı miktarda plazmid DNA'sı ve Ag nanopartikülü varlığında farklı Mg^{+2} konsantrasyonlarında (2,5-200 mM), her kuyucukta birbirinin aynı olan bant görüntülerini görüyoruz. Ortamda lipit vesiküllerinin bulunmamasından dolayı farklı bant görüntüsü görülmememiştir. Her bir kuyucuktaki örnek içeriği şu şekildedir; 1.Kuyu;1 kb Ladder (6µl), 2.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + 10 µl ddH_2O, 3.Kuyu;Ag nanopartikülü(5µl) + 2,5mM Mg^{+2}(5µl) + Pl.DNA(0,5 µg/5 µl), 4.Kuyu; Ag nanopartikülü(5µl) + 5mM Mg^{+2}(5µl) + Pl.DNA(0,5 µg/5 µl), 5.Kuyu; Ag nanopartikülü(5µl) + 10mM Mg^{+2}(5µl) + Pl.DNA(0,5 µg/5 µl), 6.Kuyu; Ag nanopartikülü(5µl) + 25mM Mg^{+2}(5µl) + Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) 7.Kuyu; Ag nanopartikülü(5µl) + 50mM Mg^{+2}(5µl) + Pl.DNA(0,5 µg/5 µl), 8.Kuyu; Ag nanopartikülü(5µl) + 100mM Mg^{+2}(5µl) + Pl.DNA(0,5 µg/5 µl), 9.Kuyu; Ag nanopartikülü(5µl) + Pl.DNA(0,5 µg/5µl) + ddH_2O (5µl), 10.Kuyu; Ag nanopartikülü(5µl) + 100mM Mg^{+2}(5µl) + ddH_2O (5µl), 11.Kuyu: 2,5mM Mg^{+2}(5µl) + ddH_2O (10µl), 12.Kuyu; 200mM Mg^{+2}(5µl) + ddH_2O (10µl) örneklerini göstermektedir.



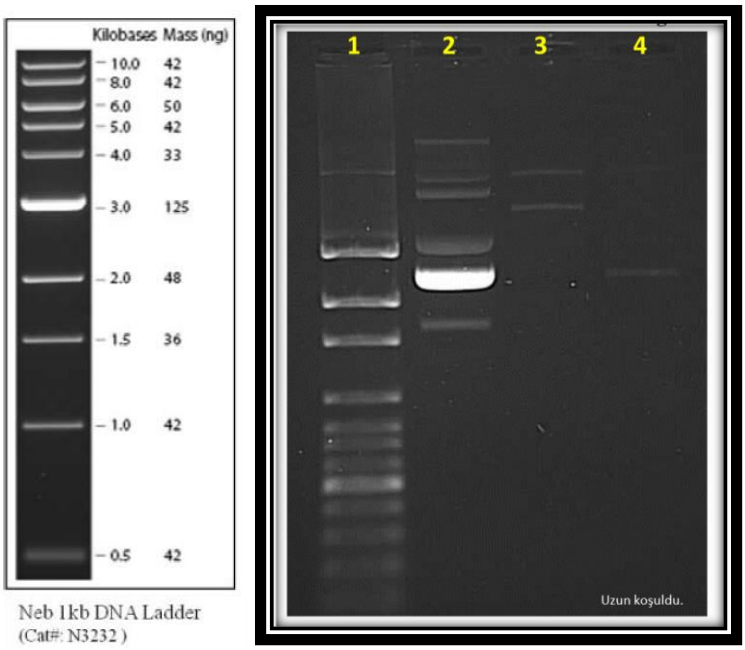
Şekil 5.66. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı ve 2,5-200 mM Mg^{+2} konsantrasyonlarında, Ag nanopartikülü varlığında temsili agaroz jel görüntüsü.

Aşağıdaki Şekil 5.67'de kapsüle edilmiş PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'nın zamana bağlı olarak lipit vesikülü dışına çıkmasından dolayı 4. kuyucukta bant gözlenmiştir. Her bir kuyucuktaki örnek içeriği şu şekildedir; 1.Kuyu; 1 kb Ladder (5µl), 2.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl), 3.Kuyu; PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV (yeni taihte hazırlanmış), 4.Kuyu; PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV (eski tarihte hazırlamış) örneklerini göstermektedir.



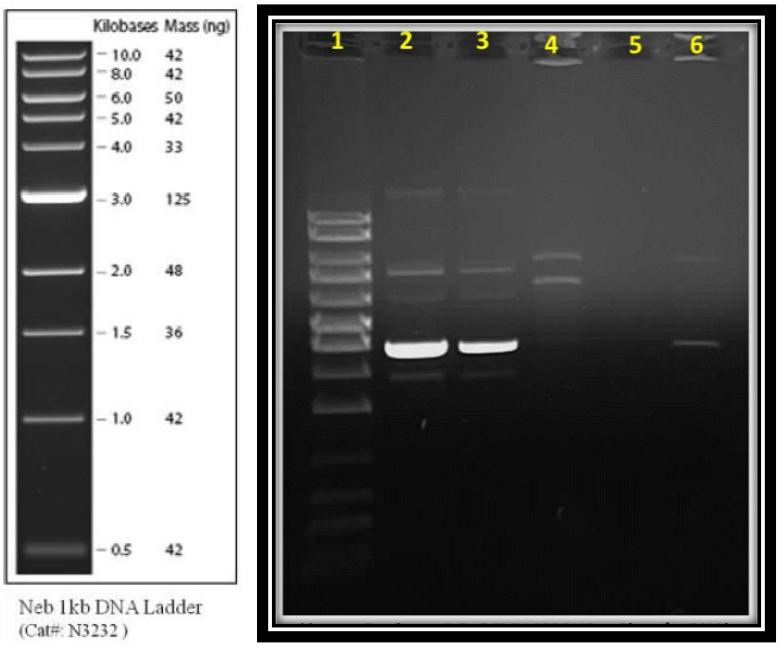
Şekil 5.67. PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV (yeni ve eski tarihte hazırlanmış)'lerin, temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

Aşağıdaki Şekil 5.68'de örnekler, Şekil 5.67'ye göre daha uzun koşularak kapsüle edilmiş PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sının zamana bağlı olarak lipit vesikülü dışına çıkmasından dolayı 4. kuyucukta daha belirgin bant gözlenmiştir. Her bir kuyucuktaki örnek içeriği şu şekildedir; 1.Kuyu; 1 kb Ladder (5µl), 2.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl), 3.Kuyu; PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV (yeni taihte hazırlanmış), 4.Kuyu; PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV (eski tarihte hazırlamış) örneklerinin uzun süreli koşulmasını göstermektedir.



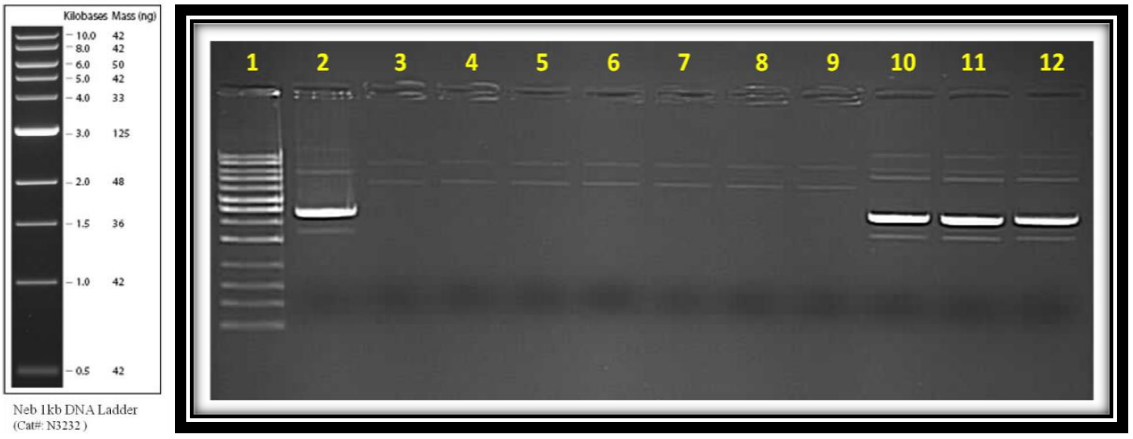
Şekil 5.68. PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV (yeni ve eski tarihte hazırlanmış) örneklerinin uzun koşulması ile elde edilen temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

Aşağıdaki Şekil 5.69'da 5. kuyucuktaki PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV örneğinde hiç bant oluşumu gözlenmemiştir. Bu bize ULV'lerin kapsülasyonda daha etkin olduğunu işaret etmiştir. Her bir kuyucuktaki örnek içeriği şu şekildedir; 1.Kuyu; 1 kb Ladder (5µl), 2.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl), 3.Kuyu; Pl.DNA(0,25 µg/5 µl), 4.Kuyu; PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV, 5.Kuyu; PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV, 6.Kuyu; PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV (eski tarihli) örneklerini göstermektedir.



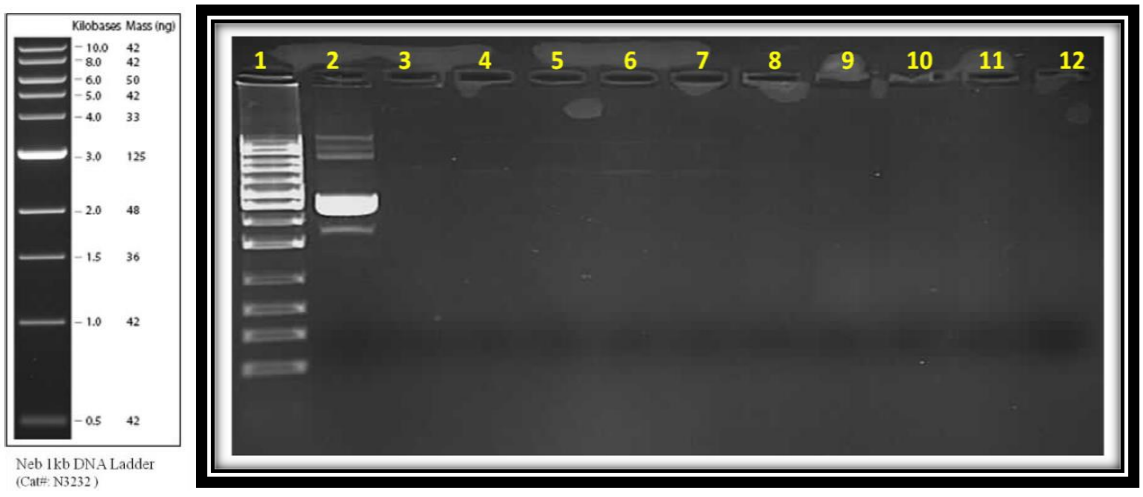
Şekil 5.69. 5 µg/5 µl ve 2,5 µg/5 µl PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı, PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV, PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV, eski tarihli PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV örneklerinin temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

Aşağıaki Şekil 5.70'de 3-9. örneklerinde PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV ve farklı Mg^{+2} (2,5-200 mM) konsantrasyonlarında, Ag nanopartikülü varlığında kapsüle olduğunu işaret etmektedir. Her bir kuyucuktaki örnek içeriği şu şekildedir; 1.Kuyu; 1 kb Ladder (5µl), 2.Kuyu; Pl.DNA(0,5 ug/5 µl) + ddH_2O (10 µl), 3.Kuyu; Pl.DNA kapsüle ULV (5µl) + 2,5mM Mg^{+2}(5µl) + Ag nanopartikülü (5 µl), 4.Kuyu; Pl.DNA kapsüle ULV (5µl) + 5mM Mg^{+2}(5µl) + Ag nanopartikülü (5 µl), 5.Kuyu; Pl.DNA kapsüle ULV (5µl) + 10mM Mg^{+2}(5µl) + Ag nanopartikülü (5 µl), 6.Kuyu; Pl.DNA kapsüle ULV (5µl) + 25mM Mg^{+2}(5µl) + Ag nanopartikülü (5 µl), 7.Kuyu; Pl.DNA kapsüle ULV (5µl) + 50mM Mg^{+2}(5µl) + Ag nanopartikülü (5 µl), 8.Kuyu; Pl.DNA kapsüle ULV (5µl) + 100mM Mg^{+2}(5µl) + Ag nanopartikülü (5 µl), 9.Kuyu; Pl.DNA kapsüle ULV (5µl) + 200mM Mg^{+2}(5µl) + Ag nanopartikülü (5 µl), 10.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + ddH_2O (5 µl) + Ag nanopartikülü (5µl), 11.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + ddH_2O (5 µl) + 2,5mM Mg^{+2}(5µl), 12.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + ddH_2O (5 µl) + 200mM Mg^{+2}(5µl) örneklerini göstermektedir.



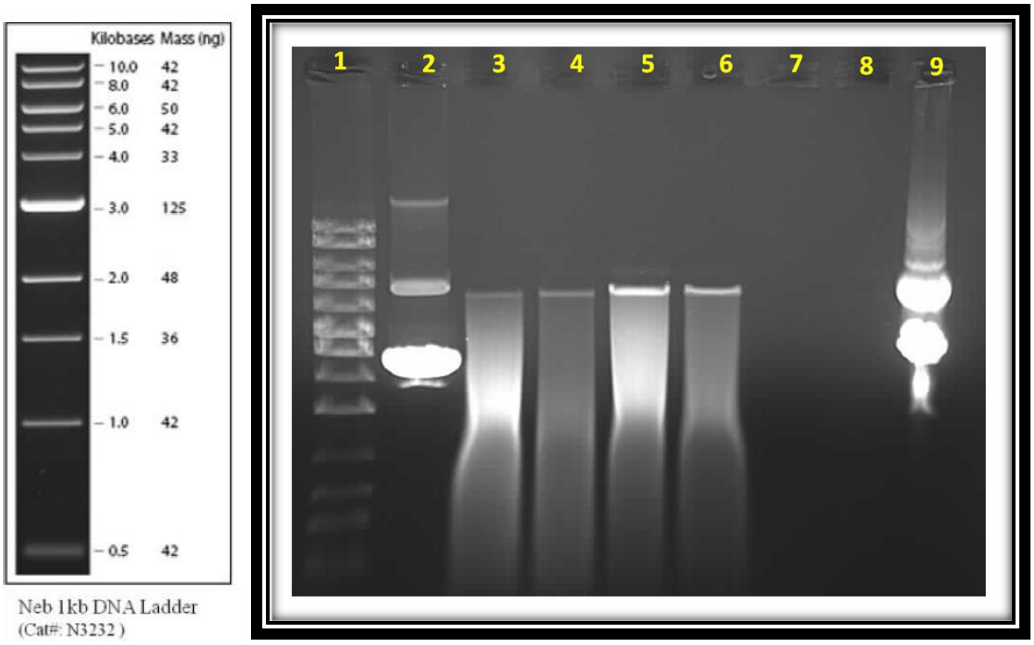
Şekil 5.70. PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV ve 2,5-200 mM Mg^{+2} konsantrasyonlarında, Ag nanopartikülü varlığında agaroz jel görüntüsü

Aşağıdaki Şekil 5.71'de PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV ve ULV'lerin farklı Mg^{+2} (2,5-200 mM) konsantrasyonlarında, temsili agaroz jel görüntüsünde hiç bant gözlenmemiştir. Her bir kuyucuktaki örnek içeriği şu şekildedir; 1.Kuyu; 1 kb Ladder (5µl), 2.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/5 µl) + ddH_2O (5 µl), 3.Kuyu; Pl.DNA kapsüle MLV (5µl) + 2,5mM Mg^{+2}(5µl), 4.Kuyu; Pl.DNA kapsüle MLV (5µl) + 10mM Mg^{+2}(5µl), 5.Kuyu; Pl.DNA kapsüle MLV (5µl) + 25mM Mg^{+2}(5µl), 6.Kuyu; Pl.DNA kapsüle MLV (5µl) + 50mM Mg^{+2}(5µl), 7.Kuyu; Pl.DNA kapsüle MLV (5µl) + 100mM Mg^{+2}(5µl), 8.Kuyu; Pl.DNA kapsüle ULV (5µl) + 2,5mM Mg^{+2}(5µl), 9.Kuyu; Pl.DNA kapsüle ULV (5µl) + 10mM Mg^{+2}(5µl), 10.Kuyu; Pl.DNA kapsüle ULV (5µl) + 25mM Mg^{+2}(5µl), 11.Kuyu; Pl.DNA kapsüle ULV (5µl) + 50mM Mg^{+2}(5µl), 12.Kuyu; Pl.DNA kapsüle ULV (5µl) + 100mM Mg^{+2}(5µl) örneklerini göstermektedir.



Şekil 5.71. PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV ve PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin 2,5-200 mM Mg^{+2} konsantrasyonlarında, temsili agaroz jel görüntüsü.

Aşağıdaki Şekil 5.72'de kapsülasyonun varlığını göstermek amacıyla S1Nuclease enzimi kullanılmıştır. Farklı miktarlarda (10U ve 20U) S1Nuclease enzimi ile muamele edilen PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sının, 7. ve 8. kuyucuklarda kapsüle olduğundan dolayı enzim tarafından parçalanamadığı gösterilmiştir. Her bir kuyucuktaki örnek içeriği şu şekildedir; PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı 97 ˚C'de 5 dakika termal döngüleyicide (termal cycle) denatüre edilmiştir. Örnekler 37 ˚C'de 30 dakika inkübe edilip, sonra jele yüklenmiştir. 1.Kuyu; 1 kb Ladder (5µl), 2.Kuyu; Pl.DNA(0,5 µg/6 µl) + ddH_2O (14 µl), 3.Kuyu; Pl.DNA(2 µg/ 3,6µl) + 10xS1Buffer(2 µl) + 10US1Nuc. (2,5 µl) + ddH_2O (11.9 µl), 4.Kuyu; Pl.DNA(2 µg/3,6 µl) + 10xS1Buffer(2 µl) + 20US1Nuc. (5 µl) + ddH_2O (9,4 µl), 5.Kuyu; Pl.DNA(2 µg/3,6 µl) + 10xS1Buffer(2 µl) + 10US1Nuc. (2,5 µl) + ddH_2O (6,9 µl) + Ag (5 µl), 6.Kuyu; Pl.DNA(2 µg/ 3,6µl) + 10xS1Buffer(2 µl) + 20US1Nuc. (5 µl) + ddH_2O (4,9 µl) + Ag (5 µl), 7.Kuyu; Pl.DNAkapsüleMLV(5 µl) + 10xS1Buffer(2 µl) + 10US1Nuc. (2,5 µl) + ddH_2O (11,5 µl), 8.Kuyu; Pl.DNAkapsüleMLV(5 µl) + 10xS1Buffer(2 µl) + 10US1Nuc. (2,5 µl) + ddH_2O (5,5 µl) + Ag (5 µl), 9.Kuyu; Sıcaklıkla denatüre edilmiş PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı (0,5 µg/6µl) örneklerini göstermektedir.



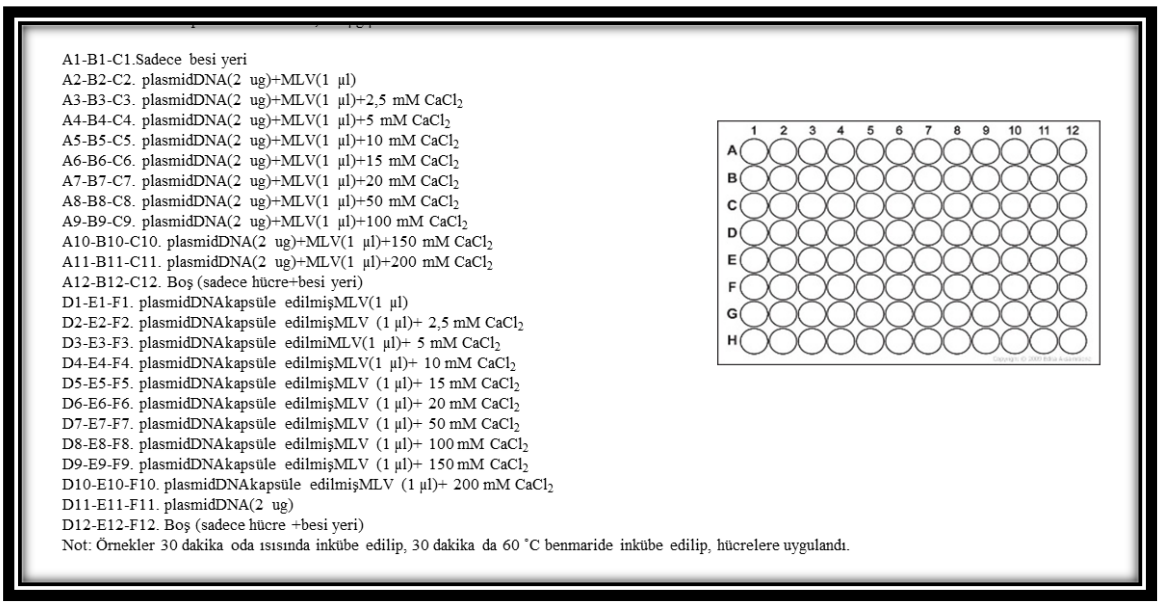
Şekil 5.72. PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sının 10U ve 20U S1Nuclease enzim kesimli, Ag varlığında ve yokluğunda temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

5.1.6. HÜCRE HATLARINDA LİPİT VESİKÜLLERİNİN (MLV VE ULV) MTT SİTOTOKSİSİTE TESTİ SONUÇLARI

Ekstruzyon yöntemiyle oluşturulan lipit vesiküllerinin (MLV ve ULV) hücre canlılığına etkisi MCF7 hücre hattında oluşturulan ikli ve üçlü oluşumlarla birlikte 30 dakika 60 ºC'de sıcak su banyosunda ve gece boyu +4ºC'de inkübe edilerek MTT sitotoksisite testi ile belirlenmiştir. Yapılan denemelerde sitotoksik bir etkinin olmadığı belirlenmiştir.

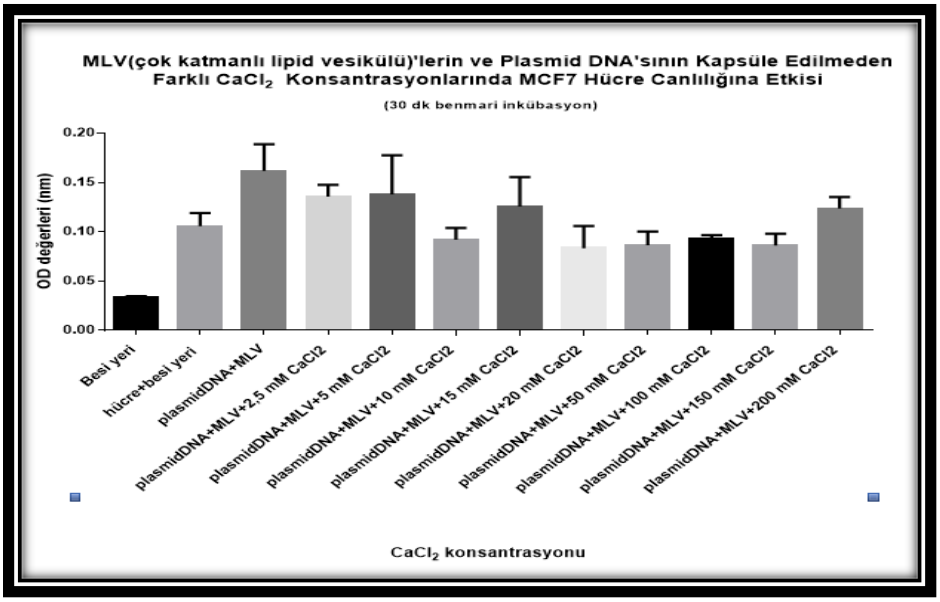
5.1.6.1. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında oluşturulan örneklerin sıcaksu banyosunda inkübasyonundan sonra MCF7 hücre hattı canlılığına etkisi

MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örnekler 30 dakika, 60 ˚C sıcak su banyosunda inkübe edilip hücrelere ($6x10^3$h/100ul yoğunlukta MCF7 hücre hattı, Pasaj no:27) uygulanmıştır. 48 saat 37 °C'de %5 CO_2'li ortamda inkübe edildikten sonra MTT *in vitro* sitotoksisite testi yapılmıştır. Aşağıdaki Şekil 5.73'de uygulanan deney planı görülmektedir.



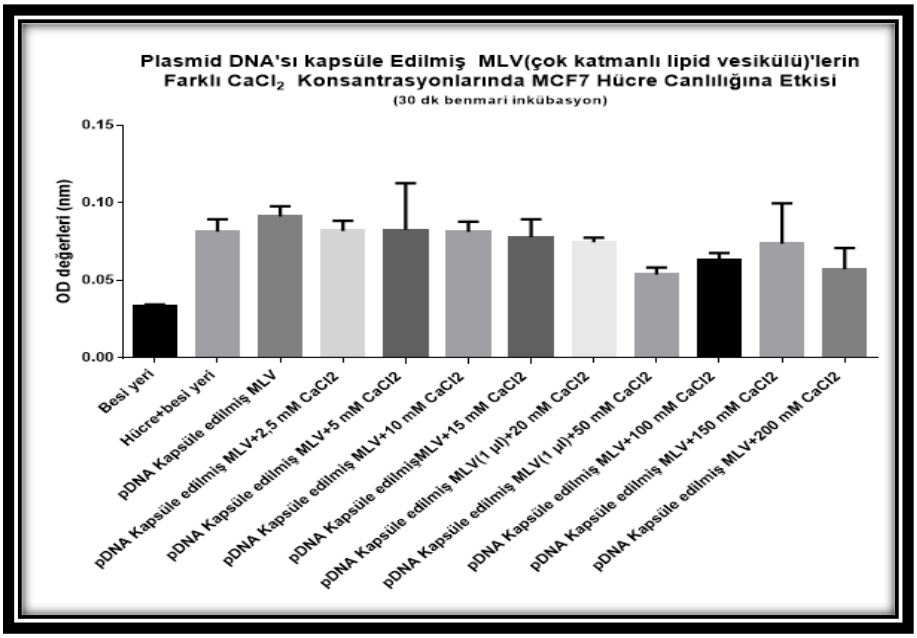
Şekil 5.73. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek farklı CaCl2 konsantrasyonlarında oluşturulan örneklerin sıcaksu banyosunda inkübasyonundan sonra MCF7 hücre hattı canlılığına etkisinin incelenmesi için kurulan deney planı.

Aşağıdaki Şekil 5.74'de MLV(çok katmanlı lipit vesikülü)'lerine ve plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden farklı $CaCl_2$ (2,5-200 mM) konsantrasyonlarında örneklerin 30 dk benmari inkübasyonu yapıldıktan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi gösterilmiştir.



Şekil 5.74. Plazmid DNA'sının kapsüle edilmemiş MLV'lerin ve 30 dk benmaride inkübe edilerek farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında MCF7 hücre canlılığına etkisi.

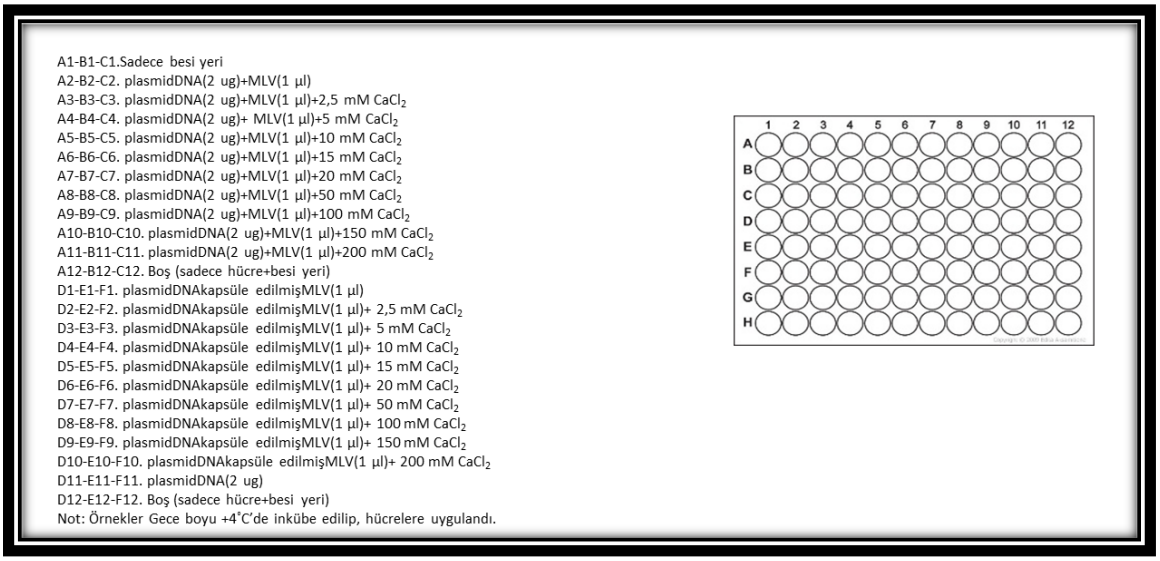
Aşağıdaki Şekil 5.75'da MLV(çok katmanlı lipit vesikülü)'lerine ve plazmid DNA'sının kapsüle edilerek, farklı $CaCl_2$ (2,5-200 mM) konsantrasyonlarında, örneklerin 30 dk benmari inkübasyonu yapıldıktan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi gösterilmiştir.



Şekil 5.75. Plazmid DNA'sının kapsüle edilmiş MLV'lerin ve 30 dk benmaride inkübe edilerek farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında MCF7 hücre canlılığına etkisi.

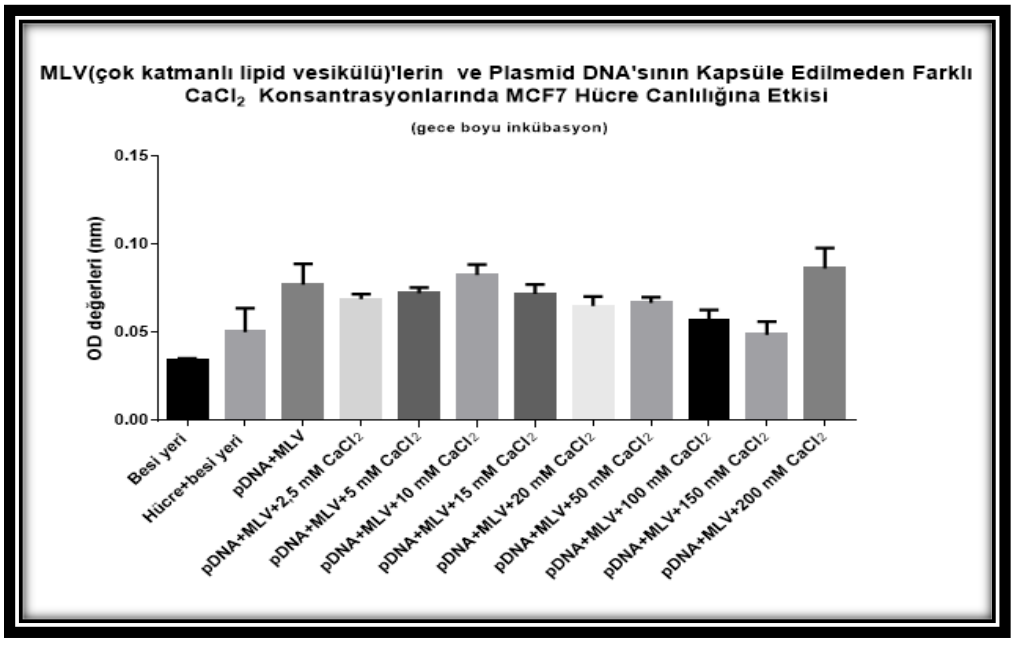
5.1.6.2. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında oluşturulan örneklerin gece boyu inkübasyonundan sonra MCF7 hücre hattı canlılığına etkisi

MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örnekler gece boyu, 4 ˚C'de inkübe edilip hücrelere ($6x10^3$h/100ul yoğunlukta MCF7 hücre hattı, Pasaj no:27) uygulanmıştır. 48 saat 37 °C'de %5 CO_2'li ortamda inkübe edildikten sonra MTT *in vitro* sitotoksisite testi yapılmıştır. Aşağıdaki Şekil 5.76'de uygulanan deney planı görülmektedir.



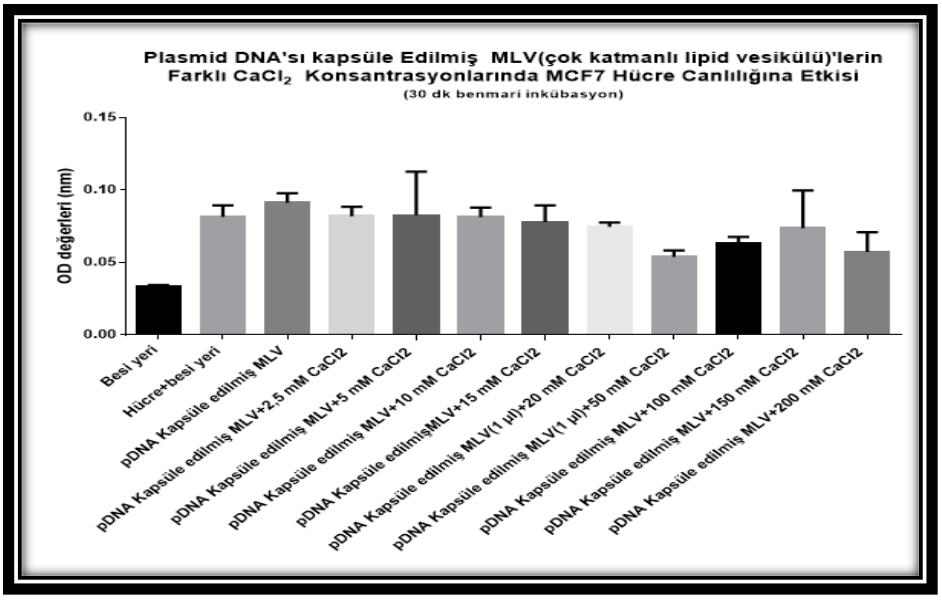
Şekil 5.76. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında oluşturulan örneklerin gece boyu inkübasyonundan sonra MCF7 hücre hattı canlılığına etkisinin incelenmesi için kurulan deney planı.

Aşağıdaki Şekil 5.77'de MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden farklı $CaCl_2$ (2,5-200 mM) konsantrasyonlarında oluşturulan örneklerin gece boyu inkübasyonundan sonra MCF7 hücre hattı canlılığına etkisi gösterilmiştir.



Şekil 5.77. MLV'lerin ve plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden gece boyu inkübe edilerek hazırlanan farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında örneklerin MCF7 hücre canlılığına etkisi

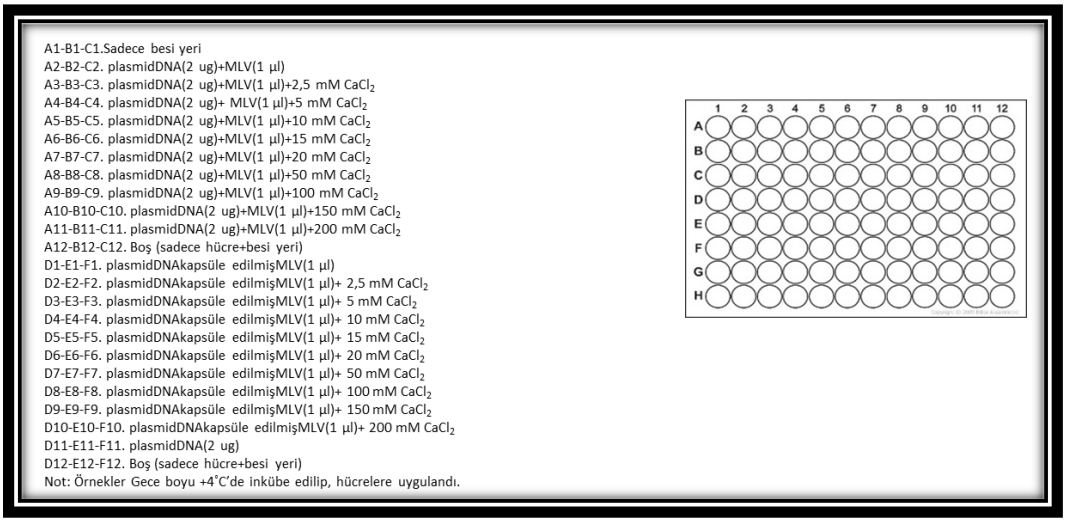
Aşağıdaki Şekil 5.78'da, plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanmış örneklerin 30 dk benmari inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi gösterilmiştir.



Şekil 5.78. Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanmış örneklerin sıcak su banyosu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi

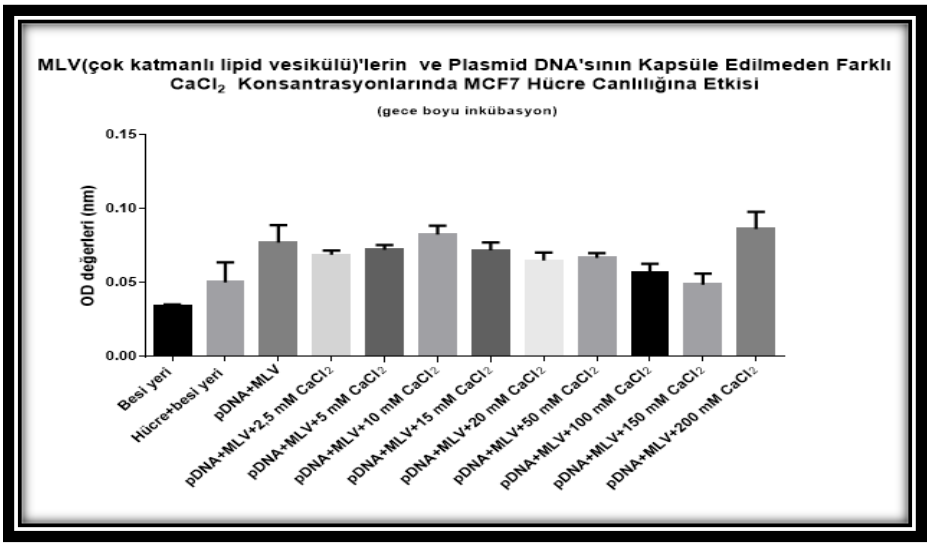
5.1.6.3. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonu sonunda MCF7 hücre canlılığına etkisi

MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında (2,5-200 mM) hazırlanan örnekler gece boyu, 4 ˚C'de inkübe edilip hücrelere (6x103h/100ul yoğunlukta MCF7 hücre hattı, Pasaj no:27) uygulanmıştır. 48 saat 37 °C'de %5 CO2'li ortamda inkübe edildikten sonra MTT in vitro sitotoksisite testi yapılmıştır. AşağıdakiŞekil 5.79'de uygulanan deney planı görülmektedir.



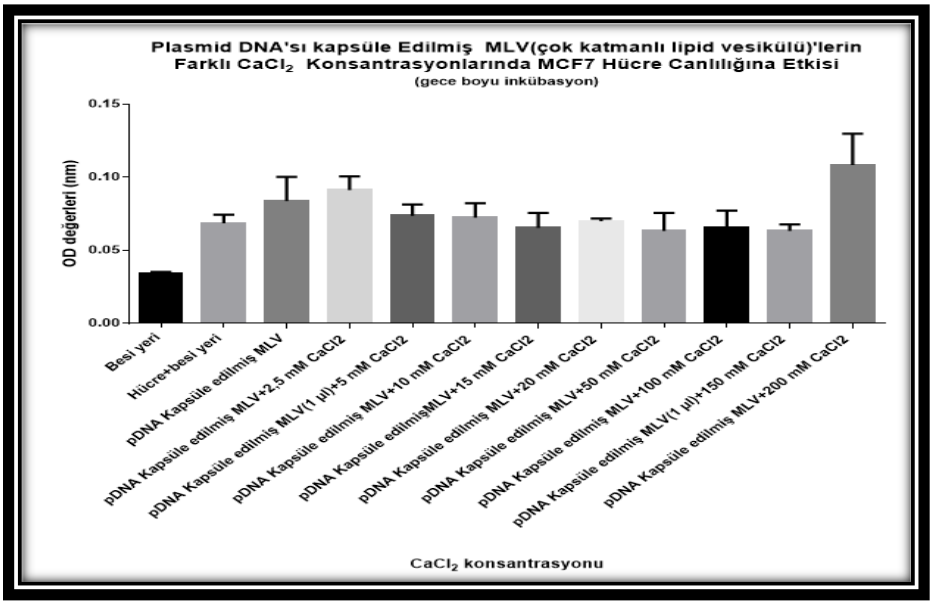
Şekil 5.79. MLV'lerin plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisinin incelenmesi için kurulan deney planı.

Aşağıdaki Şekil 5.80'de plazmid DNA'sı kapsüle edilmeden MLV(çok katmanlı lipit vesikülü)'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin +4˚C'de gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi gösterilmiştir.



Şekil 5.80. MLV'lerin plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi.

Aşağıdaki Şekil 5.81'de plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV(çok katmanlı lipit vesikülü)'lerin farklı CaCl2 konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin +4˚C'de gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi gösterilmiştir.

