



**MANYETOFEKSİYON YÖNTEMİYLE
TRANSFER EDİLEN AZURİNİN MCF-10A
HÜCRELERİNDE HETEROLOG EKSPRESYONU**

Saadet KALAKENGER

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER
Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyolojik ve Genetik Ana Bilim Dalı
Gen Mühendisliği Bilim Dalı
2021
(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI
GEN MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

**MANYETOFEKSİYON YÖNTEMİYLE TRANSFER EDİLEN AZURİNİN MCF-10A
HÜCRELERİNDE HETEROLOG EKSPRESYONU**

(Heterologous Expression of Azurin Transferred by Magnetofection Method in MCF-10A Cells)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Saadet KALAKENGER

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER

Erzurum

Ağustos, 2021

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Saadet KALAKENGER tarafından hazırlanan “Manyetofeksiyon Yöntemiyle Transfer Edilen Azurinin MCF-10A Hücrelerinde Heterolog Ekspresyonu” başlıklı çalışması 12 / 08 / 2021 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Gen Mühendisliği Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ahmet MAVİ
Atatürk Üniversitesi

Aslı Islak İmzalıdır

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER
Atatürk Üniversitesi

Aslı Islak İmzalıdır

Jüri Üyesi: Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ
Erzurum Teknik Üniversitesi

Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim Kurulunun
.../.../... tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma TÜBİTAK projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 118Z150

Aslı Islak İmzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Graduate School of Natural and
Applied Sciences

TEZ BENZERLİK ORANI BEYAN FORMU¹

Öğrencinin Adı ve Soyadı	Saadet KALAKENGER
Öğrencinin Numarası	18041908004
Ana Bilim Dalı	Moleküler Biyoloji & Genetik
Bilim Dalı	Gen Mühendisliği
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Yüksek Lisans

Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	3	30
Kuramsal Temeller	0	30
Materyal ve Yöntem	11	35
Bulgular	1	20
Tartışma	3	20
Tezin Geneli	5	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Saadet KALAKENGER	Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER
17.8.2021	17.8.2021
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

¹ Bu form bilgisayar ortamında doldurulmalı, çıktısı imzalanıp Tez Savunması Jüri Öneri Formu'yla birlikte Ana Bilim Dalı Başkanlığı aracılığıyla ÜBYS üzerinden Enstitüye iletilmelidir.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DAYTAM) yapılmıştır. Tez çalışmamın her aşamasında tecrübesi ve değerli bilgileriyle destek veren danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER'e sonsuz teşekkür ederim.

Nanomateriyal üretim kısmında bilgileriyle katkı sağlayan Sayın Prof. Dr. Ahmet MAVİ'ye ve Sayın Kübra Solak'a teşekkür ederim. Tez çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sayın Melek ACAR'a ve Sayın Şeyda YILDIZ'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları ve diğer tüm konularda her zaman yanımda olan çalışma arkadaşım Sayın Betül ARI'ya çok teşekkür ederim.

Her konuda destek ve yardımlarından dolayı DAYTAM bünyesinde çalışan tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, 118Z150 no'lu TÜBİTAK-1001 projesi kapsamında yapılmıştır. Desteklerinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederim.

Beni her zaman destekleyen, maddi ve manevi yardımları için canım aileme minnettarım.

Saadet KALAKENGER

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MANYETOFEKSİYON YÖNTEMİYLE TRANSFER EDİLEN AZURİNİN MCF-10A
HÜCRELERİNDE HETEROLOG EKSPRESYONU

Saadet KALAKENGER

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER

Amaç: Bu çalışmada, sağlıklı meme epitel hücrelerine (MCF-10A) Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller aracılığıyla rekombinant pCMV-Azu-GFP'nin manyetofeksiyonu gerçekleştirilerek hücrelerde füzyon Azu-GFP proteininin ekspresyonu amaçlandı.

Yöntem: Kodon optimize azurin geni pCMV-GFP'ye yerleştirilerek rekombinant pCMV-Azu-GFP elde edildi. Daha sonra gen aktarım aracı olarak kullanılan MNP'ler sentezlendi ve biyoyumlu hale getirmek için silika kaplama yapıldı (MSNP). Sentezlenen MSNP'lerin yüzeyi, negatif yüklü DNA'yı bağlayabilmesi için pozitif yük sağlayan PEI (MSNP@PEI) veya APTES (MSNP-NH₂) ile modifiye edildi. Sentezlenen MSNP'leri karakterize etmek için TEM, FTIR ve DLS analizi kullanıldı. pCMV-Azu-GFP ve sentezlenen pozitif yüklü MSNP'ler bir araya getirilerek (manyetofektin) optimizasyon çalışmaları yapıldı. Gen aktarım aracı olarak önerilen yapının ve ayrı ayrı her bir bileşenin proliferatif, canlılık ve sitotoksik etkisini değerlendirmek için MCF-10A hücre hattı ile MTS testi uygulandı. Sentezlenen MSNP'lerin hücre alımı, bir floresan işaret olan Oregon-green 488 ile etiketli MSNP'ler üretilerek belirlendi. Optimum şartlarda hazırlanan manyetofektinler, miknatis aracılığıyla hücrelere transfer edildi. Azu-GFP füzyon proteininin MCF-10A hücrelerinde ekspresyonunu belirlemek için hücreler konfokal mikroskopta görüntülendi. Diğer yandan, hazırlanan hücre lizatlarında protein tespiti için western blot analizi yapıldı.

Bulgular: pCMV-Azu-GFP, nükleotid blastlama sonucuna göre %100 doğrulukla elde edildi. Gen aktarım aracı olarak sentezlenen manyetitlerin ortalama 10 nm boyutunda olduğu, yüzey modifikasyonu yapılan MSNP'lerin ise ortalama 100 nm boyutunda olduğu, TEM ile belirlendi. DLS analiziyle yüzey modifikasyonu sonucu MSNP'lerin pozitif yüke sahip olduğu belirlendi. Manyetofektin optimizasyonu sonuçlarına göre 30 dakika inkübasyon süresinde en çok DNA bağlandığı, manyetofektin ortamı olarak PBS kullanılabileceği belirlendi. Aynı zamanda artan MSNP konsantrasyonu ile birlikte bağlanan DNA miktarının arttığı, ekstra kullanılan PEI miktarı da arttıkça bağlanan DNA miktarının arttığı belirlendi. MSNP'lerin MCF-10A hücreleri için sitotoksik olmadığı görülürken, yüzeyi modifiye edilen MSNP@PEI ve MSNP-NH₂ uygulanan gruplarda doz bağımlı olarak hücre canlılığında istatistiki fark gözlemlendi. Hücre alım sonuçları, 30 dakika miknatis tutulan gruplarda MSNP'lerin hücre çekirdeği etrafında daha iyi lokalize olduğunu ortaya koydu. Manyetofeksiyon sonucu hücrelerin konfokal mikroskop görüntülerine bakıldığında, hücrelerde füzyon proteininin ekspresyonu gözlemlendi. Western blot analizi sonucunda ise füzyon proteine ait azurin bandı görüldü.

Sonuç: Bu tez çalışmasında MCF-10A hücrelerine manyetofeksiyon yöntemiyle başarılı bir şekilde gen aktarımı yapılarak hücrelerde Azu-GFP füzyon proteininin ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca tümör terapisinde kullanılabilen azurinin sağlıklı hücrelerde toksik etki göstermeden ifade edildiği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Gen klonlama, azurin, manyetofeksiyon, MCF-10A, füzyon protein

Ağustos 2021, 98 sayfa

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF AZURIN TRANSFERRED BY MAGNETOFECTION METHOD IN MCF-10A CELLS

Saadet KALAKENGER

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Yağmur ÜNVER

Purpose: In this study, it was aimed to express the fusion Azu-GFP protein in healthy breast epithelial cells (MCF-10A) by performing magnetofection of recombinant pCMV-Azu-GFP via Fe₃O₄ magnetic nanoparticles.

Method: Recombinant pCMV-Azu-GFP was obtained by inserting the codon optimized azurin gene into the pCMV-GFP. Then, MNPs used as gene transfer vehicles were synthesized and silica coated (MSNP) to make them biocompatible. The surface of the synthesized MSNPs was modified with PEI (MSNP@PEI) or APTES (MSNP-NH₂), which provides a positive charge to bind negatively charged DNA. TEM, FTIR and DLS analysis were used to characterize the synthesized MSNPs. Optimization studies were performed by combining pCMV-Azu-GFP and synthesized positively charged MSNPs (magnetofectin). In order to evaluate the proliferative, viability and cytotoxic effect of the proposed construct as a gene transfer vehicle and each component separately, MTS test was performed with the MCF-10A cell line. Cellular uptake of synthesized MSNPs was determined by producing MSNPs labeled with a fluorescent marker, Oregon-green 488. The magnetofectins prepared under optimum conditions were transferred to the cells by means of a magnet. To determine the expression of the Azu-GFP fusion protein in MCF-10A cells, the cells were imaged under a confocal microscope. On the other hand, western blot analysis was performed for protein detection in prepared cell lysates.

Findings: pCMV-Azu-GFP was obtained with 100% accuracy based on the nucleotide blasting result. It was determined by TEM that the magnetite synthesized as a gene transfer medium had an average size of 10 nm, and the surface modified MSNPs were an average of 100 nm in size. As a result of surface modification by DLS analysis, MSNPs were determined to have a positive charge. According to the optimization results of the magnetofect, it was determined that the most DNA binds during the incubation period of 30 minutes, and PBS can be used as the medium of the magnetofectin. At the same time, it was determined that the amount of DNA bound increased with increasing MSNP concentration, and the amount of DNA bound increased as the amount of extra PEI used increased. While MSNPs were not found to be cytotoxic to MCF-10A cells, a dose-dependent statistical difference in cell viability was observed in the surface-modified MSNP@PEI and MSNP-NH₂ applied groups. Cellular uptake results revealed that MSNPs were better localized around the cell nucleus in groups held magnets for 30 minutes. When the confocal microscope images of the cells as a result of magnetofection were examined, the expression of the fusion protein was observed in the cells. Western blot analysis revealed azurin band of the fusion protein.

Results: In this thesis study, the expression of Azu-GFP fusion protein was carried out in MCF-10A cells by successful gene transfer to MCF-10A cells by magnetofection method. In addition, it has been shown that azurin, which can be used in tumor therapy, is expressed in healthy cells without toxic effects.

Keywords: Gene cloning, azurin, magnetofection, MCF-10A, fusion protein

August 2021, 98 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
GİRİŞ.....	1
Terapötik Proteinler	1
Bakteriyal Azurin Proteini	2
Rekombinant (heterolog) Protein Üretimi	4
Memeli Ekspresyon Sistemleri	6
Transfeksiyon Yöntemleri.....	8
Kimyasal yöntemler	8
Biyolojik yöntemler	9
Fiziksel yöntemler.....	9
Manyetofeksiyon.....	10
KURAMSAL TEMELLER.....	13
MATERYAL VE METOT.....	18
Kullanılan Cihazlar	18
Kullanılan Kimyasallar	18
Kullanılan Besiyeri, Çözelti ve Tamponlar.....	20
Kullanılan Primerler ve Vektör DNA	21
Rekombinant pCMV-Azu-GFP'nin Elde Edilmesi	22
Azurin genine ait sekansın kodon optimizasyonu ve amplifikasyonu	22
PCR Ürünlerinin AgaroZ Jel Elektroforezinde Yürütülmesi	23
PCR ürünlerinin saflaştırılması	24
PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi	24
Vektör DNA (pCMV-GFP)'nın restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi.....	25
Vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu.....	25
Ligasyon.....	25
Ligasyon ürününün kompetent <i>E. coli</i> hücrelerine transferi.....	26

Koloni PCR	26
<i>E. coli</i> hücrelerinden saflaştırılan muhtemel rekombinant plazmitin sekans analizi ile doğrulanması	27
Gen Aktarım Aracı Olarak Kullanılan Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	28
Fe ₃ O ₄ manyetik nanopartikül sentezi	28
Mezogözenekli silika kaplı Fe ₃ O ₄ (Fe ₃ O ₄ @SiO ₂) sentezi	29
MSNP'lerinin yüzey modifikasyonu.....	30
Oregon Green 488 etiketli MSNP üretimi	31
Nanopartiküllerin karakterizasyonu	31
Manyetofektin Hazırlama ve Optimizasyonu	31
Hücre Kültürü.....	32
Hücre canlılığı ve sayımı	34
Proliferasyon ve Sitotoksosite Testleri	35
Manyetik Nanopartiküllerin Hücresel Alınımının Belirlenmesi.....	36
pCMV-Azu-GFP'nin MCF-10A Hücrelerine Manyetofeksiyonu	36
Füzyon protein varlığının gösterilmesi	37
Western blot analizi.....	37
Hücre lizati hazırlama	37
TCA ile protein çöktürme	37
SDS-PAGE jelinde proteinlerin yürütülmesi	38
Blotlama	38
İstatistiksel Analiz.....	39
ARAŞTIRMA BULGULARI	40
Rekombinant pCMV-Azu-GFP'nin Elde Edilmesi	40
Azurin genine ait sekansın kodon optimizasyonu ve amplifikasyonu	40
Azurin geninin ve pCMV-GFP'nin kesilmesi	40
<i>E. coli</i> JM109 hücrelerinin transformasyonu	41
Koloni PCR ile transformantların doğrulanması	42
Rekombinant pCMV-Azu-GFP'nin sekans analizi ile doğrulanması.....	42
Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	45
Manyetofektin Hazırlama ve Optimizasyonu	49
Proliferasyon ve Sitotoksosite Testleri	56
Manyetik Nanopartiküllerin Hücresel Alınımının Belirlenmesi.....	61
Füzyon Protein Varlığının Gösterilmesi	64

TARTIŞMA VE SONUÇ.....	66
Sonuç ve Öneriler.....	76
KAYNAKLAR.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	83



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Piyasada Bulunan FDA Onaylı Terapötik Proteinler	1
Tablo 2. Çalışmada Kullanılan Cihazların Adları ve Markası.....	18
Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	19
Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Çözelti ve İçerikleri	20
Tablo 5. Çalışmada Kullanılmak Üzere Tasarlanan Primerler	21
Tablo 6. PCR Karışım İçeriği	23
Tablo 7. PCR Şartları.....	23
Tablo 8. PCR Ürünü Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği.....	24
Tablo 9. Vektör DNA'nın Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği	25
Tablo 10. Ligasyon Reaksiyonu Karışım İçeriği	26
Tablo 11. Koloni PCR Karışım İçeriği	27
Tablo 12. PCR Şartları.....	27
Tablo 13. Hücre Ekim Miktarları ve Gerekli Solüsyon Miktarları.....	33
Tablo 14. Ayırma ve Yığılma Jeli Hazırlamada Kullanılan Malzemeler ve Miktarları	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Azurinin üç boyutlu yapısı	3
Şekil 2. Azurinin etki mekanizması	3
Şekil 3. pCMV-GFP	22
Şekil 4. Fe ₃ O ₄ çekirdek sentez sistemi	29
Şekil 5. CTAB içeren sulu çözeltiye kloroformda dağıtılmış MNP'lerin eklenmesiyle oluşan mikroemülsiyona ait fotoğraf.	30
Şekil 6. Tripan mavisi ile boyanan hücrelerin ışık mikroskopundaki görüntüsü	35
Şekil 7. Manyetofeksiyon ile gen aktarımı yapılan hücreler	37
Şekil 8. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	40
Şekil 9. Amplifiye edilen azurin genine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	41
Şekil 10. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonileri	41
Şekil 11. Vektör primerleriyle gerçekleştirilen koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	42
Şekil 12. İnsört dizi primerleriyle gerçekleştirilen koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	42
Şekil 13. Vektör DNA'ya ait forward primerle gerçekleştirilen sekans analizi ile elde edilen nükleotid sekansının blast sonucu	43
Şekil 14. Vektör DNA'ya ait reverse primerle gerçekleştirilen sekans analizi ile elde edilen nükleotid sekansının blast sonucu	43
Şekil 15. pCMV-Azu-GFP	44
Şekil 16. pCMV-GFP ve pCMV-Azu-GFP'nin agaroz jel elektroforez görüntüsü	44
Şekil 17. Fe ₃ O ₄ (manyetit) TEM görüntüsü.	45
Şekil 18. Çekirdek/kabuk yapısındaki mezogözenekli MSNP'lerin TEM görüntüsü	46
Şekil 19. MSNP@PEI ve MSNP-NH ₂ TEM görüntüsü	46
Şekil 20. CTAB çıkarma öncesi ve sonrası MSNP'lerin FTIR analizi	47
Şekil 21. MSNP@PEI ve MSNP@NH ₂ 'ye ait FTIR analizi	48
Şekil 22. MSNP:PEI'ye ait DLS analizi	49
Şekil 23. DNA bağlanma süresi deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	49
Şekil 24. Uygun manyetofektin ortamı belirleme deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	50
Şekil 25. MSNP miktar optimizasyonu deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü)	51
Şekil 26. MSNP@PEI miktar optimizasyonu deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	51
Şekil 27. MSNP-NH ₂ miktar optimizasyonu deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	52

Şekil 28. nPEI ve bPEI DNA bağlanma deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	53
Şekil 29. nPEI ile farklı N/P oranlarında DNA bağlanma deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.	54
Şekil 30. MSNP-NH ₂ konsantrasyonu belirleme deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.	55
Şekil 31. N/P oranının belirlenmesi deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	56
Şekil 32. MSNP uygulaması yapılan MCF-10A hücrelerinin 48 saat sonundaki invert mikroskop görüntüleri	57
Şekil 33. MSNP uygulaması yapılan MCF-10A hücrelerinin 48 saat sonundaki MTS sonucu	57
Şekil 34. MSNP@PEI uygulaması yapılan MCF-10A hücrelerinin 48 saat sonundaki invert mikroskop görüntüleri.	58
Şekil 35. MSNP@PEI uygulaması yapılan MCF-10A hücrelerinin 48 saat sonundaki MTS sonucu.....	59
Şekil 36. MSNP-NH ₂ uygulaması yapılan MCF-10A hücrelerinin 48 sonundaki invert mikroskop görüntüleri	60
Şekil 37. MSNP-NH ₂ uygulaması yapılan MCF-10A hücrelerinin 48 saat sonundaki MTS sonucu.....	60
Şekil 38. PEI uygulaması yapılan MCF-10A hücrelerinin 48 saat sonundaki MTS sonucu. ..	61
Şekil 39. Oregon Green etiketli MSNP ile muamele edilen MCF-10A hücrelerinin hücresel alımı konfokal mikroskop görüntüsü.....	62
Şekil 40. Hücresel alım süresine ait istatistiksel analiz.....	62
Şekil 41. Hücresel alım 3D görüntüsü.....	63
Şekil 42. Manyetofeksiyon yapılan hücrelere ait konfokal mikroskop görüntüsü.....	64
Şekil 43. Rekombinant Azu-GFP füzyon proteininin western blot analizi.....	65
Şekil 44. Rekombinant Azu-GFP füzyon proteininin western blot analizi.....	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
g	: Gram
g (RCF)	: Göreceli santrifüj kuvveti (Relative centrifugal force)
kDa	: Kilodalton
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
R _h	: Hidrodinamik boyut
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
T _m	: Erime sıcaklığı
UV	: Ultra viyole
V	: Volt
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre

Kısaltmalar

bç	: Baz çifti
CIAP	: Sığır Bağırsak Alkalın Fosfataz (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)
ddH ₂ O	: Çift distile saf su
DLS	: Dinamik ışık saçılması (Dynamic Light Scattering)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (Fourier-transform infrared spectroscopy)
GFP	: Yeşil Floresan Protein (Green Fluorescent Protein)
LB	: Luria Bertani
MSNP	: Manyetik silika kaplı nanopartikül
MSNP@PEI	: Polietilen imin modifiye manyetik silika kaplı nanopartikül

MSNP-NH₂	: Amin modifiye manyetik silika kaplı nanopartikül
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PEI	: Polietilen imin
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florür
rDNA	: Rekombinant deoksiribonükleik asit
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon analiz tamponu
SOC	: Super Optimal Broth with Catabolite repressor
TCA	: Trikloroasetik asit
TE	: Tris-EDTA



GİRİŞ

Terapötik Proteinler

Peptidler ve proteinler, primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapılara sahip, canlı içerisinde doğal olarak üretilen moleküllerdir. Bu moleküller canlı içerisindeki biyolojik işlevlerin doğal akışının devam etmesine yardımcı olmaktadır. Hastalıkların tedavisinde, ilaç olarak kullanılabilen proteinler, terapötik protein olarak adlandırılır. Terapötik özellikteki peptid ve proteinler, hedefe spesifik olarak bağlanır ve sağlıklı hücreler için düşük toksisite gösterirler. Bu özellikleri sayesinde sağlık alanında önemli etkilere sahiptir (Joseph *et al.*, 2017). Terapötik proteinler, klinik açıdan değerlendirildiğinde, diyabet, böbrek hastalığı, viral hepatit, kanser tedavisiyle ilişkili nötropeni dahil olmak üzere hayatı tehdit eden çeşitli hastalıklarda temel tedaviler sağlar (Dingermann, 2008).