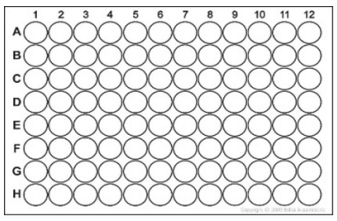


Şekil 5.81.Plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi.

5.1.6.4. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek hazırlanan örneklerin sıcak su banyosu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi

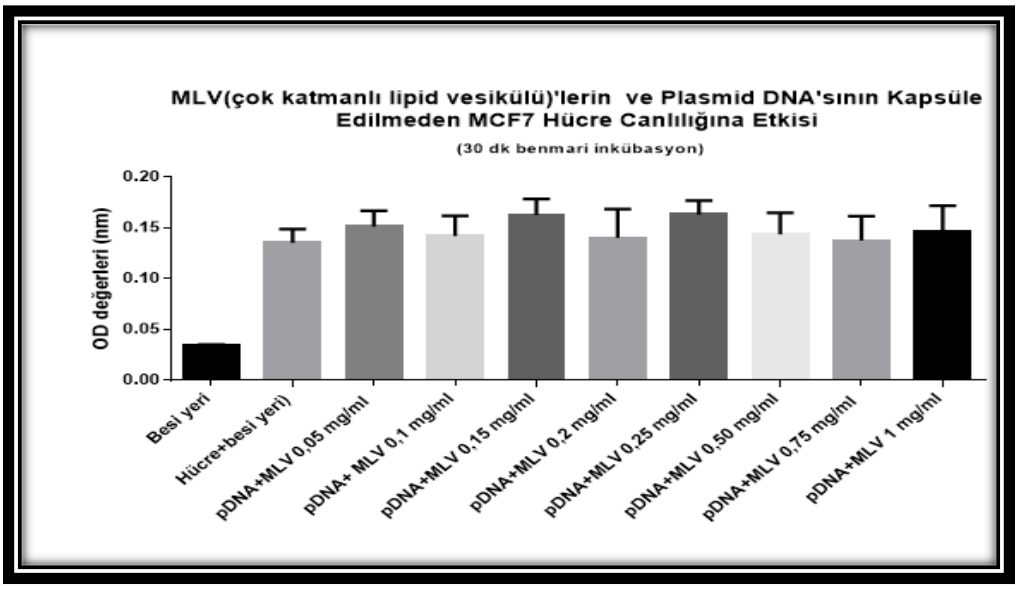
MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek hazırlanan örneklerin sıcak su banyosu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi 48 saat 37 °C'de %5 CO2'li ortamda inkübe edildikten sonra MTT *in vitro* sitotoksisite testi uygulanmıştır. Aşağıdaki Şekil 5.82'de uygulanan deney planı görülmektedir.

A1-B1-C1.Sadece besi yeri
A2-B2-C2. plasmidDNA(2 ug)+MLV 0,05 mg/ml (1 µl sulandırılmış stoktan)
A3-B3-C3. plasmidDNA(2 ug)+MLV 0,1 mg/ml (2 µl sulandırılmış stoktan)
A4-B4-C4. plasmidDNA(2 ug)+MLV 0,15 mg/ml (3 µl sulandırılmış stoktan)
A5-B5-C5. plasmidDNA(2 ug)+MLV 0,2 mg/ml (4 µl sulandırılmış stoktan)
A6-B6-C6. plasmidDNA(2 ug)+MLV 0,25 mg/ml (1 µl ana stoktan)
A7-B7-C7. plasmidDNA(2 ug)+MLV 0,50 mg/ml (2 µl ana stoktan)
A8-B8-C8. plasmidDNA(2 ug)+MLV 0,75 mg/ml (3 µl ana stoktan)
A9-B9-C9. plasmidDNA(2 ug)+MLV 1 mg/ml (4 µl ana stoktan)
A10-B10-C10. Boş (sadece hücre+besi yeri)
A11-B11-C11. Boş (sadece hücre+besi yeri)
A12-B12-C12. Boş (sadece hücre+besi yeri)
D1-E1-F1. Kontrol sadece besi yeri
D2-E2-F2. plasmidDNA kapsüle edilmiş MLV (0,5 ul ana stoktan ana stoktan)
D3-E3-F3. plasmidDNA kapsüle edilmiş MLV (1 ul ana stoktan ana stoktan)
D4-E4-F4. plasmidDNA kapsüle edilmiş MLV (2 ul ana stoktan ana stoktan)
D5-E5-F5. plasmidDNA kapsüle edilmiş MLV (3 ul ana stoktan ana stoktan)
D6-E6-F6. plasmidDNA kapsüle edilmiş MLV (4 ul ana stoktan ana stoktan)
D7-E7-F7. plasmidDNA kapsüle edilmiş MLV (5 ul ana stoktan ana stoktan)
D8-E8-F8. plasmidDNA kapsüle edilmiş MLV (6 ul ana stoktan ana stoktan)
D9-E9-F9. plasmidDNA kapsüle edilmiş MLV (7 ul ana stoktan ana stoktan)
D10-E10-F10. Boş (sadece hücre+besi yeri)
D11-E11-F11. Boş (sadece hücre+besi yeri)
D12-E12-F12. Boş (sadece hücre+besi yeri)
Not: Örnekler 30 dakika oda ısısında daha sonra 30 dakika, 60 °C sıcak su banyosunda inkübe inkübe edilip, hücrelere uygulandı.

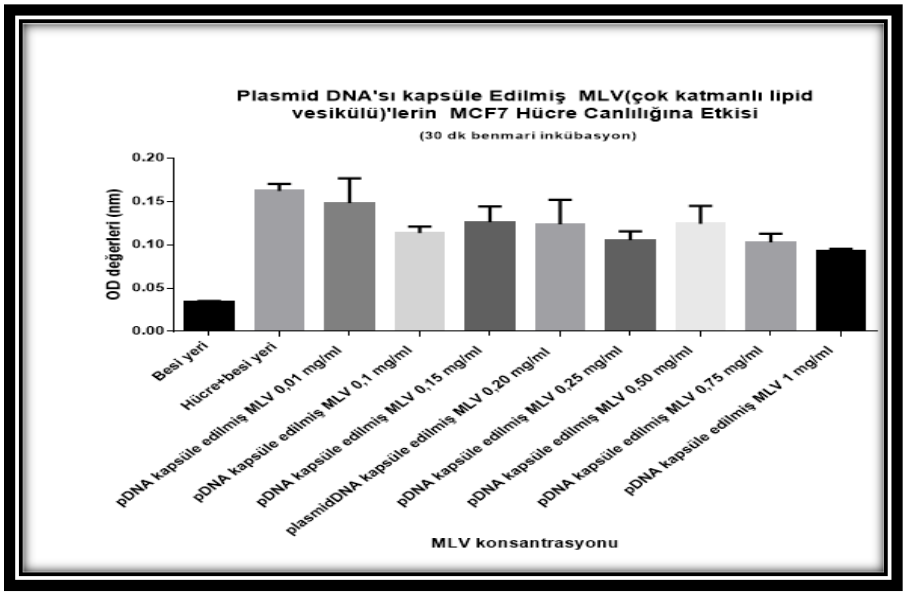


Şekil 5.82. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek hazırlanan örneklerin sıcak su banyosu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisinin incelenmesi için kurulan deney planı.

Aşağıdaki Şekil 5.83 ve Şekil 5.84'de MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek hazırlanan örneklerin sıcak su banyosu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi gösterilmiştir.



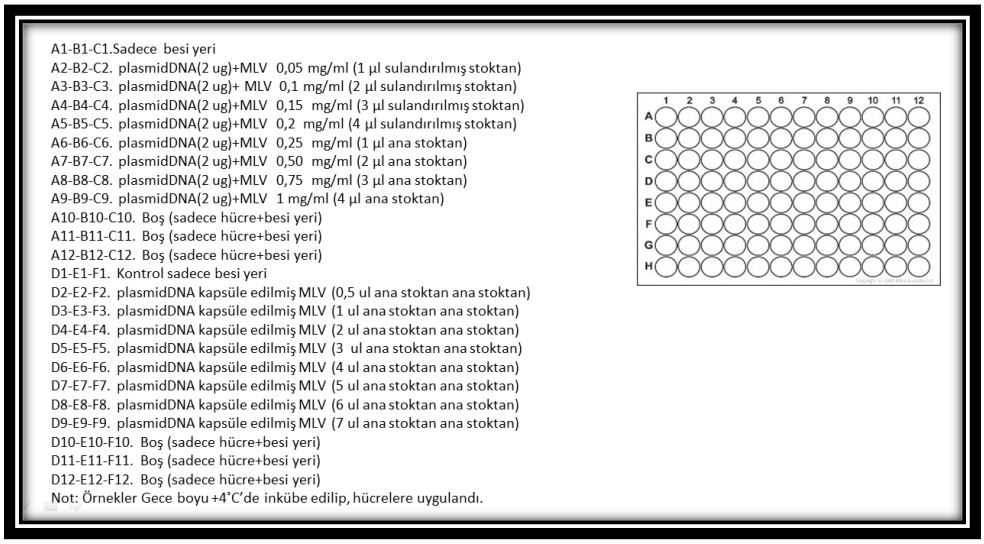
Şekil 5.83. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden hazırlanan örneklerin sıcak su banyosu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi gösterilmiştir.



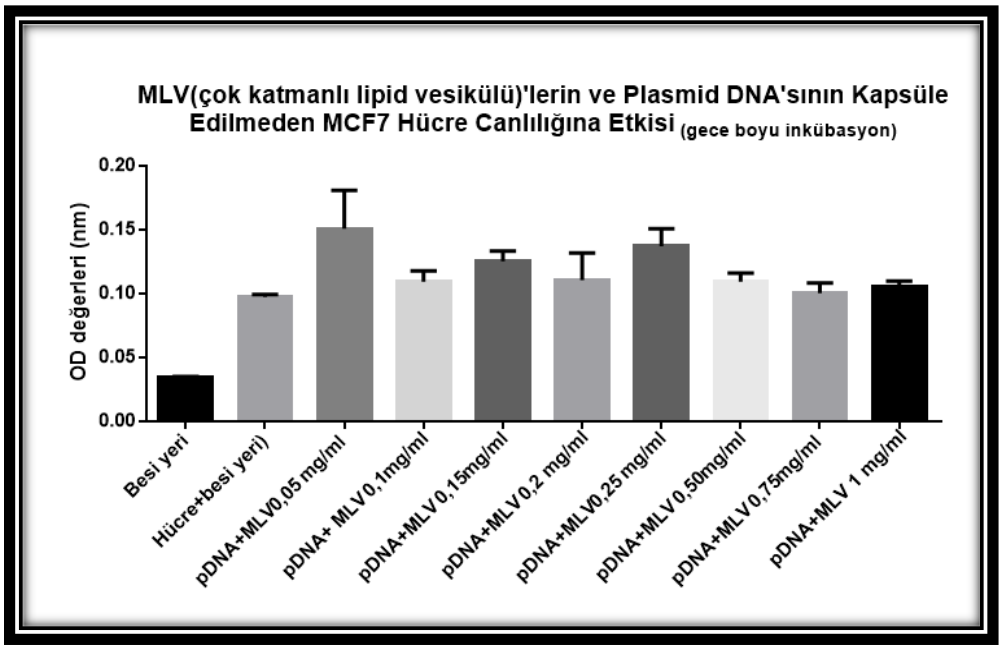
Şekil 5.84. Plazmid DNA'sının kapsüle edilmiş hazırlanan örneklerin sıcak su banyosu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi

5.1.6.5. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi

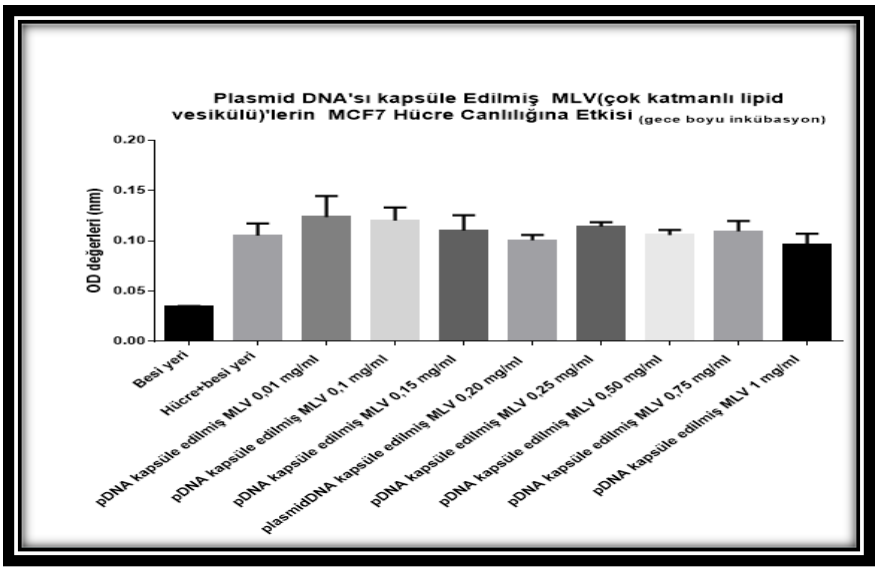
Aşağıdaki Şekil 5.85'da MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisinin incelenmesi ile ilgili deney planı gösterilmektedir.



Şekil 5.85. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden ve kapsüle edilerek hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisinin incelenmesi ile ilgili deney planı.



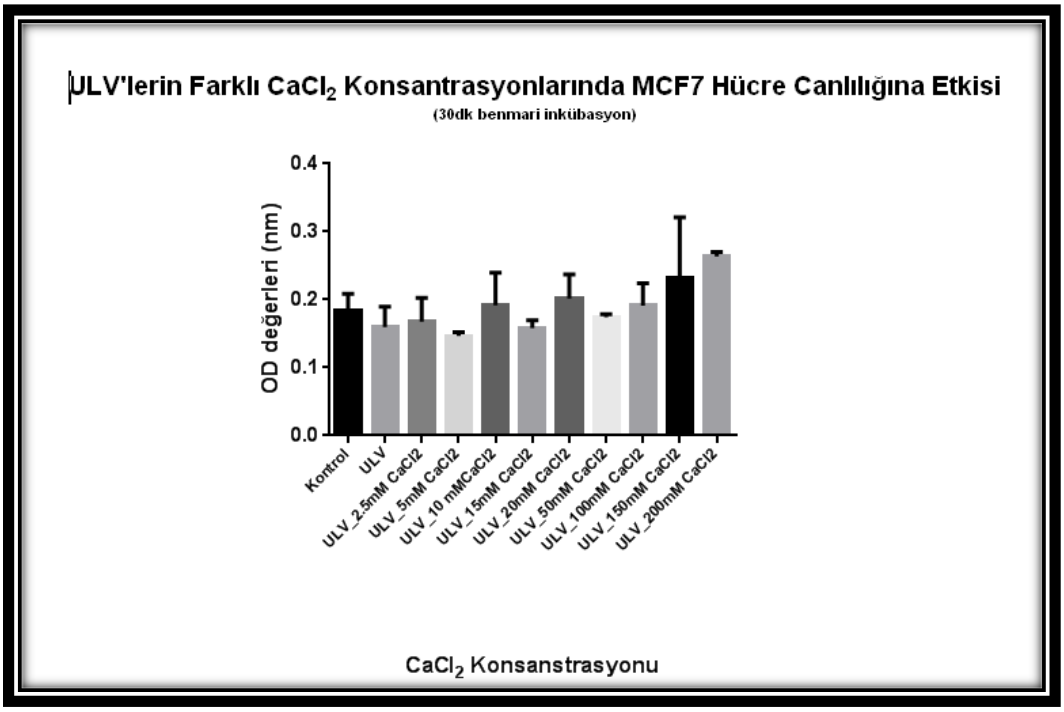
Şekil 5.86. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilmeden hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi.



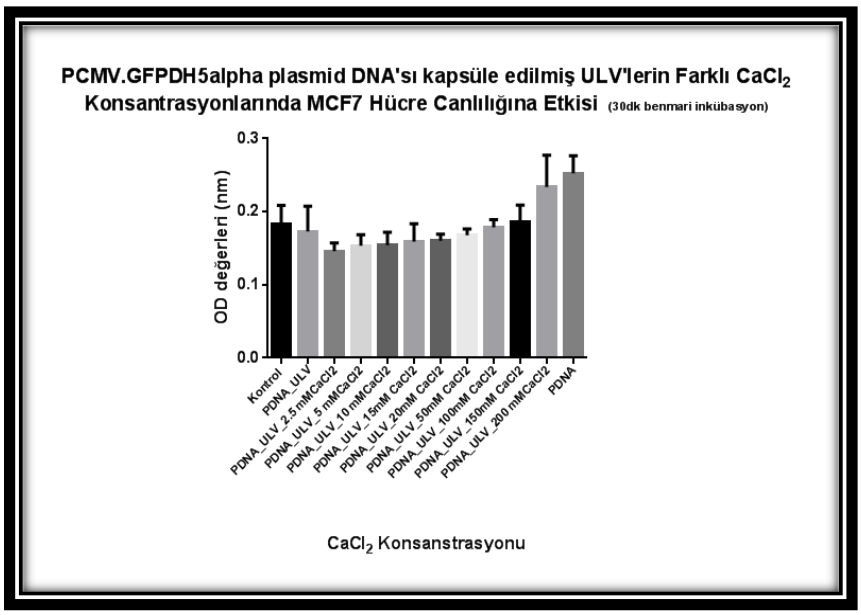
Şekil 5.87. MLV'lere plazmid DNA'sının kapsüle edilerek hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi.

5.1.6.6. ULV'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerinin sıcak su banyosunda inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi

ULV (tek katmanlı lipit vesikülü)'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerinin sıcak su banyosunda inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi MTT sitotoksisite testi ile incelenmiştir.



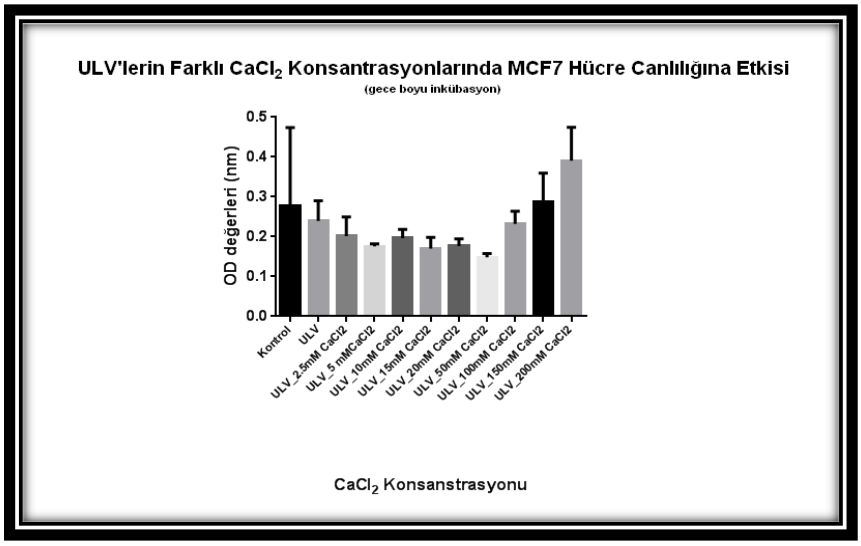
Şekil 5.88. ULV'lerin farklı CaCl2 konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerinin sıcak su banyosunda inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi.



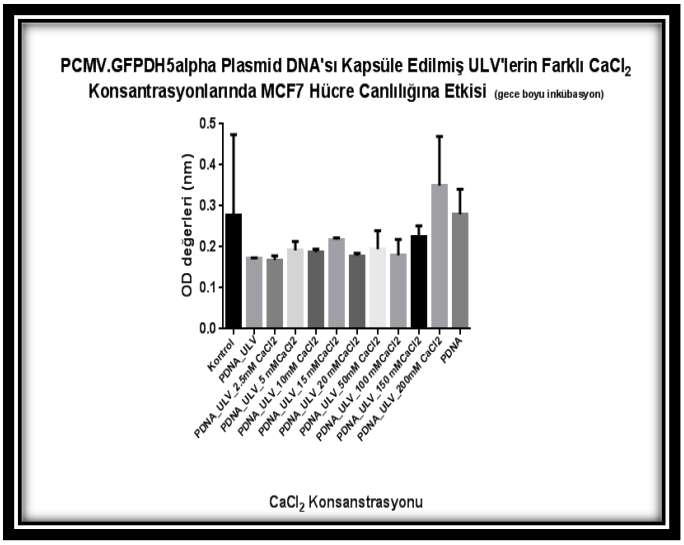
Şekil 5.89. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsule edilmiş ULV'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanmış örneklerinin sıcak su banyosu inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi.

5.1.6.7. ULV'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerinin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi

PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsule edilmiş ve kapsule edilmemiş ULV'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerinin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi, Şekil 5.90 ve Şekil 5.91'de gösterilmiştir.

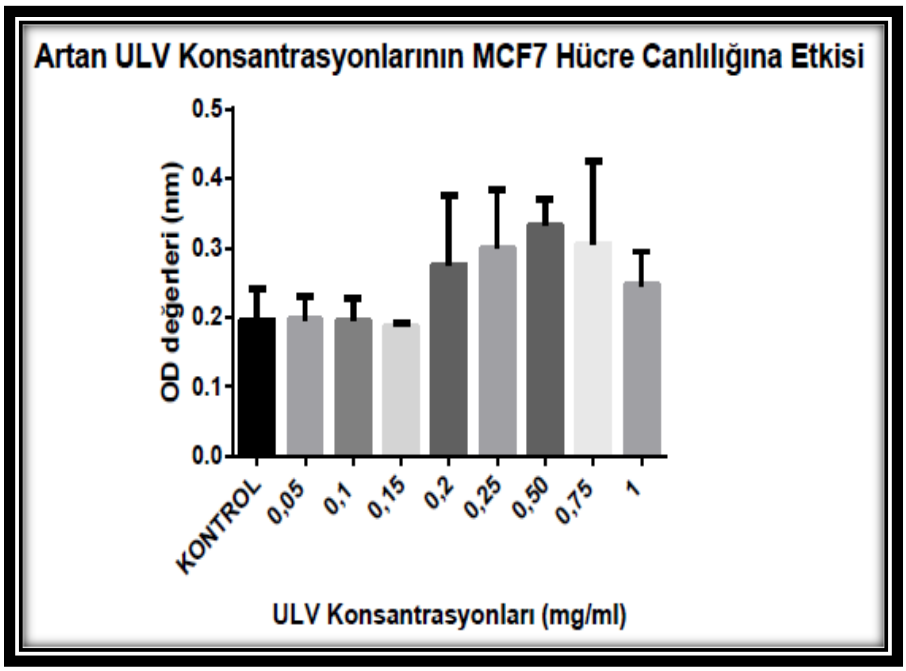


Şekil 5.90. ULV'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi.

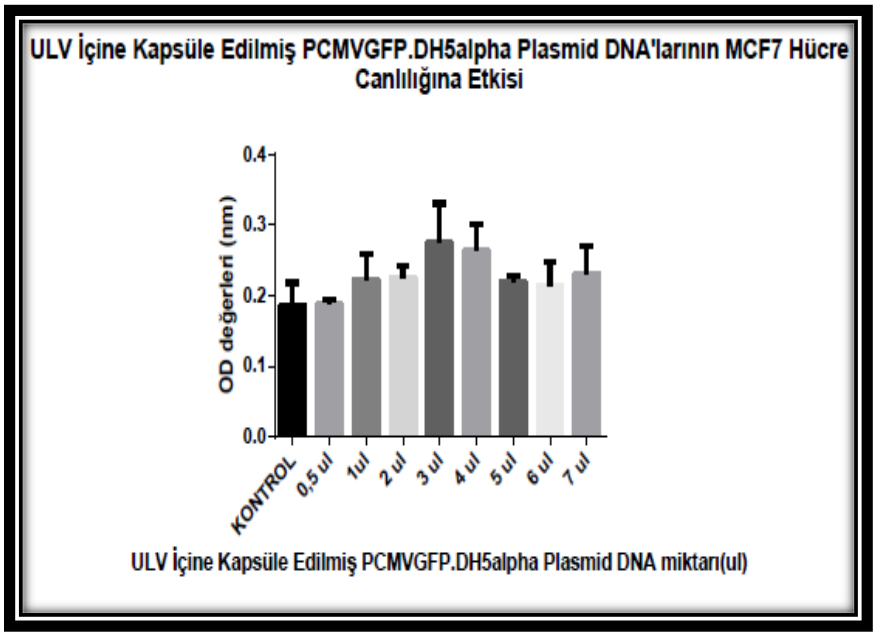


Şekil 5.91. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsule edilmiş ULV'lerin farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında hazırlanan örneklerinin gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi.

5.1.6.8. Artan ULV konsantrasyonlarının sıcak su banyosunda inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi

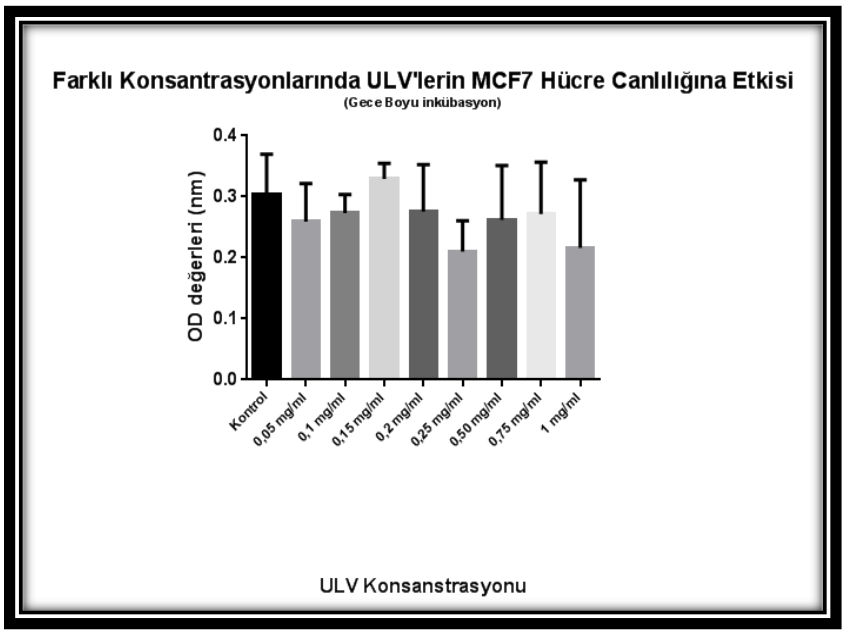


Şekil 5.92. Artan ULV konsantrasyonlarının sıcak su banyosunda inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi.

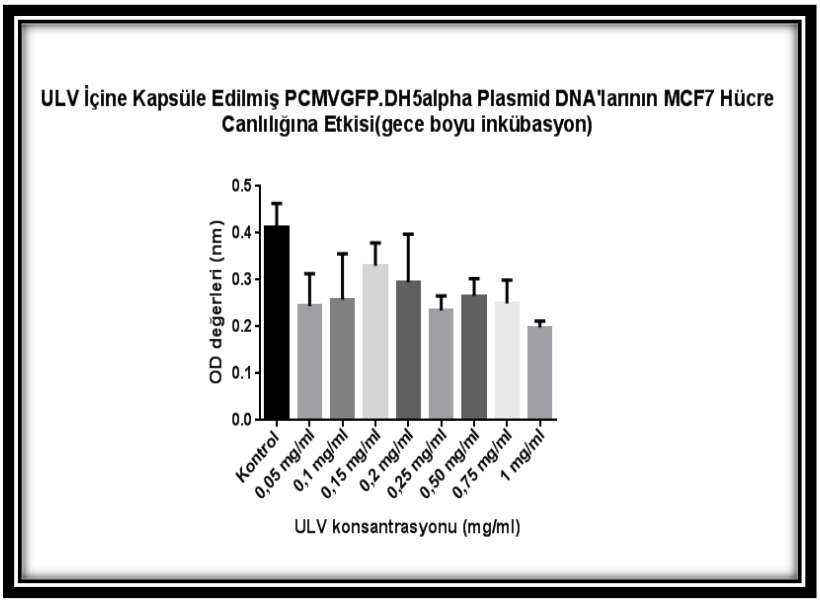


Şekil 5.93. ULV içine kapsüle edilmiş PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'larının sıcaksu banyosunda inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi.

5.1.6.9. Farklı konsantrasyonlarda ULV'lerin gece boyu inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi



Şekil 5.94. Farklı konsantrasyonlarda ULV'lerin gece boyu inkübasyonundan sonra MCF7 hücre canlılığına etkisi



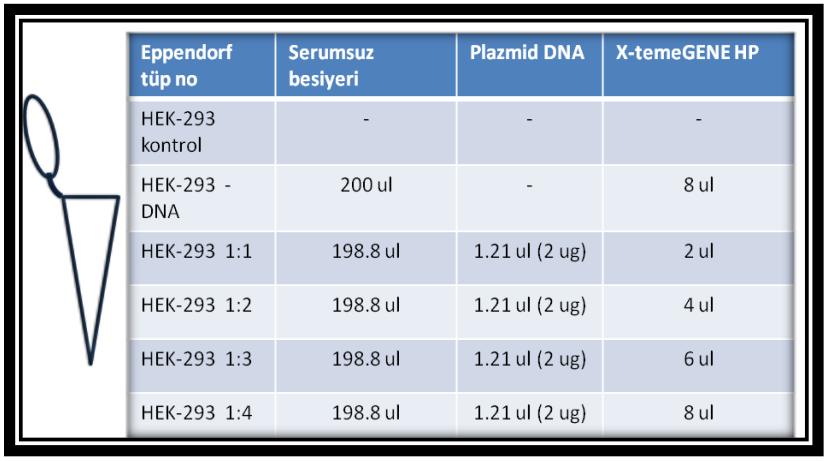
Şekil 5.95. ULV içine kapsüle edilmiş PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'larının gece boyu inkübasyonu sonrası MCF7 hücre canlılığına etkisi.

5.1.7. LİPİT VESİKÜLLERİNİN VE OLUŞTURULAN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN HÜCRE HATLARINA TRANSFEKSİYONU SONUÇLARI

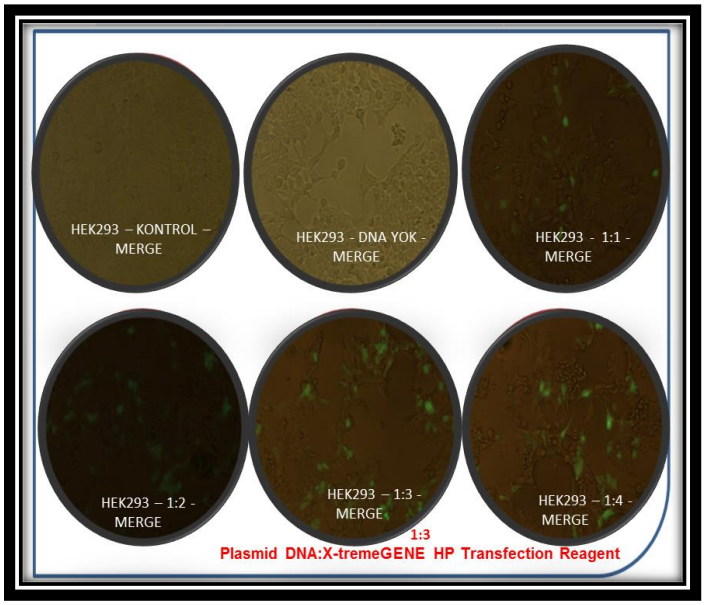
Bu tez çalışmasında HEK293T (Human Embryonal Kidney) hücreleri, X-tremeGENE HP ve katyonik lipit fazlı DOTAP transfeksiyon reaktifi kullanılarak transfekte edilip, 24, 48 ve 72. saatlerde görüntüleme yapılmıştır. Bu reaktiflerle elde edilen görüntülerle, transfeksiyon reaktifi kullanılmadan nötral lipit/pDNA/Mg^{+2}-Ca^{+2} üçlü toplaşımının transfeksiyon etkinliği karşılaştırılmıştır. Her deney düzeneğinde boş transfeksiyon (mock; plazmid içermeyen transfeksiyon) ve pCMV.GFP transfeksiyonu (transfeksiyon veriminin yüzdesini tayin etmek için kullanılmıştır. Canlı hücrelere uygun dalga boyundaki floresan ışıkla bakıldığında, bu plazmidin ürünü olan yeşil floresan protein) transfeksiyon verimi ve deney koşullarının optimumluğu hakkında fikir vermiştir. Nötral lipit/pDNA/Mg^{+2}-Ca^{+2} herhangi bir transfeksiyon reaktifi olmadan hücresel sisteme aktarıldığını göstermek amacıyla aşağıdaki transfeksiyonlar yapılmıştır.

5.1.7.1. X-tremeGENE HP transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonu ve 24, 48 ve 72. saatlerde görüntü alınması

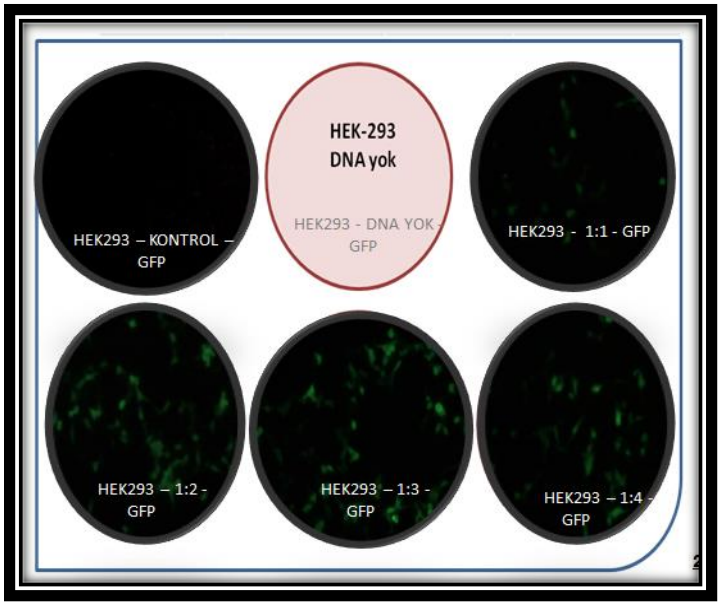
Çizelge 5.1. X-tremeGENE HP transfeksiyon ajanı kullanılarak yapılan trransfeksiyonun deney planı.



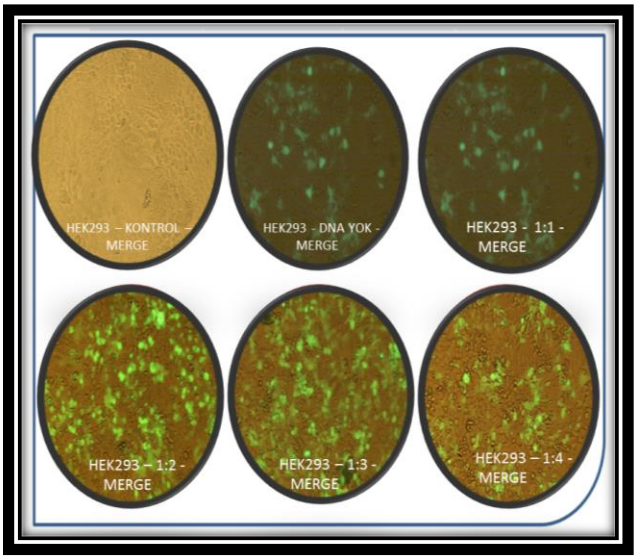
Eppendorf tüp no	Serumsuz besiyeri	Plazmid DNA	X-temeGENE HP
HEK-293 kontrol	-	-	-
HEK-293 - DNA	200 ul	-	8 ul
HEK-293 1:1	198.8 ul	1.21 ul (2 ug)	2 ul
HEK-293 1:2	198.8 ul	1.21 ul (2 ug)	4 ul
HEK-293 1:3	198.8 ul	1.21 ul (2 ug)	6 ul
HEK-293 1:4	198.8 ul	1.21 ul (2 ug)	8 ul



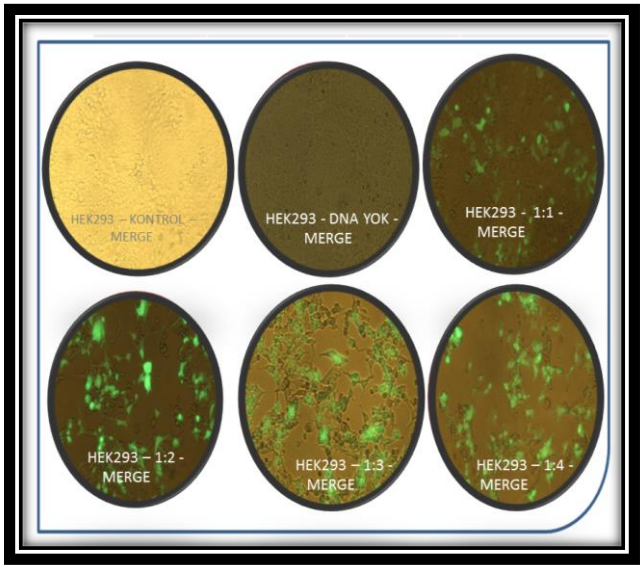
Şekil 5.96. X-tremeGENE HP transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonunun 24 saat sonra alınan birleştirilmiş (beyaz ve floresan ışık) görüntüsü.



Şekil 5.97. X-tremeGENE HP transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonunun 24 saat sonra alınan ve floresan görüntüsü.



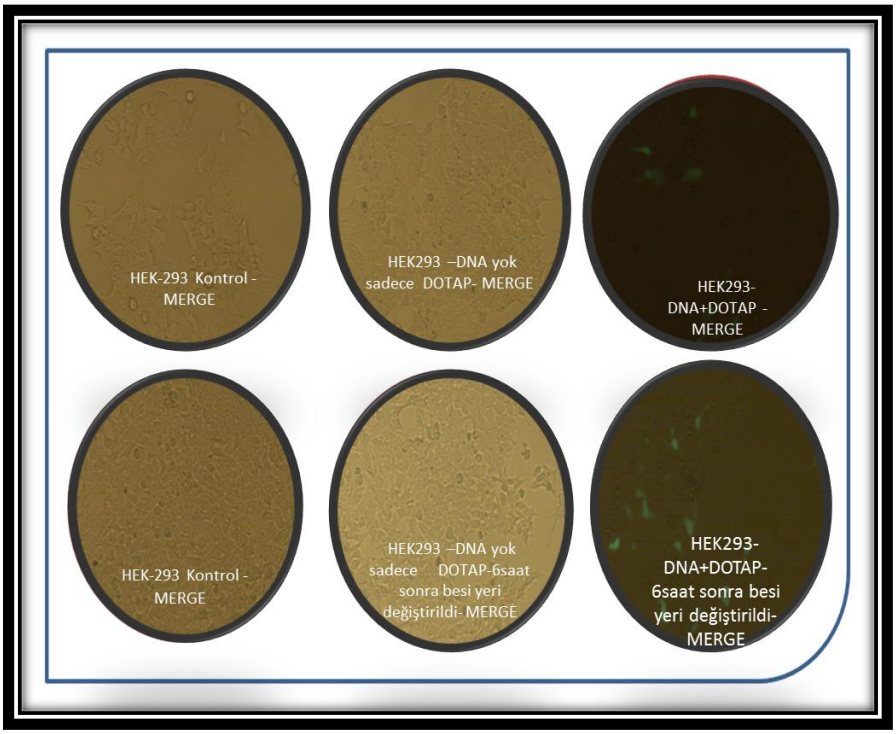
Şekil 5.98. X-tremeGENE HP transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonunun 48 saat sonra alınan birleştirilmiş (beyaz ve floresan ışık) görüntüsü.



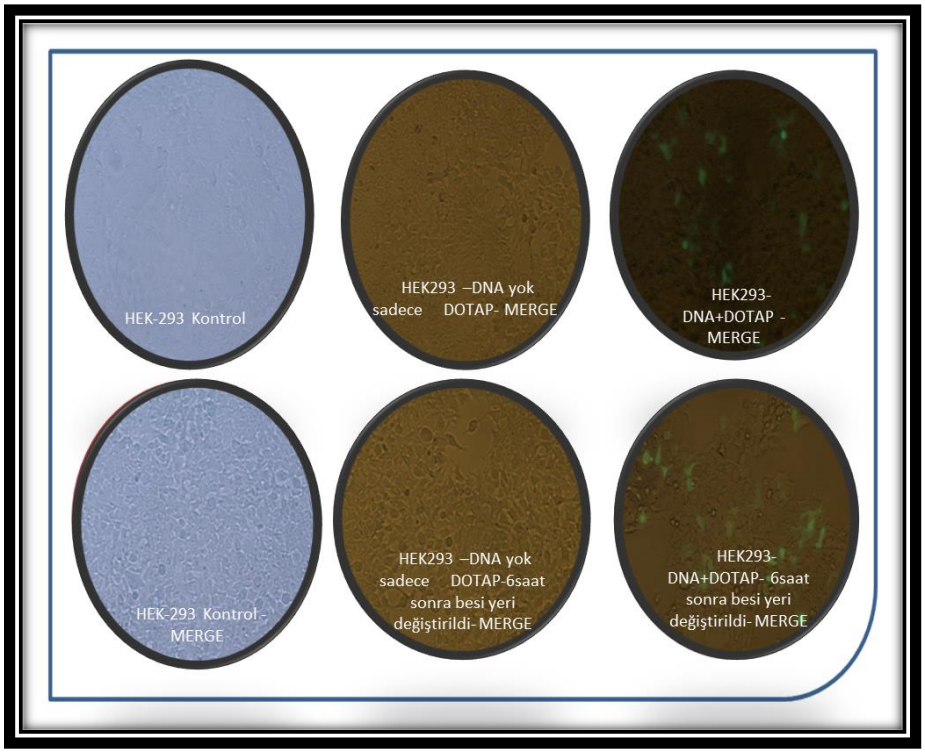
Şekil 5.99. X-tremeGENE HP transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonunun 72 saat sonra alınan birleştirilmiş (beyaz ve floresan ışık) görüntüsü.