Biyofarmasötikler içerisinde yer alan, tedavi amaçlı kullanılan peptid ve proteinlerin doğrudan canlıdan elde edilmesi zor ve zahmetlidir. Bu noktada, rekombinant DNA teknolojilerinde görülen gelişme, terapötik peptid ve proteinlere olan ilginin artmasını sağlamıştır. Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen ilk terapötik protein olan insan insülini (Humulin®), 1982 yılında FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmıştır (Johnson, 1983).

Escherichia coli ve memeli hücre hatları, biyofarmasötik üretiminin temel taşlarını oluşturmaktadır. 2003'ten beri onaylanan 31 terapötik proteinden dokuzu *E. coli*'de üretilirken, 17'si memeli hücre hatları tarafından üretilmiştir. Memeli hücre kültürü teknik olarak karmaşık, pahalı ve yavaş büyüme gibi dezavantajlara sahiptir ancak bu hücre hatları, özellikle glikosilasyon gibi post-translasyonel modifikasyon gerektiren büyük terapötik proteinlerin üretilmesi açısından şu ana kadar en etkili üretim sistemidir. Glikosilasyon gerçekleştirebilen alternatif üretim sistemleri, maya, böcek ve bitki hücrelerini içerir. Memeli hücre hatları ile karşılaştırıldığında, bu hücreler tipik olarak daha kısa fermentasyon döngülerine, daha ucuz ve daha yüksek hücre yoğunluğuna ulaşır. Ayrıca bu hücrelerin, memeli patojenlerini iletme riski daha düşüktür. Bu tür teknik ve ekonomik avantajlara rağmen, bu üretim sistemlerinde üretilen glikosile edilmiş bir biyofarmasötik, insan kullanımı için henüz onay almamıştır (Walsh, 2006). Biyofarmasötik ilaçlardan olan Cilengitide, Trebananib, NGR-hTNF, Tyroserleutide, vb. birkaç peptid, halihazırda glioblastoma, yumurtalık, mezotelyoma veya karaciğer kanserli hastalarda

faz III klinik denemelerine tabi tutulmaktadır (Kaspar & Reichert, 2013). Piyasada bulunan FDA onaylı terapötik proteinler Tablo 1’de verilmiştir (Chakrabarty *et al.*, 2014).

Tablo 1. Piyasada Bulunan FDA Onaylı Terapötik Proteinler

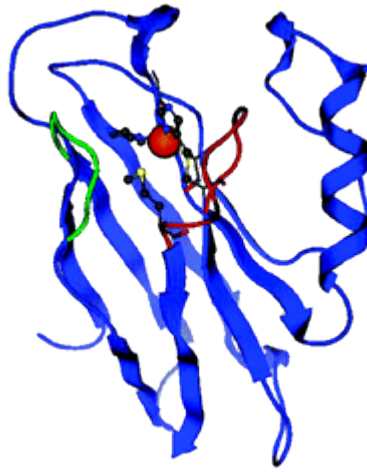
Ticari Adı	Hastalık	FDA onayı
Leuprorelin, Lupron	Prostat kanseri, meme kanseri	1985
Octreotide, Sandostatin	Prostat kanseri, meme kanseri	1988
Goserelin, Zoladex	Prostat kanseri, meme kanseri	1989
Glatiramer, Copaxone	Multipli skleroz	1996
Lucinactant, Surfaxin	Akut solunum yetmezliği	2012
Peginesatide, Omontys	Anemi (kronik böbrek hastalığı)	2012
Pasireotide, Signifor	Cushing hastalığı	2012
Carfilzomib, Kyprolis	Multipil myeloma	2012
Linacotide, Linzess	Kronik idiyopatik kabızlık	2012
Teduglutide, Gattex	Kısa bağırsak sendromu	2012
Lixisenatide, Lyxumia	Şeker hastalığı	2013

Diğer ilgi çeken ve üzerinde araştırma yapılan terapötik proteinlerden biri de kanser önleyici aktivite gösteren azurin proteinidir. Ailede meme veya yumurtalık kanseri öyküsü olan kişilerde ve BRCA1 / BRCA2 mutasyonları teşhisi konmuş kadınlarda haftalık veya iki haftada bir azurin enjeksiyonu bu tür risk altındaki insanlarda kanserin başlangıcını büyük ölçüde azaltacağı düşünülmektedir (Fialho & Chakrabarty, 2012).

Bakteriyal Azurin Proteinini

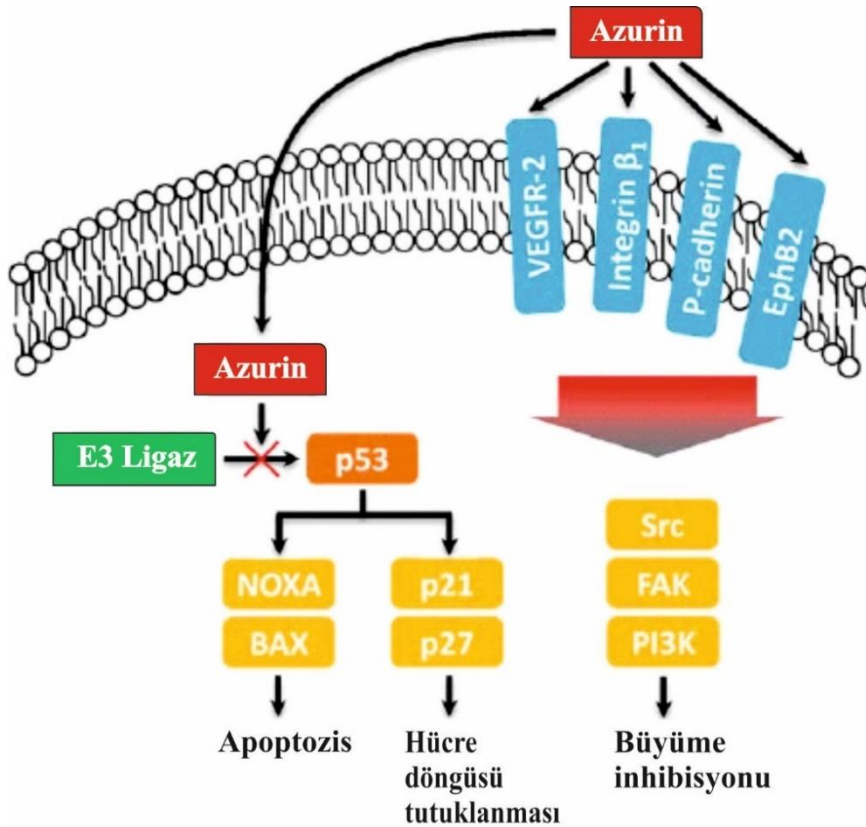
Azurin, *Pseudomonas aeruginosa* tarafından salgılanan, bakır içeren bir redoks (cupredoxin) proteinidir. Bu protein, *P. aeruginosa*’da denitrifikasyon sırasında sitokrom c551 ve nitrit redüktaz ile etkileşime girerek elektron transferinde rol alır (van de KAMP *et al.*, 1990).

Azurin proteinini, bir α -heliks ve sekiz β -yapraktan oluşup üç boyutlu bir motif oluşturur. Azurin, iki potansiyel redoks merkezine sahiptir. Bunlardan biri, doğrudan amino asit kalıntıları ile koordine edilmiş T1 mavi-bakır iyonu diğeri ise molekülün karşı ucunda bulunan bir disülfür köprüsüdür (Farver *et al.*, 1982). Azurin proteininin üç boyutlu yapısı Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Azurinin üç boyutlu yapısı (14 kDa).

Azurin, insan kanser hücrelerinde apoptoz ve büyüme inhibisyonunu indüklemektedir. Azurin kanser hücrelerine girip p53 ile kompleks oluşturmaktadır. Azurin-p53 kompleksi, p53'ün ubiquitin aracılı bozunmasını inhibe ederek p53 seviyesini yükseltmektedir. Stabilize edilmiş p53, çekirdeğe geri dönerek Bax ve Noxa gibi proapoptotik genleri veya p21 ve p27 gibi hücre döngüsü inhibitörlerini indüklemektedir. Azurinin, p53 sinyal yolağına ve reseptör olmayan trozin kinazlara (NRTK) sinyal verme ağına müdahale ederek apoptoz veya büyüme inhibisyonunu indüklediği ortaya çıkmıştır. Bu özellikleri, azurinin antikanser aktivitesini birden fazla hedefle etkileşime girerek ve hastalığın ilerlemesinde çoklu adımlara müdahale ettiğini göstermektedir (Gao *et al.*, 2017). Azurin etki mekanizması Şekil 2’de verilmiştir.



Şekil 2. Azurin etki mekanizması

Meme kanseri, melanom olmayan cilt kanseri dışında kadınlarda en sık rastlanılan kanser tipidir (Xu *et al.*, 2009). Meme kanseri, östrojen veya progesteron reseptörleri ve insan epidermal büyüme faktörü 2 (ERBB2; eski adıyla HER2) için moleküler belirteçlerin varlığına veya yokluğuna göre 3 ana alt tipe ayrılır. Bunlar hormon reseptörü pozitif / ERBB2 negatif (hastaların %70'i), ERBB2 pozitif (hastaların %15-% 20'si) ve üçlü negatif tüm üç standart moleküler belirteçlerden yoksun (hastaların %15'i) tümörlerdir (J. Kim *et al.*, 2006).

Azurin, meme kanseri hücre proliferasyonunu bloke eder ve hem *in vitro* hem de *in vivo* mitokondriyal yolla apoptozu indükler, böylece bu bakteriyel cupredoksin meme kanserinin tedavisi için potansiyel bir terapötik ajan olarak görülmektedir (Punj *et al.*, 2004). *P. aeruginosa*'dan salgılanan bir redoks proteini olan azurinden türetilen 28 amino asitli hücreye nüfuz eden bir peptit olan p28, kanser hücrelerinde p53'ün ubiquitinasyonunu inhibe ederek translasyon sonrası p53'ün artışına neden olur. p28, hücre döngüsünün belirli bir fazı olan G2-M fazında antiproliferatif aktivite sergiler. Bu bulgu önemlidir, çünkü çok sayıda kemoterapötik ilaç yalnızca aktif olarak çoğalan hücreler üzerinde çalışır, ancak dinlenme fazında olan G0 hücreleri üzerinde etki etmez. Memeli hücrelerinde, bir hücrenin ya hücre döngüsü ilerlemesini durdurma ya da apoptotik hücre ölümüne yol açma kabiliyetinden dolayı uzun süredir, tümör baskılayıcı protein p53 üzerinde durulmaktadır. p28, p53'ün DNA bağlanma bölgesine bağlanır ve HDM2 (human double minute 2)'den bağımsız bir yolla proteazomal bozunmayı inhibe eder, yabancı tipte ve mutant p53'te post-translasyonel bir artış ve bunun yanı sıra DNA bağlama aktivitesini indükler ve sikline bağlı kinaz inhibitörleri p21 ve p27'yi yükseltir. Bu proteinler, sırayla, CDK2, siklin A1 ve FOXM1 düzeyini düşürür ve G2-M fazında hücre döngüsü tutuklanmasına neden olur (Yamada *et al.*, 2009). Uzun süreli p28 kullanımı sayesinde ilerlemiş tümör hücrelerinin apoptozunu indükleyerek tümörde büyüme olmadan yaşam süresinin artırarak toksik olmayan terapötik seçenek olabileceği sonucuna varılmaktadır (Warso *et al.*, 2013).

Rekombinant (heterolog) Protein Üretimi

Rekombinant DNA teknolojisi, canlıda kendiliğinden oluşması mümkün olmayan, çoğunlukla farklı biyolojik türlerden elde edilen DNA moleküllerinin, genetik mühendislik teknolojisiyle kesilmesine ve elde edilen farklı DNA parçalarının birleştirilmesi işlemlerini kapsayan bir teknolojidir. Rekombinant DNA ise; bu işlem sonucu üretilmiş olan yeni DNA molekülüne verilen isimdir ve kısaca rDNA olarak yazılır. Bu teknoloji, uygun vektör aracılığıyla istenen bir gen sekansına sahip olan çeşitli kaynaklardan DNA fragmanlarının eklenmesini içerir (Lodish H, 2000). Bu teknoloji, 1970'lerin başında başlamış olup, moleküler

biyoloji ve genetik mühendisliğindeki gelişmeler, insan hastalıklarının biyomoleküler kökenini anlama becerisinde muazzam ilerlemeye yol açmıştır. 1980 yılı Nobel Kimya Ödülü sahibi Paul Berg, ilk olarak 1972’de rDNA’yı elde etmeyi başarmıştır (Pavlou & Reichert, 2004). rDNA teknolojisi aracılığıyla uygun konakçıda üretilen proteinlere ‘rekombinant (heterolog)’ protein adı verilmektedir. Rekombinant protein üretimi için farklı konakçılar kullanılmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, bakteri, maya, böcek hücreleri, memeli hücreleri ve bitki ekspresyon sistemleri sıklıkla kullanılır (Assenberg *et al.*, 2013).

E. coli konakçı sistemindeki rekombinant proteinlerin ekspresyonu, birçok nedenden dolayı sıklıkla tercih edilen seçenek olarak kalır: ucuzdur, kültüre edilme süreleri kısadır, yüksek biyokütle ve yüksek protein verimleri elde etme yeteneği sunar. Kapsamlı bir şekilde incelendiğinde, çok sayıda biyokimyasal ve fizyolojik bilgi mevcuttur. Ancak *E. coli*, post-translasyonel modifikasyonlar için sınırlı kapasiteye sahiptir, çözünür protein üretmede zorluklar, katlanmış protein üretimi, inklüzyon cisimciği oluşturma gibi dezavantajlara sahiptir (Brondyk, 2009). Ayrıca *E. coli* genetik olarak çeşitli araçlarla manipülasyona yatkın değildir (Assenberg *et al.*, 2013)

Mayalar, rekombinant proteinleri ifade etmek için geleneksel, güçlü konakçılardır ve şimdiye kadar çok sayıda proteini ifade etmek için başarıyla kullanılmıştır. Maya hücrelerinin, kısa iki katına çıkma süresi ve kolayca manipüle edilen bir genomu, gelişmiş protein katlama ve çoğu posttranslasyonel modifikasyonları içeren özellikleri vardır. Rekombinant protein ekspresyonu için rutin olarak kullanılan ilk maya, *Saccharomyces cerevisiae*’dır. Ancak son 15 yılda *Pichia pastoris*, tipik olarak *S. Cerevisiae*’den daha yüksek seviyelerde rekombinant protein ekspresyonuna izin verdiği için tercih edilen maya ekspresyon sistemi haline gelmiştir. Bunun yanı sıra *P. pastoris* ekspresyon sisteminde, promotör indüksiyonu amacıyla kullanılan metanol nedeniyle büyük ölçekli biyolojik üretim için gerekli bazı güvenlik önlemlerinin alınması gerekliliği ve memeli hücrelerinden farklı N-bağlı glikan yapılarının ifade edilen proteine eklenmesi yönünden dezavantajlı olduğu söylenebilir (Brondyk, 2009).

Bakulovirüs aracılı böcek ekspresyon vektör sisteminde (BEVS) rekombinant protein üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Hitchman *et al.*, 2009). Protein üretimi için büyük yarar sağlasa da, bakulovirüs teknolojisinin birtakım sınırlamaları vardır. Örneğin, litik enfeksiyon süreci, protein kalitesini etkileyebilecek konakçı ve viral proteazların salınmasına neden olur. Ayrıca, bazı viral proteinler (örn. v-katepsin ve v-kitinaz) sekretuar yolu engelleyebilir ve tekrarlanan virüs amplifikasyon turları, protein veriminde eş zamanlı azalma ile birlikte yanlış katlanmış protein üretme eğilimindedir (Assenberg *et al.*, 2013).

Bitki hücreleri, hayvan hücreleriyle bazı yapısal ve işlevsel benzerlikler paylaşır. Özellikle, bazı glikoproteinler, biyoaktif peptidler ve ilaçlar gibi karmaşık translasyon sonrası modifikasyonlar gerektiren heterolog proteinleri ifade etmek için optimal bir sistem oluştururlar. Literatürde bulunan diğer ifade sistemlerinin aksine, bitki ekspresyon sistemleri geniş kullanım alanına sahiptir. Bitki hücreleri ile eksprese edilen heterolog proteinler, gen ekspresyonunda yer alan dokuya spesifik düzenleyici sekansların kontrol edilmesiyle bitkinin farklı organlarına lokalize edilebilir. Öte yandan, ilgilenen bazı proteinler, uyarılabilir bileşenlerin ve gelişime özgü düzenleyici dizilerin manipüle edilmesi yoluyla belirli büyüme aşamalarında ifade edilebilir. Ayrıca salgı sinyali dizileri kullanılarak ifade edilen protein bitki gövdesinden salgılanabilir. Protein sentezleme fabrikaları olarak modifiye edilen bitkiler tarlada yetiştirilebilir ve fermentörlerde yetiştirilmesi gereken herhangi bir organizmaya kıyasla çok ucuz üretim ortamına sahiptir. Bitki ekspresyon sistemi ile büyük ölçekli üretim diğer ekspresyon sistemlerine göre çok daha kolaydır. Son olarak, bitki tohumlarında proteinlerin ekspresyonu, proteinlerin son derece stabil olduğu, kolayca depolandığı ve genellikle kolayca ekstrakte edildiği ve saflaştırıldığı bir üretim birimi (tohum) ile sonuçlanır. Transgenik tekniklerle veya kimerik tütün mozaik virüsü gibi virüslerle gen aktarımı yapılarak bazı heterolog proteinler, raportör genler, hayvan veya insan antikorları, patojenik mikroorganizmaların antijenleri, farmasötikler, özellikle immünojenik proteinler dahil olmak üzere birçok protein bu sistemde başarıyla ifade edilmektedir. Bitkilerin, aşı üretim sistemi olarak geliştirilmesi için üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bitki ekspresyon sistemi tarafından ifade edilen antijenler, sindirim sisteminde daha stabildir ve tercih edilen immünolojik yanıtları (özellikle mukozal immün yanıtı) ortaya çıkarmaktadır. Bu sistemin, düşük transformasyon ve ekspresyon verimlilikleri, bitki rejenerasyon sistemlerinin kurulmasındaki zorluklar, hayvandan türetilmiş hücre ekspresyon sistemlerinden farklı bir glikosilasyon modeli ve güvenliği konusundaki endişeler gibi bazı dezavantajları da vardır. Bitki ekspresyon sisteminde ifade edilen proteinler belirli biyolojik aktivite göstermiştir. Transgenik bitkilerin muazzam ticari potansiyeli göz ardı edilemez ve bazı bitki ekspresyon sistemleri, çiftlik hayvanları ve insan hastalıklarının önlenmesi için iğnesiz aşılar olarak model hayvanlar üzerinde geliştirilmektedir (Yin *et al.*, 2007).