HEK293 hücrelerinin XtremeGENE HP transfeksiyon reaktifi ile transfeksiyonunda; 24. saatte (Şekil 5.96) GFP ekspresyonu yüksek değilken, 48. saatte (Şekil 5.97) sinyal yoğunluğu en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. 72. saatte ise GFP proteini hücrelere toksik geldiği için ölü hücre sayısında artış olmaktadır (Şekil 5.98). Bu sonuç HEK293 hücrelerinin yüksek verimle transfekte edildiğini göstermektedir.

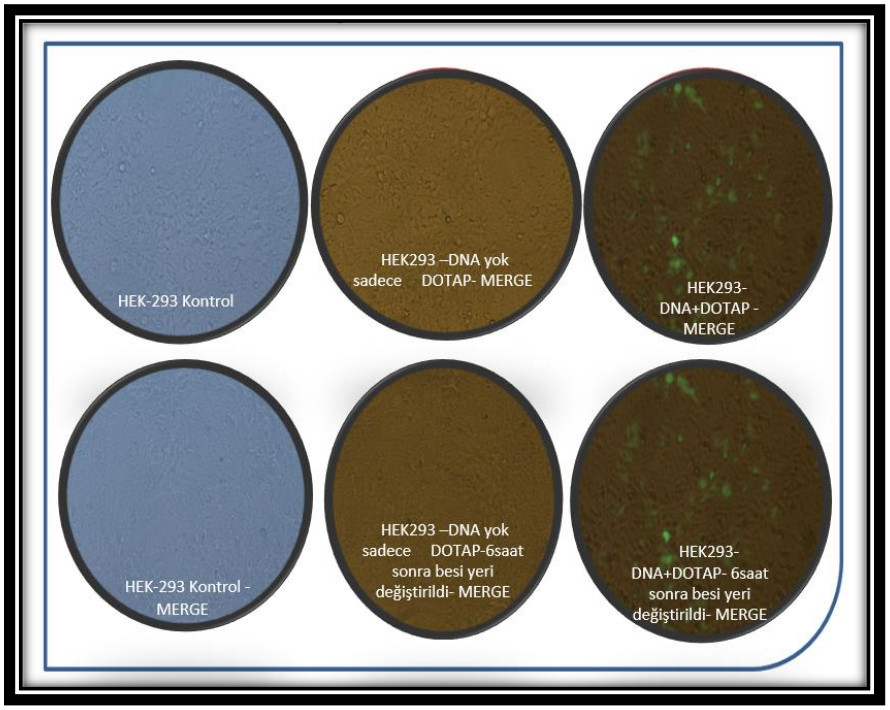
5.1.7.2. DOTAP Lipozomal transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonu ve 24, 48 ve 72. saatlerde birleştirilmiş (beyaz ışık ve floresan) görüntüsünün alınması



Şekil 5.100. DOTAP Lipozomal transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonu ve 24.saatte birleştirilmiş (beyaz ışık ve floresan) görüntüsü.



Şekil 5.101. DOTAP Lipozomal transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonu ve 48.saatte birleştirilmiş (beyaz ışık ve floresan) görüntüsü.

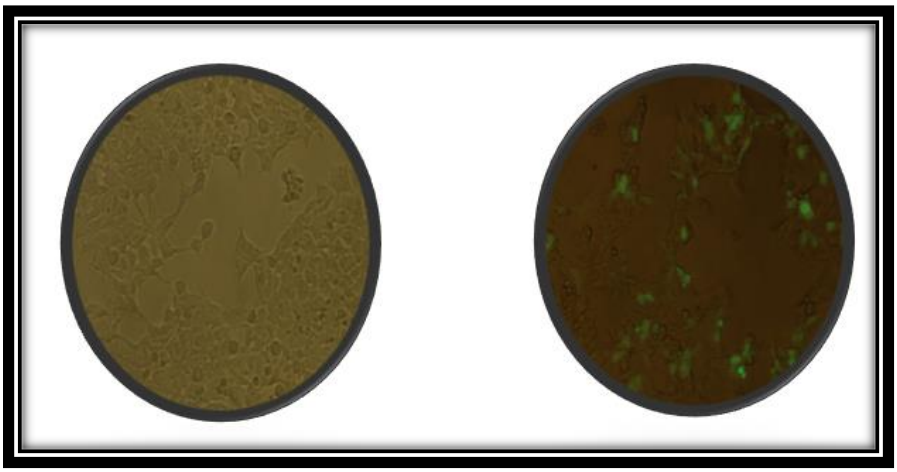


Şekil 5.102. DOTAP Lipozomal transfeksiyon ajanı aracılığıyla PCMVGFP plazmid DNA'sının HEK293 hücrelerine transfeksiyonu ve 72.saatte birleştirilmiş (beyaz ışık ve floresan) görüntüsü.

HEK293 hücrelerinin DOTAP transfeksiyon reaktifi ile transfeksiyonunda; 24. saatte (Şekil 5.100) GFP ekspresyonu yüksek değilken, 48. saatte (Şekil 5.101) sinyal yoğunluğu en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. 72. saatte ise GFP proteini hücrelere toksik geldiği için ölü hücre sayısında artış olmaktadır (Şekil 5.102). Bu sonuç HEK293 hücrelerinin yüksek verimle transfekte edildiğini göstermektedir.

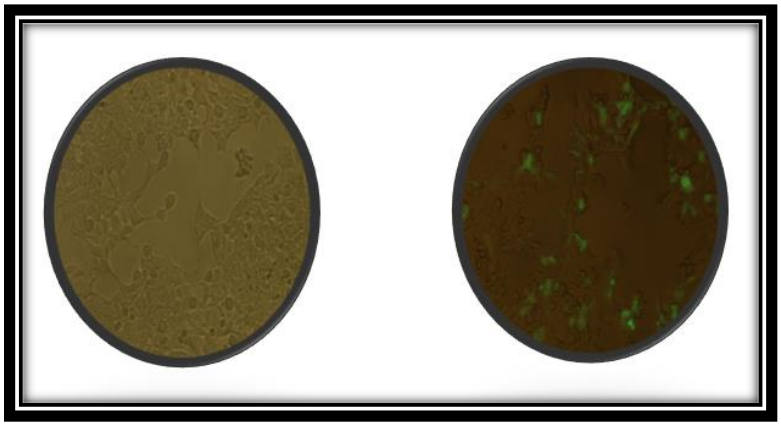
5.1.7.3. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ve edilmemiş ULV ve MLV'lerin MCF7 hücre hattına farklı (2,5uM-200uM) Mg^{+2} konsantrasyonlarında transfeksiyonu

PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmemiş MLV (çok katmanlı lipit vesikülü)'lerin MCF7 meme kanseri Hücre hattına farklı $MgCl_2$ (2,5uM-200uM) konsantrasyonlarında transfekte edilmiş, Şekil 5.103'de görüldüğü gibi DOTAP kontrol grubu hariç transfekte olmuş hücre görülmemiştir.



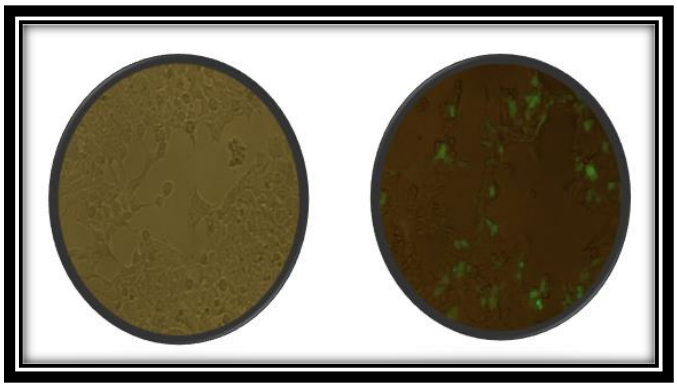
Şekil 5.103. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmemiş MLV'lerin MCF7 hücrelerine farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında transfeksiyonu.

PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmemiş ULV (tek katmanlı lipit vesikülü)'lerin MCF7 meme kanseri Hücre hattına farklı MgCl2 (2,5uM-200uM) konsantrasyonlarında transfekte edilmiş, Şekil 5.104'de görüldüğü gibi DOTAP kontrol grubu hariç transfekte olmuş hücre görülmemiştir.



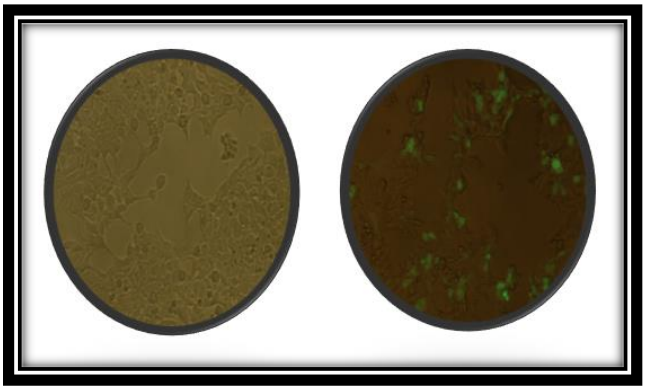
Şekil 5.104. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmemiş ULV'lerin MCF7 hücrelerine farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında transfeksiyonu.

PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV (tek katmanlı lipit vesikülü)'lerin MCF7 meme kanseri Hücre hattına farklı $MgCl_2$ (2,5uM-200uM) konsantrasyonlarında transfekte edilmiş, Şekil 5.105'da görüldüğü gibi DOTAP kontrol grubu hariç transfekte olmuş hücre görülmemiştir.



Şekil 5.105. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş MLV'lerin MCF7 hücrelerine farklı MgCl2 konsantrasyonlarında transfeksiyonu.

PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV (tek katmanlı lipit vesikülü)'lerin MCF7 meme kanseri Hücre hattına farklı $MgCl_2$ (2,5uM-200uM) konsantrasyonlarında transfekte edilmiş, Şekil 5.106'de görüldüğü gibi DOTAP kontrol grubu hariç transfekte olmuş hücre görülmemiştir.

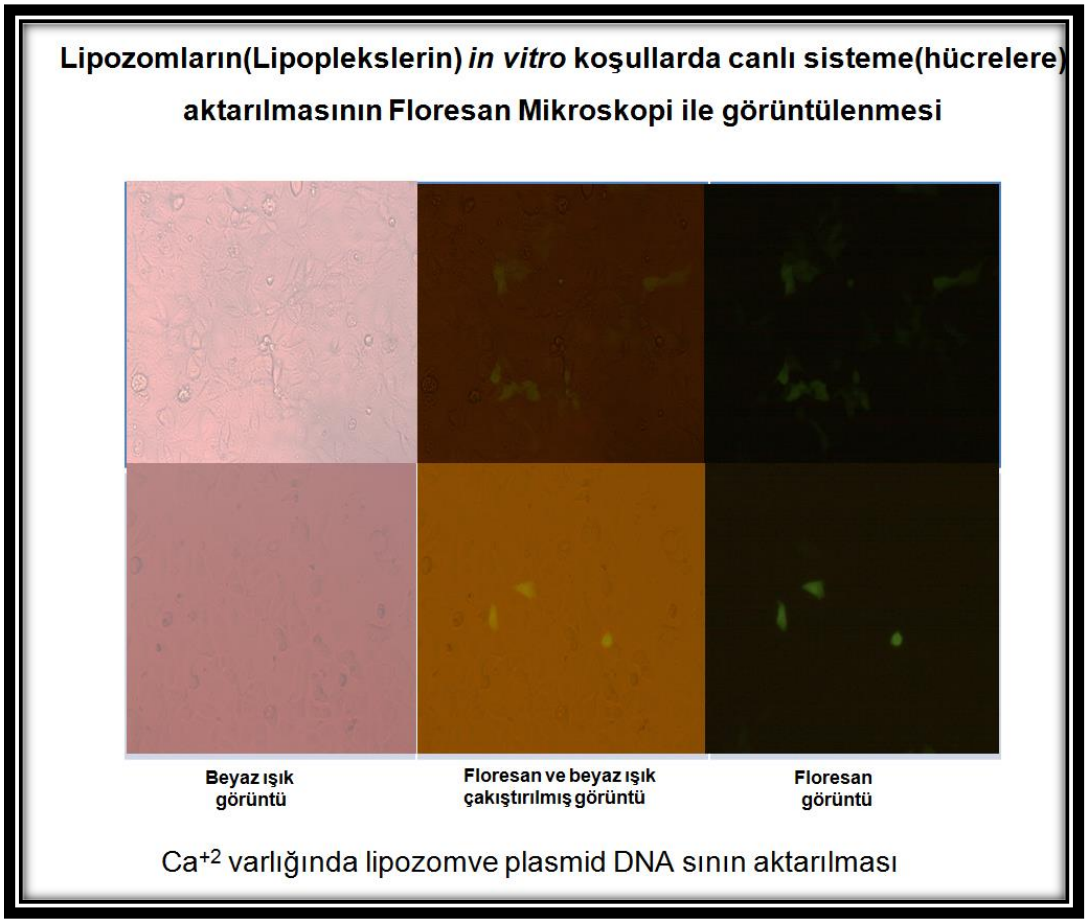


Şekil 5.106. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin MCF7 hücrelerine farklı $MgCl_2$ konsantrasyonlarında transfeksiyonu.

MLV ile yapılan deneyler sonucunda MLV'lerin 1000nm büyüklükte olmasından dolayı hücre porlarından geçişte zorlandığı sonucuna varılmış ve deneyler ULV'ler üzerine odaklanmıştır.

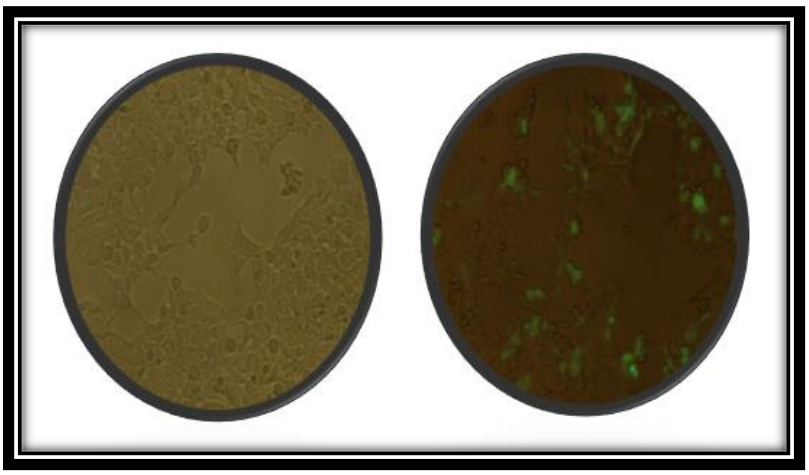
5.1.7.4. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin MCF7 hücre hattına farklı $CaCl_2$ ve $MgCl_2$ (2,5uM-200uM) konsantrasyonlarında transfeksiyonu

PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV (Tek katmanlı lipit vesikülü)'lerin MCF7 meme kanseri hücre hattına farklı $CaCl_2$ konsantrasyonlarında (2,5 mM-200 mM) transfeksiyonu sadece 5mM $CaCl_2$ konsantrasyonda gerçekleşmiştir. Şekil 5.107'de transfekte olan hücrelerin beyaz ışık, floresan ışık ve birleştirilmiş görüntüleri verilmiştir.



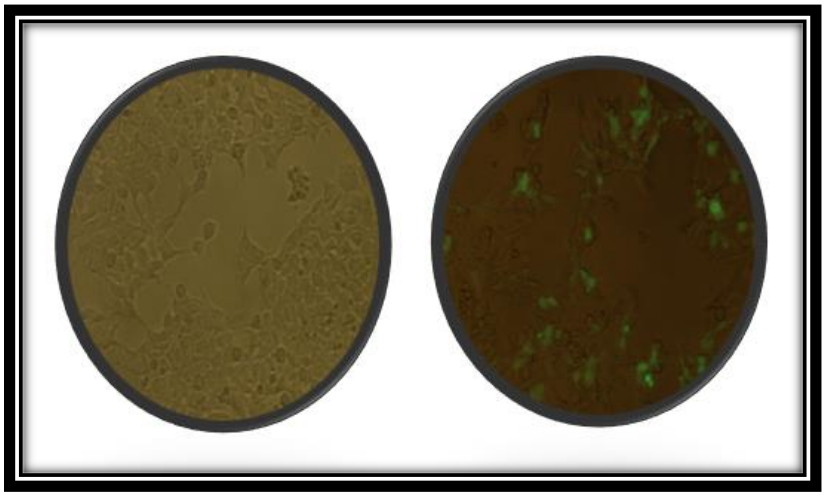
Şekil 5.107. PCMV.GFPDH5α Plazmid DNA'sı Kapsüle Edilmiş ULV'lerin MCF7 hücre hattına 5mM $CaCl_2$ konsantrasyonunda transfekte olmuş hücre görüntüleri.

PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV (tek katmanlı lipit vesikülü)'lerin MCF7 meme kanseri hücre hattına farklı $MgCl_2$ + $CaCl_2$ (2,5 mM-200 mM) konsantrasyonlarında transfekte edilmiş, Şekil 5.108'da görüldüğü gibi DOTAP kontrol grubu hariç transfekte olmuş hücre görülmemiştir.



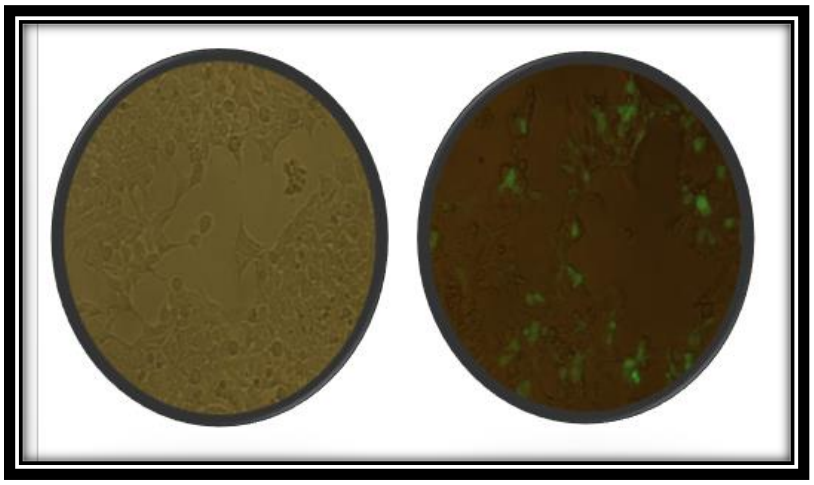
Şekil 5.108. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin MCF7 meme kanseri hücre hattına farklı $MgCl_2$ + $CaCl_2$ (2,5 mM-200 mM) konsantrasyonlarında transfeksiyonu.

PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV (tek katmanlı lipit vesikülü)'lerin MCF7 meme kanseri hücre hattına PCR kitinde kullanılan farklı $MgCl_2$ (2,5 mM-200 mM) konsantrasyonlarında transfekte edilmiş, Şekil 5.109'de görüldüğü gibi DOTAP kontrol grubu hariç transfekte olmuş hücre görülmemiştir.



Şekil 5.109. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin MCF7 hücre hattına PCR kitinde kullanılan farklı $MgCl_2$ (2,5 mM-200 mM) konsantrasyonlarında transfeksiyonu.

PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV (tek katmanlı lipit vesikülü)'lerin MCF7 meme kanseri hücre hattına PCR kitinde kullanılan $MgCl_2$ + $CaCl_2$ farklı (2,5 mM-200 mM) konsantrasyonlarında transfekte edilmiş, Şekil 5.110'de görüldüğü gibi DOTAP kontrol grubu hariç transfekte olmuş hücre görülmemiştir

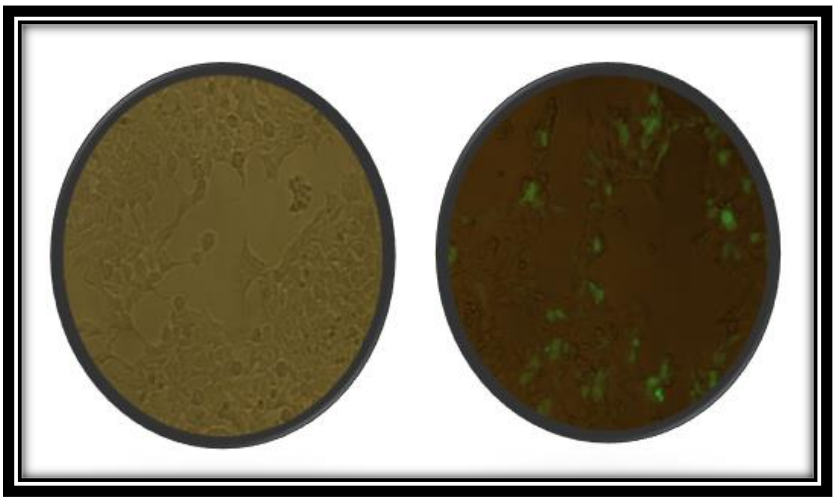


Şekil 5.110. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin MCF7 meme kanseri hücre hattına PCR kitinde kullanılan $MgCl_2$ + $CaCl_2$ farklı (2,5 mM-200 mM) konsantrasyonlarında transfeksiyonu.

5.1.7.5. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin He-La hücre hattına farklı $CaCl_2$ ve $MgCl_2$ (2,5 mM-200 mM) konsantrasyonlarında transfeksiyonu

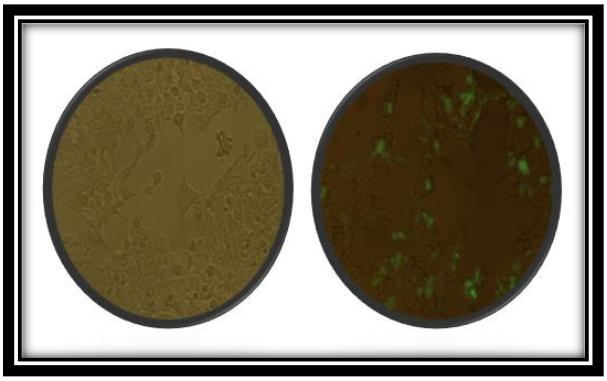
Farklı hücre tipi ile çalışmanın deney sonuçlarını etkileyip etkilemediğini araştırmak için He-La serviks kanseri hücre hattında transfeksiyon deneyleri yapılmıştır.

PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV (tek katmanlı lipit vesikülü)'lerin He-La serviks kanseri hücre hattına PCR kitinde kullanılan $MgCl_2$'ün farklı (2,5 mM-200 mM) konsantrasyonlarında transfekte edilmiş, Şekil 5.111'de görüldüğü gibi DOTAP kontrol grubu hariç transfekte olmuş hücre görülmemiştir.



Şekil 5.111. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin He-La serviks kanseri hücre hattına PCR kitinde kullanılan $MgCl_2$'ün farklı (2,5 mM-200 mM) konsantrasyonlarında transfeksiyonu.

PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV (tek katmanlı lipit vesikülü)'lerin He-La serviks kanseri hücre hattına PCR kitinde kullanılan $MgCl_2$ + $CaCl_2$'nin farklı konsantrasyonlarında (2,5 mM-200 mM) transfekte edilmiş, Şekil 5.112'de görüldüğü gibi DOTAP kontrol grubu hariç transfekte olmuş hücre görülmemiştir.



Şekil 5.112. PCMV.GFPDH5α plazmid DNA'sı kapsüle edilmiş ULV'lerin He-La hücre hattına PCR kitinde kullanılan $MgCl_2$ + $CaCl_2$'nin farklı konsantrasyonlarında transfeksiyonu.

Transfeksiyon deneyleri, MCF7 ve HeLa hücrelerinde, MLV ve ULV lipit vesikülleri ile iki değerlikli Ca^{+2}, Mg^{+2} ve PCR kitlerinde kullanılan $MgCl_2$ ile (2,5-200 mM aralığında 6 farklı konsantrasyonda) birlikte plasmid DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan MLV ve ULV'ler plasmid DNA'sı kapsüle edilerek ve kapsüle edilmeden uygulanmıştır. Bu bileşenler, uygulamadan önce geceboyu +4ºC'de ve 37ºC'de 60 dakika olmak üzere, iki farklı kondisyonda inkübe edilmmiştir. Transfeksiyon deney sonuçları Çizelge 5.2'de özet olarak gösterilmiştir. MCF7 hücrelerinde kapsüle edilmemiş ULV/DNA/Ca^{+2} üçlü kompleksi transfekte olmuştur. Burada Ca^{+2} konsantrasyonu 5 mM'dır. Diğer transfeksiyon deneylerinde transfeksiyon olmamıştır.

Çizelge 5.2. Transfeksiyon deney sonuçları

		Kap-ULV		Kap-MLV		ULV		MLV	
		GB	60	GB	60	GB	60	GB	60
MCF7	MgCl2;2.5-200mM (6 kons)								
	CaCl2;2.5-200mM (6 kons)						5 mM CaCl2		
	MgCl2 2.5-200mM;CaCl2 5mM								
	PCR kiti MgCl2; 25 mM								
Hela	PCR kiti MgCl2; 25 mM								
	PCR kiti MgCl2; 25 mM; CaCl2 5 mM								

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Yeni genom organizasyon modeli olarak nötral lipoplekslerin incelenmesi için tek katmanlı (ULV) ve çok katmanlı (MLV) lipit veziküllleri oluşturulup, oluşturulan lipit veziküllleri spektroskopik, termodinamik. mikroskopik ve boyut-potansiyel olarak incelenmiştir. Lipozom-DNA oluşumunun bütünlüğü agaroz jel elektroforezi ile teyit edilip, MTT testi ile sitotoksisitesi incelenmiş, Lipit/DNA/Mg^{+2}-Ca^{+2} üçlü oluşumunun *in vitro* tranfeksiyonu yapılarak canlı (hücresel) sisteme aktarılması değerlendirilmiştir.

6.1.1. LİPİT/DNA/MG^{+2} ÜÇLÜ OLUŞUMUNUN SPEKTROSKOPİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun spektroskopik karakterizasyonu UV/Visible, Dairesel dikroizm (CD), floresans, FT-IR, Sers-Raman spektroskopik ölçümleri ile araştırılmıştır.

UV/VIS spektrofotometre ile, tek katmanlı ve çok katmanlı lipit vesikülleriyle oluşturulan Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun yüksek moleküler ağırlıklı bileşik hale gelmeleri ve oluşum kinetikleri incelenmiştir. UV/VIS spektroskopisi ile incelemeler neticesinde dipalmitoylfosfatidilkolin (DPPC) ile nükleik asitler arasında ilk tanınma olaylarının kinetik profilleri gösterilip oluşan supramoleküler bileşenlerin sekonder yapısal değişiklikleri hakkında bilgiler elde edilmiş ve lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun meydana gelmesinde ortaya çıkan lipit füzyonları incelenmiştir (Şekil 5.1-Şekil 5.7).

Dairesel Dikroizm (Circular Dichroism spectroscopy-CD) spektroskopik görüntülemeleri sırasıyla nükleik asitler ve fosfolipitler üzerine uygulanmıştır. Lipit sabit miktarda, DNA arttırılarak üçlü oluşumdaki bağlanma, CD spektroskopik görüntüleri ile alınmıştır. Bu amaçla ele alınan B-tipi bakteriyofaj T7 DNA ile DPPC MLV arasında konformasyonel değişikliklerin takibi için uygulanmıştır. Dairesel dikroizm spektroskopik analizi yükselen DNA derişimlerinde lipozom-DNA komplekslerin konformasyonlarının değiştiğini (Şekil 8.1-Şekil 8.2) göstermektedir. Bu durum, kararlı bir bileşik oluşumunu teyit etmektedir.

Zaman Tanımlı Floresans Spektrometre, Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun meydana gelmesinde ortaya çıkan lipit füzyonlarının incelenmesinde kullanılmıştır. Şekil 5.12'de Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin floresan spektroskopisi ile ölçümünde kullanılan Mg^{+2}, her defasında 25 mM arttırılarak ölçüm yapılmış, Mg^{+2} konsantrasyonunun belirleyici olmadığı gösterilmiştir (Şekil 5.8-Şekil 5.12)

FT-IR spektroskopik ölçümleri ile Mg^{+2} varlığında çeşitli lipit türleri ile DNA arasında oluşan komplekslerde ilk tanınma olaylarının ve bu oluşumda rol oynayan fonksiyonel gruplarının ortaya çıkarılmasında kullanılmıştır. DPPC/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun yapısını aydınlatmak amacıyla örneğin küçük açılı X-ray saçılımı (WAXS ve SAXS) gibi yöntemlerle gerçekleştirilebilecek olan farklı yaklaşımların uygulanması esastır (116). Lipit ağırlıklı fazların yer aldığı termodinamik denge güçlerince meydana getirilen DNA-lipit agregatların oluştuğu açıktır. Lipit ağırlıklı yapılar bu araştırmamızda da elde edilmiştir ve bunlar titreşim spektroskopisi analizlerinden gelmektedir (Şekil 5.17-Şekil 8.3).

Şekil 5.14'da görülen 1750-1650 cm^{-1} bölgesinde 1738 cm^{-1} ve 1675 cm^{-1} daha belirgin bantlar görülmektedir. Söz konusu bantlar dana timus DNA'da daha da belirgindir. Bunlardan ilki Timine özgü C2=O, diğeri ise C4=O ve C5=C6 bağ sinyalleridir. 3400 cm^{-1} bant, B-sarmallardaki hidrasyona uğramış su moleküllerin O-H titreşim bantıdır. 1100 cm^{-1} bant PO_2 simetrik titreşim frekansıdır. Çok ilginç olarak 1200 cm^{-1} yer alan PO_2 simetrik titreşim frekansıdır. Ayrıca DPPC/DNA/Mg^{+2} üçlü bileşiklerinin farklı nükleik asit konformasyonlarına karşı bağlanma afinitelerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Nükleik asitlere özgü 1000 cm^{-1} ile 700 cm^{-1} bölgesinde birçok daha düşük frekanslı bant görülmektedir. Bunlar genelde P-O, C-O ve N-H titreşimlerden kaynaklanmaktadır. Yapılan ölçümlerde nükleik asitlerin B formunda oldukları 1236 cm^{-1}, 1086 cm^{-1}, 1064 cm^{-1} ve 956 cm^{-1}'deki piklerden kanıtlanmaktadır (Şekil 5.14). Üçlü oluşumdaki yapısal değişiklikler spektroskopik olarak gözlemlenmektedir. Genelde DNA'nın fosfat grubu üzerinden bağ yapılmaktadır. 2.pikler su bantıdır. İlk bantlar fosfat grubu üzerinden bağ yapıldığını göstermektedir. Ayrıca Şekil 5.15'de MLV ve ULV oluşumları FTIR spektroskopisiyle gösterilmiştir. MLV'lere özgü birçok titreşim bantı ve özellikle 3400 cm^{-1} bölgeye özgü su bantı, CH ve CH_2 bantları ULV süspansiyonunda görülmemektedir. ULV süspansyonunun FT-IR spektrumunda sadece fosfat ve karbonil grubu titreşim

frekans bantları görülmektedir. FT-IR ölçüm spektrumları üst üstte getirildiğinde dairesel dikroizm spektroskopisinden elde edilen konformasyonel değişiklikler teyit edilmektedir.

UV/VIS spektroskopisi oluşan yapıların kinetiği ve sekonder yapısal değişiklikleri konusunda bilgiler vermektedir. Ancak, oluşan yapılarda hangi fonksiyonel grupların yer aldığı ve önem taşıdığı konusunda güçsüz kalmaktadır. Bu nedenle, bu fonksiyonel grupları ortaya çıkarmak amacıyla Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) uygulanmıştır. pDNA'da tipik IR spektrumları görülmektedir. Bu IR spektroskopik ölçümler sayesinde çeşitli plazmid DNA, genomik DNA gibi farklı topolojiye sahip nükleik asitlerin genel fonksiyonel grupları moleküler düzeyde ortaya çıkarılmıştır.

FTIR ölçümlerinde su bandı çoğu zaman araştırılmakta olan fonksiyonel grupların bandlarıyla örtüştüğünden sağlıklı spektrumun çekilmesinde büyük bir sorun teşkil etmektedir. Çözüm olarak ağır su (D_2O) veya dekonvolusyon paket programları kullanılmaktadır. Çekilen FTIR spektrumlarını Raman spektroskopisi ile teyit etmek, bu sorunun çözümlerinden biridir. ***Raman saçılımında*** su bandı olması ölçüm sonuçlarını önemli derecede etkilememiştir. Bu tez çalışmasında, Raman spektrometrik ölçümleri su bandının sorun çıkardığı durumlarda kullanılmıştır.

Raman spektroskopisi özellikle lipit katmanların üzerinde nükleik asit sarmallarının lokalizasyonunun tayini için uygulanmıştır. Şekil 8.3'te I2935/2880, I2844/2880 ve I1090/1130 bölgelerinde görülen yüksek pik yoğunlukları, DPPC katmanlarının alkil zincirlerinin konformasyonları hakkında bilgi vermektedir. I2935/2880 ve I1090/1130 görülen pikler ise DPPC lipit katmanlarının alkil zincirlerinin ve son metil grubunun düzensizliği hakkında bilgi vermektedir. 2800–3100 cm^{-1} bölgesindeki CH hidrokarbon titreşime ait spektral değişiklikler DPPC'in alkil zincirleri ile DNA arasında oluşan bağlar hakkında bilgi vermektedir. Bu bölgeye özgü spektral yoğunlukların ve frekansların değişmesi doğan biyomembranlarda da görülen sıvı→kristal faz geçişlerini işaret etmektedir. 2844 ve 2880 cm^{-1} bölgesindeki titreşimler metilen grupların simetrik ve asimetrik CH hidrokarbon moleküllerine aittir ve konformasyonel değişikliğinin meydana geldiğini göstermektedir.

Şekil 8.3'de görüldüğü gibi üçlü kompleksin (lipit/DNA/Mg^{+2}) Sers Raman titreşim spektroskopisindeki ölçümlerinde görülen farklı dalga boylarındaki pikler üçlü yapının bir

araya geldiğini göstermektedir. Bağ oluşmasaydı, aynı titreşimde sonuçlar gözlenirdi. Lipozom/DNA/Mg^{+2} komplekslerin, lipit türüne ve DNA ile oluşturdukları yük oranlarına bağlı oldukları açıktır. Ancak bunların oluşum kinetikleri derişimlerine, ortam ısısına, vesikül boyut ve şekline ve hazırlama yöntemine bağlıdır.

6.1.2. LİPİT/DNA/MG+2 ÜÇLÜ OLUŞUMUNUN TERMODİNAMİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Lipozomların ve oluşturulan üçlü bileşenlerin termodinamik değerlendirilmeleri diferansiyel taramalı kalorimetri (Differential Scanning Calorimetry-DSC), ve izotermal titrasyon kalorimetri (Isothermal Titration Calorimetry-ITC) ile yapılmıştır.

Elde edilen neticeler, gözlenen DNA-lipit etkileşmelerinin genelde elektrostatik güçlerce (uzun vadeli, spesifik olmayan, yükler arası etkileşmeler) ve hidrojen bağları (kısa vadeli, yönlendirici, dipol-dipol etkileşmeleri) sayesinde bazen de polinükleotitlerdeki baz çiftleri üzerinden meydana geldiğini göstermektedir. DPCC'nin amfifilik doğası itibariyle yük-yük hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşmeler gibi çeşitli tepkimeler bağlanma olayında rol oynayabilmektedir. Fosfolipit baş gruplarının bir çoğunun genelde proton ve karboksil grupları üzerinden yük taşıdıklarından bunlar elektrostatik olarak DNA zincirindeki fosfat gruplarıyla ve Mg^{+2}'la da elektrostatik olarak tepkimeye girebilmektedir. ***Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)*** ile, Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun bileşik hale gelmelerinin termodinamik ölçümleri yapılmıştır.

İlginç olarak ITC izoterm ölçümleri bu tür bir elektrostatik-hidrofobik etkileşmeleri tespit edememektedir. Bağlanma serbest enerjisinin entropik kısmı DSC ve ayrıca ITC ölçümleriyle elde edilmiş olup, entropik güçlerce tetiklenen hidrofobik etkileşimlerinin meydana geldiğini göstermektedir. ***ITC cihazı ile,*** Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun bileşik hale gelmelerinin kinetik ölçümleri yapılmıştır.

ITC izotermi (Şekil 2.29-Şekil 2.30) kendi içinde elektrostatik ve hidrojen bağı kombinasyonlarını içerebildiği gibi DNA/lipit agregatlarındaki paketleme-sıkıştırma tepkimelerini de içerebilmektedir. Böylece bu tür kendi kendine oluşan toplaşımlarda genelde spesifik olmayan DNA-lipit tanıma olaylarının birkaç türü rol oynamaktadır. Mg^{+2} tarafından tetiklenen tersine doğru yük değişiklikleri hidrojen bağları sayesinde lipitdeki

son karboksil gruplarıyla ve DNA polianyon arasında uzun vadeli kolumbik (Coulombic) çekim güçlerince meydana getirilmektedir. Bu güçler kendi kendine oluşan toplaşımların oluşumlarında rol oynarlar ancak bunun tam mekanizması henüz daha bilinmemektedir.

Bu toplaşımlar, substrat ve ajanlar tarafından meydana getirilen, vesikül içinde kimyasal tepkimeyle sonuçlanacak ilaç taşınım sistemleri olarak sıkça ele alınmaktadır.

Bu bağlamda bu araştırmada ele alınan nükleik asitlerde model terapötik ilaç birimleri olarak algılanmaktadır. Söz konusu model nükleik asitlerin nano-veya mikroreaktörler olarak işlev gören lipit katmanları içinde polinükleotitlerin kendi kendine polimerizasyonuna dayanmaktadır. Bu araştırmamızda vurgulandığı üzere lipit mikrokompartmanlarında paketlenmiş DNA fazlarının meydana gelmesiyle önem kazanan mono-ve çok katmanlı akışkanlık, boyut, geçirgenlik gibi parametrelere bağlıdır. Terapötik nükleik asitlerin (DNA ve RNA) çok katmalı lipit taşıyıcılarla mı yoksa bunlardan ekstruzyon veya sonikasyon yöntemiyle elde edilen tek katmanlı lipit vesiküllerce mi hücresel transfeksiyonlarında yüksek etkinliğin elde edildiği konusuyla ilgili yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Taşıyıcı sistem ne olursa olsun böyle bir genozom başarılı terapötik gen ifadesinin elde edilmesinden önce bir çok hücresel engeli aşması gerekmektedir. Genelikle, genozomlar veya lipopleksler çeşitli mekanizmalarla hücre içi geçişi gerçekleştirmektedirler.

En sık olarak nano boyuttaki bu araçlar endositoz sorunu ile karşılaşmaktadır ve böylece hücre çekirdeğine ulaşmadan çok önce degredasyonlar meydana gelmektedir. Böylece reseptör üzerinden gerçekleştirilen hücre içi geçiş yolundan alternatif kaçış yolunun tasarlanması önem kazanmaktadır (117). Bu bağlamda DNA/lipit komplekslerinin yapıları belirleyici bir faktör olarak öne çıkmaktadır. DNA/lipit kompleksleri arasında oluşan farklı oranlar entropik güçlerce tetiklenen elektrostatik etkileşmeler izoelektrik emsallerine göre çok daha uygundur (118). Bu yüzden araştırmamızın amaçlarından biri daha az araştırılmış olan ekvimolar DNA-lipit karışımlarının incelenmesidir. Oluşan olası yapılarla ilgili diğer ipuçları literatürden gelmektedir. DNA nötr lipit DPPC ile zwitteriyonik çift tabakalar arasında nükleik asit moleküllerinin interkalasyonu ile meydana gelmektedir (119).

Böylece Mg^{+2} karşı yüke sahip iyon salınımlarıyla gerçekleştirilen elektrostatik lipit nükleik asit etkileşmelerinin meydana gelmesini sağlamaktadır. Sonuç olarak DNA daha

ileri düzeyde paketlenme haline gelmektedir ve bu olayda katyonik lipozomlarla gerçekleştirilen mekanizmalardan farklılık teşkil etmektedir (120).

6.1.3. LİPİT/DNA/MG^{+2} ÜÇLÜ OLUŞUMUNUN MİKROSKOPİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop ile, Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun yapısında yer alan lipidlerle, çift zincirli ve tek zincirli DNA'ya özgü floresans boyalar kullanarak, bu makromoleküllerinin ve özellikle DNA kompaktizasyon dinamiği ölçülmüştür.

Yüksek ***kontrastlı transmisyon elektron mikroskobu (CTEM)*** ile Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun tekli. ikili ve üçlü bileşenlerinin yüksek kontrastlı görüntüleme yapılmıştır.

6.1.4. LİPİT/DNA/MG^{+2} ÜÇLÜ OLUŞUMUNUN BOYUT VE POTANSİYEL ANALİZİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dinamik ışık saçılımı (Dynamic Light Scattering-DLS) ile incelenmesi ve Z-potansiyel ölçümleri ile yapılmıştır. ***Dinamik Işık Saçılım Spektrometresi (DLS)***, Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun boyut analizi yapılmıştır. Zeta Potansiyel ve Mobilite Ölçüm Cihazı Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun elektrostatik davranışları ve boyut analizi yapılmıştır.

Ölçümlerde Şekil 5.33'de MLV yapıları çok sayıda ve farklı boyutlarda bulunmaktadır. Oluşturdukları süspansiyon 250 nm–1000 nm arasında değişmektedir ve son derece heterojendir. Şekil 5.34'de oluşturdukları süspansiyon 50 nm–300 nm arasında değişmektedir ve son derece heterojendir.

Şekil 5.35'de veriler, bağlanmamış ve ligand bağlı ikili ve üçlü kompleks büyüklüğü dağılımları açısından gösterilmiştir. Parçacık büyüklük profilleri, farklı zaman aralıklarında farklı DNA/lipit örnekleri üzerinde yapılan dört ölçümün ortalamasıdır. Bu ölçümler sayesinde ele alınan üçlü kompleksin oluştuğu gösterilmiştir (115).

Z-potansiyel ölçümler, oluşan bu üçlü nanobileşenlerin toplam yükünün negatif olduğunu ve böylece DNA yapısında bulunan fosfat gruplarının nötral olan lipitvezikül yüklerini baskıladığını ortaya çıkarmıştır. Böylece çalışmada amaçlanan elektrostatik hücre içi geçiş mekanizmasına yönelik bir ön tasarım oluşturulmuştur.

6.1.5. LİPİT/DNA/MG+2 ÜÇLÜ OLUŞUMUNUN LANGMUİR BLODGETT TEK KATMAN YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Langmuir-Blodgett tek katman cihazı ile Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun yüzey kimyasal analizleri yapılmış ve özellikle fosfolipityüzeyine DNA'nın adsorbsyonu ile ilgili ölçümler yapılmıştır.

Langmuir-Blodgett (Langmuir-Blodgett The Science Park, Coventry CV4 7EZ, İngiltere; Model 112D) film oluturulması ve yüzey basınç ölçümleri şu şekilde gerçekleştirilmiştir. Üzerine teflondan üretilmiş olan bariyerler monte edilerek izotermler çekilmiştir. Yüzey basınç (P) Wilhelmy yöntemi ile ölçülmüştür. Konteyner ultra saf su ile doldurulmuş ve üzerine önceden belirlenen derişimlerde sırasıyla fosfolipit ve nükleik asit çözeltileri istenilen oranlarda damlatılmıştır. Tüm ölçümler 35°C kontrollü olarak gerçekleştirilmiştir.

Tek katmanların yüzeysel temizliliği kriteri olarak bariyer testi uygulayarak 3 ayrı tekrardan elde edilen izotermler arasındaki farkın ±0.1 mN/m'den daha fazla olmamasına dayanmaktadır.

Lipit tek katmanlarının izoterm eğrilerinde yüzey sınırında yer alan moleküllerinin oryantasyonlarındaki değişikliklerin göstergesi olan yapısal farklılıkları da görmek mümkündür. Uzun hidrokarbon zincirin ucunda iki hidrofil grubu içeren moleküller için örneğin floresan işareti olarak yoğun kullanılan 16 (9-antroiloksi)-palmitik asidin durumunda olduğu gibi, bu lipit ile oluşturulan tek katmanın kondanze olmasıyla, ölçülen izoterm eğrisinin türevinin (slope, eğiminin) de değiştiği bilinmektedir. Söz konusu değişiklik, oluşan yüzey sınırında bu işaretin hidrofil gruplarından biri olan COOH grubunun yer değiştirmesi ve tüm molekülün tek katmandaki konformasyonunun hareketliliği ile açıklanmaktadır. Yüzey basıncın düşük olduğu durumlarda, bu molekül yüzey sınırında su ile en uçtaki COOH-grubunun ve antranil döngüsüne komşu olan CO-grubuna temas yapacak şekilde yerleşir. Bu yaklaşım, özellikle Langmuir-Blodgett tek katman ve floresan mikroskopik araştırmalarında yoğun olarak uygulanmaktadır.

Şekil 5.58 görüldüğü gibi Poisson-Boltzman ve Gibbs teorileri doğrultusunda negatif yüklü nükleik asitler önceden oluşturumuş DPPC lipit tek katmanları üzerine ve altına hidrofobik güçler tarafından yerleşmektedir. Söz konusu ikili oluşumların işgal ettiği alan 55

A^2/molekül'dür. Söz konusu oluşumlarda elektrostatik güçlerin bir rolü yoktur. Ancak üçlü DPPC-Mg^{+2}-DNA yüzey yapılarının oluşturulmasında elektrostatik güçler rol oynamaktadır. Yük taşımayan DPPC molekülleri üzerinde hidrofobik güçlerce yerleştirilen negatif yüklü nükleik asitler Mg^{+2} katyonları sayesinde elektrostatik olarak da çok daha sabit üçlü sistemi oluşturmaktadır. Bu üçlü bileşiklerinin işgal ettiği alan 75 A^2/molekül başına karşılık olan bir alan oluşturmaktadır. Sisteme kolesterolün etkisi de incelenmiştir. Bu ölçümler sayesinde ele alınan biyomakromoleküller arasında kendi kendine toplaşım (self-assembly) oluştuğu gösterilmiştir.

6.1.6. LİPİT/DNA/MG^{+2} OLUŞUMUNUN ÜÇLÜ BİLEŞENLERİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Lipit/DNA/Mg^{+2} oluşumunun agaroz jel elektroforezi ile çift değerlikli metal iyon varlığında lipozomlarla bağlanmaları takiben plazmit DNA'nın topolojik ve konformasyonel değişiklikleri hakkında çok önemli bilgiler vermektedir. Süpersarmal nükleik asitlerin hücresel transfeksiyonlarda en etkili konformasyon olduğu anlaşıldığından dolayı büyük önem kazanmaktadır. Bu yaklaşım sayesinde plazmit DNA'nın 3 ayrı konformerlerinin (relakse, yarı sarmal ve süpersarmal;Şekil 5.59) yanı sıra 2 ayrı (plazmit DNA-lipozom ve plazmit DNA-Mg^{+2}) tanınma olaylarının analizi de mümkündür. Bu bağlamda ilk önce bakteride (E. coli) çoğaltılmış GFP-plazmitin saflaştırılması yapılmıştır. Sırasıyla, pCMV.GFP plazmiti DH5α bakterisine transforme edilmiştir. Yüksek miktarda bakteri kültüründen Endofree QIAfilter Plazmit Maxi kit (Qiagen) ile plazmit DNAsı saflaştırılması yapılmıştır, spektroforometrede düzeyi türbidimetrik olarak ölçülüp, %0.8'lik agaroz jel elektroforezde yürütülmüştür.

Daha sonra ele alınan nanobileşiklerde meydana gelen ikili (DPPC-ULV-plazmit DNA) ve üçlü (Mg^{+2} varlığında. DPPC-ULV/Mg^{+2}/plazmit DNA) tanınma olayları izlenmiştir. Şekil 5.64'da ikili lipozom/plazmit DNA bileşiklerin inkübasyon zamanına göre Mg^{+2} yokluğunda DPPC-ULV/plazmit DNA arasında oluşan bileşiklerin konformasyonel analizi gösterilmişitr. İnkübasyon süresi uzadıkça daha iyi bir lipozom-nükleik asit bağlanması olduğu açıkça görülürken, plazmit DNA bant yoğunluğu azalmaktadır. Bu olay 2 ayrı plazmit DNA topomerinde (daha yüksek moleküler ağırlığa sahip relakse topomer ve daha düşük moleküler ağırlığı olan süpersarmal plazmit DNA'sı) de görülmektedir. Ancak

süpersarmal DNA'nın, çok daha etkili bir bağ yaptığı görülmektedir. Bu topomerin hücresel transfeksiyonlarda en etkili konformasyon olduğu göz önünde bulundurulduğunda bu netice önem kazanmaktadır. Bu reaksiyon kinetiği Şekil 5.62-Şekil 5.64'de çok daha uzun inkübasyon süreleri ve farklı lipit ve plazmit DNA derişimleri kullanılarak da teyit edilmektedir. Farklı Mg^{+2} derişimlerinin ve inkübasyon sürelerinin söz konusu nanobileşik yapılarının oluşumu üzerindeki etkilerini göstermektedir. Görüldüğü gibi Mg^{+2} varlığında üçlü bileşik komplekslerinin oluşması daha yüksek inkübasyon sürelerini gerektirmektedir. Aynı fizikokimyasal özellikler,boyut analizlerinde ve *in vitro* hücresel transfeksiyonlarında da teyit edilmektedir.

Artan ULV miktarlarının kullanımının ise Şekil 5.62ve Şekil 5.63'te agaroz jelde gözlenebilen plazmit DNA görüntüsünü azaltmasından hareketle enkapsülasyon sürecine kısmen olumlu bir katkı yaptığı tespit edilmiştir. Ancak Şekil 5.62'te görüleceği üzere artan ULV kullanımı etkisi ancak kuyuda az düzeyde etkisini göstermiştir. Bu durum tarafımızdan bu protokolün tekrar edilebilirliği ile ilgili olarak olumsuz kanaat oluşturmuş ve enkapsülasyon prosedürünün alternatif bir yol olarak denenmesi gerektiğini işaret etmiştir. Kontrol amaçlı yaptığımız deneyde transfeksiyon ajanı olan DOTAP'ın plazmidi efektif olarak içine alabildiği gösterilmiştir (Şekil 5.65/Kuyu 3). MLV ve ULV'de başarılı enkapsülasyon sonuçları elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezinde gösterilmiştir.

Agaroz jel elektroforez incelemelerinden elde edilen üçlü bileşik oluşum verilerinin elektrostatik özelliklerine dayanarak biyolojik olarak daha anlamlı olan hücresel transfeksiyon deneyleri tasarlanmıştır. Katyonik lipozomlarca tetiklenen hücresel gen aktarımları üzerinde yapılan araştırmalar genelde bu tür bileşiklerin hücre içi geçiş mekanizmalarının endositoza dayalı olduklarını ve genelde plazmitlerin endozomal degradasyon neticesinde sitoplazmaya salgılandıklarını göstermektedir (121). Plazmit DNA'sı ile gerçekleştirilen hücresel transfeksiyonların katyonik lipozomlar tarafından yüksek düzeylerde kolaylaştırıldığını ortaya çıkarmıştır, ancak bu durumda bile transfeksiyon etkinliği oldukça düşük bulunmuştur.

Dolayısıyla, daha etkili terapötik DNA ve gen ifadesi profilleri elde etmek amacıyla yeni ve fizikokimyasal özellikleri iyileştirilmiş özgün yapay veya sentetik gen aktarım taşıyıcı sistemlerinin tasarlanması gerekmektedir. Katyonik lipitlerin yoğun pozitif yükü çok

yüksek sitotoksisiteye neden olduğundan (115), tasarımımızda bu tür yoğun pozitif yüklerin ve katyonik lipitlerin yerine çok düşük pozitif yük taşıyan Mg^{+2} gibi biyometallerin uygulanabilmesi hususuna vurgu yapılmaktadır.

6.1.7. LİPİT/DNA/MG^{+2} ÜÇLÜ OLUŞUMUNUN HÜCRESEL SİSTEME AKTARILMASININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarının lipozomlarca tetiklenen hücresel transfeksiyonu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Temel transfeksiyon protokolünün işlerliği test edilmiş ve gerek XtremeGeen-HP (Şekil 5.96-Şekil 5.99) gerek DOTAP'ın (Şekil 5.100-Şekil 5.102) transfeksiyon ajanı olarak kullanıldığı durumlarda GFP taşıyan plazmidin HEK-293 hücrede başarı ile aktarılabildiği görülmüştür.

MLV transfeksiyon denemeleri de gerçekleştirilmiş (Mg^{+2} varlığı ve yokluğunda) ancak olumlu sonuç alınamamıştır. Literatür verileri ve şahsi tecrübelerimiz bu durumun MLV'lerin 100-800 nm arasında büyük yapılar olmasından kaynaklandığını işaret etmiştir

Transfeksiyon çalışmalarının ilk aşamasında daha önce UNAM'da hazırlanmış olan ULV'ler kullanılarak plazmit DNAsının ULV'lerin içine girmesinde ULV ve plazmit DNA'sının birarada inkübasyona bırakıldıkları süre ve kullanılan ULV'nin artan miktarının sürece etkisi değerlendirilmiştir. Burada amaç transfeksiyon öncesi plazmit DNA'sının ULV'ye en etkin şekilde aktarılmasını/ lipopleks oluşmasını sağlamaktır. UNAM'da Mg^{+2} ile oluşturulan üçlü kompleksin hücreye transfeksiyonu gerçekleştirilmiş ancak deney tekrarlanamamıştır.

Bu tür üçlü bileşikler tarafından tetiklenen hücresel transfeksiyonlar üzerinde Mg^{+2} etkilerini ortaya çıkarmak amacıyla, ele alınan hücre hatları plazmit DNA/Mg^{+2}/DPPC-ULV kompleksleri ile yükselen Mg^{+2} derişimlerinde transfekte edilmiştir. Pozitif kontrol olarak DOTAP katyonik lipit sistemleri kullanılmıştır. Gerek pozitif kontrol olan DOTAP reaksiyonunda gerekse DPPC-ULV veziküllerle meydana gelen tepkimelerde, plazmit DNA 2 ayrı lipit türü ile bileşik haline getirilmiş ve farklı lipit/DNA oranlarında transfeksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu kompleksler hızlı bir şekilde Mg2+ derişimleri ile muamele edilmiş, 30 dakikalık sıcaksu banyosunda ya da gece boyu +4ºC'de inkübasyonları yapılmış ve son olarak son konsantrasyonlar DMEM kültür çözeltisi ile

ayarlanmış ve bu şekilde hücre kültürüne uygulanmışlardır. Kontrol deneyde beklenildiği gibi katyonik lipitler çok yüksek transfeksiyona sahip bir profil vermektedir. Tek katmanlı DPPC-ULV veziküllerin Mg^{+2} varlığında transfeksiyon etkinliği görülmemiştir. Beklenildiği gibi, pozitif yüklü DOTAP lipitlerin transfeksiyon etkinlikleri hala daha yüksektir, ancak sitotoksisiteleri de çok yüksektir. Tasarımımızda elde edilen DPPC-ULV sitotoksisik değildir. Hücresel tedavilerde bu çok önemli bir husustur.

6.2. SONUÇ

Lipoplekslerin yüksek transfeksiyon yeteneklerinin ve düşük sitotoksisite profillerinin daha iyi anlaşılabilmesi için boyut, lipit/DNA şarj oranı (±), net yüzey yükü gibi özelliklerinin iyi tanımlanması ve lipoplekslerin iyileştirilmiş özelliklerinin geliştirilmesi için gen taşıyıcı lipit kimyasal yapısı hem de genozomların genel toplaşım yapısının aydınlatılması önemlidir.

Tek katmanlı(ULV) ve çok katmanlı (MLV) lipit vezikülleri, ekstruzyon yöntemiyle elde edilmiştir. Lipit vesikülü/Mg^{+2}/DNA üçlü bileşenlerinin spektroskopik, termodinamik, mikroskopik ve boyut-potansiyel olarak incelemesi yapılmış, bu üçlü oluşum doğrulanmıştır. Doğal nükleik asit B formunun, üçlü kompleks oluşumu sırasında korunduğu CD ve FTIR spektroskopisi ile ortaya koyulmuştur. Bu tez çalışmasında yük taşımayan lipitlerle çeştli konformasyonlara ve boyutlara sahip polinükleotitler arasında oluşan kendi kendine toplaşımların (self-assemblies) hazırlanması ve kullanımları ile ilgili temel biyofiziksel parametreler incelenmiştir. Bu doğrultuda yeni deneysel protokoller geliştirilmiştir. Daha spesifik olarak, çift valanslı metal katyonlarca tetiklenen tek- ve çift sarmallı polinükleotitlerin çok katmanlı (MLV) ve tek katmanlı (ULV) fosfatidilkolin vezikülleri üzerine adsorpsyonu, agregasyonu ve adhezyonu UV/VIS Spektroskopisi ve Türbidimetri ile incelenmiştir. Zwitteriyonik lipozomların termotropik faz değişimleri Mg^{+2} varlığında polinükleotitlerle ve dana timüs DNA'sı, bakteriyofaj T7 DNAsı ve süpersarmal konformasyona sahip plasmit (pBR322 ve pUC 18) DNAları ile bileşikler oluşturmaları termodinamik ölçümler ve floresan mikroskopisi ile incelenmiş ve çeşitli elekstrostatik lipit-nükleik asit bileşiklerin oluşumları ile ilgili daha önce yayımlanan verilerle kıyasalanmıştır. Bu şekilde oluşan üçlü bileşiklerin yüzey tanınma ve sınırlararası özellikleri Langmuir-Blodgett tek katman, titreşim (FTIR ve Raman) spektroskopisi ve Dairesel Dikroism (Dairesel dikroizm=CD) Spektroskopisi ile araştırılmıştır. Bu

genozomların boyut ve morfoloji analizleri elektron mikroskopisi (TEM), z-potansiyel, Dinamik Işın Saçılımı (DLS) veya Foton Korelasyon Spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. İnorganik katyonların varlığında sentetik fosfatidilkolin vezikülleri ile polinükleotitler arasında oluşan üçlü bileşiklerin termodinamik özellikleri termal analiz (Diferansiyel Taramalı Mikrokalorimetrik (DSC)), oluşum kinetikleri ise kinetic analiz (İzotermal Titrasyon Kalorimetrik (ITC)) ölçümlerden elde edilen veriler söz konusu bileşiklerin yapısal değişikleriyle ilgili termodinamik ve kinetik modellerin ortaya çıkarılmasında kullanılmıştır. Mg+2 varlığında DNA tarafından meydana getirilen lipozomlar arasında füzyon olayları floresan mikroskopisi deneyleriyle incelenmiştir. Polinükleotit-lipit tanınma olaylarından sonra doğrudan bağlanma ve DNA sarmal stabilizasyonu, elde edilen pik yoğunluklarının önemli ölçüde düşüşlerinden gözlenmiştir. Bu bulgular bazlar arasında sıkıştırma ve çiftleşmelerin değiştiği anlamına gelmektedir. Tüm bu neticeler, doğrudan etkileşimleri ve şarj nötralizasyon nedeniyle DNA sıkıştırılmasını göstermektedir. Floresan spektroskopisi ve SERS ölçümleri lipit ortamda DNA sıkıştırma mekanizmalarının elektrostatik ve hidrofobik güçler tarafından meydana getirildiğini göstermektedir. Metal katyonlarının yoğuşmalı etkileri morfolojik olarak floresan mikroskopi ve TEM görüntüleri ile gösterilmiştir. Yeni makromoleküler tedavi sistemlerinin geliştirmesi hem kolloidal güçlere hem de dinamik biyofizikokimyasal etkileşimlere bağlı olduğundan, DNA-lipit komplekslerinin boyut, şekil, yük ve morfoloji gibi biyofiziksel özelliklerinin önemi vurgulanmıştır. Bu tür nükleik asit-lipit tanımaların nano malzeme yüzeylerinde faz ayrımları, serbest enerji salınımları, kinetik düzenlenmeleri meydana gelebileceği yapı aktivite araştırmaları sayesinde ortaya konulmuştur. Langmuir tek tabakalı lipit çalışmaları paketleme ve DNA sıkıştırma arasındaki olası ilişkiyi araştırmak için yapılmıştır. Mg^{+2} tarafından meydana getirilen ve zitteriyonik molekülerin yer aldığı DNA lipit etkileşimleri ve moleküler tanınma olayları, tek tabakalı çalışmaları ile gösterilmiştir.

Lipit vesikülü/Mg^{+2}/DNA üçlü bileşenleri, agaroz jel elektroforezi ile gösterilmiştir. bu deneylerde kullanılan plazmit DNA'sı agaroz jelde yürütülerek konformasyon, bütünlük analizleri yapılmıştır. Transfeksiyon öncesi plazmit DNA'sının ULV'ye en etkin şekilde aktarılmasını/ lipopleks oluşmasını sağlamak amacıyla plazmit DNA'sının ULV'lerin içine girmesinde ULV ve plazmit DNA'sının birarada inkübasyona bırakıldıkları süre ve kullanılan ULV'nin artan miktarının sürece etkisi agaroz jel elektroforezi ile

değerlendirilmiştir. Transfeksiyon için etkili dairesel ve süpersarmallı plazmidlerin oluşumu agaroz jel elektroforez ile ortaya çıkarılmıştır.

Lipit vesikülü/Mg^{+2}/DNA üçlü bileşenlerinin *in vitro* transfeksiyonu hücre tipine bağlı olmaksızın sağlanamazken, Lipozom/Ca^{+2}/DNA üçlü bileşenlerinin canlı (hücresel) sisteme aktarılması, herhangi bir kimyasal ajan kullanılmadan, hücre tipine bağlı olmaksızın, gerçekleşmiştir. Lipitvesiküllerinin, MTT Sitotoksisite Testi sonucunda toksik bir etkisi bulunmadığı saptanmıştır

Bu araştırmadaki bulgular, yük ve yüzey güçlerince tetiklenen DNA-lipit etkileşmelerinin viral olmayan gen taşıyıcı araçları olarak tasarımlarında yararlanılabilir sistemler olduğunu göstermektedir.

Transfeksiyon çalışmalarının ilk aşamasında DNA-Lipit-Me^{+2} üçlü komplekslerinin transfeksiyon etkinliği bakımından hem Mg^{+2} hem Ca^{+2} etkileri incelenmiştir. Bu karşılaştırma sonucunda Ca^{+2}'un Mg^{+2}'a kıyasla çok daha etkili olduğu saptanmıştır. Mg^{+2}, ULV'leri MLV'lere kolayca dönüştürdüğünden ve MLV'lerin transfeksiyona uygun olmadığından düşük transfeksiyon etkinliği saptanmıştır.

DNA-Lipit-Me^{+2} üçlü kompleksler ile yapılan sitotoksisite deneyleri bu yapıların sitotoksik olmadığını göstermiştir. Bu bağlamda daha sonraki araştırmalara iyi bir motivasyon teşkil etmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Gregoriadis G, Florence AT. Recent advances in drug targeting. In: *Trends in Biotechnology*.Vol 11.; 1993:440–442.
2. Moldawer LL, Edwards PD, Josephs M, Minter RM, Copeland EM, MacKay SL. Application of gene therapy to acute inflammatory diseases. *Shock* 1999;12(2):83–101.
3. Stone D, David a, Bolognani F, Lowenstein PR, Castro MG. Viral vectors for gene delivery and gene therapy within the endocrine system. *J. Endocrinol.* 2000;164(2):103–118.
4. Templeton DM. The importance of trace element speciation in biomedical science. *Anal. Bioanal. Chem*. 2003;375(8):1062–1066.
5. El-Aneed A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J. Control. Release* 2004;94(1):1–14.
6. Meidan VM, Glezer J, Salomon S, Sidi Y, Barenholz Y, Cohen JS, Lilling G. Specific lipoplex-mediated antisense against Bcl-2 in breast cancer cells: a comparison between different formulations. *J. Liposome Res.* 2006;16(1):27–43.
7. Pelisek J, Gaedtke L, DeRouchey J, Walker GF, Nikol S, Wagner E. Optimized lipopolyplex formulations for gene transfer to human colon carcinoma cells under in vitro conditions. *J. Gene Med.* 2006;8(2):186–197.
8. KIRBY C. J., Gregoriadis G., Liposomes in: EM (Ed. . *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*.; 1999.
9. Kobayashi, N., Nishikawa, M. and Takakura Y. *Gene Therapy and Gene Delivery, in Drug Delivery: Principles and Applications*.; 2005.
10. Flotte TR LB. Gene therapy in cystic fibrosis. *Chest*. 2001;120(3 Supp:124–131.
11. De Laporte L, Cruz Rea J, Shea LD. Design of modular non-viral gene therapy vectors. *Biomaterials* 2006;27(7):947–954.
12. University of Strathclyde Glasgow. Available at: http://www.strath.ac.uk/.
13. National Institutes of Health.

14. U. S. National Library of Medicine. Available at: http://www.nlm.nih.gov/.

15. Elouahabi A, Ruysschaert JM. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Mol. Ther.* 2005;11(3):336–347.

16. Nagasaki. Available at: www.ph.nagasaki-u.ac.jp/.../ doc/photo/main3e.htm.

17. Strayer. Viral gene delivery. *Expert Opin. Investig. Drugs* 1999;8(12):2159–2172.

18. Walther W, Stein U, Fichtner I, Alexander M, Shoemaker RH, Schlag PM. Mdr1 promoter-driven tumor necrosis factor-alpha expression for a chemotherapy-controllable combined in vivo gene therapy and chemotherapy of tumors. *Cancer Gene Ther.* 2000;7(6):893–900.

19. Wilson A, Pitt B, Li S. Complex roles of CpG in liposomal delivery of DNA and oligonucleotides. *Biosci. Rep.* 2002;22(2):309–322.

20. Ritter T, Lehmann M, Volk H-D. Improvements in gene therapy: averting the immune response to adenoviral vectors. *BioDrugs* 2002;16(1):3–10.

21. Young LS, Searle PF, Onion D, Mautner V. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J. Pathol.* 2006;208(2):299–318.

22. Zhang Y, Rong Qi X, Gao Y, Wei L, Maitani Y, Nagai T. Mechanisms of co-modified liver-targeting liposomes as gene delivery carriers based on cellular uptake and antigens inhibition effect. *J. Control. Release* 2007;117(2):281–290.

23. Guntupalli R, Sorokulova I, Long R, Olsen E, Neely W, Vodyanoy V. Phage Langmuir monolayers and Langmuir-Blodgett films. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2011;82(1):182–189.

24. Robbins PD GS. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther.* 1998;Oct;80(1):35–47.

25. Silman NJ FA. Biophysical targeting of adenovirus vectors for gene therapy. *Curr Opin Mol Ther.* 2000;2000 Oct;2:524–31.

26. Passini MA, Watson DJ WJ. Gene delivery to the mouse brain with adeno-associated virus. *Methods Mol Biol* 2004;246:225–36.

27. Büeler H. Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy. *Biol. Chem.* 1999;380(6):613–622.

28. Kootstra N a, Verma IM. Gene therapy with viral vectors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2003;43:413–439.

29. Hendrie PC, Russell DW. Gene targeting with viral vectors. *Mol. Ther.* 2005;12(1):9–17.

30. Hendriks WTJ, Ruitenberg MJ, Blits B, Boer GJ, Verhaagen J. Viral vector-mediated gene transfer of neurotrophins to promote regeneration of the injured spinal cord. *Prog. Brain Res.* 2004;146:451–476.

31. Kaplitt MG, Makimura H. Defective viral vectors as agents for gene transfer in the nervous system. *J. Neurosci. Methods* 1997;71(1):125–132.

32. Holt JR, Johns DC, Wang S, Chen ZY, Dunn RJ, Marban E, Corey DP. Functional expression of exogenous proteins in mammalian sensory hair cells infected with adenoviral vectors. *J. Neurophysiol.* 1999;81(4):1881–1888.

33. Akhtar S, Basu S, Wickstrom E, Juliano RL. Interactions of antisense DNA oligonucleotide analogs with phospholipid membranes (liposomes). *Nucleic Acids Res.* 1991;19(20):5551–5559.

34. Thierry a. R, Dritschilo a. Liposomal delivery of antisense oligodeoxynucleotides. Application to the inhibition of the multidrug resistance in cancer cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1992;660:300–302.

35. Romanczuk H, Galer CE, Zabner J, Barsomian G, Wadsworth SC, O'Riordan CR. Modification of an adenoviral vector with biologically selected peptides: a novel strategy for gene delivery to cells of choice. *Hum. Gene Ther.* 1999;10(16):2615–2626.

36. Gebhart CL, Kabanov A V. Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J. Control. Release* 2001;73(2-3):401–416.

37. Anwer K, Rhee BG, Mendiratta SK. Recent progress in polymeric gene delivery systems. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2003;20(4):249–293.

38. Jang J-H, Houchin TL, Shea LD. Gene delivery from polymer scaffolds for tissue engineering. *Expert Rev. Med. Devices* 2004;1(1):127–138.

39. Felgner PL, Rhodes G. Gene therapeutics. *Nature* 1991;349(6307):351–352.

40. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987;84(21):7413–7417.

41. Mohr L, Geissler M, Blum HE. Gene therapy for malignant liver disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2002;2(2):163–175.

42. Biontex Transfection. 2005. Available at: http://www.biontex.com/con_4_6_4/cms/front_content.php?changelang=1&idart=198.

43. Russell DW, Hirata RK. Human gene targeting by viral vectors. *Nat. Genet.* 1998;18(4):325–330.

44. Ding LH, Iimura E, Saijo K, Hamada H, Ohno T. A speedy method to detect inserted DNA fragment in cell lines transfected with retroviral vectors. *Cytotechnology* 2000;34(3):243–252.

45. Curiel DT, Huber BE, Meruelo D, Shepard N, Ledley FD, Mazumder A, Chiou H. High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus-polylysine-DNA complexes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994;716:36–58.

46. Ponnazhagan S. Adenoassociated virus vectors for genetic immunization. *Immunol. Res.* 2002;26(1-3):247–253.

47. Wozniak MA, Mee AP, Itzhaki RF. Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. *J. Pathol.* 2009;217(1):131–138.

48. Rolland AP. From genes to gene medicines: recent advances in nonviral gene delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1998;15(2):143–198.

49. Lee RJ, Huang L. DNA for Tumor Cell-specific Gene Transfer *. 1996;271(14):8481–8487.

50. Kaiser J. Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial. *Science* 2003;299(5606):495.

51. Blaisonneau J, Sor F, Cheret G, Yarrow D, Fukuhara H. A circular plasmid from the yeast Torulaspora delbrueckii. *Plasmid* 1997;38(3):202–209.

52. Mahato RI1, Takakura Y HM. Nonviral vectors for in vivo gene delivery: physicochemical and pharmacokinetic considerations. *Crit Rev Ther Drug Carr. Syst*. 1997;14(2):133-.

53. Sylvén C1, Sarkar N, Rück A, Drvota V, Hassan SY, Lind B, Nygren A, Källner Q, Blomberg P, van der Linden J, Lindblom D, Brodin LA IK. Myocardial Doppler tissue velocity improves following myocardial gene therapy with VEGF-A165 plasmid in patients with inoperable angina pectoris. *Coron Artery Dis.* 2001;12(3):239-.

54. Calarota S1, Bratt G, Nordlund S, Hinkula J, Leandersson AC, Sandström E WB. Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. *Lancet*. 1998;2;351(9112:1320–5.

55. RG. C. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 1995;20;270(523:404–10.

56. Mountain A. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol* 2000;2000 Mar;1:119–28.

57. Latha M. Santhakumaran, Alex Chen, C. K. S. Pillai, Thresia Thomas, Huixin He and TJT. Nanotechnology in NonviralGene Delivery. 2005. Available at: https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=wy5h_gCsYy0C&oi=fnd&pg=PA253&dq=santhakumaran+2005+and+gene+delivery&ots=Q1jj4C2iMC&sig=81OsLDvGDUYCfN_vpLYPk9_wGiE#v=onepage&q=santhakumaran 2005 and gene delivery&f=false.

58. Ottensmeyer FP, Whiting RF, Korn AP. Three-dimensional structure of herring sperm protamine Y-I with the aid of dark field electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1975;72(12):4953–4955.

59. Zhang S, Xu Y, Wang B, Qiao W, Liu D, Li Z. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J. Control. Release* 2004;100(2):165–80.

60. Hart S. Lipid carriers for gene therapy. 2005:423–428.

61. Azzam T DA. Current developments in gene transfection agents. *Curr Drug Deliv* 2004;Apr;1(2):165–93.

62. Igarashi S, Hattori Y, Maitani Y. Biosurfactant MEL-A enhances cellular association and gene transfection by cationic liposome. *J. Control. Release* 2006;112(3):362–368.

63. Pitard B. Supramolecular assemblies of DNA delivery systems. *Somat. Cell Mol. Genet.* 2002;27(1-6):5–15.

64. Tros de Ilarduya C, Sun Y, Düzgüneş N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010;40(3):159–170.

65. Kharakoz DP, Khusainova RS, Gorelov a. V., Dawson K a. Stoichiometry of dipalmitoylphosphatidylcholine-DNA interaction in the presence of Ca2+: A temperature-scanning ultrasonic study. *FEBS Lett.* 1999;446(1):27–29.

66. Lam AMI, Cullis PR. Calcium enhances the transfection potency of plasmid DNA-cationic liposome complexes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2000;1463(2):279–290.

67. Chowdhury E. Transfecting mammalian cells by DNA/calcium phosphate precipitates: Effect of temperature and pH on precipitation. *Anal. Biochem.* 2003;314(2):316–318.

68. History Of Cell Membrane. Available at: <http://www.123HelpMe.com/view.asp?id=69638>.

69. Hücre organel yapıları. Available at: http://www.apsubiology.org/anatomy/2010/2010_Exam_Reviews/Exam_1_Review/Ch03_Cell_Organelles_and_Cytoskeleton.htm.

70. Singer Nichelson. Available at: www.umass.edu/microbio/rasmol/cutlips.htm.

71. cell membrane. Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_membrane#/media/File:Cell_membrane_detailed_diagram_4.svg.

72. MadSci Network: Biochemistry. Biyomembran yapısında yer alan fosfolipitlerden tipik bir görünüm. Available at: http://www.madsci.org/posts/archives/2006-12/1164999854.Bc.r.html.

73. Hubbell WL MH. Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. *J Am Chem Soc.* 1971;27;93(2):314–26.

74. BANGHAM AD, HORNE RW, GLAUERT AM, DINGLE JT LJ. Action of saponin on biological cell membranes. *Nature* 1962;(8;196):952–955.

75. Wang B, Siahaan TJ, Soltero AR, Soltero RA. *Drug Delivery Principles and Applications*.; 2005. Available at: https://books.google.com/books?hl=tr&lr=&id=HbSeX8BpVmkC&pgis=1. Accessed May 5, 2015.

76. BANGHAM AD HR. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J Mol Biol* 1964;(8):660–8.

77. Lipozomların genel yapısı. Available at: www.cem.msu.edu/~reusch/ VirtualText/lipits.htm.

78. Lasch, J. Weissig V and B. *Preparation of liposomes, In: Liposomes*. 2nd Editio. (Torchilin Vl. P. And Weissig, V. E, ed.). Oxford University Press; 2003.

79. Lipit hazırlama teknikleri. Available at: http://www.avantilipits.com.

80. Enkapsülasyon amacıyla tasarlanan lipozomlar. Available at: Kaynak: www.unizh.ch/ onkwww/lipos.htm.

81. Çeşitli lipozom boyutları. Available at: www.azonano.com/details. asp?ArticleID=1243.

82. Süleymanoğlu E. Preparation and phase behaviour of surface-active pharmaceuticals: Self-assembly of DNA and surfactants with membranes. Differential adiabatic scanning microcalorimetric study. *Farmaco* 2005;60(8):701–710.

83. Süleymanoglu E. Phospholipid-nucleic acid recognition: energetics of DNA-Mg2+-phosphatidylcholine ternary complex formation and its further compaction as a gene delivery formulation. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 60(4):218–231.

84. Templeton NS. *Gene and Cell Therapy*. (Templeton NS, ed.).; 2004. doi:10.1109/JPHOT.2009.2031685.

85. Kuvichkin V V. Theoretical model of DNA-membrane contacts. *Biofizika* 28(5):771–775.

86. Kuvichkin V. V. DNA-lipid interactions in vitro and in vivo. *Bioelectrochemistry* 2002;58(1):3–12.

87. Hobart P, Duncan R, Infante AA. Association of DNA synthesis with the nuclear membrane in sea urchin embryos. *Nature* 1977.

88. Akhtar A, Gasser SM. The nuclear envelope and transcriptional control. *Nat. Rev. Genet.* 2007;8(7):507–17.

89. Lasic DD, Papahadjopoulos D, eds. *Medical Applications of Liposomes.*; 1998.

90. *Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies, Third Edition.*; 2008. Available at: https://books.google.com/books?hl=tr&lr=&id=t0AnijDl_TgC&pgis=1. Accessed May 5, 2015.

91. Singh R, Kostarelos K. Designer adenoviruses for nanomedicine and nanodiagnostics. *Trends Biotechnol.* 2009;27(4):220–9.

92. Yu H, Wagner E. Bioresponsive polymers for nonviral gene delivery. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2009;11(2):165–178.

93. Paleos CM, Tziveleka L-A, Sideratou Z, Tsiourvas D. Gene delivery using functional dendritic polymers. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2009;6(1):27–38.

94. Yu B, Zhao X, Lee LJ, Lee RJ. Targeted delivery systems for oligonucleotide therapeutics. *AAPS J.* 2009;11(1):195–203.

95. Lonez C, Vandenbranden M, Ruysschaert J-MM. Cationic liposomal lipids: From gene carriers to cell signaling. *Prog. Lipid Res.* 2008;47(5):340–347.

96. Schwendener RA. Liposomes in biology and medicine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007. doi:10.1007/978-0-387-76713-0_9.

97. Templeton NS. Nonviral delivery for genomic therapy of cancer. *World J. Surg.* 2009;33(4):685–97.

98. Montier T, Benvegnu T, Jaffrès P-A, Yaouanc J-J, Lehn P. Progress in cationic lipid-mediated gene transfection: a series of bio-inspired lipids as an example. *Curr. Gene Ther.* 2008;8(5):296–312.

99. Dow S. Liposome-nucleic acid immunotherapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv*. 2008;5(1):11–24.

100. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009;66(17):2873–2896.

101. Venkatesh S, Wower J, Byrne ME. Nucleic acid therapeutic carriers with on-demand triggered release. *Bioconjug. Chem*. 2009;20(9):1773–82.

102. Juliano R, Bauman J, Kang H, Ming X. Biological barriers to therapy with antisense and siRNA oligonucleotides. *Mol. Pharm*. 2009;6(3):686–695.

103. Fenske DB, Cullis PR. Liposomal nanomedicines. *Expert Opin. Drug Deliv*. 2008;5(1):25–44.

104. Midoux P, Pichon C, Yaouanc J-JJ, Jaffrès P-AA. Chemical vectors for gene delivery: A current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br. J. Pharmacol.* 2009;157(2):166–178.

105. Michela Pisani GM and PB. Neutral Liposomes and DNA Transfection. In: *Non-viral gene theraphy*. Rijeka: Intechopen; 2011:319–348.

106. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 2012;7:5577–5591.

107. Hori S -i., Yamamoto T, Waki R, Wada S, Wada F, Noda M, Obika S. Ca2+ enrichment in culture medium potentiates effect of oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2015:1–13.

108. Liposome-based Drug Delivery Therapy. 2011:6(8):1413–1428.

109. Demirsoy FFK, Eruygur N, Süleymanoğlu E. Supramolecular Langmuir monolayers and multilayered vesicles of self-assembling DNA–lipid surface structures and their further implications in polyelectrolyte-based cell transfections. *J. Nanoparticle Res.* 2015;17(1). doi:10.1007/s11051-014-2812-5.

110. Konfokal Mikroskop. Available at: http://merlab.metu.edu.tr/lazer-taramali-konfokal-mikroskop.

111. ODTU, Merkez Laboratuvarı, CTEM. Available at: https://merlab.metu.edu.tr/sites/merlab.metu.edu.tr/files/dokuman/TEML-2014.pdf.

112. Ikonen M, Murtomäki L, Kontturi K. Microcalorimetric and zeta potential study on binding of drugs on liposomes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2010;78(2):275–282.

113. Campen RK, Ngo TTM, Sovago M, Ruysschaert J-MM, Bonn M. Molecular restructuring of water and lipids upon the interaction of DNA with lipid monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* 2010;132(23):8037–8047.

114. 1 kb DNA ladder. Available at: https://www.neb.com/~/media/Catalog/All-Products/377DD65F798A4B7F94A0AF67A3144CB4/Datacards or Manuals/N3232Datasheet-Lot1041202.pdf.

115. Gonçalves E, Debs RJ, Heath TD. The effect of liposome size on the final lipid/DNA ratio of cationic lipoplexes. *Biophys. J.* 2004;86(3):1554–1563.

116. Dan N, Danino D. Structure and kinetics of lipid-nucleic acid complexes. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2014;205:230–239.