Memeli Ekspresyon Sistemleri

Memeli ekspresyon sistemleri, geleneksel olarak, rekombinant proteinleri eksprese etmek için en az verimli araç olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, son gelişmeler memeli hücre hatlarında ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde geliştirmiştir. Örneğin, stabil şekilde transfekte edilmiş Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücrelerinin, litre başına birkaç gramlık bir

seviyeye kadar rekombinant antikorları ifade ettiği bildirilmiştir (Brondyk, 2009). CHO ve murin miyelom hücre ekspresyon sistemleri, protein ekspresyonu için tercih edilen memeli ekspresyon sistemleri olarak kabul görmektedir (Heffner *et al.*, 2018).

Memeli ekspresyon vektörleri, yüksek seviyelerde transkripsiyon için ortak olarak sağlam bir promotör bölge taşır. En yaygın olanı, sitomegalovirüs (CMV) ve SV40 g   l  viral promotörler (Dalton & Barton, 2014) olsa da hem rekombinant biyofarmasötik üretimi için kullanılan ekspresyon sistemlerinde hem de yönlendirilmiş metabolik mühendislik yaklaşımları için çeşitli yeni promotör sistemleri geliştirilmekte ve değerlendirilmektedir (Andersen, 2004). Örneğin, son zamanlarda hem tetrasiklin hem de streptogramin bazlı gen düzenleme sistemlerinin CHO ve diğer memeli hücre kültürlerinde düzenlenebilir ekspresyon için oldukça faydalı olduğu gösterilmiştir (Fussenegger *et al.*, 2000) (Fux *et al.*, 2021). Dolayısıyla, vektör yapısının iyileştirilmesi, seçici (selektif) markır seçimi, gen hedefleme ve yüksek verimli tarama stratejilerindeki gelişmeler, yüksek spesifiklikte üretkenliğe sahip rekombinant hücre hatlarının kurulmasını nispeten yaygın hale getirmiş ve hücre hattı gelişimi için gereken zamanı azaltmıştır (Andersen, 2004).

Memeli ekspresyon sistemleri, esas olarak hücre içi (intrase  ler) rekombinant protein üretimi yerine hücre dışı (intrase  ler) protein üretimi için kullanılır. Serumsuz ortam, kültür ortamına salgılanan rekombinant proteinlerin saflaştırılmasını basitleştiren hem CHO hem de HEK293 hücre hatları için geliştirilmiştir. Bununla birlikte, besi ortamının maliyeti oldukça yüksektir ve bu durum, büyük ölçekli biyo-üretimi oldukça maliyetli hale getirir (Brondyk, 2009).

Memeli ekspresyon sistemlerinde ifade edilen proteinler, diğer ekspresyon sistemlerine göre, daha işlevsel olarak katlanır ve katlanma esnasında disülfür bağları oluşturur. Memeli hücreleri tarafından oluşturulan N-bağlı ve O-bağlı glikan yapıları son derece çeşitlidir ve bu yapılar sadece proteine değil, aynı zamanda ekspresyon konakçısı olarak kullanılan memeli hücre tipine de bağlıdır (Jenkins *et al.*, 1996). Ayrıca, besin içeriği, pH'sı, sıcaklık, oksijen seviyeleri ve amonyak konsantrasyonu gibi hücre kültürü ortamı glikozilasyon profilini önemli ölçüde etkileyebilir (Butler, 2006). Yapılan  alışmalar, uygun glikoziltransferazların aşırı ekspresyonu ile rekombinant bir protein üzerindeki oligosakkarit yapıların spesifik manipülasyonunun, glikan kalitesini arttırabildiğini göstermiştir. İyileştirmeler ya doğal yapıların homojenliğini arttırarak ya da glikan kalitesini ve işlevini özelleştirmek için konakçı hücrede olmayan kalıntıları dahil ederek yapılır. Örneğin, CHO hücrelerinde bir galaktoziltransferaz ve bir sialiltransferazın aşırı ekspresyonu, hücrelerde ifade edilen

rekombinant terapötik proteinlerin galaktoz ve siyalik asit içeriğinde bir artışa yol açmaktadır (Weikert *et al.*, 1999).

Transfeksiyon Yöntemleri

Transfeksiyon, genetik olarak modifiye edilmiş hücreler üretmek için hücrelere yabancı nükleik asitleri sokan bir prosedürdür. Transfeksiyon yöntemi, gen fonksiyonu, regülasyon ve protein fonksiyonunun incelenmesi için güçlü bir analitik araçtır. Bu yöntem, hassas bir şekilde kullanılarak hücrelerin belirli hücre içi bölgelerine nükleik asitlerin iletilmesini mümkün kılmak için geliştirilmiştir (Kim & Eberwine, 2010).

Bu yöntemle hücrelere transfer edilen genetik materyaller (DNA ve RNA) doğalarına bağlı olarak hücrelerde stabil (kararlı) veya geçici olarak bulunmaktadır (Recillas-Targa, 2006). Kararlı transfeksiyon yönteminde, genellikle bir işaretleyici gen seçimine (transgenler) sahip olan genetik materyaller, konakçı genomuna entegre edilir ve konakçı hücreler çoğaldıktan sonra bile transgen ekspresyonunu sürdürür. Kararlı bir şekilde transfekte edilmiş genlerin aksine, geçici olarak transfekte edilmiş genler, yalnızca belirli bir süre boyunca ifade edilir ve genoma entegre edilmez. Geçici olarak transfekte edilmiş genetik materyaller çevresel faktörler ve hücre bölünmesi nedeniyle kaybedilebilir. Bu nedenle kararlı veya geçici transfeksiyon seçimi deneyin amacına bağlıdır (Kim & Eberwine, 2010).

Bugüne kadar geliştirilen pek çok transfeksiyon yöntemi vardır. Transfeksiyon yönteminde, hücre yapısı ve transfeksiyon amacı göz önünde bulundurularak farklı yaklaşımlar kullanılır. Etkin transfeksiyon yöntemi, transfeksiyon etkinliği yüksek, hücre toksisitesi düşük, hücre fizyoloji üzerinde en az etkiye sahip olmalı, aynı zamanda kolay kullanımı ve tekrarlanabilir olmalıdır. Transfeksiyon yöntemleri kimyasal, biyolojik ve fiziksel yöntemler olarak sınıflandırılmaktadır (Kim & Eberwine, 2010).

Kimyasal yöntemler

Kimyasal transfeksiyon yöntemleri, modern çalışmalarda sıklıkla tercih edilen yöntemlerdir. Memeli hücrelerine yabancı genleri yerleştirmek için kullanılan ilk yöntemdir. Bu yöntemde yaygın olarak kullanılan transfeksiyon ajanları; katyonik polimer, kalsiyum fosfat, katyonik lipid ve katyonik amino asitlerdir. Bu transfeksiyon ajanlarından en eski kullanılanı katyonik polimerlerdir. En popüler transfeksiyon ajanı ise katyonik lipidlerdir (Washbourne & McAllister, 2002).

Kimyasal yöntemlerin transfeksiyon etkinliğini belirleyen faktörler; nükleik asit/kimyasal oranı, pH ve hücrenin zar yapısıdır. Kimyasal yöntem ile virüs aracılı yöntemler karşılaştırıldığında özellikle *in vivo* düşük transfeksiyon verimliliği ile sonuçlanır. Diğer

yandan, kimyasal yöntemler daha düşük sitotoksositeye sahiptir, mutageneze neden olmaz, ekstra taşıyıcı DNA'ya gerek yoktur ve paketlenecek nükleik asit için boyut sınırlaması yoktur. Kimyasal transfeksiyon verimliliği hücrenin yapısına bağlı olarak değişmektedir (Kim & Eberwine, 2010).

DEAE (diethylaminoethyl) -dekstran transfeksiyonu, RNA veya DNA'yı memeli hücrelerine aktarmak için geliştirilmiş en eski, viral olmayan kimyasal yöntemlerden biridir. Bu yöntem, genellikle sadece geçici ekspresyon çalışmaları için kullanılır, uzun vadeli stabil transfeksiyonların bu reaktif kullanıldığında daha az başarılı olduğu görülmüştür (Schenborn & Goiffon, 2000).

Biyolojik yöntemler

Klinik çalışmalarda en yaygın kullanılan yöntem, virüs aracılı transfeksiyondur. Bu yöntem 'transdüksiyon' olarak da adlandırılabilir. Virüs aracılı transfeksiyon oldukça etkilidir. Örneğin retrovirus sınıfından olan mürin lösemi virüsü (MLV), insan hücrelerine sürdürülebilir transgen ekspresyonu oluşturmak için kullanılan bir viral vektördür (Hacein-Bey-Abina, 2002). Adeno-ilişkili virüse (AAV) dayalı gen transfer vektörleri ise hayvan modellerinde uzun vadeli etkinlik elde etme yeteneklerine dayalı olarak insan gen terapisi için umut vadetmektedir (Carter, 2005).

Virüs aracılı transfeksiyonun başlıca dezavantajları, immünojenitesi ve sitotoksitesidir. Bir viral vektörün genoma entegrasyonu, inflamatuvar ve genoma entegrasyonu sırasında mutageneze neden olabilir çünkü viral vektörler, konakçı genomuna rastgele entegre olur ve bu entegrasyon, tümör baskılayıcı genleri bozabilir, onkogenleri aktive edebilir veya temel genleri kesintiye uğratabilir (Woods *et al.*, 2003). Bu yöntemin diğer bir dezavantajı ise bir virüs paketinin, sınırlı boyutlarda nükleik asit taşımasıdır. Dolayısıyla, virüs aracılı gen aktarımının yüksek transfeksiyon etkinliği ve kullanımının kolay olmasına rağmen viral olmayan transfeksiyon yöntemlerinin geliştirilmesi için çok çaba sarf edilmiştir (Kim & Eberwine, 2010).

Fiziksel yöntemler

Gen aktarımında kullanılan fiziksel yöntemler, en yeni yöntemlerdir. Bu yöntemlerin DNA'yı hücrelere doğrudan transfer etme ve transgenin hızlı ekspresyonunu sağlama potansiyelleri gösterilmiştir. Nükleik asitleri hücrelere iletmek için çeşitli fiziksel araçlar kullanılır. Bu yöntemler arasında mikro enjeksiyon, biyolistik parçacık iletimi (gen tabancası), elektroporasyon ve lazer bazlı transfeksiyon yer alır (Mehier-Humbert & Guy, 2005).

Mikro enjeksiyon yöntemi, nükleik asidi doğrudan sitoplazma veya çekirdeğe enjekte eder. Bu yöntemle, gen aktarımı beceri gerektirir, doğru gerçekleştirilemeyen aktarım genellikle hücre ölümü ile sonuçlanır (Kim & Eberwine, 2010).

Biyolistik parçacık iletimi yönteminde, nükleik asitlerle birleşen altın parçacıkları kullanılmaktadır. Nükleik asit/partikül kompleksleri hedef hücrelere yüksek hızlarda atış yapılarak gönderilir. Bu yöntem oldukça kolay ve güvenilirdir. Fakat pahalı malzemeler gerektirir ve numunelerde fiziksel olarak hasara neden olabilir (Kim & Eberwine, 2010).

Elektroporasyon, en yaygın kullanılan fiziksel yöntemdir. Kesin mekanizması bilinmemekle birlikte kısa süreli bir elektrik akımı ile hücre zarında nükleik asitlerin geçebileceği porlar açtığı varsayılmaktadır. Elektroporasyon kolay ve hızlı olduğundan, optimum elektroporasyon koşulları belirlendikten sonra çok sayıda hücreye kısa sürede transfeksiyon işlemi gerçekleştirilebilir (Inoue & Krumlauf, 2001).

Lazer aracılı transfeksiyon, (fototransfeksiyon olarak da bilinir), hücre zarında kısa süreli bir por oluşturmak için darbeli lazer kullanır. Lazer zarda por oluşturduğunda, nükleik asitler ortam ve sitozol arasındaki ozmotik farklılık nedeniyle hücreye aktarılır. Bu transfeksiyon yönteminde, lazer kullandığı için küçük boyutlu hücrelere uygulanabilir ancak pahalı bir lazer mikroskop sistemi gerektirir (Schneckenburger *et al.*, 2002).

Yukarıda bahsedilen fiziksel yöntemler haricinde günümüzde oldukça popüler bir yöntem olan manyetofeksiyon ile gen aktarımı gerçekleştirilebilmektedir.

Manyetofeksiyon

Nanoteknoloji, maddenin atomik, moleküler ve supramoleküler aralıkta kontrolü olarak tanımlanabilir. Nanopartikül araştırması, benzersiz fiziksel özelliklerinden kaynaklanan potansiyel teknolojik önemi nedeniyle şu anda yoğun bir bilimsel araştırma alanıdır. Nanopartiküller, 10-100 nm aralığında bir boyuta sahip partikül dispersiyonları veya katı partiküller olarak tanımlanabilir. Son yıllarda biyolojik olarak parçalanabilen polimerik nanopartiküller, özellikle polietilen glikol (PEG) gibi hidrofilik polimer ile kaplı olanlar, uzun süre sirküle edebilmeleri nedeniyle potansiyel ilaç taşıma ajanı olarak kullanılmaktadır. Gen terapisinde DNA taşıyıcısı olarak belirli bir organı hedeflenebilmektedir (Aarti P. Nikam, 2013).

Viral olmayan gen vektörlerinin düşük verimlilikleri, adenovirallerin reseptöre bağımlı konakçı yönelimi veya retroviral vektörlerin düşük titreleri, bunların gen terapisindeki kullanımlarını sınırlar. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için, gen vektörleri

süperparamanyetik nanopartiküller ve manyetik alan uygulamasıyla hedeflenen gen iletimi gerçekleştirilir (Scherer *et al.*, 2002).

Eşsiz mezoskopik fiziksel, kimyasal, termal ve mekanik özelliklerine dayanan süperparamanyetik nanopartiküller, çeşitli biyomedikal uygulamalar için yüksek bir potansiyel sunar. Bunlar; hücre etiketleme ve hedefleme, hücresel terapi, doku onarımı, ilaç taşınımı, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), hipertermi ve manyetofeksiyon gibi uygulamalardır. Bu uygulamalar için, parçacıkların yüzeyde yüksek manyetik doygunluk, biyouyumluluk ve etkileşimli işlevlerin birleşik özelliklerine sahip olması gerekir. Bu parçacıkların yüzeyleri, birkaç atomik organik polimer, inorganik metal (örneğin altın) veya oksit yüzey katmanlarının oluşturulmasıyla değiştirilebilir. Çeşitli biyoaktif moleküllerin eklenmesiyle daha fazla işlevselleştirme yapılabilmektedir (Gupta & Gupta, 2005).

Demir oksit manyetik nanopartiküllerin (MNP) sentezine yönelik çok sayıda araştırma yapılmıştır ve birçok çalışma, şekil kontrollü, kararlı, biyouyumlu ve tek dağılımlı demir oksit MNP'leri üretmek için verimli sentez yaklaşımlarını tanımlamıştır. Birlikte çöktürme, termal bozunma, hidrotermal sentez, mikroemülsiyon ve sonokimyasal sentez gibi en yaygın yöntemlerin tümü, yüksek kaliteli demir oksit NP'lerin sentezine yönlendirilebilir (Wu *et al.*, 2008).

Manyetofeksiyon, MNP ile ilişkili DNA'nın hedef hücrelere alınmasını teşvik etmek için manyetik alan kullanan ideal ve oldukça verimli bir gen transferi yöntemi olarak kabul edilmektedir (X. Zhao *et al.*, 2017). Bu yöntemin, *in vitro* yüksek verimli gen taraması için yeni bir araç sağlar ve *in vivo* gen tedavisindeki temel sınırlamaların üstesinden gelmeye yardımcı olabileceği bildirilmiştir (Scherer *et al.*, 2002).

DNA bağlama için en basit yaklaşım, MNP'lerin yüzeyini katyonik maddeler kaplamak ve daha sonra bunları elektrostatik adsorpsiyon yoluyla negatif yüklü genlerle bağlamaktır. Birçok amino grubundan oluşan polietilenimin (PEI), gen iletimi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Modifiye MNP'ler, gen yüklemesi için pozitif olarak yüklenebilir. Ayrıca PEI, iyi dağılmış nanopartiküller oluşturarak, siRNA ile başarılı bir şekilde bağlanabilen bir çekirdek-kabuk yapısı oluşturmak için MNP'lerin yüzeyini doğrudan değiştirebilir. PEI'nin yanı sıra, poli arginin, poli-L-lisin (PLL) ve kitosanlar gibi diğer polikasyonlar, başarılı gen bağlanması için MNP'lerin yüzeyini modifiye edilebilir. MNP'lerin bu modifikasyonları, DNA bağlama özelliklerini arttırarak manyetofeksiyonu verimli hale getirmektedir (Bi *et al.*, 2020).

İkinci yaklaşım, MNP'lerin yüzey yükünün etkisi olmadan gen/taşıyıcı kompleksleri oluşturmaktır. Bu yaklaşımda, genler genellikle ilk olarak polikatyona bağlanır. Daha sonra, zıt yüklü MNP'ler, elektrostatik adsorpsiyon yoluyla gen/taşıyıcı kompleksleri oluşturur. Sırasıyla

sitrik asit (CA), karboksilmetil-dekstran (CMD), g-aminopropiltrietoksisilan (APTES), betain ve PEI modifikasyonu ile farklı yüklü MNP'ler, karşılaştırılabilir gen/taşıyıcı kompleksleri ve artmış gen transfeksiyon verimliliğini doğruladığı bildirilmiştir (Bi *et al.*, 2020).