117. Adler AF, Leong KW. Emerging links between surface nanotechnology and endocytosis: Impact on nonviral gene delivery. *Nano Today* 2010;5(6):553–569.

118. Yan J, Korolev N, Eom KD, Tam JP, Nordenskioeld L. Biophysical Properties and Supramolecular Structure of Self-Assembled Liposome/epsilon-Peptide/DNA Nanoparticles: Correlation with Gene Delivery. *Biomacromolecules* 2012;13(1):124–131.

119. Pott T, Colin A, Navailles L, Roux D. DNA intercalation in neutral multilamellar membranes: Experiments and theory. *Interface Sci.* 2003;11(2):249–257.

120. Pozzi D, Caracciolo G, Caminiti R, De Sanctis SC, Amenitsch H, Marchini C, Montani M, Amici A. Toward the rational design of lipid gene vectors: Shape coupling between lipoplex and anionic cellular lipids controls the phase evolution of lipoplexes and the efficiency of DNA release. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2009;1(10):2237–2249.

121. Zuidam NJ, Barenholz Y, Minsky A. Chiral DNA packaging in DNA-cationic liposome assemblies. *FEBS Lett.* 1999;457(3):419–422.

122. Marty R, N'soukpoé-Kossi CN, Charbonneau D, Weinert CM, Kreplak L, Tajmir-Riahi HA. Structural analysis of DNA complexation with cationic lipids. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(3):849–857.

123. Asiala SM, Schultz ZD. Label-free in situ detection of individual macromolecular assemblies by surface enhanced Raman scattering. *Chem. Commun.* 2012;29(6):4340–4342.

124. Thacker V V, Herrmann LO, Sigle DO, Zhang T, Liedl T, Baumberg JJ, Keyser UF. DNA origami based assembly of gold nanoparticle dimers for surface-enhanced Raman scattering. *Nat. Commun.* 2014;5:3448.

125. Braun CS, Jas GS, Choosakoonkriang S, Koe GS, Smith JG, Middaugh CR. The structure of DNA within cationic lipid/DNA complexes. *Biophys. J.* 2003;84(2 Pt 1):1114–1123.

126. Sathuluri RR, Yoshikawa H, Shimizu E, Saito M, Tamiya E. Gold nanoparticle-based surface-enhanced Raman scattering for noninvasive molecular probing of embryonic stem cell differentiation. *PLoS One* 2011;6(8). doi:10.1371/journal.pone.0022802.

127. Neugebauer U, Schmid U, Baumann K, Ziebuhr W, Kozitskaya S, Holzgrabe U, Schmitt M, Popp J. The influence of fluoroquinolone drugs on the bacterial growth of S. epidermidis utilizing the unique potential of vibrational spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* 2007;111(15):2898–2906.

128. Lewis RNAH, McElhaney RN. Fourier transform infrared spectroscopy in the study of lipid phase transitions in model and biological membranes: practical considerations. *Methods Mol. Biol.* 2007;400:207–226.

129. Mereghetti P, Corsetto PA, Cremona A, Rizzo AM, Doglia SM, Ami D. A Fourier transform infrared spectroscopy study of cell membrane domain modifications induced by docosahexaenoic acid. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2014;1840(10):3115–3122.

130. Mello MLS, Vidal BC. Changes in the infrared microspectroscopic characteristics of DNA caused by cationic elements, different base richness and single-stranded form. *PLoS One* 2012;7(8):1–12.

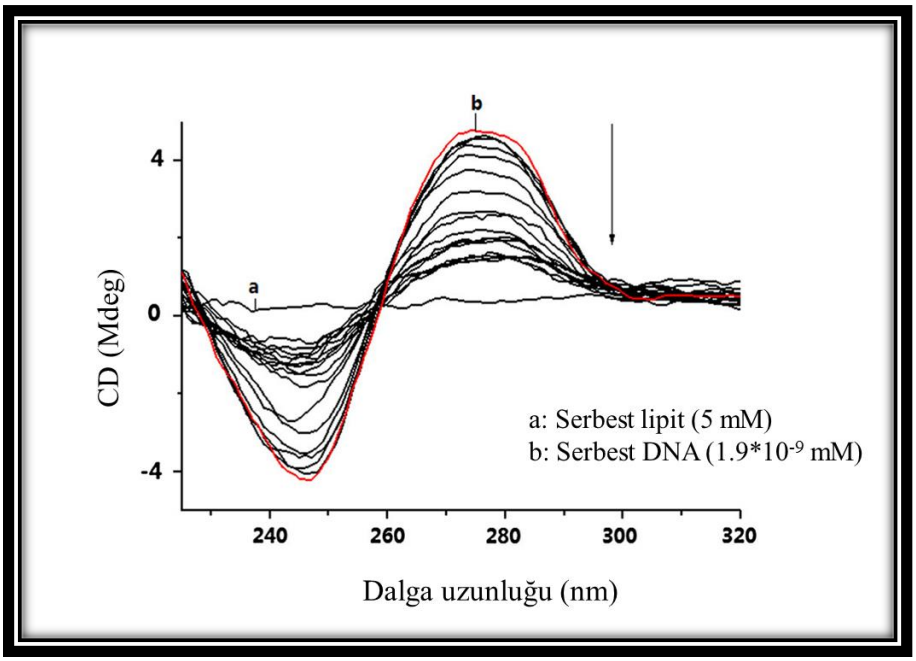
8. EKLER

Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşiklerin spektroskopik incelemelerinden, dairesel dikroizm (CD) ve Sers Raman; termodinamik değerlendirilmelerinden, termogravimetrik analiz (TGA) ve izotermal titrasyon kalorimetrisi (ITC); mikroskopik karakterizasyonundan, konfokal mikroskopi ile ilgili bulgular ekte gösterilmiştir. Ayrıca kullanılan hücre hatlarının özellikleri ve kullanılan mevcut makine teçhizat listesi ekte verilmiştir.

EK-1

Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşiklerin Dairesel dikroizm (CD) ile incelenmesi sonuçları

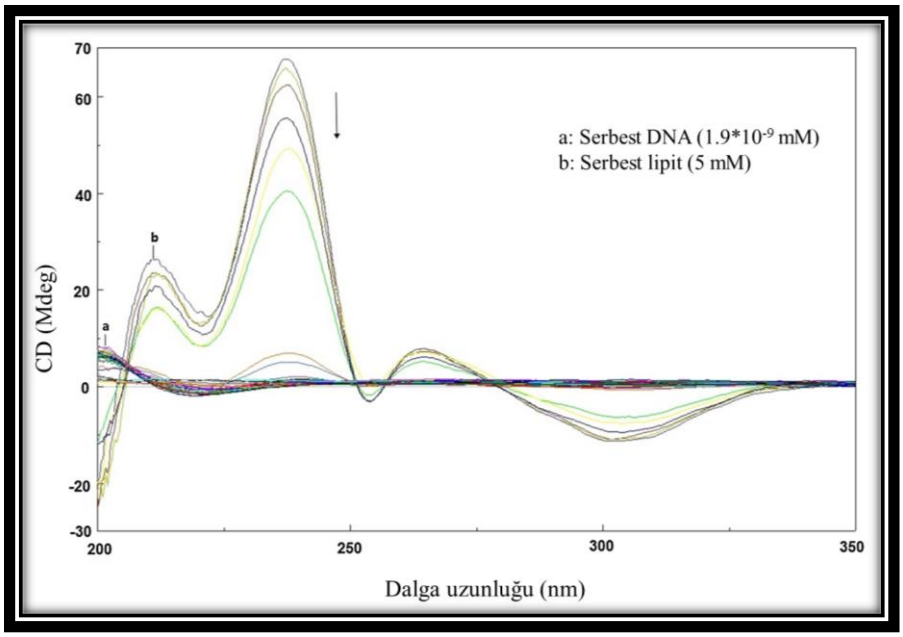
Dairesel dikroizm (CD), spektroskopik görüntülemeleri sırasıyla nükleik asitler ve fosfolipitler üzerine uygulanarak alınan sonuçlar Şekil 8.1'deki gibidir.



Şekil 8.1. Nükleik asitler ve fosfolipitlerin CD spektroskopik görüntülemeleri

Lipit sabit miktarda, DNA arttırılarak bağlanma CD spektroskopik görüntüler alınmıştır. Bu amaçla ele alınan B-tipi bakteriyofaj T7 DNA ile DPPC MLV arasında konformasyonel değişikliklerin takibi için uygulanmıştır. Dairesel dikroizm spektroskopik analizi açıkça yükselen DNA derişimlerde (yükselen derişimler ok işareti ile gösterilmiştir) lipozom-

DNA komplekslerin konformasyonlarının değiştiğini göstermektedir. Bu durum, sabit bir bileşik oluşumunu teyit etmektedir.



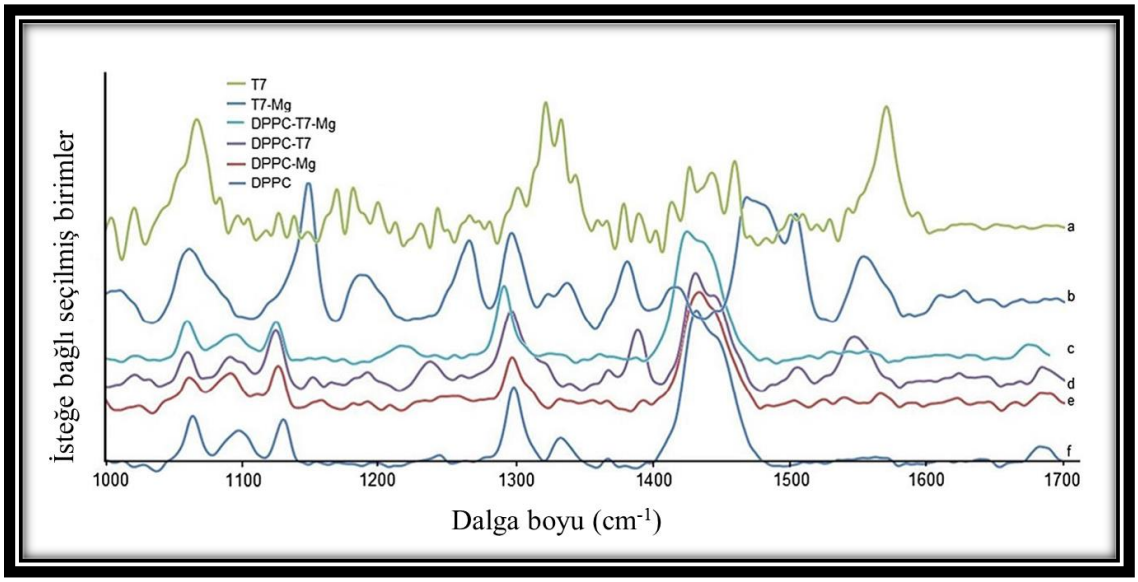
Şekil 8.2. Lipit sabit miktarda DNA arttırılarak bağlanmalarının CD spektroskopik görüntüsü.

EK-2

Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin Sers Raman titreşim spektroskopisi ile incelenmesi sonuçları

Ultra saf suda hazırlanan 0.5 mg/mL dana timus DNA'nın 260/280 dalgaboylarındaki absorbansı Nanodrop UV/VIS spektrofotometrik cihazla ölçülmüş ve 1.9 oran elde edilmiştir. Daha sonra Langmuir-Blodgett sistemine tek katman elde edildikten sonra Wylhelmi yöntemiyle örnek alınıp Raman saçılım spektrometresine yüzey analiz için hazırlanmıştır. Çok daha hassas olan Raman saçılım yaklaşımı olarak SERS-Raman spektrumları ise Ag-nanoparçacıkların kullanımıyla elde edilmiştir ve Şekil 8.3'de gösterilmiştir. Raman spektroskopisi özellikle lipit katmanların üzerinde nükleik asit sarmallarının lokalizasyonunun tayini için uygulanmıştır. $I_{2935}/_{2880}$, $I_{2844}/_{2880}$ ve $I_{1090}/_{1130}$ bölgelerinde görülen yüksek pik yoğunlukları, DPPC katmanlarının alkil zincirlerinin konformasyonları hakkında bilgi vermektedir. $I_{2935}/_{2880}$ ve I_{1090}/1130 görülen pikler ise DPPC lipit katmanlarının alkil zincirlerinin ve son metil grubunun düzensizliği hakkında bilgi vermektedir. 2800–3100 cm^{-1} bölgesindeki CH hidrokarbon titreşime ait spektral değişiklikler DPPC'in alkil zincirleri ile DNA arasında oluşan bağlar hakkında bilgi vermektedir. Bu bölgeye özgü spektral yoğunlukların ve frekansların değişmesi biyomembranlarda da görülen sıvı→kristal faz geçişlerini işaret etmektedir. 2844 ve 2880 cm^{-1} bölgesindeki titreşimler metilen grupların simetrik ve asimetrik CH hidrokarbon moleküllerine aittir ve konformasyonel değişikliğinin meydana geldiğini göstermektedir.

Şekil 8.3'de görüldüğü gibi üçlü kompleksin (DPPC/DNA/Mg^{+2}) Sers Raman titreşim spektroskopisindeki ölçümlerinde görülen farklı dalgaboylarındaki pikler, üçlü yapının bir araya geldiğini göstermektedir. Bağ oluşmasaydı, aynı titreşimde sonuçlar gözlenmesi beklenirdi.



Şekil 8.3. DPPC/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun Sers Raman titreşim spektroskopisi ile ölçümleri.

Aşağıdaki Çizelge 8.1'de SERS ve FTIR ölçümleri ile saptanmış daha önceden çalışılmış lipit ve DNA vibrasyon frekansları görülmektedir.

Çizelge 8.1. SERS ve FTIR ölçümleri ile lipit ve büyük DNA vibrasyon frekanslarının saptanması.

Ölçüm yapılan kısım	**FTIR (cm^{-1}) ile frekans saptanması**	**SERS (cm^{-1})) ile frekans saptanması**	**Referanslar**
B-tipi deoksiriboz vibrasyonları	892 ve 836	-	Marty ve ark. 2009(122)
$-N^{+}(CH_3)_3$ simetrik gerilim	722	-	Marty ve ark. 2009(122)
$-N^{+}(CH_3)_3$ antisimetrik gerilim	973	-	Marty ve ark. 2009(122)
Timinin salınım planında antisimetrik fosfat gruplarının gerilimi	1,053	-	Marty ve ark. 2009(122)
Lipit spesifik bağları C–H bantları ve C–H kıvrımı	-	1,000	Marty ve ark. 2009(122)
Bağlanmalar	-	1,065; 1,100; 1,130; 1,30(ve 1,440	Asiala ve Schultz 2014(123)
DNA fosfat ana çatısı	-	1,084	Thacker ve ark. 2014(124)
Simetrik fosfat grup gerilimi	-	1,095	Braun ve ark. 2003(125)

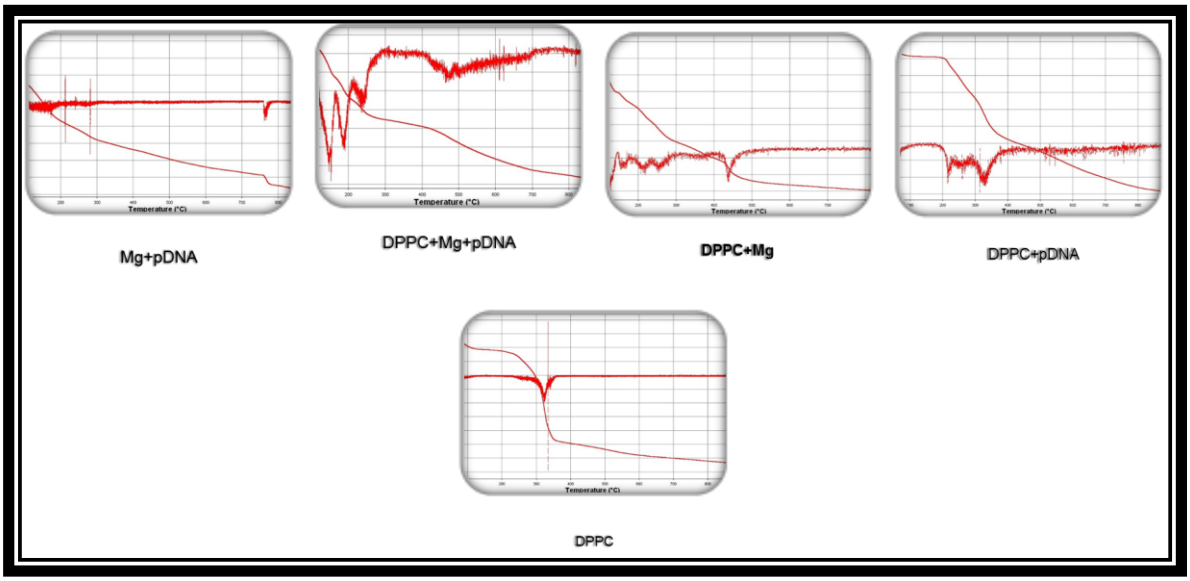
Simetrik fosfat gruplarının gerilimi	1,088	-	Marty ve ark. 2009(122)
C–O gerilimi	1,022	-	Marty ve ark. 2009(122)
Simetrik fosfat gruplarının gerilimi	1,050–1,100	-	Marty ve ark. 2009(122)
Sitozin ve guanin	-	1,060	Sathuluri ve ark. 2011(126)
Adenin	-	1,141–1,146	Sathuluri ve ark. 2011(126)
Antisimetrik fosfat gruplarının gerilimi	1,200–1,250	-	Marty ve ark. 2009(122)
Guanin	-	1,220	Sathuluri ve ark. 2011(126)
Adenin	-	1,260	Sathuluri ve ark. 2011(126)
Adenin, guanin ve timin gerilmeleri	-	1,270–1,289	Sathuluri ve ark. 2011(126)
Adenin çember vibrasyonu	-	1,310	Sathuluri ve ark. 2011(126)
Timin gerilimi	-	1,375	Braun ve ark. 2003(125)
Sitozin	-	1,485	Sathuluri ve ark. 2011 (126)
Guanin, adenine, sitozin ve timin, sırasıyla	-	1,485; 1,483; 1,530 ve 1,370	Neugebauer 2014(127)
Guanin gerilimi		1,489	Braun ve ark. 2003(125)
CH_3'nin lipit spesifik vibrasyonu	2,954; 2,870; ve 2,852	-	Lewis ve McElhaney 2007(128)
Adenine ve guaninin çember modelleri	-	1,575	Sathuluri ve ark. 2011(126)
Lipit simetrisinin CH_3 ve CH_2 vibrasyonu.	1,450; 1,530; 1,580; 1,610 ve 1,665	-	Lewis ve McElhaney 2007(128) ve Mereghetti ve ark. 2014(129)
Adenine	1,609	-	Mello ve Vidal 2012(130)

Timin	1,665	-	Mello ve Vidal 2012(130)
Guanin karbonil	-	1,700	Neugebauer 2014(127)

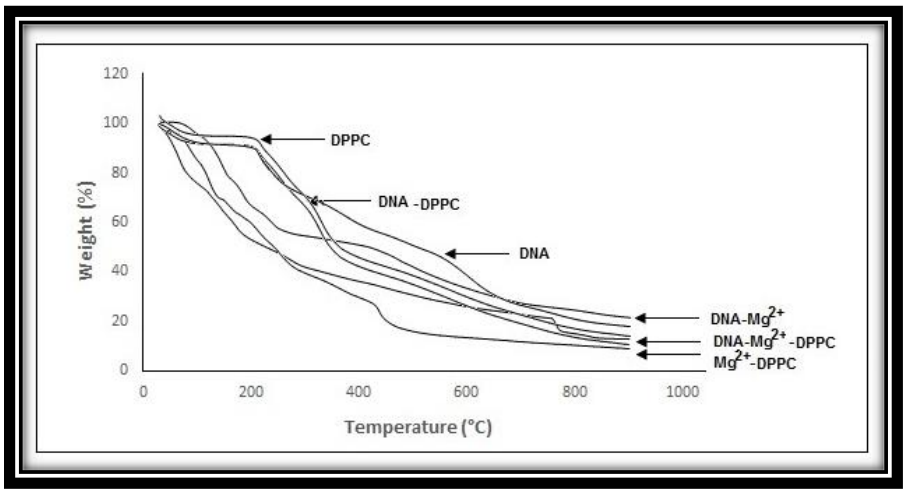
EK-3

Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin termogravimetrik analiz (Thermogravimetric Analysis, TGA) ile incelenmesi sonuçları

Aşağıdaki Şekil 8.4'de sıcaklık değişimlerinin etkileşimleriyle bağlantılı olarak üçlü bileşenlerin (DPPC-ULV/DNA/Mg^{+2}) özelliklerindeki değişim analiz edilmiştir. Şekil 8.5'da termal profilleri kıyaslanarak gösterilmiştir.



Şekil 8.4. Oluşturulan ikili ve üçlü bileşenlerin (DPPC-ULV/DNA/Mg^{+2}) termogravimetrik analiz (Thermogravimetric Analysis, TGA) ölçümleri

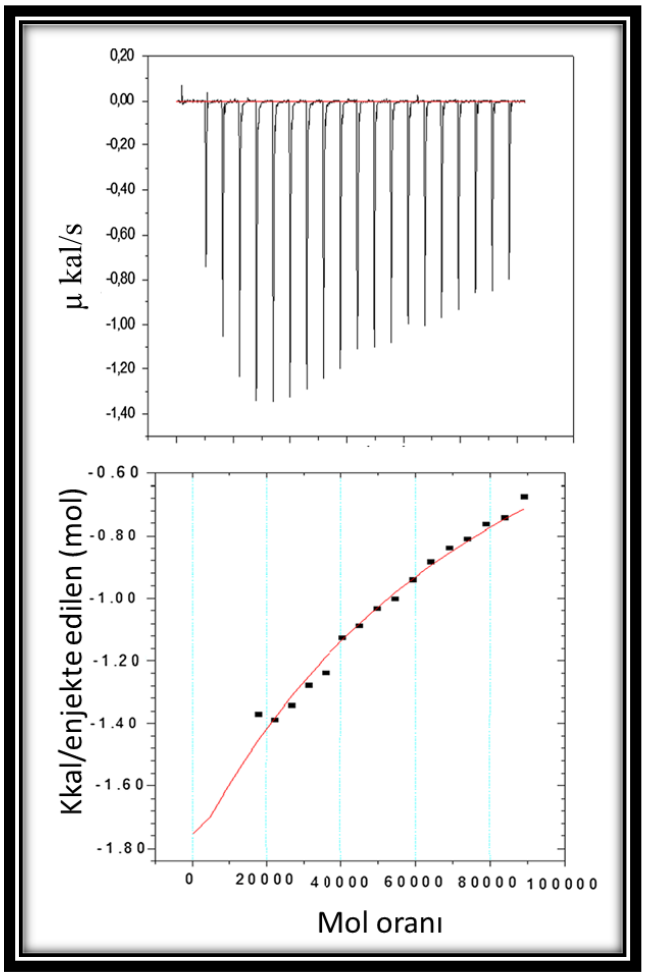


Şekil 8.5. Oluşturulan ikili ve üçlü bileşenlerin (DPPC-ULV/DNA/Mg^{+2}) termogravimetrik analiz (Thermogravimetric Analysis, TGA) ile termal profillerinin kıyaslanarak gösterilmesi

EK-4

Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin izotermal titrasyon kalorimetri (Isothermal TItratIon CalorImetry, ITC) ile incelenmesi sonuçları

Şekil 8.6'da MLV/Bakteriyofaj T7 DNA sistemin oluşum kinetiğinin (K_D *330±506* M^{-1}) izotermal titrasyon kalorimetrisi (ITC) ile termodinamik karakterizasyonu gösterilmiştir.

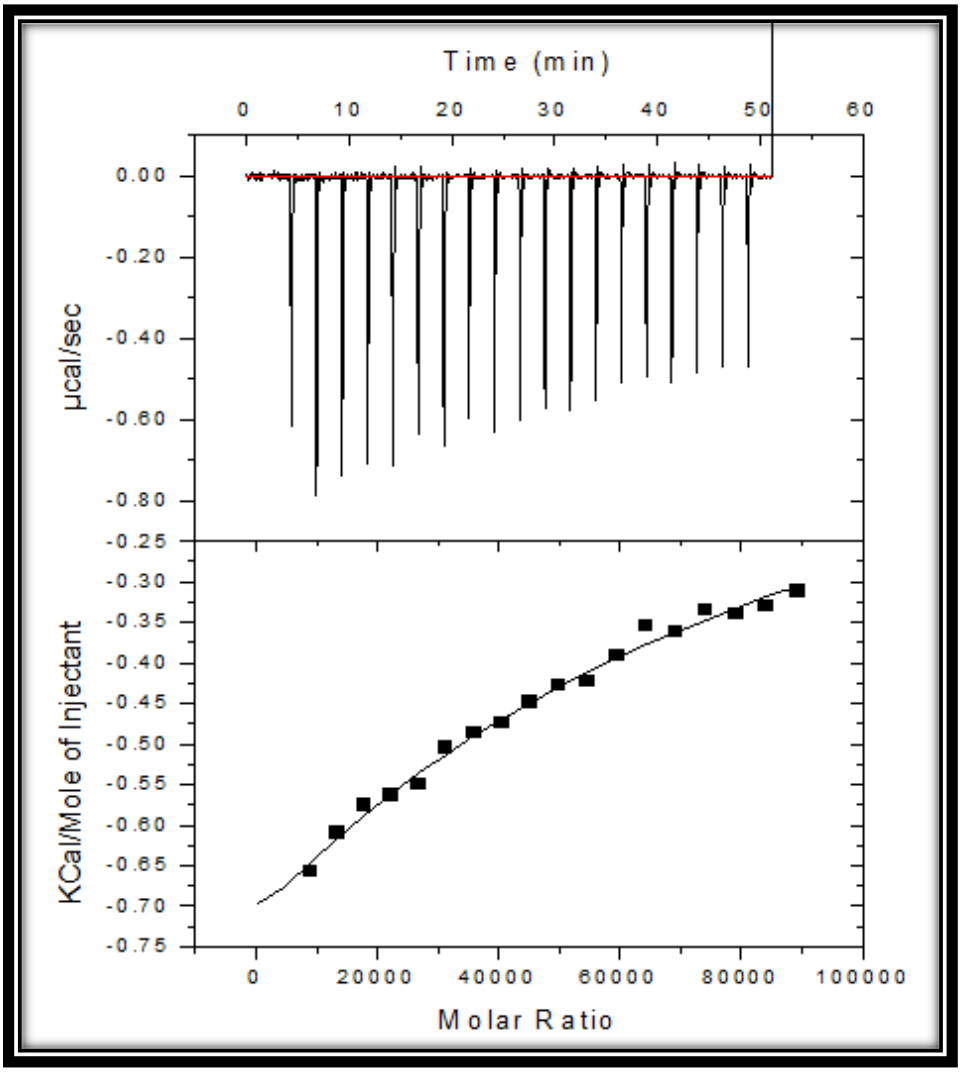


Şekil 8.6. MLV/Bakteriyofaj T7 DNA sistemin oluşum kinetiğinin (*KD 330±506* M^{-1}) izotermal titrasyon kalorimetrisi (ITC) ile ölçüm sonuçları.

MLV/Bakteriyofaj T7 DNA sistemin oluşum kinetiğinin Şekil 8.6'da gösterildiği gibi izotermal titrasyon kalorimetrisi ile ölçümü ile belirlenen oluşum kinetiği, *KD 330±506* M^{-1}'dir. DSC ve ITC yöntemleri Gibbs serbest enerji (ΔG) değişimi, entropi (ΔS) ve entalpi (ΔH) gibi çok önemli termodinamik parametrelerinin doğrudan hesaplanmasını mümkün

hale getiren yöntemlerdir. Bu tez çalışmasında ele alınan fosfolipit vezikülleri ile farklı konformasyona ve topolojiye sahip nükleik asit türleri arasında oluşan bileşenlerinin oluşum termodinamiği ve kinetiğinin ortaya çıkarılması amacıyla bu iki termal analiz yaklaşımı uygulanmıştır. DSC ölçümleri reaksiyon termodinamiği hakkında bilgiler verirken ITC ise reaksiyon kinetiği konusunda bilgiler vermektedir.

ITC ölçümleri Microcal, ITC 200 marka ITC cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Isınma hızı 600 rpm olarak ayarlanmıştır. 20 adet 0.2 µl hacimli enjeksiyon uygulanmıştır. Enjektör ısısı 25°C, referans güç 5 µcal/sn olarak ayarlanmıştır. Deney süresi 0.4 sn, 5 mM lipit karışımı 5 mM Tris-HCl tampon kullanılarak 0.012×10^{-3} mM bakteriyofaj T7 DNA'ya eklenmiş; 5 mM Tris-HCl buffer kullanılmıştır. DPPC-MLV/DNA ikili oluşumunun ITC ile ölçüm sonuçları Şekil 8.7'deki gibidir. ITC ölçümlerinden hesaplanan DPPC-MLV/DNA bağlanma sabiti, KD 330±506 M^{-1}'dir.

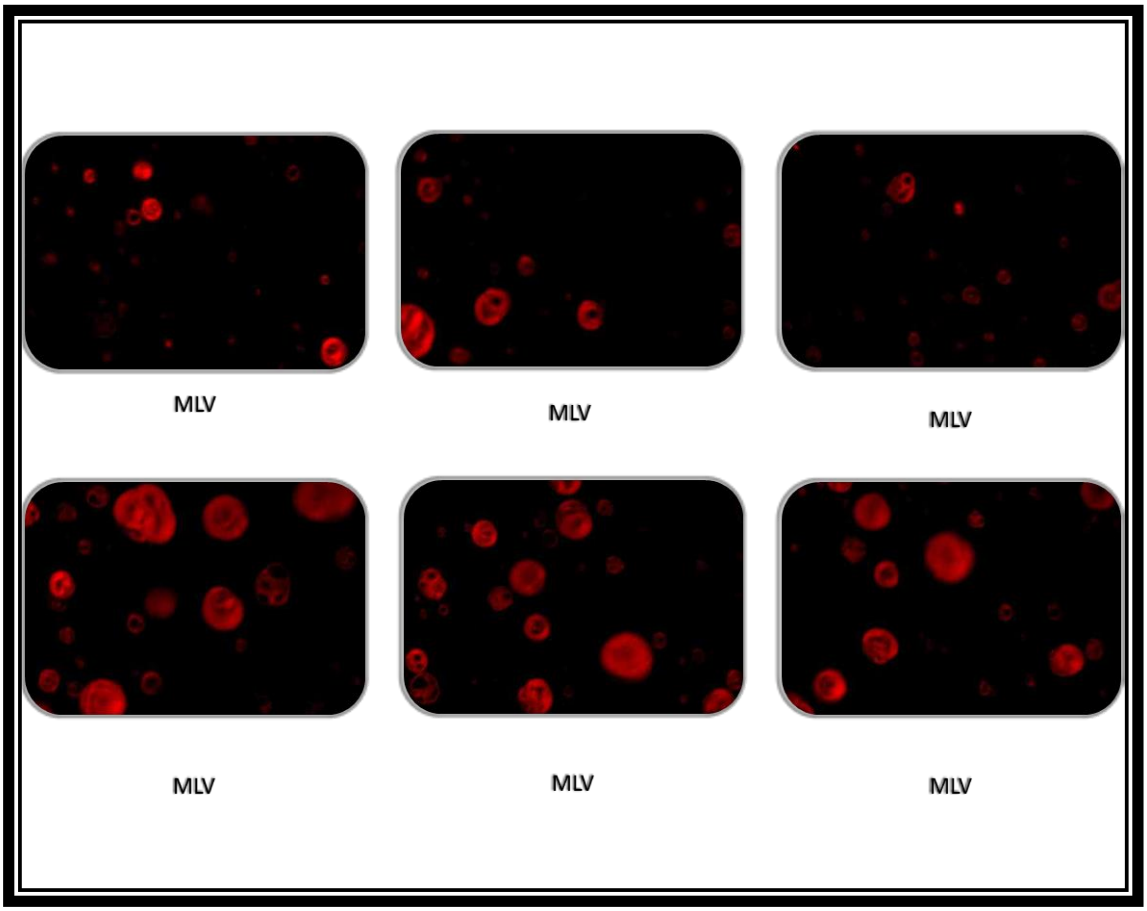


Şekil 8.7. DPPC-MLV/DNA ikili oluşumunun ITC ile ölçüm sonuçları.

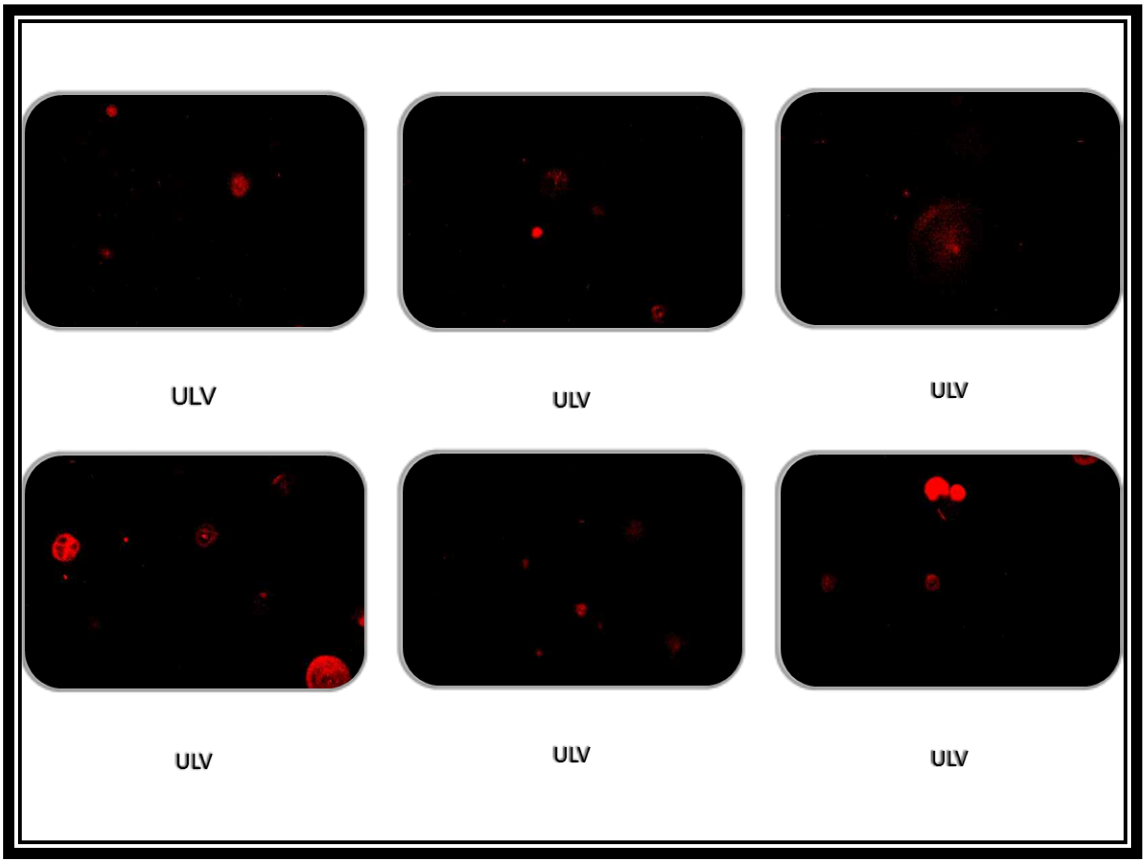
EK-5

Lipit vesiküllerinin ve oluşturulan üçlü bileşenlerin konfokal mikroskopi ile incelenmesi sonuçları

Fosfolipit vezikülleri (MLV ve ULV) konfokal görüntüleme amacıyla Nil kırmızısı boyası ile boyanmıştır ve karanlık alan konfokal mikroskopi (Konfokal mikroskop, LSM 510, Zeiss) ile görüntülenmiştir. Şekil 8.8'de MLV'lerin, Şekil 8.9'de ULV'lerin Nil kırmızısı boyası ile boyanmış, karanlık alan konfokal mikroskopi ile görüntüleri görülmektedir.



Şekil 8.8. Nil kırmızısı boyası ile boyanan fosfolipit veziküllerinden MLV'lerin karanlık alan konfokal mikroskopi ile görüntüleri.



Şekil 8.9. Nil kırmızısı boyası ile boyanan fosfolipit veziküllerinden ULV'lerin karanlık alan konfokal mikroskopi ile görüntüleri.

EK-6:

Kullanılan Hücre Hatlarının Özellikleri

HEK293 (DSMZ)

Cell line:	293
DSMZ no.:	ACC 305
Species:	human (*Homo sapiens*)
Cell type:	embryonal kidney
Origin:	established from a human primary embryonal kidney transformed by adenovirus type 5 (Ad 5); classified as risk category 1 according to the German Central Commission for Biological Safety (ZKBS); cell line also known as HEK-293 (human embryonic kidney-293)
Reference(s):	Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. The Journal of general virology 36 (1): 59-74. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/886304
Biosafety level:	1, GMO-S1
Risk assessment:	The cell line was established by transfection of the cells with sheared DNA of adenovirus type 5. The cells contain 4 to 5 copies of the left end of the virus (12% of the viral genome) including E1a and E1b genes and one copy of the right end of the virus (10% of the genome) including the E4 gene. No active viruses are produced.

DSMZ Cell Culture Data:

Morphology:	adherent fibroblastoid cells growing as monolayer
Medium:	90-95% Dulbecco's MEM + 5-10% h.i. FBS

Subculture:	split confluent culture 1:5 to 1:6 every 2-3 days (without using trypsin/EDTA, cells can be detached by tapping the flask); seed out at about 2-3 x 10^6 cells/25 cm^2
Incubation:	at 37 °C with 10% CO_2
Doubling time:	about 24-30 hours
Harvest:	cell harvest of about 40 x 10^6 cells/175 cm^2
Storage:	frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO

DSMZ Scientific Data:

Mycoplasma:	negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays
Immunology:	cytokeratin +, cytokeratin-7 -, cytokeratin-8 +, cytokeratin-17 -, cytokeratin-18 (+), cytokeratin-19 -, desmin -, endothel -, EpCAM -, GFAP -, neurofilament +, vimentin +
Fingerprint:	multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile
Species:	confirmed as human with IEF of AST, LDH
Cytogenetics:	human near-triploid karyotype with 6% polyploidy - 69(64-69)XX?X, +1, +6, -10, -13, -16, -18, -20, +21, +22, +mar, add(?X)(p22), inv(1)(p35q43), del(1)(p35), i(5p), del(6)(q11), add(8)(q24), add(13)(p13), add(17)(qter), der(?)t(5;?)(q13;?)
Viruses:	ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV -, HBV -, HCV -, HHV-8 -, HIV -, HTLV-I/II -, MLV -, SMRV –

MCF7 (DSMZ)

Cell line:	MCF-7
DSMZ no.:	ACC 115
Species:	human (Homo sapiens)Cell type: breast adenocarcinoma
Origin:	established from the pleural effusion of a 69-year-old Caucasian woman with metastatic mammary carcinoma (after radio- and hormone therapy) in 1970; cells were described of being positive for cytoplasmic estrogen receptors and having the capability to form domes
Reference:	Soule, H. D., Vazguez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. Journal of the National Cancer Institute 51 (5): 1409-1416. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4357757
Biosafety level:	1

DSMZ Cell Culture Data:

Morphology:	epithelial-like cells growing as monolayers
Medium:	90% RPMI 1640 + 10% h.i. FBS + MEM non-essential amino acids + 1 mM sodium pyruvate + 10 µg/ml human insulin
Subculture:	split confluent culture 1:2 to 1:4 every 2-6 days using trypsin/EDTA; seed out at ca. 0.1-0.2 x 105 cells/cm2
Incubation:	at 37 °C with 5% CO2 Doubling time: ca. 50 hours (range 30-72 hours) Harvest: about 50-60 x 106 cells/175 cm2
Storage:	frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO DSMZ

Scientific Data:

Mycoplasma:	negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays
Immunology:	cytokeratin +, cytokeratin-7 -, cytokeratin-8 +, cytokeratin-17 -, cytokeratin-18 +, cytokeratin-19 +, desmin -, endothel -, EpCAM +, GFAP -, neurofilament -, vimentin –
Fingerprint:	multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile
Species:	confirmed as human with IEF of AST, MDH
Cytogenetics:	human hypotetraploid karyotype with 8% polyploidy - 86(80-87)<4n>XX, -X, -X, -1, -1, +6, +7, -9, -10, -10, -12, -13, -13, +14, -17, -17, -18, -18, -20, -20, -20, -22, +6-8mar, add(X)(q27), add(2)(q35-37)x1-2, add(5)(p15), del(6)(q25)x1-2, add(7)(p11), add(7)(p14;hsr), add(10)(q23), del(11)(q21q23), add(15)(p11), i(15q), add(16)(q24), add(19)(q13), add(19)(p13)x1-2 - corresponds to published karyotype
Molec. Genetics:	expression of fusion gene BCAS4-BCAS3 confirmed by RT-PCR
Viruses:	ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV -, HBV -, HCV -, HHV-8 -, HIV -, HTLV-I/II -, MLV -, SMRV –

HELA (DSMZ)

Cell line:	HELA
DSMZ no.:	ACC 57
Species:	human (Homo sapiens)
Cell type:	cervix carcinoma

Origin: established from the epitheloid cervix carcinoma of a 31-year-old black woman in 1951; later diagnosis changed to adenocarcinoma; first aneuploid, continuously cultured human cell line

Reference(s): 1) Scherer, W. F., Syverton, J. T., Gey, G. O. (1953). Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. The Journal of experimental medicine 97 (5): 695-710. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13052828.

2) Gey, G. O., Coffman, W. D., Kubicek, M. T. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer research 12: 264-265.

3) Macville, M., Schrock, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, B. M., Zimonjic, D., Popescu, N., Ried, T. (1999). Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. Cancer Res 59 (1): 141-50. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892199.

4) Adey, A., Burton, J. N., Kitzman, J. O., Hiatt, J. B., Lewis, A. P., Martin, B. K., Qiu, R., Lee, C., Shendure, J. (2013). The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line. Nature 500 (7461): 207-11. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23925245

Biosafety level: 1

Risk assessment: The cell line is infected with papilloma virus type 18 (HPV-18). The cells contain several copies as proviruses integrated into the eukaryotic genome. The integrated virus genomes are incomplete and exhibit 2-3 kb deletions of the E2-L2 region. An activation and transmission of the HPV-18 during handling of the cell line is improbable. The cell line is categorized biosafety level 1.

DSMZ Cell Culture Data:

Morphology:	epithelial-like cells growing in monolayers
Medium:	90% MEM (with Earle's salts) + 10% h.i. FBS + 2 mM L-glutamine + non-essential amino acids (cells also grow well in 90-95% RPMI 1640 + 5-10% h.i. FBS)
Subculture:	split confluent culture 1:4 to 1:6 every 3-5 days using trypsin/EDTA; cells reach confluence quickly; seed out at ca. 1-2 x 106 cells/80 cm^2
Incubation:	at 37 °C with 5% CO2
Doubling time:	ca. 48 hours
Harvest:	cell harvest of ca. 5-15 x 106 cells/175 cm2
Storage:	frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO DSMZ

Scientific Data:

Mycoplasma:	negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays
Immunology:	cytokeratin +, cytokeratin-7 +, cytokeratin-8 +, cytokeratin-17 +, cytokeratin-18 +, cytokeratin-19 +, desmin -, endothel -, EpCAM -, GFAP -, HMB-45 -, neurofilament -, vimentin +
Fingerprint:	multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile
Species:	confirmed as human with IEF of G6PD, MDH, NP
Cytogenetics:	human hypertriploid/hypotetraploid karyotype with 15% polyploidy - 82(77-84)<4n>XXX, -X, -2, -3, -4, +5, +5, +5, +5, -7, -8, -11, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -21, -22, +mar - der(1)t(1;3)(p11;q11), add(2)(q37), del(3)(q13), der(3)t(3;5)(q11;q11), i(5p)x4,

	del(6)(q15), der(9)t(1;9)(p11;p11), add(12)(q23), i(15q), der(19)t(13;19)(q22;p13)x1-2, add(21)(p11), del(?22)(q12)
Viruses:	ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV -, HBV -, HCV -, HHV-8 -, HIV -, HPV +, HTLV-I/II -, MLV -, SMRV –

EK-7

Kullanılan Makine-Teçhizat Listesi

Kullanılan Makine – Teçhizat Listesi	
Adı/Modeli	**Kullanım Amacı**
Langmuir-Blodgett tek katman cihazı, NIMA Technology Ltd. marka, 112 D model (Teknik özellikler için bk.: http://www.nima.co.uk).	Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun yüzey kimyasal analizlerinde ve özellikle fosfolipityüzeyine DNA'nın adsorbsyonu ile ilgili ölçümlerde kullanılmıştır. Bu ölçümler Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesinde gerçekleştirilmiştir.
UV/VIS Spektrofotometre Cary 100 (Teknik özellikler için bk.: http://www.centrallar.metu.edu.tr/bio/trk/anasayfa/cihazlar/c_07.php).	UV/VIS Spektrofotometre, tek katmanlı ve çok katmanlı lipit vesikülleriyle oluşturulan Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun yüksek moleküler ağırlıklı bileşik hale gelmeleri ve oluşum kinetiklerinin incelenmesinde kullanılmıştır. Bu ölçümler Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarında (www.centrallab.metu.edu.tr) yapılmıştır.
Termogravimetrik Analiz ve FTIR Spektrometre Sistemi (TGA+FTIR) Perkin Labor Pyris 1 TGA & Spectrum 1 FT-IR Spectrometer (http://www.centrallab.metu.edu.tr/rd/trk/anasayfa/cihazlar/ta/taft.php) Bruker IFS 66/S (Teknik özellikler için bk.: http://www.centrallab.metu.edu.tr/rd/trk/anasayfa/cihazlar/s/ftir.php).	Termogravimetrik Analiz ve FTIR cihazları, Mg^{+2} varlığında çeşitli lipit türleri ile DNA arasında oluşan komplekslerde ilk tanınma olaylarının ve bu oluşumda rol oynayan fonksiyonel gruplarının ortaya çıkarılmasında kullanılmıştır. Bu ölçümler Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarında (www.centrallab.metu.edu.tr) yapılmıştır.
Raman Spektrometresi, Bruker IFS 66/S, FRA 106/S, HYPERION 1000, RAMANSCOPE II, Cihaz kızılötesi analizi için IFS 66/S, raman analizi için FRA 106/S ve bunların mikroskoplarından oluşan bileşik bir sistemdir. Hyperion 1000 kızılötesi, Ramanscope II de raman mikroskobudur. Raman cihazı 1064 nm Nd-YAG laser kullanmaktadır. (Teknik özellikler için bk.: http://www.centrallab.metu.edu.tr/?q=node/52).	FTIR ölçümlerinde su bandı çoğu zaman araştırılmakta olan fonksiyonel grupların bandlarıyla örtüştüğünden sağlıklı spektrumun çekilmesinde büyük bir sorun teşkil etmektedir. Çözüm olarak ağır su (D_2O) veya dekonvolusyon paket programları kullanılmaktadır. Çekilen FTIR spektrumlarını Raman spektroskopisi ile teyit etmek, bu sorunun çözümlerinden biridir. Raman saçılımında su bandı olması ölçüm sonuçlarımızı önemli derecede etkilememiştir. Bu tez çalışmasında, Raman spektrometrik ölçümler su bandının sorun çıkardığı durumlarda kullanılmıştır. Raman ölçümleri, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarında (www.centrallab.metu.edu.tr) yapılmıştır.
Dinamik Işık Saçılım Spektrometresi (DLS) Cihaz: Malvern CGS-3 (Teknik özellikler için bk.:http://www.centrallab.metu.edu.tr/rd/trk/anasayfa/cihazlar/pik/dis.php).	Dinamik Işık Saçılım Spektrometresi (DLS), Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun boyut analizinde kullanılacaktır. Bu ölçümler Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkezi Laboratuvarında (www.centrallab.metu.edu.tr) yapılmıştır.
Zeta Potansiyel ve Mobilite Ölçüm Cihazı MALVERN Nano ZS90 (Teknik özellikler için bk.: http://www.centrallab.metu.edu.tr/rd/trk/anasayfa/cihazlar/pik/zpm.php). Bilkent-UNAM http://www.nano.bilkent.edu.tr/Zeta_sizer.html.	Zeta Potansiyel ve Mobilite Ölçüm Cihazı Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun elektrostatik davranışları ve boyut analizinde kullanılmıştır. Bu ölçümler Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkezi Laboratuvarında (www.centrallab.metu.edu.tr) yapılmıştır.
Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Perkin Elmer Diamond DSC (Teknik özellikleri için bk.: http://www.centrallab.metu.edu.tr/rd/trk/anasayfa/cihazlar/ta/dtk.php).	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC), Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun bileşik hale gelmelerinin termodinamik ölçümlerinde kullanılmıştır.
Mikroizotermal Titrasyon Kalorimetre, VP-ITC MicroCal (Teknik özellikler için bk.:	ITC cihazı ile, Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun bileşik hale gelmelerinin kinetik ölçümlerinde kullanılmıştır. Bu ölçümler Orta

http://www.centrallab.metu.edu.tr/bio/trk/anasayfa/cihazlar/c_12.php)	Doğu Teknik Universitesi, Merkez Laboratuvarında (www.centrallab.metu.edu.tr) yapılmıştır.
Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop Zeiss LSM 510 (Teknik özellikler için bk.: http://www.centrallab.metu.edu.tr/bio/trk/anasayfa/cihazlar/c_04.php).	Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop ile, Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun yapısında yer alan lipidlerle, çift zincirli ve tek zincirli DNA'ya özgü floresans boyalar kullanarak, bu makromoleküllerinin ve özellikle DNA kompaktizasyon dinamiğinin ölçülmesinde kullanılmıştır. Bu ölçümler Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarında (www.central-lab.metu.edu.tr) yapılmıştır.
Zaman Tanımlı Floresans Spektrometre, Photon Technology International Model C-71 (Yeni isim: Model TM-2/2005 Lifetime Spektroflorometre); (teknik özellikler için bk.:http://www.centrallab.metu.edu.tr/bio/trk/anasayfa/cihazlar/c_13.php).	Lipit/DNA/Mg^{+2} üçlü oluşumunun meydana gelmesinde ortaya çıkan lipit füzyonlarının incelenmesinde kullanılmıştır. Bu ölçümler Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarında (www.centrallab.metu.edu.tr) ve Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü'nde yapılmıştır.
Elektroforez Tankı (Scie-PlasHU10W) UV görüntüleme sistemi (Syngene Gene Genius Bio İmaging System) GeneSnap 6.08.04 yazılımı	Agaroz jel elektroforezi, plazmid DNA'nın lipozomlarca indüklenen çeşitli topolojilerinin incelenmesinde kullanılmışır. Bu ölçümler Ankara Üniversitesi, Merkezi Laboratuvarında) yapılmıştır.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: F. Funda Kaya Demirsoy

Doğum Yeri: Adana

Doğum Tarihi: 28.02.1981

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce, Almanca (başlangıç seviyesinde)

Eğitim Durumu

Lise: Kahramanmaraş Anadolu Lisesi (1992-1999)

Lisans: Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji (1999-2005)

Yüksek Lisans: Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genetik (2005-2008)

Çukurova Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü Ortaöğretim Öğretmenliği (2005-2007)

İş Tecrübesi

Kurumu: TUBİTAK 108T918

‘’*C.elegans* Oosit ve Embriyolarında Global MikroRNAom Profillerinin Analizi’’

Görevi: Proje Bursiyeri **Yılları:** 2009-2012

Kurumu: TUBİTAK 111S495

“Yeni Genom Organizasyonu Modeli Olarak Nükleik Asit-Biyomembran LipitKomplekslerinin İncelenmesi ve Viral Olmayan Nanoterapilerdeki Önemi”

Görevi: Proje Bursiyeri **Yılları:** 2012-2014

10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Demirsoy Kaya F.F., Eruygur N., Suleymanoglu E. Supramolecular Langmuir monolayers and multilayered vesicles of self-assembling DNA lipit surface structures and their further implications in polyelectrolyte-based cell transfections. *J Nanopart Res* (2015), DOI 10.1007/s11051-014-2812-5.

Doktora Öncesi Yayınlar

Kaya FF, Topaktaş M.Genotoxic effects of potassium bromate on human peripheral lymphocytes *in vitro*. Mutat Res. 2007 Jan 10;626(1-2):48-52. Epub 2006 Nov 22.

Rencüzogullari E, Ila HB, Kayraldiz A, Diler SB, Yavuz A, Arslan M, Funda Kaya F, Topaktas M. The mutagenic and anti-mutagenic effects of Ecballium elaterium fruit juice in human peripheral lymphocytes.Genetika. 2006 Jun;42(6):768-72.

Kayraldiz A, Kaya FF, Canimoglu S, Rencüzogullari E..Mutagenicity of five food additives in Ames/Salmonella/microsome test.Annals of Microbiology. 2006 56(2):129-133.

KONGRE-TOPLANTI BİLDİRİLER

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Sözlü Bildiriler

Demirsoy Kaya, F. F., Eruygur, N., and Süleymanoglu, E., Cell-Nanolipopleks interactions Bowl Size Analysis and Characterization with Z-Potential Measurement International 2nd

Drug ChemistryCongress. Nov.21-23 March, 2014, Antalya-Beldibi/Turkey, 21-23 Mart 2014, (sözlü bildiri).

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Poster Bildirileri

Demirsoy, F.F.K., Atalay A., Eruygur, N and Süleymanoğlu, E., "Pharmaceutical Perspectives of Supramolecular DNA-Neutral Phospholipit Self-Assemblies Towards Developing Novel Non-Viral Gene Delivery Vehicles: Physicochemical Studies, Transfection Efficiencies and Cytotoxicity Profiles". International Multidisciplinary Symposium on Drug research and Development. Nov.28-30, 2013, Antalya-Turkey, pp-44.

Demirsoy Kaya, F. F., Eruygur, N., and Süleymanoglu, E., Pharmaceutical Perspectives of Supramolecular DNA-Neutral Phospholipit Self-Assemblies Towards Developing Novel Non-Viral Gene Delivery Vehicles: Physicochemical Studies, Transfection Efficiencies and Cytotoxicity Profiles, International Multidisciplinary Symposium on Drug Research & Development, Lara-Antalya, Turkey, 28-30 November 2013, P. 100.

Eruygur, N, Demirsoy Kaya, F. F., Süleymanoglu, E., Lipopleks Thermodynamics: DNA-Mg^{+2}-neutral lipit Differential Thermal Analysis of Interaction Energetics, and Isothermal Titration Calorimetry Differential Scanning Calorimetry Determination,International Multidisciplinary Symposium on Drug research and Development. Nov.28-30, 2013, Antalya-Beldibi/Turkey. 21-23 March 2014, P302.

Demirsoy Kaya, F. F., Eruygur, N., and Süleymanoglu, E., Biophysical Studies on Supramolecular Structures of Self-Assembling Nucleic Acid-Liposome Nanopharmaceuticals: Relevance To Gene Delivery and DNA Chromatography, 2. BAU

Drug Design Conference, 17-19 April, 2014, Bahçeşehir University School of Medicine-Beşiktaş Campus-Istanbul, Turkey, p. 175.

Demirsoy Kaya, F. F., Eruygur, N., and Süleymanoglu, E., "Supramolecular Langmuir-Blodgett Monolayers of Self-Assembling Nucleic Acid-Lipit Surface Structures: From Origin of Life To Nonviral Gene Delivery Nanomedicines" NanoTR10-10th Nanoscience and Nanotechnology Conference, Yeditepe University, 17-21 June, 2014, Kayısdagı Campus-Istanbul, Turkey, p.T49,345.

Demirsoy Kaya, F. F., Eruygur, N., and Süleymanoglu, E., Supramolecular Self-Assembling Nucleic Acid-Lipid Surface Structures Designed as Pharmaceutical Non-Viral Gene Delivery Nanomedicines. ISOPS 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 9-12 June2015, Ankara, Turkey, p.287,sayfa 255

J Nanopart Res (2015) 17:50
DOI 10.1007/s11051-014-2812-5

RESEARCH PAPER

Supramolecular Langmuir monolayers and multilayered vesicles of self-assembling DNA–lipid surface structures and their further implications in polyelectrolyte-based cell transfections

Fatma Funda Kaya Demirsoy · Nuraniye Eruygur · Erhan Süleymanoğlu

Received: 12 August 2014 / Accepted: 9 December 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract The basic interfacial characteristics of DNA–lipid recognitions have been studied. The complex structures of individual unbound DNA molecules and their binary and ternary complexes with zwitterionic lipids and divalent cations were followed by employing lipid monolayers at the air–liquid interfaces, as well as by performing various microscopic, spectroscopic, and thermodynamic measurements with multilayered vesicles. The pressure-area isotherms depicted that Mg^{2+}-ions increase the surface pressure of lipid films and thus give rise to electrostatic and hydrophobic lipid–DNA interactions in terms of DNA adsorption, adhesion, and compaction. These features were further approached by using multilamellar vesicles with a mean diameter of 850 nm, where a metal ion-directed nucleic acid compaction and condensation effects were shown. The data obtained show the effectiveness of Langmuir monolayers and lipid multilayers in studying nucleic acid–lipid recognitions. The data provide with further details and support previous reports on mainly structural features of these recognitions. Biomolecular surface recognition events were presented in direct link with spectral and thermodynamic features of lipid vesicle–polynucleotide complex formations. The results serve to build a theoretical model considering the use of neutral lipids in lipoplex designs as a polyelectrolyte alternative to the currently employed cytotoxic cationic liposomes. The supramolecular structures formed and their possible roles in interfacial electrostatic and hydrophobic mechanisms of endosomal escape in relevant cell transfection assays are particularly emphasized.

Keywords DNA–lipid surface recognitions · Mg^{2+} specificities · Supramolecular Langmuir monolayers · Multilayered lipid vesicles · Lipoplex design · Nanobiotechnology

Part of this work was presented at 10th Nanoscience and Nanotechnology Conference, held on 17–21 June, 2014 at Yeditepe University-Istanbul, Turkey.

Fatma Funda Kaya Demirsoy and Nuraniye Eruygur have contributed equally to this work.

Guest Editors: Mustafa Culha, Rawil F. Fakhrullin, Ratnesh Lal

This article is part of the topical collection on Nanobiotechnology

F. F. K. Demirsoy
The Central Laboratory of The Institute of Biotechnology, Ankara University, Ankara 06500, Turkey

N. Eruygur
Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Gazi University, Ankara 06330, Turkey

E. Süleymanoğlu (✉)
Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Gazi University, Ankara 06330, Turkey
e-mail: erhans@mail.ru

Published online: 21 January 2015

Introduction

Macromolecular biopolymers possess the fundamental properties of natural systems to self-assembly and therefore studying their self-organizing mechanisms becomes important for developing novel kinetic and thermodynamic models of their associations and for engineering better cell-based nanobiotechnological tools (Kunitake 2000). An understanding of the interactions between various biomacromolecules is essential for deciphering their molecular and cellular functions. From all possible macromolecular complexes of nucleic acids with other biomolecules, those formed with lipids are less studied. Nucleic acid–lipid recognitions has attracted research interest for many years initially in terms of pure physical chemistry of biomacromolecular assemblages and later in the context of "host–guest" concept of supramolecular chemistry (Dotan et al. 2002). Such recognitions were considered crucial in developing primordial protocell models in the origin of life field (Black et al. 2013). Afterwards, their emerging importance was recognized in cellular events such as bacterial nucleoid phase separation (Haberle and Ferguson 2011; Sato et al. 2012; Hoch and Hartmann 2014; Aumiller et al. 2014), prokaryotic mesosome formation (Reusch and Burger 1973; Silva et al. 1976), viral infections (Laliberte and Moss 2014), eukaryotic gene expressions (Klose and Rossmann 2014), transcription–translation–translocations (Norris and Fishov 2001) and in macromolecular crowding (Aumiller et al. 2014). Besides the utilizations of their recognitions in nanofabrication designs (Motschmann and Möhwald 2001; Barthélémy et al. 2005; Okahata and Kawasaki 2005; Dai et al. 2005; Jen and Grote 2012) and bioelectronics (Shimomura et al. 2003), nucleic acid–lipid interactions have gained considerable research interest during the recent years after realization of their potential for developing novel gene delivery vehicles with improved physicochemical and serum stability characteristics (Liang et al. 2014; Scherman 2014; Gu 2015; Shi 2015). Currently, various gene transfer tools are under investigations in terms of increasing the therapeutic profiles of different gene therapy trials. Various alternatives of highly efficient, but risky viral systems (Altaras et al. 2005) are proposed regularly. Besides physical methods of gene transfers (Haberl et al. 2013), such nonviral genosome designs are based mainly on the employment of chemical synthetic approaches utilizing cationic polymers (polyplexes) and lipids (lipoplexes) or their various combinations (Anwer et al. 2003, Kabanov 2006; Caracciolo and Amenitsch 2012). The newly designed gene delivery vehicles have to overcome numerous cellular barriers through their route via cytosol to nucleus before the expression of their therapeutic effect is achieved. A highly readable accounts of the topic are available (Kaneda 2001; Lechardeur and Lukacs 2002; Wiethoff and Middaugh 2003; Read et al. 2005; Oupický 2005; Kabanov 2006; Wang et al. 2012; Nguyen and Szoka 2012; Kamimura et al. 2012). Various biological barriers for gene carriers were reviewed also by Akita et al. (2011). Excess of positive charges allows electrostatic interactions with negatively charged surfaces of the target cells. These genosomes are formed through compaction of DNA and charge neutralization and aggregation of macromolecular complexes, leading to formation of multilamellar structures (Zuidam et al. 1999; Yan et al. 2012). Various types of therapeutic single stranded, double stranded and hybrid nucleic acids have been designed for therapeutic gene delivery, such as plasmid DNA, oligodeoxyribonucleotides, small interference RNA (siRNA) and micro RNA (miRNA) (Akita et al. 2011). Whatever nucleic acid chain topology is used (Dhanoya et al. 2011), these macromolecular therapeutic assemblies should reach either the cytosol or the nucleus of target cells before successful transgene expression. Since both the DNA to be carried and cell surface are negatively charged, they should be bring into electrostatic contact, in order for hydrophilic high molecular weight DNA to pass though lipophilic plasma membrane of cells to be transfected. The employed cationic polyplexes and lipoplexes bind to nucleic acids and compact them, resulting in positively charged complexes. These enter cells via detrimental endocytosis involving lysosomal degradation of the genosomes. Even if successful cellular internalization is achieved, their effects here or their further route to the nuclear membrane is impeded by the unsuitable viscosity of the cell cytoplasm. The latter is measured in terms of diffusion coefficients by Förster resonance energy transfer (FRET) approaches, for instance (Engelborghs and Visser 2014). Another problematic issue is the lack of specificity of transfections and even success in escape from endosomal degradations does

not imply efficient transgene expression. Obviously, the physicochemical factors, such as charge and shape, the N/P (±) ratios, as well as the morphology of the lipoplexes govern the efficacy of transfections (Resina et al. 2009). Therefore, the role of the structure, and the physicochemical and interfacial and colloidal parameters of the gene transfer vehicles in mechanisms of gene release is emphasized (Antipina et al. 2007; Pozzi et al. 2009; Adler and Leong 2010; Yan et al. 2012; Fortier et al. 2014). The role of these parameters still remains unclear. Detailed studies on the surface chemical and biophysical factors governing mechanisms of lipoplex–cell interactions are needed to construct a sort of a synthetic polyelectrolyte-based DNA vaccine (Kabanov 2006). The prerequisite for this is better understanding of DNA–lipid interactions.

Since the excessive positive charge of cationic liposomes is considered as the cause of cytotoxicity, one of the alternative approaches would be to employ less positive charges and to use neutral lipids as alternatives to problematic cationic vesicles. Such design is not characterized well concerning its transfection efficiencies. We have tried previously to follow another possibility of the detrimental receptor-mediated cellular internalization of genosomes and have studied biophysically the nucleic acid chain directed lipid fusions with cell surface model membrane lipids triggered my divalent metal cations and gave further details of such polyelectrolyte complex formation (Süleymanoğlu 2004) and its thermodynamic stability features (Süleymanoğlu 2005), respectively. However, due to the transient kinetic and thermodynamic characteristics of the formed ternary complexes of DNA–metal cations–liposomes, there is no yet any report claiming their high transfection rates. Further studies on the interfacial and physicochemical behavior of such lipoplexes is needed for more detailed understanding of alternative ways for endosomal escape.

Such approaches of following DNA–lipid interactions are mostly based on employing various biomembrane model systems, since direct studies with real plasma membranes are difficult to perform. The experimental drawbacks exist, due to difficulties mainly arising from employment of harsh procedures with difficult to remove afterwards detergents, used to solubilize integral membrane proteins. Model membrane systems, such as lipid monolayers (Brockman 1999; Vollhardt 2002; Brezesinski and Möhwald 2003; Kundu 2010; Guntupalli et al. 2011), bimolecular lipid membranes (Trajanowicz and Mulchandani 2004; Chipot et al. 2005; Kahya et al. 2007) and liposomes (ElBayoumi and Torchilin 2010), represent a suitable approach to follow self-organizations between nucleic acids and lipids. Langmuir monolayers present several advantages to bilayer systems. The self-assembly formations studied are followed by two-dimensional layer, thus avoiding mesophasic structural changes often seen in vesicles. Measurements of the surface pressure-area (π–A) isotherms give information on the intermolecular and surface forces governing the associations. These are expressed in terms of molecular areas occurring in membranes and provide direct data on structural changes which can take place also on biomembrane surfaces of live cells.

The increasing interest concerning gene therapy approaches has led to research efforts toward structural characterization studies, more specifically on therapeutic nucleic acid–lipid interactions, which are usually employed in gene delivery vector designs. The reported data are based mainly on the use of unilamellar vesicles of various sizes, trying to link their physicochemical features to transfection efficiencies. However, very few works exist on the initial recognition events between nucleic acids and cell surfaces, which are approached by air–liquid interfaces. The later is reasonable to be used for following DNA adsorption and adhesion on lipid surfaces. Applying Langmuir–Blodgett troughs, such interactions were studied by neutron reflectivity (Wu et al. 2006; Lin et al. 2012), infrared reflection absorption spectroscopy (IRRAS), grazing incidence X-ray diffraction (GIXD) and Brewster angle microscopy (BAM) measurements (Gromelski and Brezesinski 2006; Antipina et al. 2007). The obtained data concern the structure of DNA bound to lipid monolayers in quasi-two-dimensional systems, employing mainly cationic lipids. The suggested in the current work DNA–zwitterionic lipid complexes were studied by Gromelski and Brezesinski (2006), emphasizing also the structural features. The idea of these studies that one possible way to enhance efficacy of lipoplexes by introducing various polyelectrolyte sensitivities is clear, however it is difficult to link the reported structures to transfection efficiencies. Hence, more detailed studies on DNA–lipid surface interactions are needed.

We report herein the interfacial and physicochemical features of DNA condensation on zwitterionic lipid monolayers, triggered by divalent metal cations as a system, which deserves to be exploited further in a relevant transfection assays, as a polyelectrolyte-based gene delivery design. In addition to the valuable structural data from the abovementioned studies, lipid monolayers were used in combination with direct microscopic, morphologic, spectroscopic and thermodynamic analyses performed with fluid multilayered vesicles, which would give further clues on nucleic acid–lipid interactions on cellular surfaces. Since the commonly employed unilamellar vesicles also convert into multilayered structures upon complexations with nucleic acids, it is more appropriate to follow surface effects using multilamellar vesicles.

The present study is a continuation of our previous measurements (Süleymanoğlu 2004; Süleymanoğlu 2005, 2006a, b, 2009; Manavbasi and Süleymanoglu 2007) on the use of zwitterionic lipid vesicles in a similar polyelectrolyte design based on their recognitions with nucleic acids in the presence of cationic species. The problematic high positive charge of the cytotoxic cationic lipids is substituted by small charge of Mg^{2+}, which brings about complex formation of negatively charged DNA and also negatively charged cell surfaces. Mg^{2+} is applied not only in terms of its well established roles in nucleic acid topologies and in phosphate group transfers, but also due to its features as a stabilizing agent for a number of enteroviruses, such as polioviruses, against thermal inactivation (Altaras et al. 2005). This divalent metal cation is chosen after appreciation of its roles in evolution (Dacks and Field 2004), cell function (Lucia 2013) and due to its roles in improving the gene transfection efficiencies both in chemical transfections (Lam and Cullis 2000), as well as in electroporative gene transfers (Haberl et al. 2013).

Experimental

Materials

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC, MW 734.039) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Tris–HCl buffer (10 mM), chloroform ($CHCl_3$, MW 119.38), methanol (CH_3OH, MW 32.04), phosphotungstic acid solution and magnesium chloride ($MgCl_2{\cdot}2H_2O$, anhydrous, ≥98 %, MW 95.21) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and were used as supplied. Ethanol and ethydium bromide (EtBr) used for fluorescence spectroscopic measurements were a product of Invitrogen Life Technologies. Bacteriophage T7 DNA, which is isolated from infected *E. coli* strain, was purchased from GeneOn (Germany). It is linear 39936 bp long with molecular weight of 26×10^6 daltons. Its freshly prepared stock solution in concentration of 0.5 μg/μl was stored in 10 mM Tris–HCl (pH 8.0); 1 mM EDTA buffer, provided by the supplier. It was kept at −20 °C in suitable vials on blue ice during the experiments. The ultra pure water was obtained from a MilliQ system (Barnstead NanoPure™) with a resistivity of 18.2 MΩ cm (Millipore) and was used in both air–liquid interface experiments as a subphase and in preparations of lipid multilamellar vesicles. The experiments were conducted at 22 °C.

Methods

Lipid monolayer formation and surface pressure measurements

Monolayer experiments were performed with a computer controlled Langmuir film balance (Nima Technology, Coventry, England), placed in a perplex box, supplied by the manufacturer. The rectangular trough and the barrier were made of Teflon. The surface pressure (π) was measured by the Wilhelmy method using a filter paper plate (Stine and Moore 2002; Girard-Ergot and Blum 2007). The measurement is based on the determination of force due to surface tension on a plate suspended partially in the subphase. A Wilhelmy plate attached to a force balance determines the interfacial tension and the signal from the balance controls the moving barriers. The Langmuir trough was filled with ultra pure water. The experiments were carried out at 22 °C. DPPC monomolecular films were obtained by spreading 50 μl of defined ratio of both lipid stock solution (1 mg/ml in $CHCl_3$) and its binary and ternary complexes with DNA and $MgCl_2$, respectively, at the air/water interface. Chloroform evaporates leaving a low concentration of DPPC lipids on the water surface due to the repulsive forces of their hydrophobic ends. Then, after complete evaporation of the solvent (20 min), the lipid film was

slowly compressed up to the defined lateral pressure, in accordance with Guntupalli et al. (2011). Complete evaporation of chloroform was assessed by following the normalized fixed value of the surface pressure (π), as also advised by the manufacturer. Initially, an ultra pure water solution was spread over the trough. The water interface was compressed from maximal to minimal surface area, and any surface tension decrease was monitored below the measured value for pure water of 72.4 mN/m. Using a Pasteur pipet connected to a vacuum pump, the surface contaminants were removed until the surface pressure reaches around 0 mN/m or surface tension reaches 72 mN/m. Afterwards, the solvent evaporation and the monolayer stability was checked either by following the decrease in surface pressure when the area is held constant, or by recording the decrease in film area when the surface pressure is kept constant. Since monolayer stability represents the dynamic π–*A* isotherms, its purity was ensured by backward movements of the barriers, referred to as hysteresis experiments. The monolayer was successively compressed to a fixed surface pressure and relaxed afterwards to its original value. 10 repeated compressions and expansions were employed to achieve a reproducible isotherm and to produce a stable DPPC monolayer. A very small shift of hysteresis loops towards lower mean molecular areas was used as a criterion for obtaining of a stable monolayers in all control, binary and ternary mixtures of DPPC, DNA and $MgCl_2$. The absence of pressure-area isotherm for chloroform itself after its evaporation from the trough interface indicates the purity of the lipid monolayer surface. For DNA interaction experiments, DNA dispersion in pure water (1.50 mg/ml) was added (50 µl) by a small clean Hamilton syringe (10 µl), provided by the manufacturer. 5 mM $MgCl_2$ concentration was used throughout the experiments. Holding the syringe a few millimeters above the water surface, small drops of the DNA and $MgCl_2$ solutions were added subsequently (Díaz and Cerro 2008). Each drop was added at the center of the water surface spread over the trough. Every next drop with samples was added after spreading and evaporation of the previous drop. This procedure produces better results compared with the injection of the DNA solutions beneath the lipid monolayer, since it helps to spread away any contaminants from the dipping area. Compression of the monolayers was performed at a speed of 5 mm/min, until the necessary constant pressure was attained. In all the experiments, the water surface was routinely characterized prior to film dispersion by a complete compression cycle, in accordance with Cristofolini et al. (2007). The trough surface was routinely cleaned before any repetition of experiments by subsequent treatments with ethanol, acetone, chloroform and finally with water, all of them of the highest purity.

Preparation of DPPC multilayers

A lipid mixture which contained 0.36 µmol of DPPC lipids, were dissolved in chloroform/methanol (9:1) solution in a 50 ml round-bottomed flask. Then the solution was dried at 20 °C, evaporated first for 2 h on N_2 stream, and afterwards overnight at vacuum at room temperature in a fume hood in order to form a thin lipid film on the bottom of the flask. The dry lipid film was hydrated in 50 ml, 5 mM Tris–HCl buffer in distilled water at pH 7.4. Dispersion was equilibrated for 2 h at 80 °C by vortexing and shaking, until white and turbid solution was obtained on the bottom of the flask, indicating multilamellar vesicle formation. The rehydrated multilamellar vesicle suspension was then lyophilized for 72 h to produce powders, which were placed in tightly capped glass vials and stored at −70 °C.

Preparation of zwitterionic DPPC–Mg^{2+}, DNA–Mg^{2+} binary complexes and ternary complexes of DPPC MLV–Mg^{2+}–DNA

5 mM $MgCl_2$ stock solution at pH 7.4 was prepared in 5 mM Tris–HCl buffer. 5 mM lipid stock solution was prepared in 5 mM Tris–HCl buffer at pH 7.4. Equimolar binary lipid–Mg^{2+} control mixtures were prepared and incubated for 30 min at 25 °C. Equimolar complexes (1:1) between DPPC MLVs and Mg^{2+} were prepared by their direct mixing in concentrations and ratios mentioned in experiments and incubated 30 min before each measurement. Mg^{2+}–DNA binary complexes were prepared by using 5 mM phage T7 DNA and $MgCl_2$ as a source of Mg^{2+} cations, as described (Patil et al. 2005). Ternary complexes between multilamellar vesicles, metal cations and DNA were prepared by adding Mg^{2+} into previously formed binary complexes of DPPC–MLV and DNA. Liposomal suspensions were centrifuged at 16,000×*g* for 45 min at 4 °C to separate bound and unbound fractions. The supernatant was removed and 4 ml water was added to the pellet to

resuspend the lipid vesicles before repeating the centrifugation. This procedure was repeated 6 times before each measurement.

Circular dichroism spectroscopy

The circular dichroism (CD) spectra of bacteriophage T7 DNA and multilamellar vesicles-phage T7 DNA binary systems, as well as their ternary complexes with Mg^{2+} were recorded with Jasco J-815 spectropolarimeter (Jasco, UK) at pH 7.4. A quartz cell with 10 mm path length was used during this study. The measurements were taken in UV region of 220–300 nm. The spectra were corrected for the cuvette and buffer signals but were not subjected to any smoothing procedures.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy

IR spectra were recorded on a Bruker FTIR spectrometer (Tensor 37 model). Interferograms were accumulated over the spectral range 4,000–400 cm^{-1} with a line resolution 2 cm^{-1}. ~10 µl sample was dropped onto each cell in FTIR plate.

Surface-enhanced Raman scattering (SERS)

SERS measurements were performed using DeltaNu Examiner Raman microscope (DeltaNu Inc., Lamarie, WY, USA) with a 785 nm laser source, a motorized microscope stage sample holder, and a CCD detector was used to detect nucleic acid and lipid bands. Instrument parameters were as follows: 50× magnification objective, 30 µm laser spot size, 100 mW laser power, and 30 s acquisition time. The average value of three SERS spectra was obtained and baseline correction was performed for all measurements. Appropriate mixtures of DNA and lipids were dried under a lyofilizator stream, in water and centrifuged at 6,000 rpm for 15 min and the pellets were used for spectroscopic measurements, after Álvarez et al. (2002). The use of Tris buffer was avoided, since it gives rise to artificial Raman bands afterwards.

Fabrication of silver nanoparticles for SERS measurements

The colloidal Ag nanoparticles were a kind gift of the Dept. of Analytical Chemistry of Gazi University, Faculty of Pharmacy. They were fabricated through reduction of silver nitrate by hydroxylamine hydrochloride in an alkaline pH environment at room temperature. Briefly, 10 mL of $AgNO_3$ suspension (10^{-2} M) was rapidly added to freshly prepared 90 mL of NH_2OH–HCl solution (1.67×10^{-3} M) containing 3.33×10^{-3} M NaOH (10^{-1} M solution) while stirring. Then the mixture was added rapidly to 90 ml of a 1.11×10^{-3} M silver nitrate aqueous solution, and the resulting mixture was shaken until homogeneity is obtained, in accordance with Cañamares et al. (2005). The resulting colloid showed milky gray color. The fabricated colloidal Ag nanoparticles (10^{-3} M) were kept for 3 weeks at room temperature in a dark. These Ag nanoparticles were kept in freshly prepared physiologic saline solution and were centrifuged at 13.000 rpm 3 times before spectroscopic measurements, as described elsewhere (Leopold and Lendl 2003; Park et al. 2005; Bothun 2008; Park et al. 2009; Sau et al. 2009; Wu et al. 2009; Michel and Gradzielski 2012).

Fluorescence spectroscopy

EtBr dissolved in 0.5 mmol/l Tris buffer was used as a fluorescent probe. The previously prepared solution of phage DNA and multilamellar DPPC vesicles were mixed to obtain the desired equimolar ratio in each sample. After 10 min incubation, the Mg^{2+} ligand was added to form the ternary DNA/metal cation/DPPC complexes. Samples were briefly vortexed. Their fluorescence spectra were measured using Varian Carry Eclipse spectrofluorimeter at excitation wavelength 260 nm and emission wavelength of 600 nm in cuvettes with 1 cm optical path length (Hellma, Germany).

UV/VIS spectroscopy

Absorption spectra of unbound and ligand bound phage T7 DNA in the presence of Mg^{2+} were recorded using NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo-Scientific, USA). 1.8 µl of bacteriophage T7 DNA was loaded and scanned for a peak at 260 nm. 260/280 ratio between 1.8 and 2.0 and lack of a peak around 220–230 nm was considered as a criterion for nucleic acid purity.

Size analysis

Size distributions of the multilamellar vesicles and their complexes with Mg^{2+} and bacteriophage T7 DNA were determined by photon correlation spectroscopy using the Malvern Zetasizer Nano ZS90 laser light scattering spectrometer system (Malvern Instruments, UK). The samples were diluted in distilled water at 1:10 volume ratio for zeta size/potential analyses. To obtain zeta size/potential distributions, 4 separate measurements were taken for each sample. Each measurement was repeated 4 times and an average was taken. All measurements were conducted with disposable sizing cuvettes at a scattering angle of 173°. These measurements were done with neat lipid vesicle samples, where the mean diameters based on the intensity of scattered light are reported afterwards.

Fluorescence microscopy

Liposomes were stained with Nile Red dye (Sigma) for confocal imaging purposes. Fluorescence confocal microscopy (LSM 510, Zeiss, Germany) was applied to visualize the multilamellar DPPC vesicles to confirm their size analysis data from dynamic light scattering experiments. Lipid/Nile Red molar ratio was 1:1. Multilamellar lipid vesicles were centrifuged and excess of Nile Red was removed with H_2O washing. An upright Zeiss LSM 510 microscope was used. All images were viewed using a X100 objective and relevant software, provided by the manufacturer, was employed for image capture. A simple glass slide was used and 20–30 µl of sample was found to be sufficient for image capture. The DNA/Mg^{2+}/DPPC ternary complexes were visualized by placing the coverslip on the top of the each sample before measurement, as suggested (Bibi et al. 2011).

Transmission electron microscopy

Morphology and size analysis of the multilamellar vesicles and their binary and ternary complexes with Mg^{2+} and bacteriophage T7 DNA were studied by transmission electron microscopy (TEM) using Tecnai G^2 Spirit Biotwin device (FEI, USA) operated at an accelerating voltage of 80 kV with a line resolution of 0.34 nm. The samples were diluted in distilled water at 1:10 volume ratio. Three images of multilayer vesicles, silver loaded vesicles and silver nanoparticles were obtained during the study. An aliquot of each solution was applied to the three TEM grids, separately. Using filter papers, excess of the samples were removed from the grids. Negative staining was applied to all grids by using an aliquot of diluted 2 % (w/v) phosphotungstic acid in distilled water and after 60 s, excess of phosphotungstic acid was removed with using another filter paper. The grids were left to dry overnight before imaging.

Isothermal titration calorimetry

To detect enthalpy changes associated with Mg^{2+}-driven DNA–lipid recognitions, isothermal titration calorimetry (ITC) measurements were conducted with Microcal ITC 200 device (MicroCal, Northampton, MA, USA), following the protocol of Gonçalves et al. (2004) with slight modifications. Briefly, 1.8 µl of vesicle suspension was added to sample cell (vol. = 1.338 ml). Stirring speed was at 600 rpm. Added ligand volume was 0.2 µl and total number of injections were 20. Cell temperature was 25 °C. Reference power was 5 µcal/s. Duration was 0.4 s. 5 mM lipid mixture in 5 mM Tris–HCl buffer was added to 0.012×10^{-3} mM phage T7 DNA in 5 mM Tris–HCl buffer. Injection volume of aliquots of previously prepared equimolar DNA–Mg^{2+} binary mixture were injected into the cell at constant time intervals of 5 min. A control titration, in which Mg^{2+} was added to pure buffer was used to correct the enthalpy of each injection for the heat of Mg^{2+} dilution effects. Raw data were processed using Origin 7.0 program provided with the instrument by the manufacturer, as reported (O'Brien et al. 2001; Privalov 2009; McKnight 2013).