Bahsi geçen manyetofeksiyon işlemi şu şekilde gerçekleştirilmektedir: Vektörler ve manyetik nanopartiküller, manyetofeksiyon işleminde kullanılan tuz ile kolloid agregasyon oluşturmaktadır. Manyetofeksiyon işleminde kullanılan MNP'ler polikasyonlar ile kaplanmaktadır. Manyetik nanopartiküller genellikle dallı yapıya sahip polietilen imin (PEI) ile kaplanmaktadır. Bu tür parçacıklar, tuz içeren tamponda çıplak DNA, lipopleksler veya poliplekslerle (PEI-DNA gibi) karıştırılırsa, bu bileşiklere bağlanır veya birlikte toplanır. MNP, DNA ve PEI'nin oluşturduğu komplekslerin (manyetofektin) uygulandığı hücreler, partikülleri hücrelere doğru çeken bir manyetik alanın etkisi altında manyetofektin ile inkübe edilir. Manyetofeksiyon işlemi sonucunda, esasen tüm hücrelerin vektörlerle temasa geçmesi ve hücrelerin çoğunun hızla transfekte olması beklenmektedir (Mykhaylyk *et al.*, 2007).

Bu tez çalışmasının amacı; *Pseudomonas aeruginosa*'da doğal olarak ifade edilen azurin proteini kodlayan genin kodon optimizasyonunu yaparak memeli ekspresyon vektörü olan pCMV-GFP'ye yerleştirmek ve rekombinant DNA'nın (pCMV-Azu-GFP) MCF-10A hücrelerine manyetofeksiyonu yapılarak azurin proteininin ifade edilmesini sağlamaktır. Bu doğrultuda;

- i. Memeli ekspresyon vektörü olan pCMV-GFP'ye azurin genini yerleştirilmesi,
- ii. Gen aktarım aracı olarak kullanılan manyetik nanopartiküllerin sentezlenmesi ve karakterizasyonu,
- iii. Rekombinant DNA'nın manyetik nanopartiküllere bağlanması ve MCF-10A hücrelerine manyetofeksiyonu,
- iv. Rekombinant DNA'yı alan MCF-10A hücrelerinin konfokal mikroskopta görüntülenmesi ve western blot analizi ile azurin proteininin üretildiğinin doğrulanması hedeflenmektedir.

KURAMSAL TEMELLER

Yang *et al.*, (2009) yaptıkları çalışmada, hidrofilik bir omurgaya ve nanopartiküllerin yüzeyine bağlanmayı kolaylaştıran yan zincirlere sahip biyouyumlu ve suda çözünür bir poli (amino asit) türevi kullanılarak hidrofobik Fe_3O_4 MNP'lerini kaplamışlardır. Bu kaplama yöntemiyle, hidrofobik MNP'lerin organik çözücülerden sulu faza aktarılması için yeni bir yöntem ortaya çıkarmışlardır. Biyouyumlu poli (amino asit) kaplı Fe_3O_4 MNP'ler sulu çözeltilerde 30 nm'den küçük, son derece stabil ve birkaç liyofilizasyondan sonra bile stabilitelerini koruduğu belirlenmiştir. Poli (amino asit) kaplı MNP'ler, sitotoksikite, doygunluk manyetizasyonu ve yüksek T2 gevşeme katsayıları (r_2 değerleri) göstermemiştir. Poli (amino asit) kaplı Fe_3O_4 MNP'ler, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi biyolojik uygulamalarda güçlü potansiyel olduğunu belirtmişlerdir.

Xu *et al.*, (2009) yaptıkları çalışmada, benzil eter ve oleyilamin içinde $\text{Fe}(\text{acac})_3$ 'ün indirgeyici ayrışması yoluyla monodispers Fe_3O_4 MNP'leri sentezlemek için kolay bir yöntem sunmuşlardır. Sentezde, oleyilamin hem bir indirgeme ajanı hem de bir stabilizatör görevi göstermiştir. Partikül boyutunu, oleyilamin ve benzil eterin hacim oranlarını değiştirerek kontrol etmişlerdir. Katalitik özellikleri, basit yüzey kimyaları ve süperparamanyetizmaları ile bu MNP'ler, manyetik parçacık tabanlı tıbbi görüntüleme ve terapötik uygulamalar için büyük potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Qu *et al.*, (2011) yaptıkları çalışmada, yüzeyi işlevselleştirilmiş, suda dağılabilen demir oksit MNP'ler hazırlamak için basit bir strateji geliştirmişlerdir. Aminler, karboksilikler ve tiyoller gibi istenen fonksiyonel gruplara sahip olan küçük organik moleküller, yüzey modifikasyon maddeleri olarak seçilip sentezin sonunda reaksiyon ortamına enjekte edilmektedir. Çeşitli işlevsel, ligand kabuğunu oluşturmak için basitçe yüzey modifikasyonu ligandını değiştirerek minimum düzeyde çözücü ve kimyasal kaynak tüketimi ile MNP'lerin yüzeyine etkili bir şekilde dahil edilmektedir. Ortaya çıkan nanokristaller yarı küresel olduğunu belirlemişlerdir. Enerji dağıtıcı X-ışını analizi ve Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopi çalışmaları ile demir oksit MNP'lerinin işlevsel ve başarılı yüzey modifikasyonu yapıldığını belirlemişlerdir. Kolloidal kararlılıkları, dinamik ışık saçılımı ve zeta potansiyeli ölçümleriyle karakterize etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda işlevselleştirilmiş MNP'lerin çok kararlı olduğunu ve çoğunlukla tampon çözeltilerde monodispers olarak dağıldığını belirlemişlerdir.

Ding *et al.*, (2012) yaptıkları çalışmada, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ çekirdek/kabuk MNP elde etmek için Fe_3O_4 MNP'leri ters mikroemülsiyon yöntemiyle sentezlemişlerdir. Çekirdeksiz silika

partiküllerinin oluşumunu engellemek için, ya TEOS içeriğini eşit olarak damlalar yoluyla ya da azaltılmış TEOS ile amonyağı arttırarak elde edilebileceğini göstermişlerdir. Sonuçlar, kontrollü kabuk kalınlığına sahip tek tip $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ çekirdek/kabuk MNP'lerini sentezlemek için bir strateji sağlamakla beraber, diğer çekirdek/kabuk MNP'lerin hazırlanmasında da uygulanabilecek bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Solak *et al.*, (2021) yaptıkları çalışmada, toksik olmayan, biyouyumlu ve mezogözenekli bir yapıya sahip manyetik mezogözenekli silika nanopartiküllere ($\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2$ MNP) dayalı bir ilaç taşıyıcı sistem hazırlamışlardır. $\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2$ MNP'lerinin, hem suda çözünürlüklerini hem de kanser hücreleri için özgünlüklerini artırmak amacıyla folik asit bağlı polietilenimin (PEI-FA) ile modifiye etmişlerdir. Kanser seçici DSF taşıyıcı sistemi (mMDPF)'ni dinamik ışık saçılımı (DLS), transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve Brunauer Emmett Teller (BET) analizi ile karakterize etmişlerdir. mMDPF'nin ilaç yükleme kapasitesi yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) ile % 4.35 olarak ölçülmüş ve mMDPF'nin en iyi ilaç salım kinetiği 37 °C ve endozomdaki pH olan pH 6.0'da olduğunu göstermişlerdir. mMDPF'nin MCF-7 hücreleri tarafından daha fazla alındığı ve MCF-7 hücreleri üzerindeki toksisitesinin tümörjenik olmayan (MCF-10A) hücrelerden çok daha yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Zuvin *et al.*, (2019) yaptıkları çalışmada, gelişmiş bir manyetofeksiyon elde etmek için bir döner tabla üzerinde dört nadir toprak miktatısından oluşan yeni bir manyetik alan sistemi tasarlamış ve üretmişlerdir. İşaretleyici protein olarak yeşil floresan protein kodlayan DNA'yı, polietilen imin kaplı süper paramanyetik demir oksit nanopartiküllerine (SPION) bağlamışlardır. Manyetofeksiyonu, MCF-7 hücreleri üzerinde test etmişlerdir. Sistem, standart polietilen imin transfeksiyon protokolünün transfeksiyon süresini (1 saate kadar) düşürdüğünü belirlemişlerdir. Sonuç olarak, sistemin gen transferi için etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Zhao *et al.*, (2017) yaptıkları çalışmada, rejenerasyon olmaksızın doğrudan transgenik tohumlar üretmek için yeni bir transformasyon yöntemi ile polen manyetofeksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Kullandıkları bu sistemde, manyetik nanopartiküllere yüklenen eksojen DNA'yı, bir manyetik alan varlığında polene iletmışlerdir. Manyetofeksiyon ile gen aktarılan polenlerden, tozlaşma yoluyla, transforme tohumları başarıyla elde etmişlerdir. Eksojen DNA'nın, genoma başarılı bir şekilde entegre edildiğini, etkili bir şekilde ifade edildiğini ve tohumlarda kararlı bir şekilde ifade edildiğini bildirmişlerdir. Oluşturulan sistem ile basit, hızlı ve çoklu gen dönüşümü sağlayabilecek bir yöntem geliştirmişlerdir. Manyetofeksiyon yapılan polenler ile yeni transgenik mahsullerin elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Xie *et al.*, (2013) tarafından yapılan çalışmada, farklı doyma manyetizasyon değerlerine sahip iki negatif yüklü manyetik nanopartikül (MNP) hazırlanmış ve polietilenimin-DNA (PD) kompleksleri oluşturmuşlardır. Oluşan manyetik komplekslerin, düşük agregasyon ve sınırlı boyut dağılımı gösterdiğini belirlemişlerdir. PD kompleksleri ile karşılaştırıldığında, manyetik komplekslerin daha düşük sitotoksite ve serumlu veya serumsuz daha yüksek gen transfeksiyonu gösterdiğini bildirmişlerdir. Daha hızlı ve daha yüksek hücre alımının gerçekleştiği manyetik komplekslerin, yüksek manyetofeksiyon verimliliğini sağladığını bildirmişlerdir. Hayvan deneyi, tümör gen terapisi için daha da geliştirilebilecek, *in vivo* olarak düşük topaklanma ile manyetik komplekslerin yüksek verimliliğini doğrulamışlardır.

Zhang *et al.*, (2012) yaptıkları çalışmada, birincil kanserlerin büyümesini engellemek için tümörü hedefleyen antitümör protein azurin ile *E. coli* Nissle 1917'yi birleştirmişlerdir. Bu çalışma, bakteriyolitik kanser tedavisi için yeni bir model oluşturmuştur. Daha da önemlisi, *E. coli* Nissle 1917 bir probiyotiktir ve ilaçlarda ve sağlık bakım ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, *E. coli* Nissle 1917'nin, kanser tedavisi için çeşitli ilaçların bir taşıyıcısı olarak işlev görmek üzere genetik olarak tasarlanabileceğini bildirmişlerdir.

Ghasemi-Dehkordi *et al.*, (2020) yaptıkları çalışmada, pBudCE4.1-azurin-MAM-A rekombinant vektörün, hücre döngüsü genlerini kontrol ederek ve proapoptotik genlerin (BAK, FAS ve BAX) Cyclin-D1 up-regülasyonu yoluyla MCF-7 meme kanseri hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını önlediği bildirilmiştir. Hayvan modellerinde pBudCE4.1-azurin-MAM-A rekombinant vektörün bağışıklık sisteminin uyarılması ve bağışıklama üzerindeki etkilerinin daha sonraki çalışmalarda izlendiğini ileri sürmüşlerdir. Bu bulgular, öngörülebilir gelecekte meme kanseri hücrelerinin genişlemesini ve bu malignitenin tedavisi için terapötik yaklaşımlar için umut vaat ettiği bildirmişlerdir.

Unver *et al.*, (2020) tarafından yapılan çalışmada, *Pichia pastoris* ekspresyon sisteminde sıklıkla kullanılan alkol oksidaz promotörünün kontrolü altında antikanser ajanı olan azurin proteininin üretimi gerçekleştirilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* genomik DNA'sından amplifiye edilen ve pPICZαA'ya eklenen azurin geni, *Escherichia coli* hücrelerinde klonlanmıştır. Daha sonra lineer hale getirilen rekombinant vektör, *P. pastoris* X-33 hücrelerine aktarılmıştır. Çok kopyalı transformantların seçimi için antibiyotik direnç testi ve koloni PCR gerçekleştirilmiş olup 48 saatlik inkübasyonun ardından seçilen transformantların protein ekspresyon kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Western blot analizi ile hepsinde hem hücre dışı hem de hücre içi protein ekspresyonları gözlenmiştir. Birinci klona ait olan hem hücre içi hem de hücre dışı proteinin göreceli ekspresyon seviyeleri diğerlerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Öte yandan 4. klonun en yüksek protein salgılama kabiliyetine sahip olduğu

görülmüştür. Rekombinant klonlar tarafından üretilen hücre dışı azurin proteininin moleküler kütesinin yaklaşık 20 kDa olduğu belirlenmiştir.

Lee *et al.*, (2013) tarafından yapılan çalışmada, pCMV-GFP-EPI plazmidi orfoz kasına elektroporez yöntemi ile taransfekte etmişlerdir ve bunun *Vibrio vulnificus* ile enfeksiyonu üzerindeki etkisi incelenmişlerdir. Epi'nin aşırı ekspresyonu, enfeksiyondan 24 ve 48 saat sonra bakteriyel sayıları verimli bir şekilde azalttığı, kas ve karaciğerde immün ile ilişkili genlerin ekspresyonunu artırarak pro-inflamatuvar infiltrasyonla ilişkili orta düzeyde doğal immün yanıt oluşturduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, *V. vulnificus* enfeksiyonu olmadan pCMV-GFP-EPI plazmidinin elektroporasyonu, özellikle doğuştan gelen bağışıklık genleri olmak üzere bazı bağışıklık ile ilgili genlerin orta derecede ekspresyonunu indüklediğini bildirmişlerdir. Bu veriler, epi'nin orfoz kasına elektroporasyon aracılı gen transferinin, deniz balıklarında patojen enfeksiyonu için antimikrobiyal terapi olarak potansiyel yöntem olabileceğini göstermişlerdir.

Das *et al.*, (2014) yaptıkları çalışmada, iki enjeksiyon bölgesi kullanarak pCMV-GFP plazmitini kornea stromasına başarıyla transfekte etmişlerdir. Belirgin GFP ekspresyonu 15 günde tespit etmişler ve hafif ekspresyonu 21 güne kadar tespit edebilmişlerdir. Bu çalışmada, GFP geninin ekspresyonu 6 günde maksimum seviyeye ulaşmış ve 2,5 µg plazmit içeren 5 µl kornea enjeksiyonu çözeltisiyle 15. güne kadar devam etmiştir. GFP ekspresyonunun daha uzun süresi (yaklaşık 10 gün plazmit ekspresyonunun yarı ömrü), korneanın iki bölgesine enjeksiyon yoluyla plazmit DNA iletiminin artmış bir miktarı (toplam 4 µg) ile ilişkilendirmişlerdir. Çalışmada, yaralı fare korneal hücrelerinin pCMV-GFP plazmiti ile başarıyla transfekte edildiğini göstermişlerdir. Bu bulgular, viral olmayan gen terapötik yaklaşımının, kornea fibrozunu tedavi etme ve nihayetinde yara izini azaltma potansiyeline sahip olduğunu göstermişlerdir.

Salem, (2020) yaptıkları çalışmada, viral promotörlerin konakçı olmayan hücrelerde nasıl çalıştığını ve memeli hücrelerinin bir eksojen düzenleyici diziye karşı nasıl davrandığını anlamak için kullanılabilecek bir platform oluşturmuşlardır. Bu sonuçlar doğrultusunda, böcek ve memeli hücre hatlarındaki yüksek ekspresyon seviyesi nedeniyle gelişmiş bir mekik vektörü olarak pCMV/tIE2-261'i önermişlerdir. Son olarak, farklı OpIE2 promotör uzunlukları ile ilişkili kademeli inhibisyon için daha düşük bir ekspresyon gerektiğinde CMV promotörünün downstream yönünde daha uzun bir OpIE2 fragmanı ve daha yüksek olduğunda daha kısa bir fragman kullanarak, memeli hücrelerinde CMV promotörünün ekspresyon seviyesini uyarlamaya yardımcı olabildiğini bildirmişlerdir.

Silva *et al.*, (2020) yaptıkları çalışmada, mezankimal kök hücreyi (MSC) iki farklı doku kaynağından (BM ve UCM), bir antitümoral bakteri proteininin insan kodonu optimize edilmiş

bir versiyonunu eksprese etmek ve salgılayarak hücre dışına salgılamak için tasarlamışlardır. Hazu-MSK'den alınan CM'yi test ederken, hücre çoğalmasında, göçünde ve meme (MCF-7) ve akciğer (A549) kanser hücre hatlarının yayılımında bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Ek olarak, her iki hücre hattı için hücre ölümünde bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak, burada sunulan sonuçlar, MSK'nin doğal tümör hedefleme özelliklerini ve azurinin geniş antikanser aktivitesini kullanarak, kanser için hücre temelli tedavilere katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir.



MATERYAL VE METOT

Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar Tablo 2’de verildi.

Tablo 2. Kullanılan Cihazların Adları ve Markası

Cihaz Adı	Marka
Çalkalayıcı inkübatör	IKA KS 3000i ve JSR
Gradyent PCR cihazı	SensoQuest
Hassas terazi	Shimadzu-ATX224
Isıtıcıly manyetik karıştırıcı	Heidolph
İnkübatör	Memmert
Mikroplate okuyucu	BioTek Epoch
Mikroskop	ZEISS
Lazer taramalı konfokal mikroskop	Zeiss LSM 710
Otoklav	HMC Hırayama
PCR cihazı	Applied Biosystems ProFlex
pH metre	Mettler Toledo
Saf su cihazı	Millipore Direct-Q 8 UV
Santrifüj	Beckman Coulter-Allegra X30R
SDS-PAGE sistemi	BIO-RAD
Soğutmalı sirkülatörlü su banyosu	Vivo iTherm Polyscience
Steril kabin	ESCO
Su banyosu	Memmert
UV görüntüleme cihazı	BIO-RAD Gel Doc™ XR+
UV spektrofotometre	Shimadzu UV 1800
Vorteks	Heidolph
- 80 °C dondurucu	Nuaire

Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar Tablo 3’te verildi.

Tablo 3. Kullanılan Kimyasallar

İsim	Marka
Agaroz	Sigma
Amonyum hidroksit (NH ₃ basis)	Sigma Aldrich
At serumu	Gibco
Amfisilin antibiyotiği	Sigma Aldrich
Benzil Eter	Sigma Aldrich
Kalsiyum klorür (CaCl ₂ .2H ₂ O)	Sigma Aldrich
Demir (III) asetilasetonat Fe(acac) ₃	Sigma Aldrich
Dimetilsülfoksit (DMSO)	MERCK
DMEM/F12 (glukoz ve L-glutamin içeren besiyeri)	Gibco
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	Sigma Aldrich
Etanol (EtOH)	Sigma Aldrich
Gliserol	ISOLAB
Fosfat tamponu (PBS)	Sigma Aldrich
Hekzan	Sigma Aldrich
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma Aldrich
Hidrokortizon	Sigma Aldrich
İnsülin	Sigma Aldrich
Fenol/kloroform/izoamil alkol	Sigma Aldrich
Kloroform	Sigma Aldrich
Metanol	Sigma Aldrich
MTS Cell Proliferation Assay Kit	ABCAM
Nitrik asit (HNO ₃)	Carlo Erba
Oleyilamin	Sigma Aldrich
Paraformaldehit	Sigma Aldrich
Penisilin-streptomisin antibiyotiği	Gibco
Polietilen imin (PEI) 25kDa	Sigma Aldrich
Potasyum klorür (KCl)	Carlo Erba
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma Aldrich
Sodyum asetat	Sigma Aldrich
Tetraetil ortosilikat (TEOS)	Sigma Aldrich
Tripsin/EDTA (%0,25)	Gibco
Tripan blue	Gibco
DMF (dimetilformamid)	Thermo Fisher Scientific
Oregon-Green 488-X	Thermo Fisher Scientific

Kullanılan Besiyeri, Çözelti ve Tamponlar

Bu tez çalışmasında kullanılan besiyeri, çözelti, tamponlar ve hazırlanışı Tablo 4'te verildi.

Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Besiyeri, Çözelti, Tamponlar ve Hazırlanışı

Çözelti	Hazırlanışı
LB agar besiyeri	%1 tripton, %0,5 NaCl, %0,5 maya ekstraktı ve %1,5 agar saf su ile çözdürüldü. Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavlanarak steril edildi.
LB sıvı besiyeri	%1 tripton, %0,5 NaCl ve %0,5 maya ekstraktı saf su ile çözdürüldü. Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavlanarak steril edildi.
SOC besiyeri	%2 tripton, %0,5 maya ekstraktı, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ ve 20 mM glikoz saf su ile çözdürüldü. Besiyeri hazırlandıktan sonra 0,22 µM gözeneklere sahip steril filtreden geçirildi.
PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi, pH 7,4)	100 mg hazır tablet, 100 mL suda çözüldü. Otoklavlanarak steril edildi. Çözelti +4 °C'de muhafaza edildi.
%4 PFA (paraformaldehit)	1X PBS (pH 7,4), %4 PFA ısıtılarak çözdürüldü. Çözelti hazırlandıktan sonra steril filtreden (0,22 µM) geçirildi ve +4 °C'de muhafaza edildi.
Bazik PEI (bPEI) solüsyonu	1 mg PEI (polietilen imin), 1 mL nükleaz içermeyen su ile çözdürüldü. Çözelti hazırlandıktan steril filtreden (0,22 µM) geçirildi ve +4 °C'de muhafaza edildi.
Nötral PEI (nPEI) solüsyonu	10 mg PEI tartıldı, 8 mL nükleaz içermeyen su ile çözüldü ve HCl ile pH 7,0-7,4'ye ayarlandıktan sonra son hacim 10 mL'ye tamamlandı. Steril filtreden (0,22 µM) geçirildi ve +4 °C'de muhafaza edildi.
TE tamponu (Tris-EDTA)	10 mM tris (pH 8,0; HCl) ile 1 mM EDTA (pH 8,0; NaOH) karıştırıldı. Çözelti hazırlandıktan sonra otoklavlanarak steril edildi ve +4 °C'de muhafaza edildi.
TCA çözeltisi	5 g TCA (trikloroasetik asit), 3,5 mL saf suda çözdürüldü. + 4 °C de saklandı.
PER çözeltisi (%10)	0,5 g amonyum persulfat, 4,5 mL saf suda çözdürüldü.
SDS-PAGE yükleme tamponu (2X)	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) çözeltisinden 2,5 mL alınıp üzerine 200 µL gliserol, 0,4 µL β-merkaptoetanol, 0,02 g bromfenol mavisi ve 0,4 g SDS ilave edilip son hacim steril saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Aliquotlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.
Tris/HCl (pH 8,8 veya pH 6,8)	12,1 g tris, 90 mL saf su içerisinde çözdürülerek pH'sı 1 M HCl ile 8,8 veya 6,8'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
Akrilamid-Bisakrilamid çözeltisi (%30)	12 g akrilamid ve 0,32 g bisakrilamid, 27,68 mL saf suda çözdürüldü.
SDS (%10)	1 g SDS tartılıp 9 mL saf suda çözdürüldü.
SDS-PAGE yürütme tamponu (1X)	1,5 g tris, 7,2 glisin ve 0,5 g SDS, 500 mL saf suya eklenerek karıştırıldı.

Tablo 4. (Devamı)

Transfer çözeltisi (10X)	900 mL saf suya, 58 g tris, 29 g glisin 3,7 g SDS eklenip çözündürüldükten sonra pH'sı 8,3'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.
Transfer çözeltisi (1X)	100 mL 10X transfer çözeltisine 700 mL saf su ve 200 mL methanol eklenerek hazırlandı.
TAE (1X)	20 mL 50X TAE, saf su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlandı.
PBST (1X)	150 mL saf su içerisinde 0,03 gr KCl, 1,2 g NaCl, 0,036 g KH ₂ PO ₄ ve 0,213 g Na ₂ HPO ₄ çözündürüldü. Otoklavlandıktan sonra 75 µL Tween-20 eklendi.
Bloklama tamponu (%5)	30 mL 1X PBST çözeltisi içerisinde 1,5 g yağsız süt tozu çözündürüldü.
RIPA tamponu (1 X)	ddH ₂ O ile 1:10 oranında seyreltilen RIPA tamponu içerisinde 1 mM olacak şekilde PMSF eklenip vortekslendi.

Kullanılan Primerler ve Vektör DNA

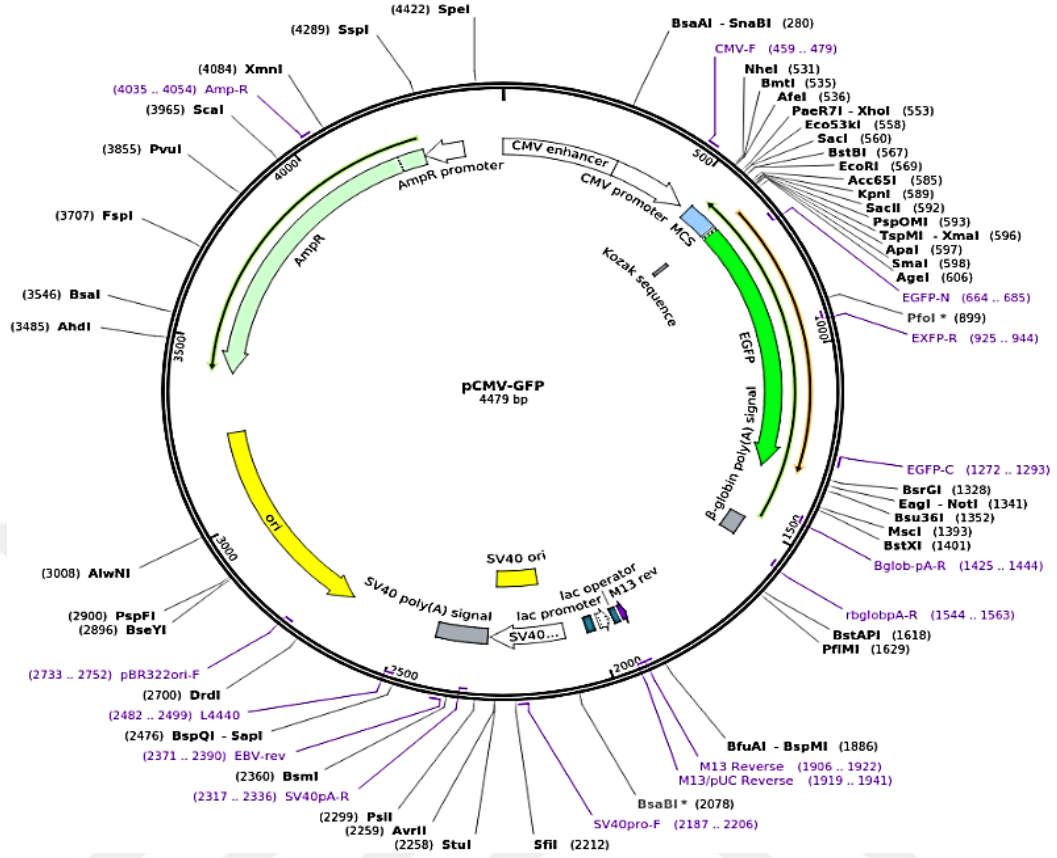
pCMV-GFP ve azurin (Azu) genine ait forward ve reverse primerler www.thermofisher.com (T_m calculator) adresinden uygun T_m sıcaklıkları hesaplanarak tasarlandı. Tasarlanan primerler, Tablo 5'te verildi.

Tablo 5. Çalışmada Kullanılmak Üzere Tasarlanan Primerler

Primer Adı	Sekansı	T _m (°C)	%GC	Uzunluk (bç)
<i>EcoRI</i> -Azu-F primer	5'-AGGCGAATTCATGCTGAGAAAACGCTG-3'	69,5	48,0	29
<i>KpnI</i> -Azu-R primer	5'-TTGGTACCCTTCAGGGTCAGGGTG-3'	67,6	58,0	24
CMV-F primer	5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'	60	67,0	21
EGFP-N-R primer	5'-CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG-3'	64	73,0	22

*Altı çizili kısımlar, restriksiyon enzim tanıma bölgelerini içermektedir.

Çalışmada kullanılan pCMV-GFP, Addgene'den (<https://www.addgene.org/11153/>) temin edildi. Vektör DNA'nın şekli, Şekil 3'te verildi.



Şekil 3. pCMV-GFP

Rekombinant pCMV-Azu-GFP'nin Elde Edilmesi

Azurin genine ait sekansın kodon optimizasyonu ve amplifikasyonu

Pseudomonas aeruginosa bakterisine ait azurin proteininin memeli (insan) hücrelerinde ekspresyonunu arttırmak ve nadir bulunan kodonları sıkça kullanılanlar ile değiştirmek amacıyla kodon optimizasyonu yapıldı. Bu amaçla, NCBI'da (National Center for Biotechnology Information) tespit edilen '*P. aeruginosa* azurin' (Accession number M30389.1) genine (wild-type) ait sekans, MCF-10A hücrelerinde ifade edilmesi için IDT (Integrated DNA Technologies) Codon Optimization Tool software (San Jose, California, USA) programı kullanılarak optimize edildi. Optimize edilen sekansın optimizasyondan önce ve sonraki kodon adaptasyon indeksleri (Codon Adaptation Index: CAI) ve GC içerikleri, GenScript Rare Codon Analysis Tool software (GenScript, Piscataway, NJ, USA) programı kullanılarak belirlendi.

Sentetik azurin genine ait primerlerin bağlanma sıcaklıkları arasında fark olduğundan uygun primer bağlanma sıcaklığını belirleyebilmek için gradiyent PCR yapıldı. Tablo 5'te

verilen primerler ile Tablo 6’da verilen PCR karışım içeriği kullanılarak, Tablo 7’deki şartlarda reaksiyon gerçekleştirildi ve ilgili bölge amplifiye edildi.

Tablo 6. PCR Karışım İçeriği

PCR karışım içeriği	Miktar (µL)
Kalıp DNA	0,8 (4 ng)
dNTP karışımı (10 mM)	1,6
MgCl ₂ (50 mM)	0,3
<i>Eco</i> RI-Azu-F (10 pmol/µL)	1
<i>Kpn</i> I-Azu-R primer (10 pmol/µL)	1
5X Phusion HF buffer	4
ddH ₂ O	11,1
*HF polimeraz	0,2
Toplam	20

*Phusion High-Fidelity (HF) DNA Polymerase

Tablo 7. PCR Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)
1	98	30
35	98	10
	Uygun primer bağlanma sıcaklığı (68-68,5-69)	30
	72	30
1	72	300
1	4	∞

PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

PCR sonrasında elde edilen ürünlerin görüntülenmesi için %1’lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için toplam hacme göre %1 oranında olacak şekilde tartılan agaroz, gerekli miktardaki 1xTAE içerisine alındı, mikrodalga fırında kaynatıldıktan sonra 40 °C’ye soğutuldu. Bu karışıma son konsantrasyon 0,4 µg/mL olacak şekilde RedSafe™ nükleik asit boyama solüsyonu eklenip jel katılaşmaya bırakıldı. Jel katılaştıktan sonra PCR ürünleri yükleme boyası ile karıştırıldı ve kuyucuklara yüklenerek 60 V’de markırla birlikte 90 dakika yürütülerek UV görüntüleme cihazında (BIO-RAD Gel Doc™ XR⁺) görüntülendi (Sambrook and Russell 2001).

PCR ürünlerinin saflaştırılması

Yapılan gradiyent PCR sonucu belirlenen uygun primer bağlanma sıcaklığı kullanılarak Tablo 6 ve Tablo 7’deki karışım içeriği ve şartlar kullanılarak azurin geni amplifiye edildi. PCR ürünleri, MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification Kit kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi kısaca şu şekilde yapıldı; PCR ürünlerinin toplam hacminin 5 katı kadar BNL tamponu eklendi ve vortekslendi. Karışım MEGAquick-spin™ kolonuna transfer edildi. 11.000 g’de 30 saniye santrifüj edildi, kolondan inen sıvı uzaklaştırıldı. Kolona 750 µL yıkama tamponu eklendi, 11.000 g’de 30 saniye santrifüj edildi. Kolondan inen sıvı uzaklaştırıldı, kolon boş olarak 18.000 g’de 3 dakika santrifüj edildi. Kolon, steril mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Membrana dokunmadan kolonun tam ortasına 40 µL elüsyon tamponu eklendi. Ardından 18.000 g’de 1 dakika santrifüj edildi ve kolon uzaklaştırıldı. Elüe edilen DNA’nın konsantrasyonu ve saflığı nanodrop spektrofotometre ile belirlendi.

PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi

Saf olarak elde edilen, uçlarında restriksiyon enzimlerinin tanıma dizilerini içeren azurin genine ait PCR ürünleri, www.restrictionmapper.org adresinden gene ait diziyi kesmediği tespit edilen Fast Digest *EcoRI* ve *KpnI* enzimleri ile kesildi. PCR ürünü kesim reaksiyonu karışım içeriği, Tablo 8’de verildi.

Tablo 8. PCR Ürünü Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar (µL)
ddH ₂ O	24,7
10xFast Digest tamponu	2
DNA (PCR ürünü)	1,3 (200 ng)
<i>EcoRI</i>	1
<i>KpnI</i>	1
Toplam	30

Tablo 8’deki gibi hazırlanan karışım, 37°C’de 30 dakika inkübe edildikten sonra 80°C’de 5 dakika süreyle enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi. Her iki enzim ile kesilen DNA solüsyonları, nükleaz içermeyen su ile 100 µL’ye tamamlanarak fenol/kloroform ekstraksiyonu yapıldı (Acar, 2020).

Vektör DNA (pCMV-GFP)'nın restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi

PCR ürünlerinin kesimi ve ekstraksiyonunun ardından vektör DNA da aynı enzimlerle (*EcoRI* ve *KpnI*) kesildi. Kesilen DNA'nın 5' ucundaki fosfat gruplarını uzaklaştırmak için reaksiyona CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) enzimi ilave edildi. Vektör DNA'nın kesim reaksiyonu karışım içeriği, Tablo 9'da verildi.

Tablo 9. Vektör DNA'nın Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar (µL)
ddH ₂ O	22,4
10xFast Digest Green tamponu	3
Vektör DNA	1,6 (1,5 µg)
<i>EcoRI</i>	1,5
<i>KpnI</i>	1,5
Toplam	30

Tablo 9'daki gibi hazırlanan karışım, 37 °C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra 80°C'de 5 dakika süreyle enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi. İnaktivasyondan sonra 1 µL CIAP eklenerek 50°C'de 60 dakika inkübe edildi.

Vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu

Kesim reaksiyonu sonrası %1'lik agaroz jele yüklenip yürütülen örnekler, jelden ekstrakte edildi. Vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification Kit kullanılarak yapıldı. Bu işlem için; jelde yürütülen DNA, UV altında kesilerek jelden alındı. Üzerine 500 µL BNL tamponu eklendi. 55 °C'de 10 dakika su banyosunda inkübe edildi, her 3 dakikada bir tüpler hafifçe vortekslendi. Jel çözündükten sonra 5 dakika daha 55 °C'de inkübe edildi. Tüplerdeki karışım tek bir kolonda birleştirildi, 11.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi, kolonun altındaki sıvı uzaklaştırıldı. Kolona 750 µL yıkama tamponu (W1) eklendi. 11.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi, kolonun altındaki sıvı uzaklaştırıldı. Kolon boş olarak maksimum hızda (18.000 g) 3 dakika santrifüj edildi. Kolon yeni steril bir tüpe yerleştirildi ve kolonun tam ortasına 40 µL elüsyon tamponu (E5) eklendikten sonra 18.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Elüe edilen DNA konsantrasyonu nanodrop spektrofotometrede ölçüldü.

Ligasyon

Vektöre yerleştirilecek (insört) gen (azurin) ve vektör DNA (pCMV-GFP), restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra reaksiyon karışımına gen/vektör DNA miktarı eşit hacimde olacak şekilde ilave edildi. Ligasyon karışım içeriği, Tablo 10'da verildi.

Tablo 10. Ligasyon Reaksiyonu Karışım İçeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar (µL)
10X ligasyon tamponu	4
İnsört DNA	6 (122,4 ng)
Lineer vektör DNA	6 (136 ng)
T4 DNA ligaz	1,5
Steril dH ₂ O	3
Toplam	20,5

Reaksiyon karışımı 16 °C’de 16 saat boyunca inkübe edilerek ligasyon gerçekleştirildi.

Ligasyon ürününün kompetent *E. coli* hücrelerine transferi

Hücrelerin transformasyonu için öncelikle hücreler kompetent hale getirildi. Kompetent *E. coli* JM109 hücrelerinin elde edilmesi için öncelikle hücreler, 10 mL LB sıvı besiyerine transfer edilerek 37°C’de ve 150 rpm’de gece boyu inkübe edildi. Elde edilen ön kültürden 500 µL alınıp 50 mL’lik LB sıvı besiyerine inoküle edildi ve hücreler, 37 °C’de 150 rpm’de inkübasyona bırakıldı. OD₆₀₀ değeri 0,5’e ulaşan kültürdeki hücreler buz üzerine alınarak santrifüj tüpüne konuldu ve 6.000 rpm’de, +4 °C’de 8 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen hücre peletinin üzerine 20 mL buzda soğutulmuş (ice-cold) CaCl₂ ilave edilip hücreler yavaşça pipetaj ile süspanse edildi. Hücreler, 20 dakika buzda bekletildikten sonra 6.000 rpm’de +4 °C’de 8 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen hücre peleti üzerine 2,5 mL buzda soğutulmuş CaCl₂ eklendi ve pelet çözüldü. Kompetent hücre solüsyonu 100 µL aliquatlara ayrılarak hemen kullanım için buz üzerinde bekletildi (Anonymous 2019).

Önceki bölümde elde edilen ligasyon ürününün bakteri hücrelerine transfer edilmesi için buz üzerinde bekletilen hücrelerin üzerine 5 µL DNA (ligasyon karışımı) (10 pg-100 ng) ilave edildi. Tüpler yavaşça karıştırıldıktan sonra, buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi ve çalkalanmadan 42 °C’de 30 saniye bekletildi. Tüpler, buz üzerinde 2 dakika bekletildikten sonra steril ortamda önceden ısıtılmış SOC besiyerinden 250 µL ilave edildi. Tüpler, çalkalayıcı inkübatörde 37 °C’de 225 rpm’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Önceden ısıtılmış LB-amfisilin seçim plaklarına transformasyon karışımından 150 ve 200 µL yayılarak 37 °C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı (Invitrogen 2010a).