Results and discussion

The major aim of the present work was to approach the relevance of intermolecular and surface forces to design novel functional nucleic acid platforms or surfaces and to use these interactions further to develop improved electrostatic and hydrophobic non-viral gene delivery vehicles. The importance of the topic was emphasized in a recent review (Langecker et al. 2014). For this, a synthetic system currently developed for transfer of therapeutic nucleic acids into target cells using a synthetic DNA supramolecular

assembly is presented. By combining self-assembling properties of nucleic acids and lipids a variety of possibly occurring structures are figured out emphasizing the role of molecular recognitions at supramolecular interfaces. To achieve this, two major experimental designs were applied. First, the initial recognition events between nucleic acid chains and lipid moieties were studied by lipid monolayer measurements, where the surface adsorptions and adhesions of DNA onto phospholipid monolayers were approached. Second, in order to increase the level of the recognition events from this first (1D or 2D) to a higher third dimension (3D), a multilayered vesicle systems were applied. The aim is to characterize such DNA–lipid recognitions by performing experiments on a shorter length scales, as suggested also by Czolkos et al. (2009).

Langmuir monolayers

The main objective of these measurements was to study the complexation behavior of DNA with previously organized DPPC monolayers in the presence and in the absence of divalent metal cations for comparison with other reports (Hianik et al. 2003; Bhaumik et al. 2004; Gromelski and Brezesinski 2006; Erokhina et al. 2007; Cristofolini et al. 2007; Castano et al. 2009; Campen et al. 2010). DPPC lipids were used due to their well-known physicochemical properties and due to their wide use in pharmaceutical lipoplex formulations for therapeutic gene delivery trials.

Surface pressure-area isotherms are shown in Figs. 1, 2 and 3. A typical DPPC monolayer isotherm is obtained in unbound form of the lipid with its three different physical states, ranging from liquid-like to compressed phase until a collapse point is reached at the end (Cadenhead et al. 1980; Chifu et al. 1983; Zsakó et al. 1984; Möhwald 1995; Lee 2008). DPPC lipids form stable monolayers and their compression isotherms revealed a smooth π–A curves, lacking indications for structural transitions and indicating the films to be in the liquid expanded (LE) state (Cadenhead et al. 1980; Chifu et al. 1983; Möhwald 1995). When shorter incubation is applied (15 min), in the presence of DNA, the isotherm is shifted towards smaller areas. This shows the effect of packaging within lipid monolayers, the effect being more enhanced in the presence of Mg^{2+} (Fig. 1). This suggests that the attachment of DNA to DPPC

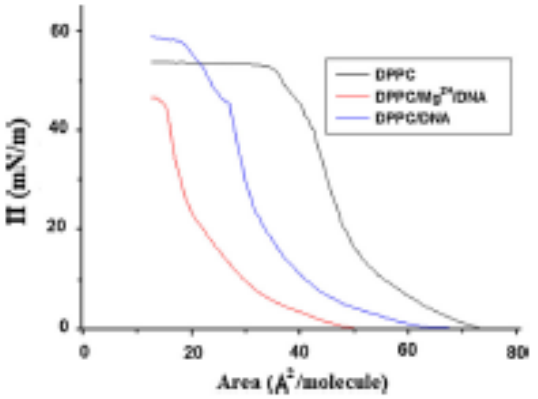


Fig. 1 Surface pressure-area (π-A) isotherms of unbound DPPC and of its binary mixture with phage T7 DNA and their ternary complexes with Mg^{2+}. The interaction occurs even in the absence of Mg^{2+}, in shorter incubation times (15 min.), due to co-existance of several phases, indicating the lack of interfering water subphase (Campen et al. 2010), which previously was reported to prevent such a binary associations in the absence of divalent metal cations (Cristofolini et al. 2007)

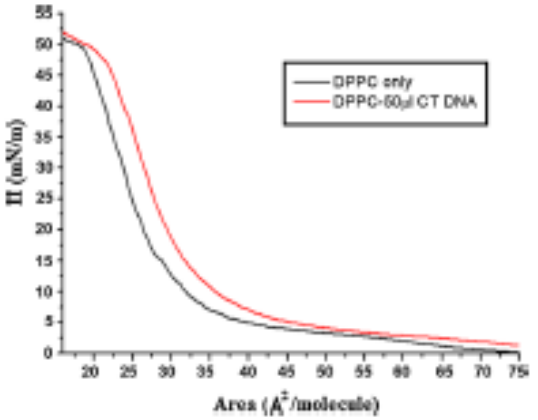


Fig. 2 Surface pressure-area isotherms of DPPC and its binary complex with calf thymus DNA

decreases the molecular area, the effect being attributed to molecular packing and the electrostatic formation of smaller lipid domains. The effects are more profound under higher pressures above 10–20 mN/m, where DNA induces dense packing of the lipid monolayer, also supported from reflectivity measurements of similar system with Ca^{2+} as metal cation used. Otherwise Ca^{2+} behaves differently at lower pressures shifting the curve towards larger area per molecule suggesting that molecules interact with

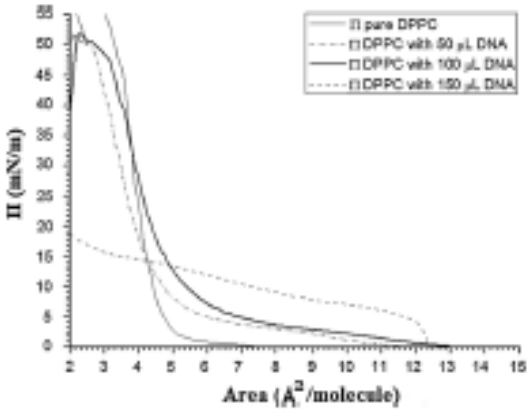


Fig. 3 Surface pressure-area isotherms of ligand-unbound DPPC and of its binary mixture with phage T7 DNA and ternary complexes of lipid/Mg^{2+}/DNA, shown as area/molecule after 15 h of incubation. The amount of DNA are depicted as volumes, just to show qualitatively the effect of their increased amounts, since it is difficult to calculate their exact concentration from subphase used, as well as due to difficulties arising from water effects in aqueus media

each other through the attached DNA strands at much longer distance, depending on incubation times (Cristofolini et al. 2007). The effects appear to be dependent on incubation time, pH, buffers used, concentrations and types of polynucleotides (Erokhina et al. 2007). Interestingly, different effects are obtained when different nucleic acid strands are used, however it appears that the incubation time and the lipid type (Gromelski and Brezesinski 2006; Castano et al. 2009) used in the construction of monolayers are the more important parameters. A control experiment employing calf thymus DNA possessing different polynucleotide chain topology produces different effects on the monolayer when different ionic conditions are used in longer incubation times (Fig. 2). The figure is shown for comparative purposes only. In this case a π–A isotherm shifted to larger molecular areas, showing a formation of DNA–lipid complexes even in the absence of Mg^{2+} ions. The effects obviously depend on the state of monolayers, since lipid headgroups are protonated. The condensed film produces surface pressure independent effects, while more fluid monolayers produce pressure dependent effects, the whole process being governed by either the electrostatic attraction forces between oppositely charged lipid headgroups and DNA or the repulsive forces between DNA strands of the same charge.

When longer incubation times are applied, the surface area-pressure isotherms are shifted to larger molecular areas (Fig. 3), where softer monolayers are formed and molecules interact with each other through the attached DNA strands at much longer distances (Cristofolini et al. 2007). The addition of DNA–Mg^{2+} binary complex to already formed DPPC monolayers compensates the electrostatic cost of packaging the polar lipid head groups and favors the formation of larger domains. Since the observed recognition trends usually depend on N/P(±) ratios, screening of charges in DNA by counterions seems to be responsible for dense packing lipid phases. Lateral heterogeneity in lipid distributions at the air–water interface results in film expansions due to the persistence length of polynucleotide helix, the effect being enhanced by the changes of the monolayer dipole potential, as well as by the increased attraction of DNA towards monolayers with higher density of positive charges due to the presence of Mg^{2+} ions. Obviously, the coupling of DNA to binary mixtures is a transition process, which depends on surface pressure and time. At the highest pressures, the overall thickness of DPPC film is unaffected by the presence of the nucleic acid, which considers a DNA attached below the DPPC film and indicates the presence of double-stranded polynucleotide chains. At lower pressures, however, (10 mN/m), DNA seems to induce reduction of the DPPC thickness, due to the induction of densely packed monolayers, where probably several phases co-exist. Thus, the occupied molecular areas are larger than those obtained for unbound DPPC as a result of higher molecular tilting effects, since the presence of DNA–Mg^{2+} binary mixtures give rise to a reduction of tilt angle of zwitterionic lipids. Adsorption of DNA leads to a fluidization of the monolayer (Antipina et al. 2007). Thus, at low lateral pressures, the nucleic acid partially penetrates into the lipid monolayer but is squeezed out at higher pressures (Gromelski and Brezesinski 2006). Monolayers composed from pure DPPC lipids possess different compression isotherms (Figs. 1, 2, 3) due to the existance of different subphase, because of the impossibility to perform various control experiments with different incubation times in parallel without cleaning the subphase. The issue is also emphasized by Guntupalli et al. (2011). The initially formed ternary complexes between DPPC headgroups, metal cations and DNA are not in a thermodynamic equilibrium (Fig. 1) and various

phases co-exist in these time intervals (Girard-Ergot and Blum 2007). Thermodynamic equilibrium is reached in much longer times (Fig. 3), where dominant van der Waals dispersion forces result from the attraction between fluctuating dipoles (Evans and Wennerström 1999). Usually, a combination of capillary and van der Waals interactions occur (Möhwald 1995; Guntupalli et al. 2011). The kink of DPPC isotherms in liquid condensed (LC) state, being analogous to the L_β phase in vesicle dispersions (Vaknin et al. 1991) is not observed here, since it is frequently undetectable by the Wilhelmy plate. It is seen more effectively by Pt-wire method of measuring of surface pressures, after treating of the later with a small fire flame for a certain time before measurements (Girard-Ergot and Blum 2007). Moreover, the LC kink is not always horizontal and clearly visible, as expected, and this is explained by the formation of small aggregates or surface micelles (Möhwald 1995). Such phase separation are observed in Langmuir monolayers by either fluorescence microscopy (Stine and Moore 2002; Lee 2008; Stottrup et al. 2010), Brewster angle microscopy (BAM) (Vollhardt 2002) or the polynucleotide arrays are detected by atomic force microscopy (AFM) (Girard-Ergot and Blum 2007). The reported isotherms are in principle agreement with similar studies employing DNA, complexed to lipid monolayers, triggered by Ca^{2+}, Mg^{2+} and Ba^{2+} ions (Lin et al. 2012), the reasoning being further supported by structural analysis employing neutron reflectivity measurements (Wu et al. 2006). The obtained pressure-area isotherms are also in agreement with similar measurements performed with cationic lipids (Moghaddam et al. 2011). From these measurements, it was concluded that the ternary complex of DPPC–Mg^{2+}–DNA promotes a high packing density of the zwitterionic lipids and compacted DNA phase with a high collapse pressures resulting in a more rigid interfacial structure.

Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) allows a rapid estimation of important structural transitions of various biomolecules and is a well established method for following such changes upon ligand bindings depending on biomacromolecule concentrations, buffer, pH, ionic strength, as well as on DNA and lipid type (Ranjbar and Gill 2009; Chang et al. 2012). CD serves as a classic technique to identify nucleic acid polymorphs in a sample. CD spectroscopy was applied for following secondary structural transitions of both DPPC lipids and DNA in the presence of Mg^{2+} as a ternary complex forming agent.

The effects of both titrations of lipid vesicles on DNA and of titrations of phage T7 DNA on lipid spectral features, while keeping the ligand (Mg^{2+}) concentrations constant are depicted on Fig. 4a and b, respectively. Such CD measurements show electronic transitions in the intrinsic ester chromophors localized near the chiral center of the phospholipids, which are sensitive to ligand binding (Wakde and Blöchliger 1997). A lipid-dominated spectrum is seen when amplitudes of CD signals of both biomacromolecules are compared. Both types of titrations result in significant changes of the respective CD bands. In the absence of Mg^{2+}-driven lipid binding, the nucleic acid CD spectrum is typical of the B-form of DNA with positive bands at about 220 and 270 nm (Fig. 4a). The addition of increasing concentration of DPPC vesicles drive these bands in the negative directions but their locations remain unchanged, suggesting that DNA condensation takes place in a similar manner as observed with plasmids interacting with cationic peptide ligand conjugates (Do et al. 2011). To confirm the importance of the lipid charge for membrane interactions of T7 DNA and to study the potential changes of the lipid secondary structures upon binding we have performed CD experiments depicting lipid spectral signals (Fig. 4b) after subtraction of nucleic acid bands. DPPC vesicles possess a broad elliptical signal at 235 nm ($n \rightarrow \pi^*$ transitions of the ester chromophor) with shoulders at 215 nm, as well as at 265 nm and negative signal at 300 nm. It is interesting to study whether the CD spectrum, which reflects the headgroup regions (surface area), is sensitive to the physical state of alkyl chains of the phospholipid chains within the multilayers. In these conditions, the hydrocarbon chains are in all-*trans* conformation showing crystalline-like features. As seen, a drastic shifts occur after complexation with increasing amounts DNA in fixed concentrations of Mg^{2+} ligands. Such titrations demonstrate that the intrinsic CD properties of the phospholipids are sensitive to these conformational transitions in the regions of the hydrophobic chains. The measurements of the intrinsic CD signals are therefore important in studies on the role of surface electrostatics and hydrophobicity of lipid vesicles in further gene carrier designs.

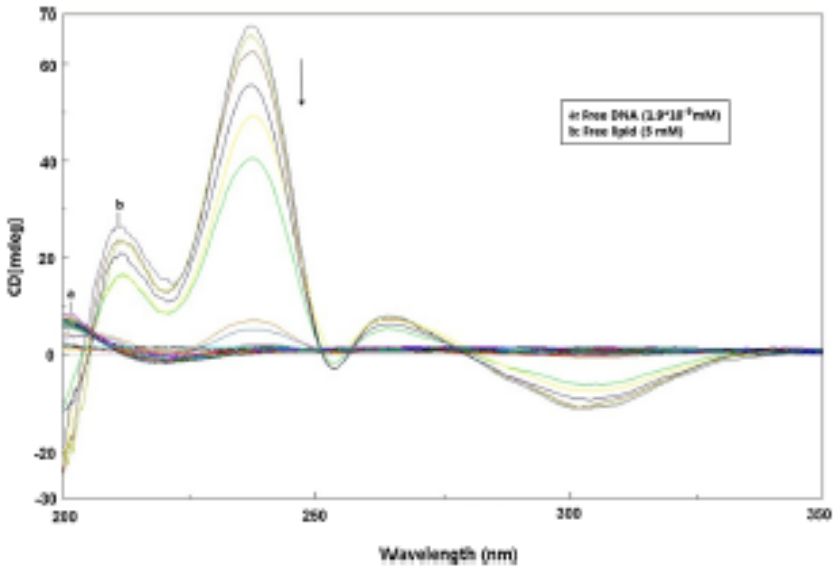


Fig. 4 CD spectra of aqueous dispersions of equimolar ternary lipid-DNA complexes in the presence of Mg^{2+}. Both the effect of lipid vesicles titrations on spectral effects of DNA (*a*) and the titrations of phage T7 DNA on DPPC lipids (*b*) are shown. The arrow indicates the increasing lipid and nucleic acid concentrations at constant Mg^{2+} ligand concentrations. The spectra for lipids and DNA were subtracted from each other, respectively

The spectral structural transitions of nucleic acids upon macromolecular binding are more informative than those of lipids and are therefore given separately. A typical B-type of phage T7 DNA in unbound with DPPC lipids form exists (Fig. 5). This type of polynucleotide helix possesses approximately equal positive (275 nm) and negative (245 nm) components centered at around 260 nm (Zuidam et al. 1999; Ranjbar and Gill 2009; Do et al. 2011; Chang et al. 2012). At 220 nm the CD signal is either positive or less negative. Adding increasing amounts of lipid vesicles changes the intensity of CD signals, but the shape of the spectrum remains the same, suggesting that the ligand binding mode is unchanged though the amount of bound ligand may have changed. In such a case, it is useful to keep the ligand concentration (Mg^{2+}) constant as then any changes are more easily apparent. The observed CD spectrum suggests that obviously a single binding mode exists for DNA–lipid recognitions, or if any multiple binding sites exist, their relative proportions are independent of DNA/lipid ratios. Interestingly, no any effect of *B*-to-*A* (Ranjbar and Gill 2009) or *B*-to-*C* transitions, or any DNA collapse with subsequent formation of a ψ-phase of a cholesteric-like nucleic acid phase was observed (Zuidam et al. 1999). Interestingly, such *B*–*Z* type transition is reported for a similar system using Ca^{2+} and plasmid DNA with anionic vesicles (Patil

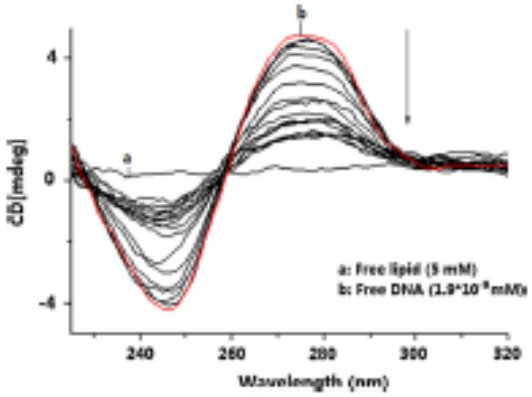


Fig. 5 CD spectra of ternary complexes formed between DPPC multilayer vesicles-T7 DNA in 5 mM Tris–HCl (pH ~7.4) at 22 °C at constant ligand concentration of Mg^{2+}

et al. 2005). Apparently, under the employed experimental conditions, essential electrostatic interactions occurring between the negatively charged nucleic acid phosphate groups and Mg^{2+}-induced charge reversed DPPC vesicles take place interfering with base–base interactions of polynucleotide strands.

Fluorescence and UV/VIS Spectroscopy

Fluorescence and UV/VIS spectroscopy were used to follow the interactions between DPPC multilayers and DNA, triggered by Mg^{2+}, which could be seen from

changes of spectral profiles. To enhance DNA fluorescent features, EtBr) was used as a fluorescent label. Free EtBr has a week fluorescent properties, however an intense red-shifted fluorescence band is obtained after its addition to DNA, showing the intercalation. After addition of multilamellar vesicles to the DNA–EtBr solution, the shape and position of the fluorescence peak does not change. Otherwise, addition of increasing amounts of DNA to EtBr would increase fluorescence intensities several fold (Alhani 2007). However, increasing concentrations of Mg^{2+} ligand titrations clearly brings about lipid–DNA interactions, as depicted by arrow on Fig. 6. Mg^{2+} competes with EtBr for polynucleotide helix binding and slowly diminishes its bound amount to DNA, followed by decrease of the fluorescence intensity of the complex. In addition, divalent metal cations mediate the electrostatic interactions between DNA polyanion and charge reversed lipid vesicles acting as a barrier to fluoroprobe (Lengyel et al. 2011), resulting in less amount of EtBr intercalating in DNA, these both effects leading to a decrease in the emission intensity (Fig. 6). DNA is condensed and compacted by both reversed charged vesicles and yet unbound Mg^{2+} with different affinities to DNA affecting the access of EtBr and thus diminishing the intensities of the emission spectrum. Fluorescence measurements of this sort can not give clue on DNA condensation alone—such data are obtained mainly by fluorescence microscopy, using extended linear DNA and giant lipid vesicles, but apparently the intensity of EtBr is decreased due to these DNA condensation and compaction effects, as seen form CD (Figs. 4, 5), size (Fig. 10), and morphology analysis (Fig. 11). The divalent metal cation mediated DNA–lipid interactions are further seen from UV/VIS spectroscopic measurements (the inset of Fig. 6), where the characteristic spectral band at 260 nm is lost after the complexation.

Vibrational spectroscopy: FTIR and SERS

Vibrational spectroscopy, in terms of infrared (IR) absorption (Mereghetti et al. 2014) and Raman scattering (Duguid et al. 1993; Rinia et al. 2007), has provided a very useful method for following interactions between various biomolecules and their associations with different ligands, since the recorded signals arise from their intrinsic molecular features. A label-free measurement opportunity, as oppose to fluorescence methods for instance, makes such an approach very suitable for studying the intrinsic details of biomolecular interactions with minimal perturbations of their native structures. A highly readable accounts, as well as more technical reviews and reports on its applications are readily available elsewhere in the relevant literature (Schultz and Levin 2011 and references therein). We have used vibrational spectroscopic approach to measure binding modes and functional group specificities of DNA–lipid interactions. Several conformation depicting

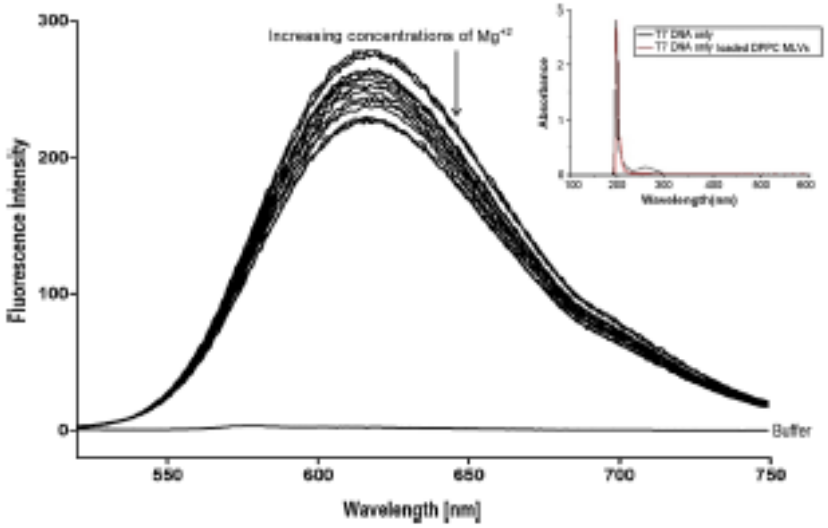


Fig. 6 Fluorescence spectra of ternary lipid/Mg^{2+}/DNA complexes. The *arrow* shows the effect of the increased Mg^{2+} ligand concentrations on fluorescence intensity profiles of the equimolar binary DNA/DPPC vesicles system. *Inset* absorption spectra of unbound phage T7 DNA and its ternary bound form with DPPC lipid vesicles in the presence of Mg^{2+} as a condensing agent

vibrational frequencies are seen in the FTIR and Raman spectra of DNA–lipid complexes. To determine which parts of the DNA molecule are engaged in lipid binding FTIR spectroscopy was applied. Comparison of FTIR spectra of MLVs with their binary mixtures with nucleic acids reveal a lipid-dominated spectrum (Fig. 7a, b) with very little contribution from DNA. Addition of Mg^{2+} in equimolar amounts clearly inserts a dehydrating effects of both spectra (Fig. 7c). An overall spectra of ternary DNA–lipid complexes formed in the presence of Mg^{2+} and a control unbound DNA spectrum, respectively are shown on Fig. 7d, e. Thymine stretch (1,330 cm^{-1}), symmetric and asymmetric phosphate stretches (1,090 and 1,225 cm^{-1}) and a strongly coupled sugar-phosphodiester signal (970 cm^{-1}) are depicting the existence of B-form of DNA (Braun et al. 2003). A good water substraction is achieved as seen by a flat baseline around 2,200 cm^{-1}, where the water band contribution is located. This reveals that this native nucleic acid form is retained upon ternary complex formation (Fig. 7d) in agreement also with CD measurements (Figs. 4, 5). The employed measurement method give rise to substantial decrease of lipid specific bands, which are replaced by clearly seen moisture signals (Fig. 7a–c). Different methods of FTIR sample preparations lead to different *B–C–A–Z* DNA transitions emphasizing the relevance of sample preparations. Nucleic acid specific frequencies seen at 1,222, 1,088 and 1,053 cm^{-1} are ascribed to asymmetric, symmetric phosphate group and C–O stretchings, while those at 892 and 836 cm^{-1} are indicators of B-type deoxyribose vibrations (Marty et al. 2009). The other polynucleotide and lipid specific vibrations are shown in Table 1. Due to inevitable water vapor interference, the Thymine (1,665 cm^{-1}) and Adenine (1,609 cm^{-1}) vibrations cannot be analysed by IR absorption approach and were followed afterwards by more suitable SERS measurements. Substantial reductions in peaks intensities suggest direct binding, as well as polynucleotide helix stabilization, revealing an alteration of base stacking and base pairing upon DNA–lipid associations, in terms of base pair spacings and tilt changes. This could be the results of both direct interactions and DNA compaction, governed by charge neutralizations, in agreement with CD and fluorescence data.

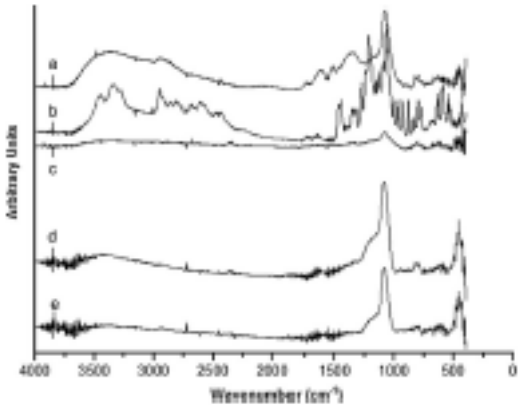


Fig. 7 Overall FTIR spectra of equimolar mixtures of binary and ternary DNA-lipid complexes, as well as of individual unbound biomolecules. *a* MLVs–phage T7 DNA binary complex *b* MLVs only *c* MLVs–Mg^{2+} *d* MLVs–Mg^{2+}–T7 DNA ternary complex and *e* unbound phage T7 DNA

Band subtraction in FTIR spectroscopy is rather intricate. Raman scattering offers a complimentary measurement technique for following the suggested DNA compaction within DPPC multilayers and thus the nucleic acid bands were investigated by surface-enhanced Raman scattering (SERS). The polynucleotide helix sensitive Raman signals include the symmetric phosphate stretch (1,095 cm^{-1}) and Thymine and Guanine stretches (1,375–1,489 cm^{-1}, respectively), in accordance with Braun et al. (2003). The most prominent Raman bands of polynucleotides are the triene vibration at around 1,485 cm^{-1} (Guanine), 1,483 cm^{-1} (Adenine), 1,530 cm^{-1} (Cytosine) and 1,370 cm^{-1} (Thymine), which could be used as a marker bands (Neugebauer 2014). Vibrations at 1,600–1,150 cm^{-1} are in-plane vibrations of the bases and those at 1,050 cm^{-1} represent bands of sugar residues (Fig. 8). At room temperature DPPC is in the gel phase with acyl chains highly ordered in a fully stretched configuration and with a minimum of *gauche* kinks (Rinia et al. 2007). The obtained results are not indicative enough to deduce any *B–C* transition of DNA form. The relative intensity of the symmetric phosphate vibration (1,110 cm^{-1}) exists in both FTIR and SERS spectra and is increased in height suggesting a possible hydrogen bonding upon ternary complex formation. Otherwise, an electrostatic interaction would be suggested. The Guanine N7 (1,490 cm^{-1}) disappears and a new band at 1,465 cm^{-1} appears indicating a possible hydrogen bonding. The decline in Adenine N6 (1,420 cm^{-1}) and ring N3 (1,580 cm^{-1})

Table 1 The Major DNA and Lipid Specific Vibrational Frequencies Detected by FTIR and SERS Measurements

Assignments	Frequencies detected by FTIR (cm^{-1})	Frequencies detected by SERS (cm^{-1})	References
B-type deoxyribose vibrations	892 and 836	–	Marty et al. (2009)
$-N^{+}(CH_3)_3$ symmetric stretch	722	–	Marty et al. (2009)
$-N+(CH_3)_3$ antisymmetric stretch	973	–	Marty et al. (2009)
Antisymmetric phosphate group stretching	1,053	–	Marty et al. (2009)
in plane rocking mode of Thymine	–	1,000	Thaker et al. (2014)
Lipid specific bands of C–H twisting and C–H bendings	–	1,065; 1,100; 1,130; 1,300 and 1,440	Asiala and Schultz (2014)
DNA phosphate backbone	–	1,084	Thaker et al. (2014)
Symmetric phosphate group stretch	–	1,095	Braun et al. (2003)
Symmetric phosphate group stretching	1,088	–	Marty et al. (2009)
C–O stretching	1,022	–	Marty et al. (2009)
Symmetric phosphate group stretching	1,050–1,100	–	Marty et al. (2009)
Cytosine and guanine	–	1,060	Sathuluri et al. (2011) and Neugebauer (2014)
Adenine	–	1,141–1,146	Sathuluri et al. (2011) and Neugebauer (2014)
Antisymmetric phosphate group stretches	1,200–1,250	–	Marty et al. (2009)
Guanine	–	1,220	Sathuluri et al. (2011) and Neugebauer (2014)
Adenine	–	1,260	Sathuluri et al. (2011) and Neugebauer (2014)
Adenine, guanine and thymine stretches	–	1,270–1,289	Sathuluri et al. (2011) and Neugebauer (2014)
Adenine ring vibration	–	1,310	Sathuluri et al. (2011) and Neugebauer (2014)
Thymine stretch	–	1,375	Braun et al. (2003)
Cytosine	–	1,485	Sathuluri et al. (2011) and Neugebauer (2014)
Guanine, adenine, cytosine and thymine, respectively	–	1,485; 1,483; 1,530 and 1,370	Neugebauer (2014)
Guanine stretch	–	1,489	Braun et al. (2003)
Lipid specific vibrations of CH_3	2,954; 2,870 and 2,852	–	Lewis and McElhaney (2007)
Ring modes of adenine and guanine	–	1,575	Sathuluri et al. (2011) and Neugebauer (2014)
Lipid specific vibrations of symmetric CH_3 and CH_2	1,450; 1,530; 1,580, 1,610 and 1,665	–	Lewis and McElhaney (2007) and Mereghetti et al. (2014)
Adenine	1,609	–	Mello and Vidal (2012)
Thymine	1,665	–	Mello and Vidal (2012)
Guanine carbonyl	–	1,700	Neugebauer (2014)

peak intensities could also be indicative for hydrogen bonded state (Braun et al. 2003). Addition of Mg^{2+} to DNA causes substantial changes in the nucleic acid spectrum (Fig. 8b). Almost all marker DNA bands are more or less reduced or shifted, indicating a structural or more specifically conformational transitions due to metal ion binding. New bands appear at 1,190, 1,250, 1,290, 1,370, 1,480, and 1,510 cm^{-1}, indicating the formation of probably compact form of DNA. At least vibrations at 1,250 and 1,480 cm^{-1} could be linked to unstacking of deoxycytidine and metal coordination at N7, respectively. The formation of metal induced

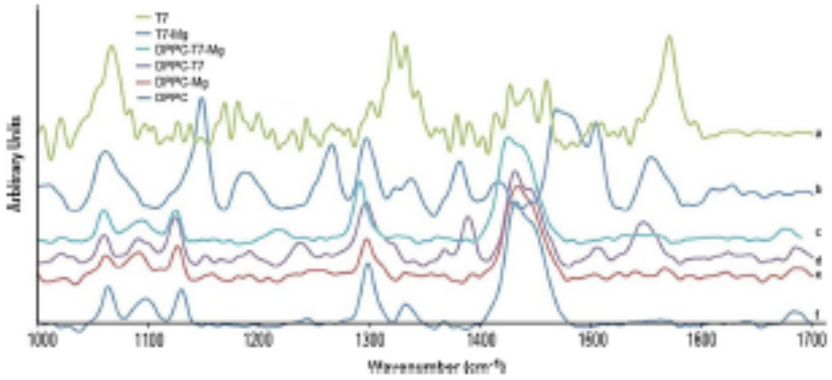


Fig. 8 Representative Surface-Enhanced Raman Spectra (SERS) of ternary MLVs–Mg^{2+}–DNA complex and its unbound members

compact form of polynucleotide chain could occur by Mg^{2+} bindings to purine N7 sites locally destabilizing the double helix, followed by opening of base pairs favoring further metal ion binding to other acceptors, such as N1 (Adenine), N3 (Cytosine) and N3H (Thymine) in a cooperative manner (Duguid et al. 1993). Mg^{2+} preferentially binds to nucleobases with inner-sphere coordination type to the 5′ phosphate, rather than to phosphodiester backbone (DeRose 2009). This would allow the separated DNA strands to crosslink and further aggregate and would eventually lead to formation of more condensed and compact DNA phases. The ternary complex formation is followed by a decrease or shift to lower wavelengths of the band at 1,576 cm^{-1}, which arises from vibrations of Adenine and Guanine bases depicting the complexation reaction in a lipid dominating spectrum (Fig. 8c). The rest of the spectra are also composed of lipid-dominated signals. Since no significant shift is observed at 1,700 cm^{-1} (Guanine carbonyl), a direct interaction with the imidazole nitrogen could be suggested, while other slight shifts of this regions are linked to localized or bound water molecules. In conclusion, the observed spectral patterns reveal reorganization of DNA in the ternary complex.

Size analysis and morphology of DNA–lipid aggregates

The average particle size of unbound zwitterionic vesicle was 850 ± 250 nm (Fig. 9). Multilayered DPPC vesicles show polydispersity in size distributions. Most of the vesicles are close to 1 μm in diameter, with a smaller fraction of vesicles in the 60-nm range, in agreement with Gonçalves et al. (2004). These size distributions were confirmed by fluorescence microscopy (Fig. 10) and negative staining transmission electron microscopy after Belletti et al. (2013) (Fig. 11). Particle sizes are measured using dynamic light scattering (DLS). This technique measures the time-dependent fluctuations in the intensity of scattered light which occur due to Brownian motion of the particles. Analysis of these intensity fluctuations also enables the determination of the diffusion coefficients which are converted into size distributions. Examination of these figures show that multilamellar vesicles have varying diameters from 500 nm to 1–2 μm. A small amount of DNA–free vesicles is also obtained (Fig. 9b, d), showing that Mg^{2+} mediated the formation of larger DNA–lipid aggregates. Size distributions indicate a high level of DNA complexation with neutral DPPC vesicles induced by Mg^{2+} showing the ability of the system members to interact electrostatically. This capability of the system to form polyelectrolyte aggregates of this form is attributed to the bridging effect of metal cations leading to re-organization of the complex, which is highly dependent on +/− charge ratio. Mg^{2+} ions induce an increase in vesicle size by charge reversal of lipid headgroups of neutral DPPC resulting in increased tendency for aggregation due to reduced electrostatic Coulombic interactions between the biopolymers and consequently more aggregation and to formation of larger structures (Panayotov and Fakirov 1988; Moghaddam et al. 2011). Apparently, the molecular packing of the lipids is responsible for such size distributions leading to more rigid structures. Interestingly, such rigidity was observed also in

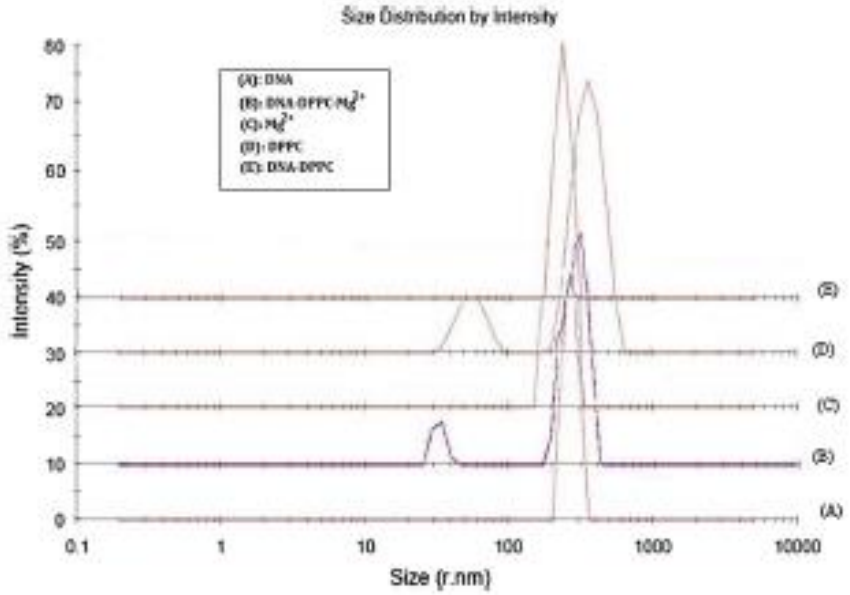


Fig. 9 Particle size analysis of free and ligand-bound molecules forming ternary DNA–Mg^{2+}–lipid complexes. Particle size profiles are averages of four measurements performed on different DNA/lipid preparations for different periods of time, as suggested (Gonçalves et al. 2004). Data are shown in terms of size distributions of free unbound and ligand-bound binary and ternary aggregates

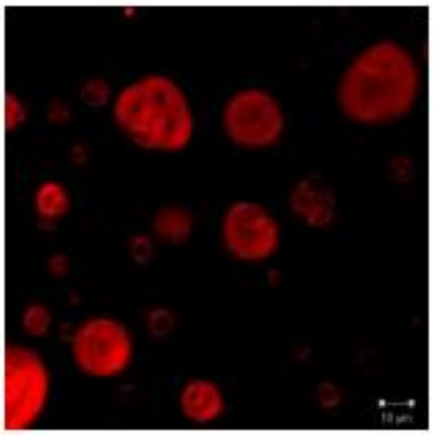


Fig. 10 Fluorescence microscopy of DPPC multilayer vesicles. Nile Red staining of multilamellar zwitterionic DPPC vesicles depicts their morphology. A variety of vesicles with different sizes are observed, since no any fixation was performed to prevent any artificial associations and the vesicles freely move under the microscope slide, showing their heterogeneous size distributions

Langmuir monolayer studies (Figs. 1, 2, 3) indicating a correlation between the undertaken experimental designs concerning DNA–lipid surface recognitions. The particle size distributions observed by dynamic light scattering are further evident from electron microscopic and fluorescent microscopic images. Negative staining is routinely used method for following morphology changes in lipid vesicles and their aggregates with various macromolecules. Negative staining of liposomes often causes artificial images, such as flattering of spherical or cylindrical structures (Miyamoto and Stoeckenius 1971; Hamilton et al. 1980). Since the commonly used uranyl acetate frequently induces aggregation of the macromolecules, due to the binding of uranyl ions to phosphate groups of lipids and nucleic acids, phosphotungstic acid was employed in electron microscopic analysis in this study. It does not have a disruptive effect on membraneous structures and our experience shows that performing such grid evaporations under these experimental conditions permit even spreading of lipid vesicles without apparent structural changes. Even though the method does not provide with more detailed data on the structure of the complexed nucleic acids within interbilayer spaces of the multilayered lipid vesicles, as compared to freeze fracture electron microscopy or cryo-TEM

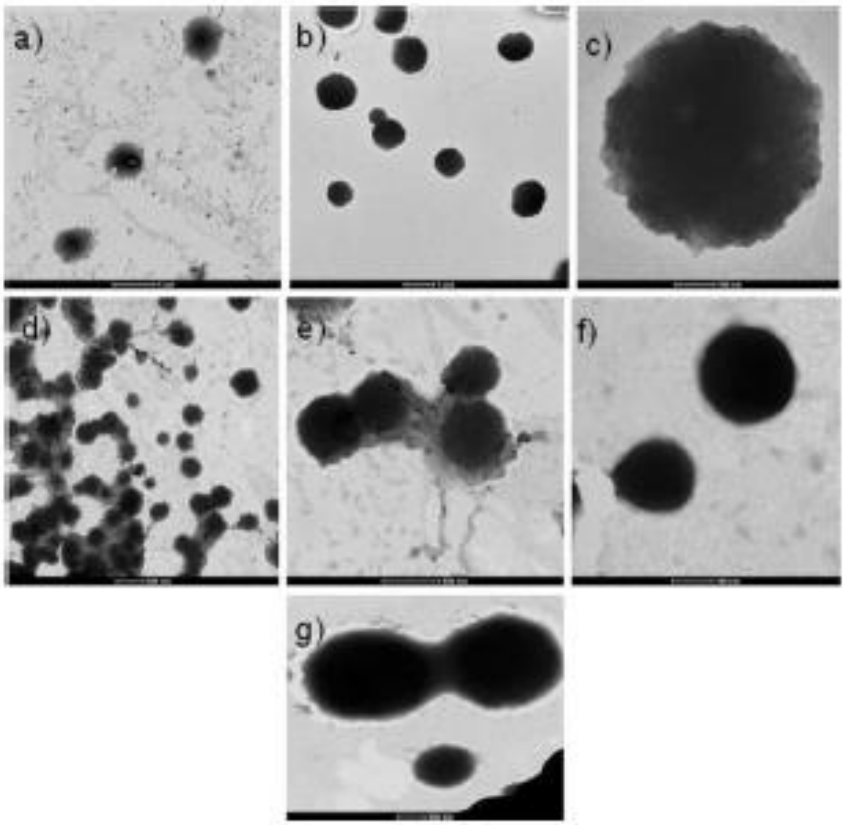


Fig. 11 Transmission electron microscopy of unbound and ligand bound members of DNA–lipid complexes unfixed with osmium tetroxide ternary DNA–Mg^{2+}–lipid aggregates. **a** Multilamellar DPPC vesicles (MLVs); **b**, **c** Mg^{2+}–phage T7 DNA binary complex; **d**, **e** MLV–phage T7 DNA binary complex; **f** compacted binary aggregate formed between MLVs–Mg^{2+} and **g** ternary phage T7 DNA–Mg^{2+}–MLVs

(Schmutz et al. 1999), it is still the preferred method of choice, since it is quick and easy to perform. Since the lipoplex morphologies determine the transfection efficiency (Ma et al. 2007), the negative staining, as well as fluorescence microscopy, was used solely to confirm the size analysis data from dynamic light scattering measurements (Fig. 9) and to visualize the morphology changes of zwitterionic vesicles upon their complexations with DNA. Size distributions of the formed complexes were verified by these three methods; however, the observed trends have also functional implications, since the effect of size and surface charges is considered determining factors in cell transfections (Moghaddam et al. 2011; Andar et al. 2014). In this respect, it would be interesting to explore in future studies the role of lipoplex size on cellular uptake mechanisms emphasizing the importance of increased target cell type specificity, increased transfection efficacy and reduced nanoparticle cytotoxicity of the delivery vectors (Lewinski et al. 2008). Polyelectrolyte reasoning would be able to distinguish various cell type-dependent internalization mechanisms for different populations of distinctly sized lipid carriers and further decipher molecular mechanisms of specific relationships between endocytic escape and vesicle size. Since the surface potential of target cells is negatively charged, such approaches of characterizing interfacial adhesions between lipid vesicles and cell biomembranes by Coulomb forces would lead to further increase of transfection efficiencies. This could be followed by exposures of combinations of inhibitors of specific endocytic pathways and liposomes of various sizes to elucidate size-based uptake mechanisms (Andar et al.