Koloni PCR

İnkübasyon sonrası gelişen kolonilerden 12 tanesi seçildi ve Tablo 5’te verilen vektör DNA’ya ait primerler kullanılarak koloni PCR yapıldı. Bu işlem için koloniden çok küçük miktar mikropipet ucu ile alınarak pipet ucu, PCR karışımı üzerine yerleştirilip etrafında sabitçe

evrildikten sonra reaksiyon başlatıldı (Kaymak, 2008). Reaksiyon sonrası elde edilen ürünler agaroz jelde yürütüldü. Yürütme sonucu pozitif sonuç veren kolonilerden altı tanesi ile vektöre yerleştirilen sekansa (azurin geni) ait primerler kullanılarak koloni PCR gerçekleştirildi. Koloni PCR için reaksiyon karışım içeriği ve PCR şartları, Tablo 11 ve

Tablo 12’de verildi.

Tablo 11. Koloni PCR Karışım İçeriği

PCR karışım içeriği	Miktar (L)
dNTP karışımı	0,8
MgCl ₂ (50 mM)	1
CMV-F / <i>Eco</i> RI-Azu-F primer (10 pmol/L)	1
EGFP-N-R / <i>Kpn</i> I-Azu-R primer (10 pmol/L)	1
10xPCR tamponu	1
ddH ₂ O	6,6
Taq DNA polimeraz	0,6
Toplam	12

Tablo 12. PCR şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (C)	Süre (dakika)
1	94	10
35	94	1
	63/61,5	1
	72	1
	72	5
1	4	∞

***E. coli* hücrelerinden saflaştırılan muhtemel rekombinant plazmitin sekans analizi ile doğrulanması**

Klonlamanın doğruluğunu kontrol etmek için seçilen koloni LB-amfisilin sıvı besiyerinde büyütüldü. PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit kullanılarak gerçekleştirilen plazmit saflaştırma işlemi özetle şu şekilde yapıldı; 37 C’de 150 rpm’de gece boyu inkübe edilen n kültürden 50 L alınarak amfisilin içeren LB sıvı besiyerine (10 mL) inoküle edildi. Kültür, gece boyu 37 C’de 150 rpm’de inkübe edildi. 1 gecelik kültürden steril mikrosantrifüj tüpüne 4 mL alınıp 4.000 g’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pelete 0,25 mL RNase içeren resspansiyon tamponu ilave edilerek hücreler, tamamen homojen oluncaya kadar süspanse edildi. zerine 0,25 mL lizis tamponu ilave edilen lizat karışımı,

yavaşça ters çevrilerek tamamen homojen oluncaya kadar karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. 0,35 mL çöktürme tamponu ilave edilip tüp ters çevrilerek tamamen homojen oluncaya kadar karıştırıldı. Lizat, 12.000 g'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant kolona yüklenip 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi, alttaki sıvı uzaklaştırıldı. Kolon, 0,7 mL yıkama tamponu ile yıkanıp 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi, alttaki sıvı uzaklaştırıldı. Kolon boş olarak 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolonun altına steril elüsyon tüpü yerleştirildi. 75 µL TE tamponu eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Saflaştırılan plazminin Sanger sekans analizi yaptırıldı.

Gen Aktarım Aracı Olarak Kullanılan Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Fe₃O₄ manyetik nanopartikül sentezi

Çalışmada kullanılan manyetik nanopartiküller (MNP) schlenk sistemi kullanılarak üretildi. Bu sistemde kullanılan spiral soğutucu içerisinden geçen su yardımıyla reaksiyon ortamından buharlaşan çözücünün tekrar reaksiyon ortamına dönmesi sağlandı. MNP sentezi boyunca reaksiyon sıcaklığı adım kontrol cihazı (PC441, Ordell) ile otomatik olarak kontrol edildi. Senteze başlamadan önce sistem sıcaklıkları otomatik ayar yapılarak ayarlandı. Sıcaklık ölçümlerinde ise K4 tipi termokupl (NiCr-Ni) kullanıldı.

MNP sentezi için demir kaynağı olarak demir (III) asetil asetonat (Fe(acac)₃) kullanıldı. Yüzey aktif maddesi ve indirgeyici ajan olarak oleyilamin, reaksiyon için çözücü olarak benzil eter kullanıldı. Sentez reaksiyonu 15 mL oleyilamin ve 15 mL benzil eter içerisinde çözülmüş 3 mmol Fe(acac)₃ ile gerçekleştirildi (Solak *et al.*, 2021). Karışım soğutucu sisteme bağlanıp 1.400 rpm'de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Reaksiyon başlayınca üç boyunlu reaksiyon balonu içerisine olası oksidasyonu engellemek için azot (N₂) gazı verilmeye başlandı ve sentez boyunca reaksiyon ortamına N₂ verildi. 3 boyunlu reaksiyon balonunun açıkta kalan diğer ucundan karışımın içine termokupl daldırıldı ve adım kontrol cihazına bağlandı. Adım kontrol cihazına aşağıdaki komutlar girildi:

1. adım: 15 dakikada 110 °C'ye çık (reaksiyonu aktive eden sıcaklık)
2. adım: 60 dakika 110 °C'de kal (çekirdek oluşum aşaması)
3. adım: 19 dakikada 300 °C'ye çık
- 4.adım: 60 dakika 300 °C'de kal (büyüme aşaması/stabilizasyon)

Reaksiyon bittikten sonra karışım, oda sıcaklığına gelmesi için ısıtma sisteminden ayrıldı ve karıştırılmaya devam edildi. Karışım soğutulduktan sonra 50 mL'lik santrifüj

tüplerine alınıp etanol ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemi, 10.300 g'de 10 dakika yapıldı. Süpernatantın rengi şeffaf oluncaya kadar 2-3 kez etanol ile yıkandı, yıkama sonrası oleyilaminle stabilize edilen Fe_3O_4 MNP'leri hekzan içerisinde dağıtılarak N_2 gazı verildi ve kullanılıncaya kadar $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Fe_3O_4 çekirdek sentez sistemi Şekil 4'te verildi.

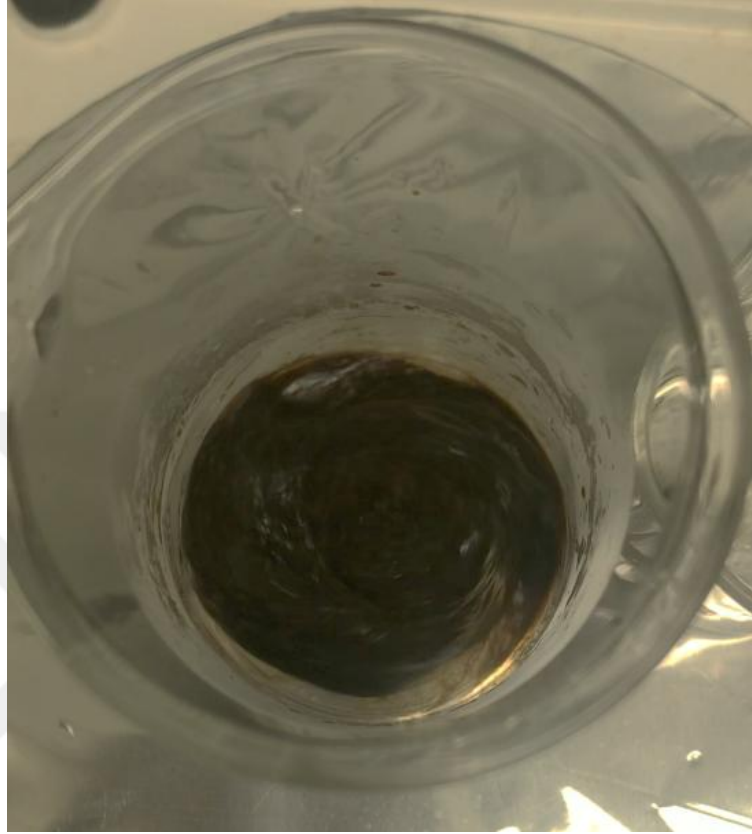


Şekil 4. Fe_3O_4 çekirdek sentez sistemi

Mezogözenekli silika kaplı Fe_3O_4 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) sentezi

Mezogözenekli silika kaplı manyetik nanopartikül (MSNP) sentezinde Stöber metodunun modifiye edilmiş hali kullanıldı (J. Kim *et al.*, 2006). Bunun için, 1 mL kloroform içinde dağıtılmış 40 mg Fe_3O_4 MNP, 10 mL CTAB çözeltisi (10 mL, 360 mg) içine eklendi ve 1.400 rpm'de 30 dakika manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. CTAB-MNP karışımı mikro emülsiyon oluşturur (Şekil 5). Karışım, içerisindeki kloroformun uzaklaştırılması için 30 dakika 70°C 'de ısıtıldı. Oda sıcaklığına gelmesi beklendikten sonra karışım 50 mL'lik santrifüj tüpüne alındı ve 10.300 g'de 20 dakika santrifüj edilerek toplandı. Ortamdaki fazla CTAB ve diğer atıkları uzaklaştırmak için MNP'ler 3 kez saf su ile yıkandı. Son yıkamadan sonra pelet 1 mL saf suda dağıtıldı. Suda dağıtılan MNP'ler üç boyunlu reaksiyon balonuna alındı ve üzerine 9 mL CTAB çözeltisi (8,2 mg/mL) eklendi. Karışıma son olarak 100 μL NaOH çözeltisi (0,1 M) eklendi. Karışım, 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı ve 30 dakika

sonunda sıcaklık 55 °C'ye çıkarıldı. Karışım sıcaklığı 55 °C'ye ulaşınca üzerine 50 µL silika kaynağı olan TEOS eklendi. Karışımın 4 saat boyunca 55 °C'de karıştırıldı. Süre sonunda MNP'ler 10.300 g'de 20 dakika santrifüj edilerek toplandı. MNP'lerin kirliliklerden arındırılması amacıyla 3 kez saf su ile yıkama işlemi yapıldı.



Şekil 5. CTAB içeren sulu çözeltiye kloroformda dağıtılmış MNP'lerin eklenmesiyle oluşan mikroemülsiyona ait fotoğraf.

Yıkama işlemi ardından, elde edilen ~20 mg MSNP'lerin üzerine 40 mL %5 asetik asit içeren etanol ilave edildi. Karışım, oda şartlarına gece boyu 400 rpm'de çalkalayıcı bir karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. MSNP'ler santrifüj edilerek toplandı ve 3 kez saf su ile yıkandı. Yıkama ile asetik asit tamamen uzaklaştırıldıktan sonra toplanan MSNP'ler 1 kez de etanol ile yıkandı ve steril kabin içinde kurutuldu (Lai *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016).

MSNP'lerinin yüzey modifikasyonu

MSNP'lerin yüzey yükünün pozitif hale getirilmesi için MSNP'ler APTES (g-aminopropiltrietoksisilan) ve PEI (polietilen imin) ile modifiye edildi. APTES modifikasyonu için sentezlenen MSNP'lerden 20 mg tartıldı ve 2 mL saf suda dağıtıldı. Soğutucu sisteme bağlı üç boyunlu reaksiyon balonu içerisine suda dağıtılan MSNP'ler ve 30 mL etanol eklenerek 75°C'ye ısıtıldı. Daha sonra 2 mL NH₄OH (%25) ve 200 µL APTES eklendi. Karışım, 1.400 rpm'de 75°C'de 2 saat boyunca karıştırıldı. Sistemin sıcaklığı termokupl ile ölçüldü. Reaksiyon bittikten sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar soğumaya bırakıldı. Soğutulduktan sonra

karışım 50 mL’lik santrifüj tüpüne alındı ve 10.000 g’de 20 dakika santrifüj edildi. Ortamda kalan kirlilikleri uzaklaştırmak için 3 kez etanol ile yıkama işlemi yapıldı (Zhao *et al.*, 2015).

PEI ile yüzey modifikasyonu için MSNP ve PEI ağırlık oranlarına (1:0.5, 1:1, 1:2) göre hazırlandı. Saf su içerisinde çözündürülen PEI, saf su içerisinde dağıtılan MSNP üzerine damla damla ilave edildi. MSNP@PEI karışımı oda sıcaklığında gece boyu 400 rpm’de karıştırıldı. Bağlanmamış PEI 10.300 g’de 20 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. MSNP’ler 1 kez saf su ile yıkandı ve son olarak 1 kez alkol ile yıkanarak MSNP’ler steril hale getirildi (Solak *et al.*, 2021).

Oregon Green 488 etiketli MSNP üretimi

Çalışılan MSNP’lerin hücresel alımını tespit etmek amacıyla floresan bir molekül olan Oregon-Green 488-X (Succinimidyl Ester, 6-isomer) ile MSNP etiketleme yapıldı. Öncelikle 0,5 mL sodyum bikarbonat tamponu (0,1 M) içinde 100 µL APTES çözöldü ve diğer yandan, 0,2 mL DMF (dimetilformamid) içinde 1 mg Oregon-Green 488-X çözöldü. Reaksiyon sürekli karıştırılarak karanlık ortamda, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. MSNP sentezi bölümünde anlatıldığı gibi MSNP’ler hazırlandı, 50 µL TEOS ekleme sırasında MSNP’leri içeren ortama 50 µL Oregon-APTES (1:1) ile karıştırılmış TEOS eklendi. Karışım, 55°C’de ve karanlık ortamda 4 saat daha karıştırıldıktan sonra MSNP’ler, 10.000 g’de 20 dakika santrifüj edilerek toplandı ve 3 kez saf su-etanol ile yıkandı.

Nanopartiküllerin karakterizasyonu

Manyetit, MSNP, MSNP@PEI ve MSNP-NH₂ nanopartiküllerinin şekillerinin ve boyutlarının belirlenmesi için TEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) kullanıldı. TEM görüntüleri, karbon kaplı bakır grid üzerine damlatılan örnekler kurutulduktan sonra kaydedildi. MSNP’lerin gözeneksiz ve gözenekli yapıları ve MSNP@PEI ve MSNP-NH₂ fonksiyonel gruplarının belirlenmesi için FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy; Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) analizi yapıldı. FTIR spektrumları vakum ortamında ve 400-4000 cm⁻¹ aralığında alındı. MSNP@PEI’lerin yüzey yükünün, zeta potansiyelinin ve PDI (polidispersite indeksi) değeri belirlenmesi için DLS (Dinamik ışık saçılması) analizi yapıldı. Ölçüm ve analizler için DAYTAM (Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi)’dan uzman desteği alındı.

Manyetofektin Hazırlama ve Optimizasyonu

Gen transfer aracı olarak sentezlenen MSNP, MSNP@PEI ve MSNP-NH₂ ile plazmit DNA’yı bağlama çalışmaları yapıldı. DNA’yı optimum şartlarda bağlamak için süre, uygun

manyetofektin ortamı, MNP miktarı ve N/P oranı (PEI'den gelen nitrojenin (N), plazmit DNA'daki fosfat gruplarına (P) olan oranı) optimizasyonu yapıldı. Plazmit DNA olarak, pCMV-GFP kullanıldı. Manyetofektin (MSNP/DNA/PEI) için öncelikle süre ve tampon optimizasyonu yapıldı. Daha sonra MSNP miktarı ve N/P oranı optimizasyonu yapıldı.

Süre denemesi için manyetofektinler 0, 5, 15, 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Uygun manyetofektin ortamını belirlemek için manyetofektinler PBS ve serum içermeyen büyüme besiyeri içerisinde hazırlandı ve hazırlanan manyetofektinler, 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bağlanmayan DNA'nın uzaklaştırılması için pelet, 36 µL nükleaz içermeyen saf su içerisinde dağıtıldı ve 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet 36 µL %1 oranında hazırlanan SDS (sodyum dodesil sülfat) ile dağıtıldı. Elde edilen karışım, 60 °C ve 400 rpm'de 30 dakika boyunca çalkalanarak bağlanan DNA'nın salımı gerçekleştirildi (Danthanarayana *et al.*, 2018). Optimum MSNP miktarını belirlemek için 2,5-100 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışıldı. DNA koruması için kullanılan ekstra PEI için N/P:0-15 oran aralığında çalışıldı.

Manyetofektinler, 1,5 mL'lik tüplerde son hacmi 100 µL olacak şekilde hazırlandı ve oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası optimizasyon için oluşturulan grupların DNA bağlanma kapasitelerini belirleyebilmek için %1 oranındaki agaroz jele 20 µL manyetofektin yüklendi ve 60 V'de 60 dakika yürütüldükten sonra jel, UV görüntüleme cihazında görüntülendi.

Manyetofektin optimizasyonları için kullanılan N/P oranları aşağıdaki formüle göre hesaplandı (W. Wang *et al.*, 2011):

$$N/P \text{ Oranı} \times 43,1/330 = PEI(\mu g) \times DNA(\mu g)$$

Hücre Kültürü

Manyetofeksiyon ile gen aktarımı için konakçı olarak, ATCC (American Type Culture Collection) firmasından temin edilen, MCF-10A (CRL-10317™) hücre hattı kullanıldı. Bu hücre hattıyla çalışmak üzere steril laminar kabin kullanıldı ve hücre kültürü çalışmaları boyunca aseptik koşullara tamamen uyularak olabilecek herhangi bir kontaminasyon riskinden kaçınıldı. Kullanılan malzemeler otoklavlanarak steril edildi. Çalışmalardan önce laminar kabinin UV lambası 15 dakika açık bırakılarak yüzey sterilizasyonu sağlandı. Kabin ve hücre kültürü için gerekli materyaller %70'lik etanol ile silindi.

MCF-10A hücreleri literatürde tarif edildiği şekilde; %5 at serum, %1 antibiyotik, 0,5 µg/mL hidrokortizon, 10 µg/mL insülin, 100 ng/mL kolera toksin ve 20 ng/mL epidermal

büyüme faktörü (EGF) içeren DMEM/F12 medyumunda kültüre alındı. Hücreler, 37 °C’de %5 CO₂ ve %90 nem ortamı sağlayan inkübatörde inkübe edildi (Nahler, 2009).

Primer kültür evresinde dondurulmuş halde temin edilen MCF-10A hücreleri hızlı bir şekilde çözündürülerek 15 mL’lik santrifüj tüpüne alındı ve 1 mL büyüme ortamı eklendi. Hücreler 1.300 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet 1 mL büyüme ortamı ile dağıtıldı ve 1.300 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Pelet 1 mL büyüme ortamı ile dağıtıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu 3 mL medyum içeren flasklara ekildi ve inkübatöre kaldırıldı.

Tez çalışması boyunca kullanılan hücre büyüme kapları ve kaplara ekilecek hücre miktarı ile medyum miktarı ve ekim sonrası pasajlama yapmak için gereken tripsin miktarı Tablo 13’te verildi.

Tablo 13. Hücre Ekim Miktarı ve Gerekli Solüsyon Miktarları

Hücre büyüme kapları	Yüzey alanı (cm ²)	Hücre sayısı	Büyüme medyum (mL)	Tripsin (mL)
6 kuyulu	9,6	0,3×10 ⁶	2	1
12 kuyulu	3,5	0,1×10 ⁶	1,5	0,4-1
24 kuyulu	1,9	0,05×10 ⁶	0,75	0,2-0,3
96 kuyulu	0,32	0,01×10 ⁶	0,2	0,05-0,1
T-25	25	0,7×10 ⁶	4	3
T-75	75	2,1×10 ⁶	12	5
T-175	175	4,9×10 ⁶	40	17

Flasklara ekim yapıldıktan sonra yeterli doluluk oranına ulaşan adherent özelliğe sahip olan MCF-10A hücreleri %0,05 tripsin uygulanarak pasajlandı. Pasajlama işlemi adımları:

- Kültür ortamındaki büyüme medyumunu uzaklaştırıldı ve ortamdaki serumu gidermek amacıyla hücreler PBS (kalsiyum ve magnezyum içermeyen) ile yıkandı,
- Hücrelerin bulunduğu ortama gerekli miktarda tripsin ilave edildi ve inkübatörde 15 dakika inkübe edildi,
- İnkübasyon sonrası yüzeyden kalkan hücrelerin üzerine serum içeren büyüme ortamı eklenerek tripsin aktivitesi inhibe edildi,
- Hücreler pipet yardımıyla 15 mL’lik santrifüj tüpüne alınarak 1.300 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi,
- Santrifüj sonrası hücre peleti büyüme ortamı ile süspanse edildi ve hücreler 1.300 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi,

- Santrifüj sonrası hücre peleti büyüme ortamıyla süspanse edildi ve tripan mavisi ile boyandı. Hücre süspanسیونundan 10 µL alınarak thoma lamında hücre sayımı yapıldı,
- Gerekli sayıda hücre flasklara transfer edildi ve geriye kalan hücreler DMSO ve serum içeren dondurma çözeltisi ile karıştırıldı. Dondurma çözeltisi içindeki hücre süspanسیونu kriotüplere alınarak ilk 1 saat -20 °C’de donduruldu ve daha sonra -80 °C’de muhafaza edildi. Uzun süreli saklama amacıyla tüpler sıvı azot tankına konuldu.

Hücre canlılığı ve sayımı

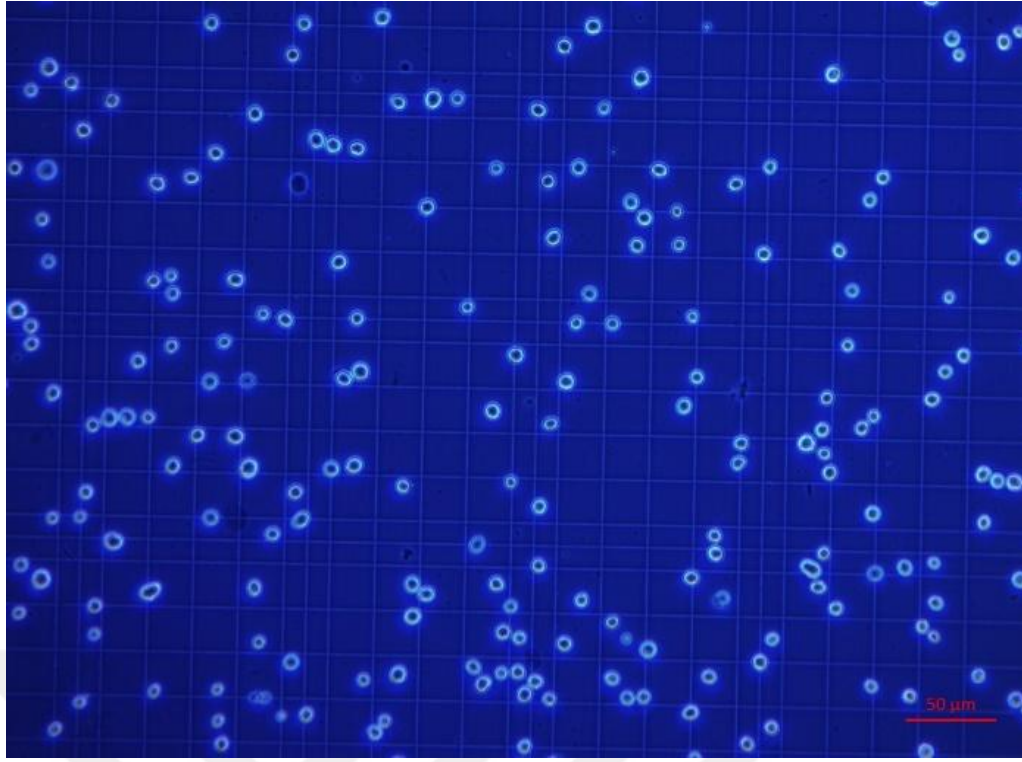
Hücreler büyütölüp tripsin ile kaldırma işlemi yapıldıktan sonra tripan mavisi ile boyanarak canlı hücreler sayıldı. Boyama işlemi, 10 µL hücre süspanسیونu üzerine 10 µL tripan mavisi boyası eklenerek yapıldı. Boyalı hücre süspanسیونundan 10 µL thoma lamına damlatılarak 10X büyütme oranında ışık mikroskobu altında sayım gerçekleştirildi. Hücre süspanسیونu içerisindeki genel hücre sayısı şu formüle göre hesaplandı:

$$\text{Hücre konsantrasyonu} = \frac{\text{Sayılan toplam hücre}}{16 \text{ adet kare}} \times 10000 \times \text{Dilüsyon faktörü}$$

Canlı hücre sayısı ise şu formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ Canlı hücre} = \left[1,00 - \left(\frac{\text{mavi boyanan hücre sayısı}}{\text{toplam hücre sayısı}} \right) \right] \times 100$$

Hücre sayımı sonrası Tablo 13’te verilen miktarlara göre flasklara ekim yapıldı. Hücre sayımında kullanılan thoma lamı ve mikroskop altındaki görüntüsü Şekil 6’da verildi.



Şekil 6. Tripan mavisi ile boyanan hücrelerin ışık mikroskopundaki görüntüsü (50 µm).

Proliferasyon ve Sitotoksikite Testleri

Manyetofektin içeriğinin hücreler üzerindeki proliferatif ve sitotoksik etkisinin belirlenmesi için MTS testi (MTS Cell Proliferation Assay Kit (Colorimetric), 197010, ABCAM) yapıldı. T25 flasksında MCF-10A büyüme ortamı ile hücreler büyütüldü. Hücreler flaskta %80 doluluk oranına ulaştıktan sonra tripsin ile yüzeyden kaldırıldı ve 96 kuyucuklu kültür kaplarına, her bir kuyucukta 7.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekimden 24 saat sonra hücrelere uygulama yapıldı.

96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen hücrelere 10-100 µg/mL konsantrasyonlarında MSNP, MSNP@PEI ve MSNP-NH₂ uygulandı. Uygulama sonrası hücreler 30 dakika manyetik alana maruz bırakıldı ve 48 saat inkübasyonun ardından canlılık belirlendi. PEI uygulaması için ise nötral ve bazik PEI'ler, 0,1-10 µg/mL konsantrasyonlarında PEI hazırlandı. Hazırlanan PEI'ler 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen hücrelere uygulandıktan 48 saat sonra canlılık testi (MTS) yapıldı.

MTS testi kısaca şu şekilde yapıldı; uygulamadan 48 saat sonra büyüme ortamı uzaklaştırılıp hücreler üç kez PBS ile yıkandı. Hücrelere 200 µL büyüme ortamı ve 20 µL MTS çözeltisi eklendikten sonra 3 saat inkübatör içerisinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası absorbans değerleri, mikropate okuyucu ile ölçüldü. Hücre canlılığı (%) şu formüle göre hesaplandı:

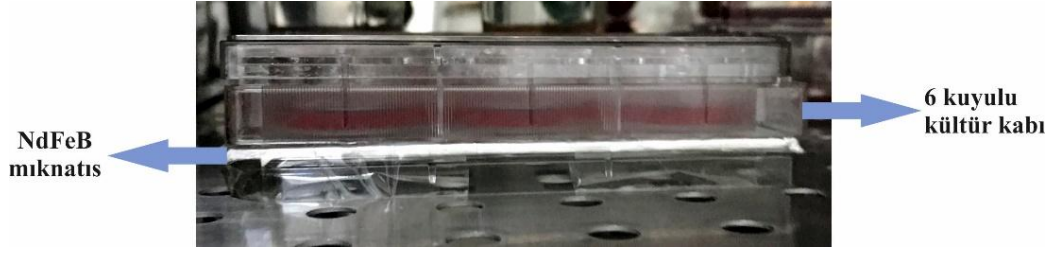
$$\% \text{ canlılık} = \frac{\text{absorbans(muamele)}}{\text{absorbans(kontrol)}} \times 100$$

Manyetik Nanopartiküllerin Hücresel Alınımının Belirlenmesi

Üretilen Oregon Green etiketli silika kaplı MSNP'lerin ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -Oregon Green) manyetik alan uygulamasıyla hücreler tarafından alınımı belirlendi. Bunun için; T-75 flaskında büyütülen MCF-10A hücreleri tripsin yardımıyla yüzeyden kaldırılarak 12 kuyulu kültür kabının içine yerleştirilen yuvarlak lamellere ekildi. Lameller kullanılmadan önce etanol ile steril edilip PBS ile durulandı. Her bir kuyuya 20.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler, 48 saat boyunca inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin üzerine 150 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda hazırlanan Oregon-Green etiketli MSNP'ler uygulandı. Manyetik alan uygulama süresini belirlemek için hücreler, neodmiyum mıknatıs üzerinde 0, 15, 30, 60 dakika tutuldu. Uygulama işleminden sonra hücreler 4 saat boyunca inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler 2 kez PBS ile yıkandı. Fiksasyon amacıyla hücrelere 1 mL %4 PFA eklendi ve bu şekilde oda şartlarında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 2 kez PBS ile yıkandı ve hücrelerin üzerine 1 mL %0,3 tritonX-100 eklendi. 5 dakika inkübasyonun ardından hücreler PBS ile yıkandı. Yıkama sonrası kuyulara metanol içinde çözülerek 1 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda hazırlanmış DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) solüsyonu eklendi ve 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. PBS ile 2 kere yıkandıktan sonra lazer taramalı konfokal mikroskop ile görüntülendi.

pCMV-Azu-GFP'nin MCF-10A Hücrelerine Manyetofeksiyonu

MCF-10A hücreleri T-75 flasklarına ekilerek büyütüldü. Flask içerisinde yeterli doluluk oranına ulaşan hücreler pasajlanarak 6 kuyulu kültür kaplarına her bir kuyuda 300.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekimi yapılan hücreler 24 saat inkübatör içerisinde inkübe edildikten sonra uygulama yapıldı. Uygulama gruplarında manyetofektin için 25, 50 ve 75 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda MSNP-NH₂ kullanıldı. 3 ve 9 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda pCMV-Azu-GFP kullanıldı. PEI N/P:23, 35, 46, 103, 207, 310 oranlarında kullanıldı. Manyetofektinler 1,5 mL'lik tüplerde hazırlandı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Manyetofektinler hazırlandıktan sonra 6 kuyulu kaplarda büyütülen hücrelere uygulandı ve hücrelere 30 dakika manyetik alan uygulandı. Uygulamadan 4 saat sonra hücre ortamı çekildi ve taze büyüme besiyeri eklendi. Uygulama yapılan hücreler 48 saat inkübatörde inkübe edildi.



Şekil 7. Manyetofeksiyon ile gen aktarımı yapılan hücreler.

Füzyon protein varlığının gösterilmesi

MCF-10A hücrelerine manyetofeksiyon yöntemiyle aktarılan pCMV-Azu-GFP ile Azu-GFP füzyon protein ekspresyonunun gerçekleştirildiğini belirlemek için fiksasyon işlemi yapılarak lazer taramalı konfokal mikroskop ile görüntü alındı.

Western blot analizi

Transfekte edilen hücrelerde azurin ekspresyonunu teyit etmek için western blot analizi yapıldı. Hücre içi ifade edilen füzyon proteine ulaşmak için hücreler RIPA tamponu ile parçalandı. TCA ile çöktürülen hücre lizatları western blot analizinde kullanıldı.

Hücre lizatı hazırlama

Uygulamadan 48 saat sonra hücreler tripsin ile kaldırıldı ve santrifüj yardımıyla toplandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peletinin üzerine 1 mL PBS eklenerek pelet, pipet yardımıyla dağıtıldı. Tekrar santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre peletinin üzerine 200 µL 1X RIPA (Radyoimmünopresipitasyon) tamponu (1mM PMSF (fenilmetilsülfonil florür) içeren) eklenerek pelet, pipet yardımıyla dağıtıldı. Hazırlanan hücre süspansiyonu 5 dakika boyunca buz içerisinde inkübe edildi. Inkübasyon sonrası hücre süspansiyonu +4°C'ye soğutulan sonikatör içerisinde 10 dakika boyunca bekletildi. Sonikasyon işlemi sonrası örnekler, 14.000 g'de +4°C'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar alındı ve alikuatlanarak -80°C'ye kaldırıldı.

TCA ile protein çöktürme

Hazırlanan hücre lizatlarından 150 µL alındı ve üzerlerine Tablo 4'te tarif edildiği gibi hazırlanan TCA çözeltisinden 37,5 µL eklendi. Hazırlanan karışım +4 °C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra 13.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra peletin üzerine yıkama için 200 µL soğuk aseton eklendi ve 13.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Yıkama işlemi aynı şekilde bir kere daha tekrarlandı. Aseton ile yıkanan örnekler 95 °C'de bekletilerek asetonun tamamen uzaklaşması sağlandı (Ünver, 2014).

SDS-PAGE jelinde proteinlerin yürütülmesi

SDS-PAGE jeli hazırlamak için öncelikle elektroforez plakaları ve aparatları saf su ve etanol ile temizlenerek jel hazırlama aparatına yerleştirildi. Cam plakalar arasına hazırlanan ayırma jeli (Tablo 14) pipet yardımıyla döküldü ve jelin üst kısmı izopropanol ile dolduruldu. Ayırma jeli polimerleştikten sonra izopropanol uzaklaştırılarak polimerleşen jelin üzerine yığma jeli (Tablo 14) ilave edildi. Yığma jeline tarak yerleştirildi ve polimerleşmesinden sonra tarak çıkarıldı. Cam plakalar elektroforez tankına konularak üzerine yürütme tamponu ilave edildi. Diğer yandan, TCA ile çöktürülen örneklerin üzerine 20 µL yükleme tamponu eklenerek süspanse edildi ve 95°C’de 5 dakika bekletildikten sonra kuyulara 15’er µL yüklendi. Örnekler ilk önce 60 V’de 30 dakika, daha sonra 120 V’de 70 dakika oda sıcaklığında yürütüldü (Laemmli, 1970).

Tablo 14. Ayırma ve Yığma Jeli Hazırlamada Kullanılan Malzemeler ve Miktarları

Malzemeler	Ayırma jeli için kullanılan miktar	Yığma jeli için kullanılan miktar
1 M Tris-HCl	2500 µL (pH 8,8)	220 µL (pH 6,8)
Akrilamid-Bisakrilamid	2200 µL	400 µL
%10’luk SDS	100 µL	15 µL
TEMED	65 µL	15 µL
Saf su	1565 µL	1225 µL
%10’luk PER	35 µL	20 µL

Blotlama

TCA çöktürmesi yapıp SDS-PAGE jelinde yürütülen proteinler, PVDF membrana blotlandı. Bu işlem için; SDS-PAGE jel elektroforezinde yürütülen jel, yıkandıktan sonra 1X transfer tamponu içerisinde 5 dakika bekletildi. Membranlar kullanılmadan önce 5 dakika metanol ile muamele edildi. Daha sonra membran 1X transfer tamponu içerisine alındı ve 5 dakika bekletildi. SemiDry Blotlama cihazına (Bio-Rad Trans-Blot® Turbo™ Transfer System) sırayla 4-5 parça blot kağıdı, nitroselüloz membran, jel ve 4-5 parça blot kağıdı konulup cihaz kapatıldı. Blotlama işlemi, 25V, 2,5A, 7 dakika yapıldı. Süre sonunda membran 10 mL bloklama tamponuna alınıp 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonun ardından membran, 20 mL ‘PBST’ (Phosphate-Buffered Saline + Tween 20) ile 2 kez 5 dakika yıkandı. 6 mL bloklama tamponuna 1 µL anti-Azurin antikoru (SICGEN) (1.antikor) ilave edildi ve membranın üzerine dökülerek 1 gece +4°C’de inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası membran 20 mL PBST ile yavaşça çalkalanarak 3 kez 5 dakika yıkandı. Yıkama sonrası 6 mL bloklama tamponuna 1 µL Anti-Goat IgG H&L (HRP) (2. antikor) ilave edildi. Membran ikinci antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası membran

20 mL PBST ile yavaşça çalkalanarak 6 kez 5 dakika yıkandı. Femto ve Pico substratları (ECL reagent) ile antikorun kimyasal sinyal oluşturmaları sağlandı ve membran ChemiDoc™ Touch Imaging System ile görüntülendi.

İstatistiksel Analiz

Manyetofektin hazırlama ve optimizasyon çalışmalarında elde edilen jel görüntülerinin bant yoğunluğu ImageJ yazılımı kullanılarak sayısal verilere dönüştürüldü. Elde edilen sayısal veriler GraphPad Prism yazılımı sürüm 5.0 kullanılarak bant yoğunluğu grafiği elde edildi.

Hücrel alım konfokal mikroskop görüntülerinin yeşil floresan şiddeti ImageJ yazılımı kullanılarak sayısal veriye dönüştürüldükten sonra GraphPad Prism yazılımı sürüm 5.0 ile grafik elde edildi.

MTS sonrası formazan boyasının verdiği absorbans değerleri, mikropate okuyucu ile 3 tekrar olacak şekilde okutulduktan sonra OrjinPro 8.5 yazılımı ile grafik elde edildi.

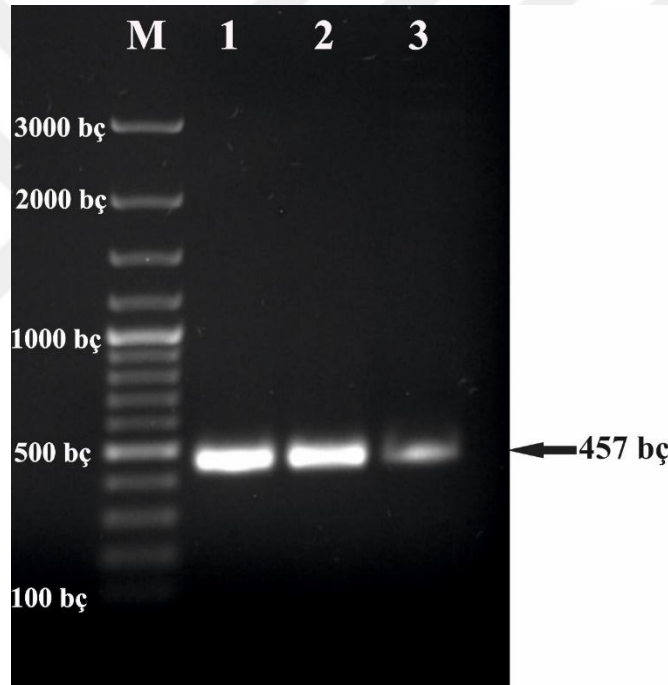
Tek yönlü ANOVA ile analiz yapıldı. Tüm veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak sunuldu. P değerleri < 0.05 anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel olarak önemli değişiklikler ‘*’ sembolle gösterildi.