2014). The roles of the surface charge and density of lipoplexes gain further importance after suggestion that a reduction in these parameters may be beneficial for allowing the appropriate DNA dissociation from the lipoplex surfaces after cellular uptake during the DNA route to the cell nucleus (Moghaddam et al. 2011).

Thermodynamic profiles

The association reaction between lipid MLVs and phage T7 DNA in the presence of Mg^{2+} was characterized by isothermal titration calorimetry (ITC). Typical calorimetric traces obtained after addition of successive amounts of DNA–Mg^{2+} binary complexes to vesicle suspension are shown on Fig. 12 and Table 2. The enthalpy change recorded upon formation of ternary DNA–Mg^{2+}–MLVs complex is negative, depicting that the aggregate forms through an exothermic reaction. ITC is a very useful technique for measuring binding constants (K) as a measure of the stability of the complexes formed. Usually, obtaining higher K values is preferable for claiming a formation of thermodynamically stable nanoaggregate features. The data are represented by using MicroCal Origin 5.0 (MicroCal) software version. For this, a non-linear curve fit is used. Applying "one-set of binding sites" model, the thermodynamic constants of standard reaction enthalpy (ΔH), binding constant (K), standard reaction entropy (ΔS), and the stoichiometric ratio of the reaction (N) can be obtained (O'Brien et al. 2001; Privalov 2009; McKnight 2013). The latter parameter represents the ratio of associated with vesicles DNA polyanion. The obtained ternary complex possesses a high binding constant in the range of 10^6, revealing a strong binding involving both electrostatic and hydrophobic interactions. The negative value of ΔH ($-1.723 \times 10^6 \pm 1.276 \times 10^9$ cal/mol) and the negative value for ΔS (-5.77×10^3 cal/mol/deg) represents both a favorable and unfavorable thermodynamic values, respectively, depicting that counterion release compensation process takes place. The former is a measure of electrostatic interactions and hydrogen bond formations, while the latter is indicative of hydrophobic associations. The stoichiometric ratio ($258 \pm 1.91 \times 10^5$ sites) shows that more than 2 DNA–Mg^{2+} polyelectrolyte particles bind to zwitterionic MLVs via Mg^{2+}-mediated bridges. The event is enthalpy driven upon absorption of the DNA molecules on the surface of MLVs. Almost certainly, all liposomes interact with DNA existing as a single phase and very small amount exist as DNA-free fraction, as also seen from dynamic light scattering measurements (Fig. 9). The binding of an

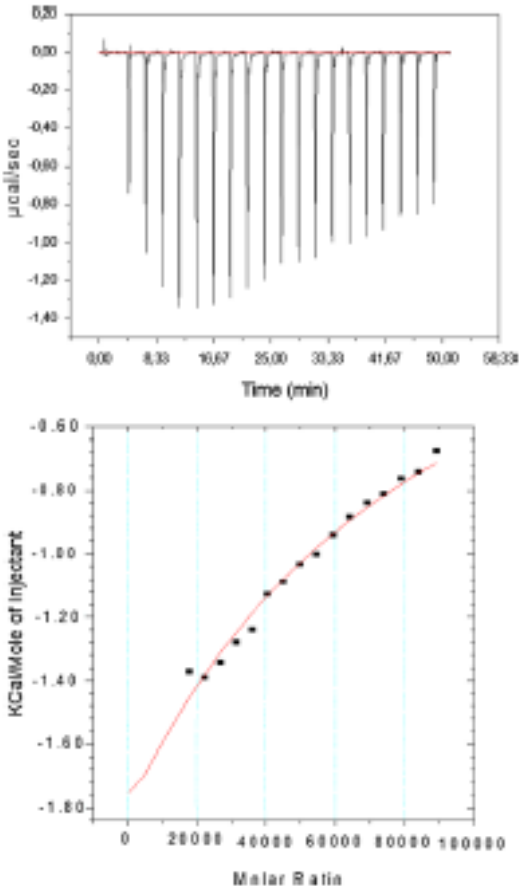


Fig. 12 Calorimetric titrations of DPPC MLVs with phage T7 DNA in the presence of Mg^{2+} ions at 22 °C

Table 2 Thermodynamic characteristics of the ternary complex formation

Thermodynamic parameters of the DPPC-MLV/Mg^{2+}/phage T7 DNA complex formation	Representative constants of the interactions
N	258 ± 1.91^5 Sites
K (M^{-1})	330 ± 506 M^{-1}
ΔH (cal/mol)	-1.723^6 ($\pm 276^9$ cal/mol)
ΔS (cal/mol^{-1}/K)	-5.77^3 cal/mol/deg

entire DNA molecule is strong as opposed to the binding of individual DNA charges because of the presence of multiple, simultaneous interactions, and the relatively small free energies of the individual charges sum to a very large binding energy for the whole molecule. Testing these thermodynamic findings with shorter nucleic acids with different topologies at various DNA/lipid (∓) ratios and their effects on the binding energies and on the affinity of DNA–lipid recognitions would be interesting issue to study in future studies.

The results obtained suggest that observed DNA–lipid interactions occur mainly through electrostatic forces (long-range, nonspecific, charge–charge interactions) and hydrogen bonding (short-range, directional, dipole–dipole interactions) and that some binding is taking place via base pairs of the polynucleotide. Due to the amphiphilic nature of DPPC, various interactions, such as charge–charge, hydrogen bonding, and hydrophobic associations, could play role in the binding. Since most of the phospholipid headgroups are usually protonated and carboxyl groups are ionized these electrostatically attract phosphate groups in the DNA backbone and Mg^{2+}, respectively. Interestingly, no hydrophobic–electrostatic dual type of interaction is detected by ITC isotherm. The entropic component of the binding free energy, ΔS°, was also determined by ITC measurements, indicating that the entropically driven hydrophobic interactions at 22 °C could occur. The ITC isotherm (Fig. 12) itself could involve a combination of electrostatics, hydrogen bonding, and condensation–compaction of the DNA–lipid aggregates. Thus, several types of DNA–lipid recognitions mostly nonspecific could play role in the self-assembly. Hydrogen bonding between Mg^{2+}-triggered charges reversed lipid terminal carboxyl groups, and DNA polyanion is most likely enabled by long-range Coulombic attraction forces, which could be responsible for cooperativity in binding; however, the exact mechanisms of self-assembly formation still remain to be determined.

Self-assemblies of this type are frequently considered as drug delivery systems, whereby chemical substrates or reagents must enter the vesicle and undergo a chemical reaction. In this context, the nucleic acids studied herein are also considered as model therapeutic drug substances. The model considers self-polymerization of polynucleotides within lipid layers regarded as nano- or microreactors of nucleic acids. This depends on mono- and multilayer fluidity, size, and permeabilities, demanding condensed DNA phases in lipidic microcompartments, as also undertaken in the present study. A considerable debate on whether multilamellar lipid carriers of therapeutic nucleic acids (DNA and RNA) unilamellar vesicles prepared from them by extrusion or sonication perform better in cell transfections. Whatever carrier system is used, either polyplexes or lipoplexes, such a genosome, must overcome many cellular barriers before successful therapeutic gene expressions are achieved. Usually, these are internalized by cells via different mechanisms. Most frequently, such nanoscale vehicles face the problem of endocytosis, followed by their endosomal degradation much before reaching the cell nucleus. Thus, escape of receptor-mediated uptake of gene carriers becomes important, the process being dependent on physicochemical properties of lipid/DNA complexes. The importance of these mechanisms was reviewed in great detail by Adler and Leong (2010).

In this respect, the structures of DNA/lipid complexes formed become a determining factor. Different ratios between them resulting in their entropically driven electrostatic interactions are more favorable than the situation employing their isoelectric counterparts (Yan et al. 2012). Therefore, one of the aims of the present study was to approach equimolar DNA–lipid mixtures, which are less studied. Further clues on the possibly formed structures come from the literature. DNA interacts with neutral lipid DPPC by intercalation of nucleic acid molecules between zwitterionic bilayers (Pott and Roux 2002). Nevertheless, Mg^{2+} brings about electrostatic lipid–nucleic acid interactions through probably counterion release routes (Pozzi et al. 2009) leading to further DNA condensation and compaction with ligand-bound lipids having greater motional freedom, which represents mechanisms different from those of cationic liposomes. More detailed studies are needed for the ternary DPPC/Mg^{2+}/DNA system, which could be obtained for instance from further wide and small angle X-ray scattering (WAXS and SAXS) experiments, which are beyond the scope of the current study. Further evidence on possibly formed structures comes from a recent review by Dan and Danino (2014). Apparently, equilibrium structures are formed by DNA–lipid aggregates, governed by thermodynamic equilibrium forces, dominated by the

lipid preferred phase. Lipid-dominated features were determined also in our study, mainly from the vibrational spectroscopic analysis (Figs. 7, 8). The structures are obviously dependent on the lipid type used and on their charge ratios with DNA. The kinetics of their association, however, depends on their concentrations, temperature, vesicle size, and shape, as well as on their method of preparation. The order of addition of DNA to vesicles in the presence of Mg^{2+} ends with different results (data not shown for brevity). While local, equilibrium properties on the nanoscale affect the state of nucleic acids in the complex and rate of DNA release, transfection efficiencies depend on lipoplex size, shape, and charge, these features being dependent on kinetics rather than equilibrium (Dan and Danino 2014). Addition of Mg^{2+} gives rise to increase in their size (Fig. 9). DNA–lipid recognitions occur between the nucleic acid charges, proportional to their concentration, and the lipid charges available on the surface of the vesicles, which are reversed by Mg^{2+} into cationic. Dan and Danino (2014) suggest a three-step process through which a relevant aggregates are probably formed also in the current study. First, DNA molecules rapidly adsorb onto the surface of the cationic vesicles. Then, DNA-intercalated vesicles flocculate to form larger aggregates. The process seems to be driven by metal ions as seen from size analysis and morphology of the aggregates (Figs. 9 and 11, respectively). Afterwards, the more prolonged local rearrangements giving rise to the thermodynamically preferred global equilibrium nanostructures occur. The last step involves a substantial structural transition of both DNA and lipids. In contrast to systems employing cationic lipids for transfections, the present systems utilize the DNA-induced lipid phase separation within the multilayers, resulting in regions of free and unbound to ligands zwitterionic DPPC lipid moieties, which have a higher degree of motional freedom. Further measurements on the ternary DPPC/metal ion/DNA systems employing different DNA/lipid ratios, as well as a variety of vesicle curvatures, charges and shapes would be useful for making deductions for the role of multilamellar and unilamellar lipoplex structures on increasing the in vitro transfection efficacies on various host cell types.

Nucleic acid–lipid recognitions have always been approached by researchers from the molecular evolution field as an attractive designs for suggesting and testing novel protocell models. Following the elegant approach of Kurihara et al. (2011), the DNA–lipid recognitions undertaken in the present study could be further exploited in the origin of life field as a type of primordial cellular form. Protocell should self-reproduce the compartment and self-replicate the information carrying nucleic acids. By using the supramolecular principles, such a primitive cell could be envisaged by considering DNA (encapsulated guest) within a self-reproducible giant vesicle (host), composed of primordial polyribonucleotides (RNA) and ancestral lipids, the reaction being catalysed by Mg^{2+}, acting as a primitive enzyme in an essentially inorganic world. Further studies are needed to test whether such a system would self-replicate.

Conclusions

To develop lipoplexes with high transfection and low cytotoxicity profiles, better understanding on controlling size, lipid/DNA charge ratio (±), net surface charge and their effects on the lipoplex formulations, chemical structure of gene carrier lipid, as well as the overall structure of the genosome is crucial.

Langmuir monolayer studies were performed to investigate any possible correlation between lipid packing and DNA compaction. Monolayer studies demonstrated that zwitterionic molecular packing occurs, indicating DNA–lipid interactions, the effect being governed by Mg^{2+}. CD and FTIR spectroscopy revealed that the native nucleic acid form is retained upon ternary complex formation. A direct binding and DNA helix stabilizations were deduced by the substantial reductions in peak intensities, suggesting an alteration of base stacking and pairing following the polynucleotide–lipid recognitions. This depicts direct interactions and DNA compaction due to charge neutralizations.

Fluorescence spectroscopy and SERS measurements depicted and electrostatic and hydrophobic mechanisms of DNA compaction in lipid environment. The condensing effects of metal cations were shown morphologically by fluorescence microscopy and TEM images.

Since developing novel macromolecular therapeutic system depends on colloidal forces, as well as on dynamic biophysicochemical interactions, the importance of biophysical properties of DNA–lipid complexes, such as size, shape, charge, and morphologies

is highlighted. The issue that such nucleic acid–lipid recognitions may induce phase separations, free energy releases, kinetic rearrangements at the nanomaterial surfaces is stressed by noticing that probing these various interfaces allow the development of predictive links between structure and activity, that are determined by these interfacial features.

Our findings demonstrate the effect of surface and interfacial forces for DNA–lipid recognitions, which deserves to be exploited further as nonviral gene delivery vehicles, as well as supramolecular design for fabrication of immobilized DNA arrays with potential use in bioelectronics. Our studies regarding gene transfection profiles of DNA–lipid systems are in progress and will be reported separately.

Acknowledgments This work was supported by The Technological and Research Council of Turkey (TÜBITAK) in the frame of the EU-COST Project 1118496. The staffs of The Central Laboratory of Middle East Technical University and Bilkent University-UNAM are greatly acknowledged for access to instruments. We also thank Pelin Tören for technical assistance during some of the experiments, and the Dept. of Analytical Chemistry of Gazi University, Faculty of Pharmacy for the use of their fluorescence and Raman spectrometers. The gratitudes of E. S. go particularly to Prof. Holm Holmsen (University of Bergen, Bergen-Norway) for introducing him to the field of Langmuir–Blodgett films and lipid monolayers during their joint work on antipsychotic drug–membrane interactions.

References

Adler AF, Leong KW (2010) Emerging links between surface nanotechnology and endocytosis: impact on nonviral gene delivery. Nano Today 5:553–569

Akita H, Hatakeyama H, Khalil IA, Yamada Y, Harashima H (2011) Delivery of nucleic acids and gene delivery. In: Ducheyne P, Healy KE, Hutmacher DW, Grainger DW, Kirkpatrick CJ (eds) Comprehensive biomaterials. Elsevier, New York, pp 411–444

Albani JR (2007) Principles and applications of fluorescence spectroscopy, Interaction between ethydium bromide and DNA. Blackwell Publishing, Oxford, pp 168–183

Altaras NE, Aunins JG, Evans RK, Kamen A, Konz JO, Wolf JJ (2005) Production and formulation of adenovirus vectors. In: Schaffer DV, Zhou W (eds) Gene therapy and gene delivery vectors. Springer, Berlin, p 247

Álvarez RMS, Della Védova CO, Mack H-G, Farías RN, Hildebrandt P (2002) Raman spectroscopic study of the conformational changes of thyroxine induced by interactions with phospholipid. Eur Biophys J 31:448–453

Andar AU, Hood RR, Vreeland WN, DeVoe DL, Swaan PW (2014) Microfluidic preparation of liposomes to determine particle size influence on cellular uptake mechanisms. Pharm Res 31:401–413

Antipina MN, Schulze I, Dobner B, Langer A, Brezesinski G (2007) Physicochemical investigation of a lipid with a new core structure for gene transfection: 2-Amino-3-hexadecyloxy-2-(hexadecyloxymethyl)propan-1-ol. Langmuir 23:3919–3926

Anwer K, Rhee BG, Mendiratta SK (2008) Recent progress in polymeric gene delivery systems. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 20(4):249–298

Asiala SM, Schultz ZD (2014) Label-free in situ detection of individual macromolecular assemblies by surface enhanced Raman scattering. Chem Commun (Camb) 49(39):4340–4342

Aumiller WM Jr, Davis BW, Keating CD (2014) Phase separation as a possible means of nuclear compartmentalization. Int Rev Cell Mol Biol 307:109–149

Barthélémy P, Lee SJ, Grinstaff M (2005) Supramolecular assemblies with DNA. Pure Appl Chem 77(12):2133–2148

Belleri D, Tonelli M, Fomi F, Tosi G, Vandelli MA, Ruozi B (2013) AFM and TEM characterization of siRNAs lipoplexes: a combinatory tools to predict the efficacy of complexation. Colloids Surf A 436:459–466

Bhaumik A, Ramakanth M, Rao LK, Raychaudhuri AK, Rondelez F, Chatterji D (2004) Formation of a DNA layer on Langmuir-Blodgett films and its enzymatic digestion. Langmuir 20:5891–5896

Bibi S, Kaur R, Henriksen-Lacey M, McNeil SE, Wilkhu J, Lattmann E, Christensen D, Mohammed AR, Perrie Y (2011) Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM. Int J Pharm 417(1–2):138–150

Black RA, Blosser MC, Stottrup BL, Tavakley R, Deamer DW, Keller SL (2013) Nucleobases bind to and stabilize aggregates of a prebiotic amphiphile, providing a viable mechanism for the emergence of protocells. Proc Natl Acad Sci USA 110(33):13272–13276

Bothun GD (2008) Hydrophobic silver nanoparticles trapped in lipid bilayers: size distribution, bilayer phase behavior, and optical properties. J Nanobiotechnol. doi:10.1186/1477-3155-6-13

Braun CS, Jas GS, Choosakoonkriang S, Koe GS, Smith JG (2003) The structure of DNA within cationic lipid/DNA complexes. Biophys J 84:1114–1123

Brezesinski G, Möhwald H (2003) Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. Adv Colloid Interface Sci 100–102:563–584

Brockman H (1999) Lipid monolayers: why use half a membrane to characterise protein-membrane interactions? Curr Opin Struct Biol 9:438–443

Cadenhead DA, Müller-Landau F, Kellner BMJ (1980) Phase transitions in insoluble one and two-component films at the air/water interface. In: Sinha SK (ed) Ordering in two dimensions. North Holland, Amsterdam, pp 73–81

Campen RK, Ngo TTM, Sovago M, Ruysschaert J-M, Bonn M (2010) Molecular restructuring of water and lipids upon the interaction of DNA with lipid monolayers. J Am Chem Soc 132:8037–8047

Cañamares MV, García-Ramos JV, Gómez-Varga JD, Domingo C, Sanchez-Cortes S (2005) Comparative study of the morphology, aggregation, adherence to glass, and surface-enhanced Raman scattering activity of silver nanoparticles

prepared by chemical reduction of Ag^+ using citrate and hydroxylamine. Langmuir 21:8546–8553
Camerciolo G, Amenitsch H (2012) Cationic liposome/DNA complexes: from structure to interactions with cellular membranes. Eur Biophys J 41(10):815–829
Castano S, Delord B, Février A, Lehn J-M, Lehn P, Desbat B (2009) Asymmetric lipid bilayer formation stabilized by DNA at the air/water interface. Biochimie 91:765–773
Chang Y-M, Chen CK-M, Hou M-H (2012) Conformational changes in DNA upon ligand binding monitored by circular dichroism. Int J Mol Sci 13:3394–3413
Chifu E, Zsakó J, Tomoaia-Cotişel M (1983) Xanthophyl films: I. Single-component monolayers at the air/water interface. J Colloid Interface Sci 95(2):346–354
Chipot C, Klein ML, Tarek M (2005) Modeling lipid membranes. In: Yip S (ed) Handbook of materials modeling. Springer, New York, pp 929–958
Cristofolini L, Berzina T, Erokhina S, Konovalov O, Erokhin V (2007) Structural study of the DNA dipalmitoylphosphatidylcholine complex at the air-water interface. Biomacromolecules 8:2270–2275
Czolkos I, Hannestad JK, Jesorka A, Kumar R, Brown T, Albinsson B, Orwar O (2009) Platform for controlled supramolecular nanoassembly. Nano Lett 9(6):2482–2486
Dacks JB, Field MC (2004) Eukaryotic cell evolution from a comparative genomic perspective: the endomembrane system. In: Hirt RP, Horner DS (eds) Organelles, genomes and eukaryote phylogeny—an evolutionary synthesis in the age of genomics. CRC Press, Boca Raton, pp 309–334
Dai S, Zhang X, Du Z, Dang H (2005) Fabrication of nanopatterned DNA films by Langmuir-Blodgett technique. Mater Lett 59(4):423–429
Dan N, Danino D (2014) Structure and kinetics of lipid-nucleic acid complexes. Adv Colloid Interphase Sci 205:230–239
DeRose V (2009) Chapter 5: characterization of nucleic acid-metal ion binding by spectroscopic techniques. In: Hud NV (ed) Nucleic acid-metal ion interactions. RSC Publishing, Cambridge, p 174
Dhanoya A, Chain BM, Keshwarz-Moore E (2011) The impact of DNA topology on polyplex uptake and transfection efficiency in mammalian cells. J Biotechnol 155:377–386
Díaz ME, Cerro RL (2008) Physicochemistry and hydrodynamics of Langmuir-Blodgett depositions: influence of molecular level forces on the efficiency of deposition of perfectly ordered Langmuir nanofilms. VDM Verlag Dr. Müller, Saarbrücken, pp 1–14
Do TT, Tang VJ, Aguilera JA, Perry CC, Milligan JR (2011) Characterization of a lipophilic plasmid DNA condensate formed with a cationic peptide fatty acid conjugate. Biomacromolecules 12:1731–1737
Dotan N, Cohen N, Kalid O, Freeman A (2002) Supramolecular assemblies made of biological macromolecules. In: Rossof M (ed) Nano-surface chemistry. Marcel Dekker Inc., New York, pp 461–471
Duguid J, Bloomfield VA, Benevides J, Thomas GJ Jr (1993) Raman spectroscopy of DNA-metal complexes. I. Interactions and conformational effects of the divalent cations: Mg, Ca, Sr, Ba, Mn Co, Ni, Cu, Pd and Cd. Biophys J 65:1916–1928
El Bayoumi TA, Torchilin VP (2010) Current trends in liposome research. In: Weissig V (ed) Liposomes. Methods in molecular biology. Humana Press, New York, pp 1–27
Engelborghs Y, Visser AJWG (eds) (2014) Fluorescence spectroscopy and microscopy—methods and protocols. Methods in molecular biology, vol 1076. Humana Press, New York
Erokhina S, Berzina T, Cristofolini L, Konovalov O, Erokhin V, Fontana MP (2007) Interaction of DNA oligomers with cationic lipidic monolayers: complexation and splitting. Langmuir 23:4414–4420
Evans DF, Wennerström H (1999) The colloidal domain: where physics, chemistry, biology and technology meet, Wiley, New York
Fortier C, Durocher Y, De Crescenzo G (2014) Surface modification of nonviral nanocarriers for enhanced gene delivery. Nanomedicine (Lond) 9(1):135–151
Girard-Egot AP, Blum LC (2007) Langmuir-Blodgett technique for synthesis of biomimetic lipid membranes. In: Martin DK (ed) Nanobiotechnology of biomimetic membranes. Springer, New York, pp 23–74
Gonçalves E, Debs RJ, Heath TD (2004) The effect of liposome size on the final lipid/DNA ratio of cationic lipoplexes. Biophys J 86:1554–1563
Gromelski S, Brezesinski G (2006) DNA condensation and interaction with zwitterionic phospholipids mediated by divalent cations. Langmuir 22:6293–6301
Gu Z (ed) (2015) Bioinspired and biomimetic systems for drug, protein and gene delivery. Wiley, New York
Guntupalli R, Sorokulova I, Long R, Olsen E, Neely W, Vodyanoy V (2011) Phage Langmuir monolayers and Langmuir-Blodgett films. Colloids Surf B 82:182–189
Haberl S, Kanduser M, Flisar K, Hodžić D, Bregar VB, Miklavčič D, Escoffre JM, Rols MP, Pavlin M (2013) Effect of different parameters used for in vitro gene electrotransfer on gene expression efficiency, cell viability and visualization of plasmid DNA at the membrane level. J Gene Med 15(5):169–181
Haberle FA, Ferguson GW (1980) Phase separation in lipid membranes. In: Simons K (ed) Additional perspectives on the biology of lipids. Cold Spring Harb Perspect Biol 3:1–3
Hamilton RL Jr, Goerke J, Guo LSS, Williams MC, Havel RJ (1980) Unilamellar liposomes made with the French pressure cell: a simple preparative and semiquantitative technique. J Lipid Res 21:981–992
Hianik T, Vitovic P, Humenik D, Andreev SY, Oretskaya TS, Hall EAH, Vadgama P (2003) Hybridization of DNA at the surface of phospholipid monolayers: effect of orientation of oligonucleotide chains. Bioelectrochemistry 59:35–40
Hoch PG, Hartmann RK (2014) Supramolecular membrane-associated assemblies of RNA metabolic proteins in *Escherichia coli*. Biochem J 458(1):1–3
Jen JJ, Grote J (eds) (2012) Materials science of DNA. CRC Press, Boca Raton
Kabanov AV (2006) Polymer genomics: an insight into pharmacology and toxicology of nanomedicines. Adv Drug Deliv Rev 58:1597–1621
Kaltya N, Merkle D, Schwille P (2007) Pushing the complexity of model bilayers: novel prospects for membrane biophysics. Springer Ser Fluoresc 4:339–359

Kaminura K, Suda T, Zhang G, Liu D (2012) Advances in gene delivery systems. Pharmaceut Med 25(5):293–306
Kaneda Y (2001) Gene therapy: a battle against biological barriers. Curr Mol Med 1(4):493–499
Klose T, Rossmann MG (2014) Structure of large dsDNA viruses. Biol Chem 1395(7–8):711–719
Kundu S (2010) Lipid-polyelectrolyte complexes at the air-water interface for different lipid packing. Colloids Surf A 368:31–36
Kunitake T (2000) Self-assemblies of biomembrane mimics. In: Bazzlin A, Norde W (eds) Physical chemistry of biological interfaces. Marcel Dekker Inc., New York, pp 283–305
Kurihara K, Tamura M, Shohda K, Toyota T, Suzuki K, Sugawara T (2011) Self-reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA. Nat Chem 4:775–781
Laliberte JP, Moss B (2014) A novel mode of poxvirus superinfection exclusion that prevents fusion of the lipid bilayers of viral and cellular membranes. J Virol 7:816–824
Lam AMI, Cullis PR (2000) Calcium enhances the transfection potency of plasmid DNA-cationic liposome complexes. Biochim Biophys Acta 1463:279–290
Langecker M, Arnaut V, List J, Simmel F (2014) DNA nanostructures interacting with lipid bilayer membranes. Acc Chem Res 47:1807–1815
Lechardeur D, Lukacs GL (2002) Intracellular barriers to non-viral gene transfer. Curr Gene Ther 2(2):183–194
Lee KYC (2008) Collapse mechanisms of Langmuir monolayers. Annu Rev Phys Chem 59:771–791
Lengyel A, Uhríková D, Klacsová M, Balgavý P (2011) DNA condensation and its thermal stability influenced by phospholipid bilayer and divalent cations. Colloids Surf B 86:212–217
Leopold N, Lendl B (2003) A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride. J Phys Chem B 107(24):5723–5727
Lewinski N, Colvin V, Drezek R (2008) Cytotoxicity of nanoparticles. Small 4(1):26–49
Lewis RNAH, McElhaney RN (2007) Fourier transform infrared spectroscopy in the study of lipid phase transitions in model and biological membranes. In: Dopico AM (ed) Methods in molecular biology, vol 400., Methods in membrane lipidsHumana Press, Totowa, pp 207–226
Liang H, Zhang XB, Lv Y, Gong L, Wang R, Zhu X, Yang R, Tan W (2014) Functional DNA-containing nanomaterials: cellular applications in biosensing, imaging, and targeted therapy. Acc Chem Res 47(6):1891–1901
Lin T-L, Wu J-C, Hu Y, Jeng U-S, Lee H-Y (2012) Effect of different divalent ions on the DNA adsorption by lipid monolayers. Chin J Phys 50(2):332–343
Lucia B (ed) (2013) Metal ions in life sciences. Metallomics and the cell. Springer, Dordrecht
Ma B, Zhang S, Jiang H, Zhao B, Lv H (2007) Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. J Control Release 123:184–194
Manavbaşı Y, Süleymanoğlu E (2007) Nucleic acid-phospholipid recognition: fourier transform infrared spectrometric characterization of ternary phospholipid-inorganic cation-DNA complex and its relevance to chemicopharmaceutical design of nanometric liposome based gene delivery formulations. Arch Pharm Res 30(8):1027–1040
Marty R, N'soukpoe-Kossi CN, Charbonneau D, Weinert CW, Kreplak L, Tajmir-Riahi H-A (2009) Structural analysis of DNA complexation with cationic lipids. Nucleic Acids Res 37(3):849–857
McKnight RE (2013) Chapter 6: insights into the relative DNA binding affinity and preferred binding mode of homologous compounds using isothermal titration calorimetry (ITC). Intech, New York, pp 129–152
Mello MLS, Vidal BC (2012) Changes in the infrared microspectroscopic characteristics of DNA caused by cationic elements, different base richness and single-stranded form. PLoS One 7(8):e43169. doi:10.1371/journal.pone.0043169
Mereghetti P, Corsetto PA, Cremona A, Rizzo AM, Doglia SM, Ami D (2014) A Fourier transform infrared spectroscopy study of cell membrane domain modifications induced by docosahexaenoic acid. Biochim Biophys Acta 1840:3115–3122
Michel R, Gradzielski M (2012) Experimental aspects of colloidal interactions in mixed systems of liposome and inorganic nanoparticle and their applications. Int J Mol Sci 13:11610–11642
Miyamoto VK, Stoeckenius W (1971) Preparation and characteristics of lipid vesicles. J Membr Biol 4:252–269
Moghaddam B, McNeil SE, Zheng Q, Mohammed AR, Perrie Y (2011) Exploring the correlation between lipid packing in lipoplexes and their transfection efficacy. Pharmaceutics 3(4):848–864
Möhwald H (1995) Phospholipid monolayers. In: Lipowski R, Sackmann E (eds) Handbook of biological physics. Elsevier, Dordrecht, pp 161–211
Motschmann H, Möhwald H (2001) Langmuir-Blodgett films. In: Holmberg K (ed) Handbook of applied surface and colloid chemistry. Wiley, New York, pp 629–648
Neugebauer U (2014) Characterization of bacteria, antibiotics of the fluoroquinolone type and their biological targets DNA and gyrase utilizing the unique potential of vibrational spectroscopy. Dissertation, Friedrich Schiller University, Jena
Nguyen J, Szoka FC (2012) Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle? Acc Chem Res 45(7):1153–1162
Norris V, Fishov I (2001) Hypothesis: membrane domains and hyperstructures control bacterial division. Biochimie 83(1):91–97
O'Brien R, Ladbury JE, Chowdhry BZ (2001) Isothermal titration calorimetry of biomolecules. In: Harding SE, Chowdhry BZ (eds) Protein-ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry. Practical approach series. Oxford University Press, Oxford, pp 263–286
Okahata Y, Kawasaki T (2005) Preparation and electron conductivity of DNA-aligned cast and LB films from DNA-lipid complexes. Top Curr Chem 260:57–75
Oupický D (2005) Subcellular fate of proteins and nucleic acids. In: Mahato R (ed) Biomaterials for delivery and targeting of proteins and nucleic acids. CRC Press, Boca Raton, pp 323–350
Panayotov I, Fakirov S (1988) Chemistry and physics of polymers, Chapter XV: Biopolymers. Nauka i Izkustvo, Sofia, pp 562–586 (In Bulgarian)

Park SH, Oh SG, Mun JY, Han SS (2005) Effects of silver nanoparticles on the fluidity of bilayer in phospholipid liposome. Colloids Surf B 44(2–3):117–122

Park SH, Oh SG, Suh KD, Han SH, Chung DJ, Mun JY, Han SS, Kim JW (2009) Control over micro-fluidity of liposomal membranes by hybridizing metal nanoparticles. Colloids Surf B 70(1):108–113

Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ (2005) Biophysical characterization of anionic lipoplexes. Biochim Biophys Acta 1711:1–11

Pott T, Roux D (2002) DNA intercalation in neutral multilamellar membranes. FEBS Lett 511:150–154

Pozzi D, Caracciolo G, Caminiti R, De Sanctis SC, Amenitsch H, Marchini C, Montani M, Amici A (2009) Toward the rational design of lipid gene vector: shape coupling between lipoplex and anionic cellular lipids controls the phase evolution of lipoplexes and the efficiency of DNA release. ACS Appl Mat Interfaces 1(10):2237–2249

Privalov PL (2009) Microcalorimetry of proteins and their complexes. In: Shriver JW (ed) Methods in Molecular Biology™. Protein structure, stability and interactions. Humana Press, New York, pp 1–39

Ranjbar B, Gill P (2009) Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses—a review. Chem Biol Drug Des 74:101–120

Read ML, Logan A, Seymour LW (2005) Barriers to gene delivery using synthetic vectors. Adv Genet 53:19–46

Resina S, Prevot P, Thierry AR (2009) Physico-chemical characteristics of lipoplexes influence cell uptake mechanisms and transfection efficacy. PLoS One 4(6):e6058. doi:10.1371/journal.pone.0006058

Reusch VM Jr, Burger MM (1973) The bacterial mesosome. Biochim Biophys Acta 300(1):79–104

Rinia HA, Wurpel GWH, Miller M (2007) Measuring molecular order and orientation using coherent anti-Stockes Raman scattering microscopy. In: Dopico AM (ed) Methods in molecular biology, vol 400, Methods in membrane lipidsHumana Press, Totowa, pp 45–61

Sathuluri RR, Yoshikawa H, Shimizu E, Saito M, Tamiya E (2011) Gold nanoparticle-based surface-enhanced Raman scattering for noninvasive molecular probing of embryonic stem cell differentiation. PLoS One 6(8):e22802. doi:10.1371/journal.pone.0022802

Sato S, Kawamoto J, Sato SB, Watanabe B, Hiratake J, Esaki N, Kurihara T (2012) Occurrence of a bacterial membrane microdomain at the cell division site enriched in phospholipids with polyunsaturated hydrocarbon chains. J Biol Chem 287(29):24113–24121

Sau TK, Urban AS, Dondapati SK, Fedoruk M, Horton MR, Rogach AL, Stefani FD, Rädler JO, Feldman J (2009) Controlling loading and optical properties of gold nanoparticles on liposome membranes. Colloids Surf A 342:92–96

Scherman D (ed) (2014) Advanced textbook on gene transfer, gene therapy and genetic pharmacology: principles, delivery and pharmacology and biomedical applications of nucleotide-based therapies. Imperial College Press, London

Schmutz M, Durand D, Debin A, Palvedeau Y, Etienne A, Thierry AR (1999) DNA packing in stable lipid complexes designed for gene transfer imitates DNA compaction in bacteriophage. Proc Natl Acad Sci USA 96(22):12293–12298

Schultz ZD, Levin IW (2011) Vibrational spectroscopy of biomembranes. Annu Rev Anal Chem 4:343–366

Shi D (ed) (2015) Bio-inspired nanomaterials and applications: nanodetection, drug/gene delivery, medical diagnosis and therapy. World Scientific Publishing Co., Singapore

Shimomura M, Mitamura R, Matsumoto J, Ijiro K (2003) DNA-mimetics: towards novel molecular devices having molecular information. Synth Met 133–134:473–475

Silva MT, Sousa JC, Polónia JJ, Macedo MA, Parente AM (1976) Bacterial mesosomes: Real structures or artifacts? Biochim Biophys Acta 443(1):92–105

Stine KJ, Moore BG (2002) Langmuir monolayers: fundamentals and relevance to nanotechnology. In: Rossoff M (ed) Nano-surface chemistry. Marcel Dekker Inc., New York, pp 59–140

Stottrup LB, Nguyen AH, Tilzel E (2010) Taking another look with fluorescence microscopy: image processing techniques in Langmuir monolayers for the twenty-first century. Biochim Biophys Acta 1798:1289–1300

Süleymanoğlu E (2004) A nanoscale polynucleotide-neutral liposome self-assemblies formulated for therapeutic gene delivery. Electron J Biomed 2:13–35

Süleymanoğlu E (2005) Preparation and phase behaviour of surface-active pharmaceuticals: self-assembly of DNA and surfactants with membranes. Differential adiabatic scanning microcalorimetric study. Farmaco 60(8):701–710

Süleymanoğlu E (2006a) Phosphopolipid-nucleic acid recognition: energetics of DNA-Mg^{2+}-phosphatidylcholine ternary complex formation and its further compaction as a gene delivery formulation. PDA J Pharmaceut Sci Technol 60(4):218–231

Süleymanoğlu E (2006b) Phosphopolipid-nucleic acid recognition: developing an immobilized liposome chromatography for DNA separation and analysis. PDA J Pharmaceut Sci Technol 60(4):232–239

Süleymanoğlu E (2009) The use of IR spectroscopy after rehydration to follow ternary lipoplex formation and design as a metal-based DNA nanopharmaceuticals. Prilozi 1:61–80

Thaker VV, Hermann LO, Sigle DO, Zhang T, Liedl T, Baumberg JJ, Keyser UF (2014) DNA origami based assembly of gold nanoparticle dimers for surface-enhanced Raman scattering. Nat Commun 1:1–7

Trajanowicz M, Mulchandani A (2004) Analytical applications of planar bilayer lipid membranes. Anal Bioanal Chem 379:347–350

Vaknin D, Kjaer K, Als-Nielsen J, Lösche M (1991) Structural properties of phosphatidylcholine in a monolayer at the air/water interface: neutron reflection study and reexamination of X-ray reflection measurements. Biophys J 59(6):1325–1332

Vollhardt D (2002) Supramolecular organisation in monolayers at the air/water interface. Mater Sci Eng C 22:121–127

Walde P, Bütschliger E (1997) Circular dichroic properties of phosphatidylcholine liposomes. Langmuir 13:1668–1671

Wang T, Upponi JR, Torchilin VP (2012) Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: dilemmas and strategies. Int J Pharm 427(1):3–20

Wiethoff CM, Middaugh CR (2003) Barriers to nonviral gene delivery. J Pharm Sci 92(2):203–217

Wu G, Mikhailovsky A, Khant HA, Zasadzinski JA (2006a) Synthesis, characterization, and optical response of gold nanoshells used to trigger release from liposomes. Methods Enzymol 464:279–307

Wu J-C, Lin T-L, Jeng U-S, Torikai N (2006b) Neutron reflectivity studies on the DNA adsorption on lipid monolayers at the air-liquid interface. Phys B 385–386:838–840

Yan J, Korolev N, Rom KD, Tam JP, Nordenskiöld L (2012) Biophysical properties and supramolecular structure of self-assembled liposome/α-peptide/DNA nanoparticles: correlation with gene delivery. Biomacromolecules 13:124–131

Ziaikò J, Tomoaia-Cotisel M, Chifu E (1984) Insoluble mixed monolayers. I. Phase equilibria at the collapse of binary monolayers at gas/liquid interfaces. J Colloid Interface Sci 102:186-205

Zuidam NJ, Barenholz Y, Minsky A (1999) Chiral DNA packaging in DNA-cationic liposome assemblies. FEBS Lett 457:419-422