ARAŞTIRMA BULGULARI

Rekombinant pCMV-Azu-GFP'nin Elde Edilmesi

Azurin genine ait sekansın kodon optimizasyonu ve amplifikasyonu

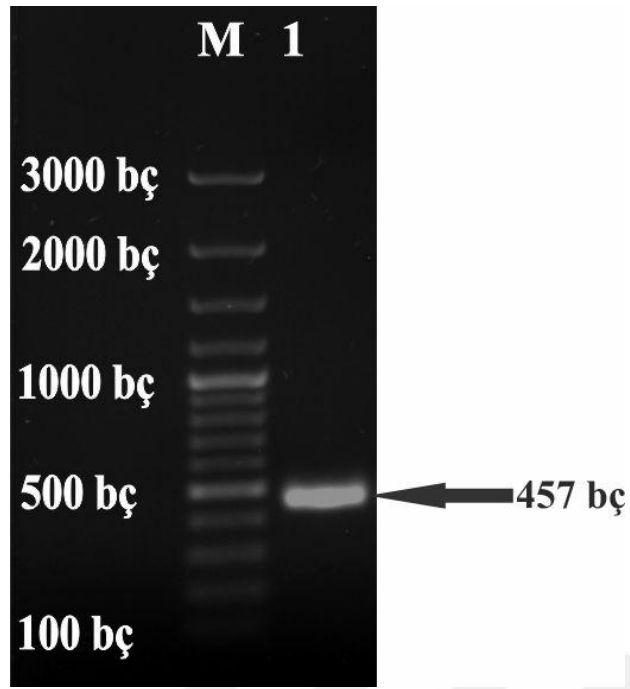
Kodon optimize edilen azurin genine ait nükleotid sekansının optimizasyondan önceki ve sonraki CAI değerlerinin 0,84 ve 0,95 olduğu aynı şekilde GC içeriğinin %61,97 iken %62,26 olduğu belirlendi. Azurin genine ait primerler için uygun bağlanma sıcaklığını belirlemek amacıyla Tablo 5'teki primerler kullanılarak Tablo 6'daki gibi gradiyent PCR yapıldı. Reaksiyon sonucu amplifiye edilen bölgenin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 8'de verildi. Elde edilen jel görüntüsünde beklenen boyutta (457 bp) bant gözlemlendi. Sonraki amplifikasyonlarda primer bağlanma sıcaklığı olarak 68°C tercih edildi.



Şekil 8. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1, 2 ve 3: sırasıyla; 68 °C, 68,5 °C ve 69 °C primer bağlanma sıcaklıkları ile elde edilen amplifikasyon ürünleri).

Azurin geninin ve pCMV-GFP'nin kesilmesi

Rekombinant pCMV-Azu-GFP'nin elde edilmesi için azurin geni Tablo 5'teki primerler kullanılarak yapılan PCR sonucu amplifiye edildi. Reaksiyon sonucu elde edilen ürünün agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 9'da verildi. Elde edilen jel görüntüsünde beklenen boyutta (457 bp) bant gözlemlendi.

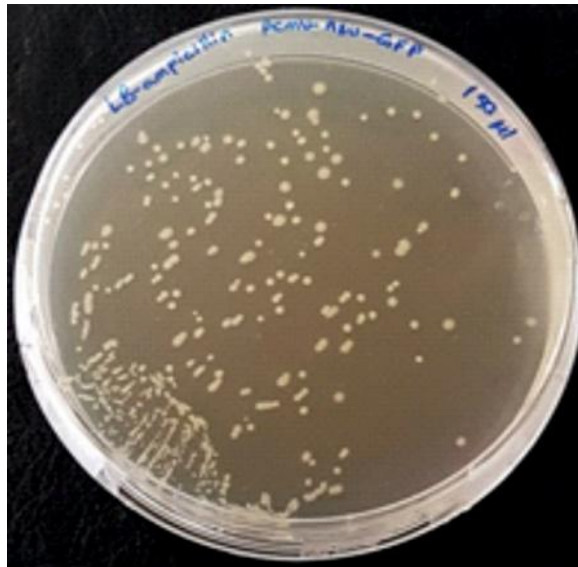


Şekil 9. Amplifiye edilen azurin genine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1: PCR ürünü)

PCR sonucu elde edilen DNA dizisi saflaştırıldıktan sonra *EcoRI* ve *KpnI* enzimleri ile kesim reaksiyonu gerçekleştirildi. Aynı enzimlerle pCMV-GFP için de kesim reaksiyonu gerçekleştirildi. Kesim sonucu vektör DNA jelden ekstrakte edildikten sonra kesilen PCR ürünü (azurin geni) ve vektör DNA'nın ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

***E. coli* JM109 hücrelerinin transformasyonu**

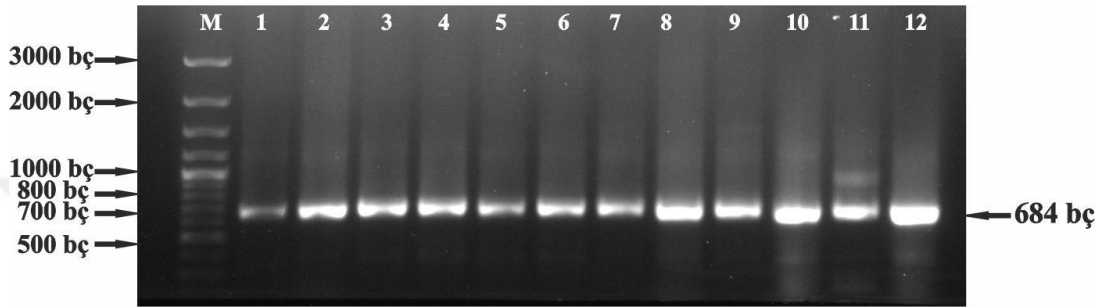
Ligasyon reaksiyonu sonucu elde edilen ligasyon ürünü kompetent yapılan *E. coli* JM109 hücrelerine transfer edildi. Transformasyon işlemi sonrası seçilen antibiyotiğe dirençli kolonilerin amfisilin içeren LB agardaki görüntüsü Şekil 10'da verildi.



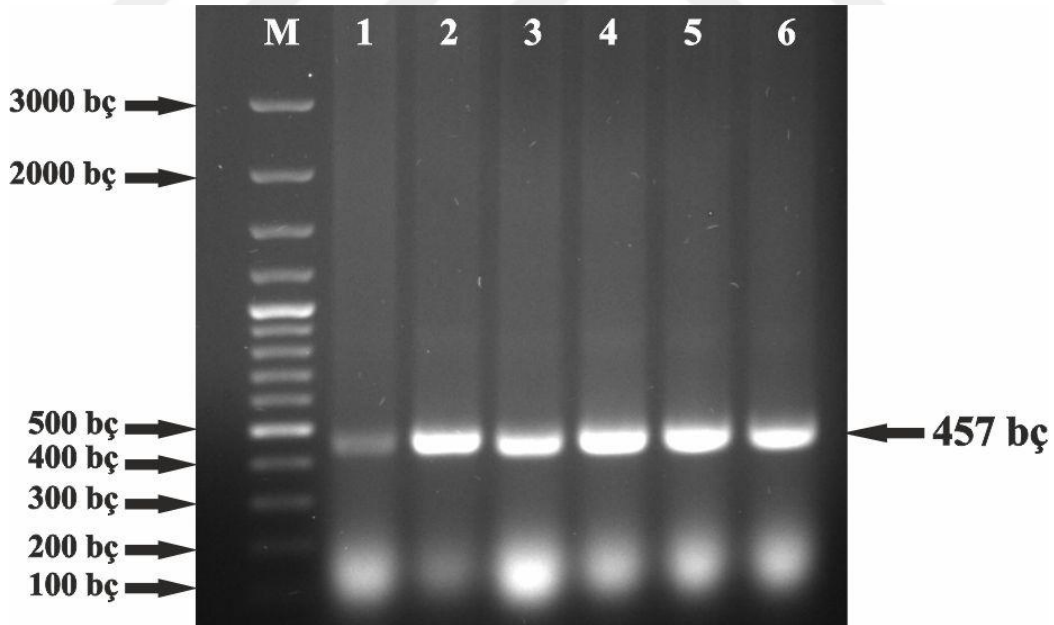
Şekil 10. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonileri

Koloni PCR ile transformantların doğrulanması

Transformasyon sonrası seçilen antibiyotiğe dirençli bakteri kolonilerinin insört diziyi içeren plazmiti taşıyıp taşımadığını belirlemek için koloni PCR yapıldı. Vektör primerleri (CMV-F ve EGFPN-R) ve vektöre yerleştirilen sekansa (insört) ait primerler (*EcoRI*-Azu-F ve *KpnI*-Azu-R) ile Tablo 11'deki gibi PCR gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 11 ve Şekil 12'de verildi. Görüntüleme sonucu, seçilen kolonilerde beklenen boyutta bantlar (vektör primerleri ile PCR ürünü: 684 bç, insört dizi: 457 bç) gözlemlendi.



Şekil 11. Vektör DNA'ya ait primerler ile gerçekleştirilen koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1-12: 1'den 12'ye kadar seçilen kolonilere ait PCR ürünleri)



Şekil 12. İnsört dizi primerleriyle gerçekleştirilen koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Markır; 1-6: 1'den 6'ya kadar seçilen kolonilere ait PCR ürünleri)

Rekombinant pCMV-Azu-GFP'nin sekans analizi ile doğrulanması

İnsört dizi ve vektör DNA'ya ait primerler ile yapılan koloni PCR sonucuna göre 6 numaralı koloniden plazmit saflaştırıldı. Elde edilen plazmit Sanger sekanslama ile doğrulandı (Şekil 13 ve Şekil 14).

Sequence ID: **Query_30485** Length: **1059** Number of Matches: **1**

Range 1: 77 to 532 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
843 bits(456)	0.0	456/456(100%)	0/456(0%)	Plus/Plus
Query 1	GAATTCATGCTGAGAAAACTCGCTGCCGTGTCCCTGCTGTCCCTGCTCAGCGCCCCCTG	60		
Sbjct 77	GAATTCATGCTGAGAAAACTCGCTGCCGTGTCCCTGCTGTCCCTGCTCAGCGCCCCCTG	136		
Query 61	CTGGCTGCCGAGTGACGCTGGACATCCAGGGCAACGACCAGATGCAGTTCAACACCAAT	120		
Sbjct 137	CTGGCTGCCGAGTGACGCTGGACATCCAGGGCAACGACCAGATGCAGTTCAACACCAAT	196		
Query 121	GCCATCACCGTGGACAAGAGCTGCAAGCAGTTACCGTCAACCTGTCCACCCCGGCAAC	180		
Sbjct 197	GCCATCACCGTGGACAAGAGCTGCAAGCAGTTACCGTCAACCTGTCCACCCCGGCAAC	256		
Query 181	CTGCCAAGAAGCTCATGGGCCACAACCTGGGTGCTGAGCACCGCCGCCGACATGCAGGGC	240		
Sbjct 257	CTGCCAAGAAGCTCATGGGCCACAACCTGGGTGCTGAGCACCGCCGCCGACATGCAGGGC	316		
Query 241	GTGGTCACCGACGGCATGGCTTCCGGCTGGACAAGGATTACCTGAAGCCCGACGACAGC	300		
Sbjct 317	GTGGTCACCGACGGCATGGCTTCCGGCTGGACAAGGATTACCTGAAGCCCGACGACAGC	376		
Query 301	AGAGTCATCGCCACACCAAGCTGATCGGCAGCGGCGAGAAGGACAGCGTGACCTTCGAC	360		
Sbjct 377	AGAGTCATCGCCACACCAAGCTGATCGGCAGCGGCGAGAAGGACAGCGTGACCTTCGAC	436		
Query 361	GTCTCCAAGCTGAAGGAAGGCGAGCAGTACATGTTCTTCTGCACCTTCCCGGCCACTCC	420		
Sbjct 437	GTCTCCAAGCTGAAGGAAGGCGAGCAGTACATGTTCTTCTGCACCTTCCCGGCCACTCC	496		
Query 421	GCCCTGATGAAGGGCACCTGACCTGAAGGGTACC	456		
Sbjct 497	GCCCTGATGAAGGGCACCTGACCTGAAGGGTACC	532		

Şekil 13. Vektör DNA'ya ait forward primerle gerçekleştirilen sekans analizi ile elde edilen nükleotid sekansının blast sonucu (Query: Referans alınan sekans, Sbjct: Sanger analiz sonucu elde edilen sekans)

Sequence ID: **Query_30981** Length: **1033** Number of Matches: **1**

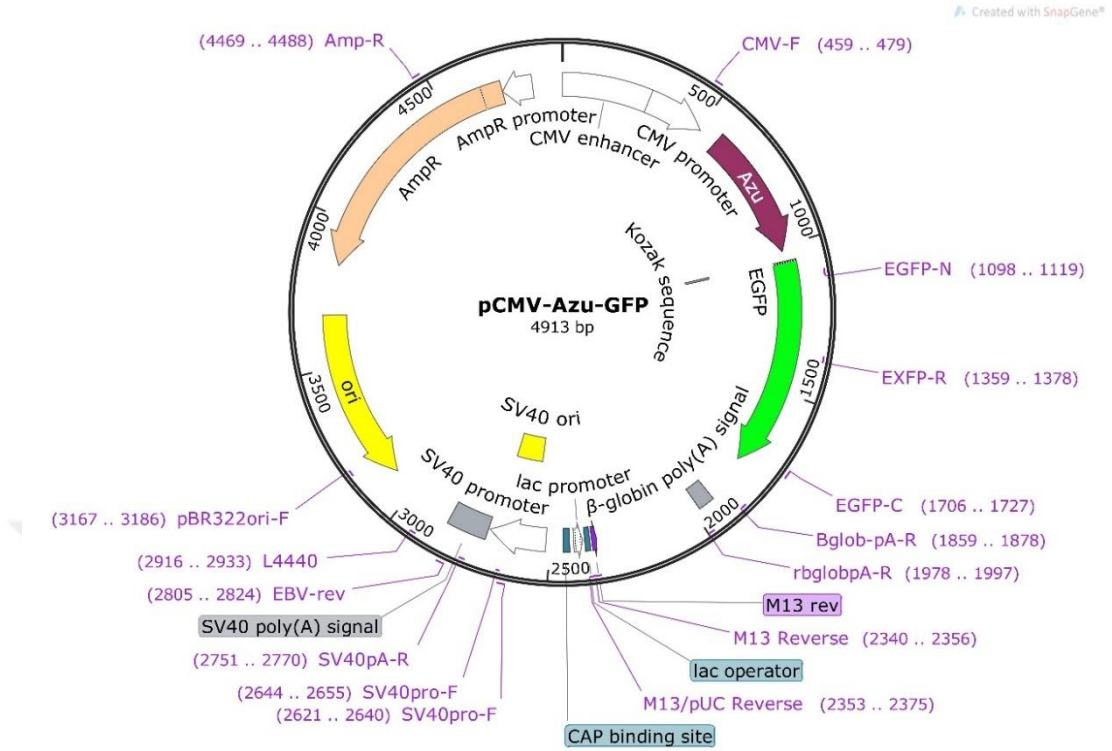
Range 1: 57 to 512 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
843 bits(456)	0.0	456/456(100%)	0/456(0%)	Plus/Minus
Query 1	GAATTCATGCTGAGAAAACTCGCTGCCGTGTCCCTGCTGTCCCTGCTCAGCGCCCCCTG	60		
Sbjct 512	GAATTCATGCTGAGAAAACTCGCTGCCGTGTCCCTGCTGTCCCTGCTCAGCGCCCCCTG	453		
Query 61	CTGGCTGCCGAGTGACGCTGGACATCCAGGGCAACGACCAGATGCAGTTCAACACCAAT	120		
Sbjct 452	CTGGCTGCCGAGTGACGCTGGACATCCAGGGCAACGACCAGATGCAGTTCAACACCAAT	393		
Query 121	GCCATCACCGTGGACAAGAGCTGCAAGCAGTTACCGTCAACCTGTCCACCCCGGCAAC	180		
Sbjct 392	GCCATCACCGTGGACAAGAGCTGCAAGCAGTTACCGTCAACCTGTCCACCCCGGCAAC	333		
Query 181	CTGCCAAGAAGCTCATGGGCCACAACCTGGGTGCTGAGCACCGCCGCCGACATGCAGGGC	240		
Sbjct 332	CTGCCAAGAAGCTCATGGGCCACAACCTGGGTGCTGAGCACCGCCGCCGACATGCAGGGC	273		
Query 241	GTGGTCACCGACGGCATGGCTTCCGGCTGGACAAGGATTACCTGAAGCCCGACGACAGC	300		
Sbjct 272	GTGGTCACCGACGGCATGGCTTCCGGCTGGACAAGGATTACCTGAAGCCCGACGACAGC	213		
Query 301	AGAGTCATCGCCACACCAAGCTGATCGGCAGCGGCGAGAAGGACAGCGTGACCTTCGAC	360		
Sbjct 212	AGAGTCATCGCCACACCAAGCTGATCGGCAGCGGCGAGAAGGACAGCGTGACCTTCGAC	153		
Query 361	GTCTCCAAGCTGAAGGAAGGCGAGCAGTACATGTTCTTCTGCACCTTCCCGGCCACTCC	420		
Sbjct 152	GTCTCCAAGCTGAAGGAAGGCGAGCAGTACATGTTCTTCTGCACCTTCCCGGCCACTCC	93		
Query 421	GCCCTGATGAAGGGCACCTGACCTGAAGGGTACC	456		
Sbjct 92	GCCCTGATGAAGGGCACCTGACCTGAAGGGTACC	57		

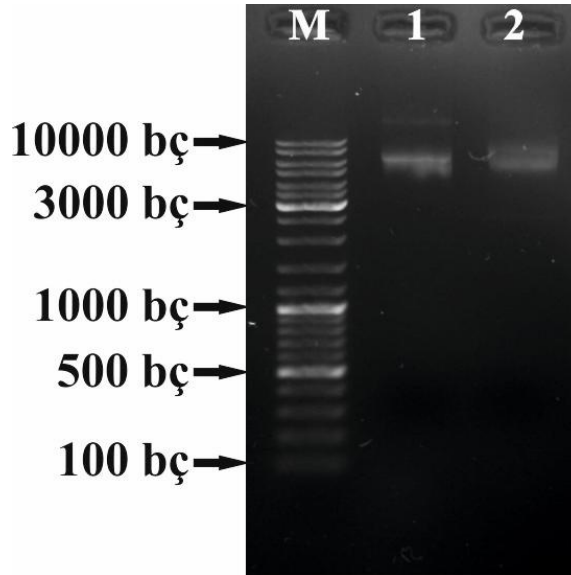
Şekil 14. Vektör DNA'ya ait reverse primerle gerçekleştirilen sekans analizi ile elde edilen nükleotid sekansının blast sonucu (Query: Referans alınan sekans, Sbjct: Sanger analiz sonucu elde edilen sekans)

Böylelikle blastlama sonucu ile azurin geninin pCMV-GFP'ye %100 doğrulukla yerleştirildiği görüldü. Rekombinant pCMV-Azu-GFP DNA'sının şekli, Şekil 15'te verildi.



Şekil 15. pCMV-Azu-GFP

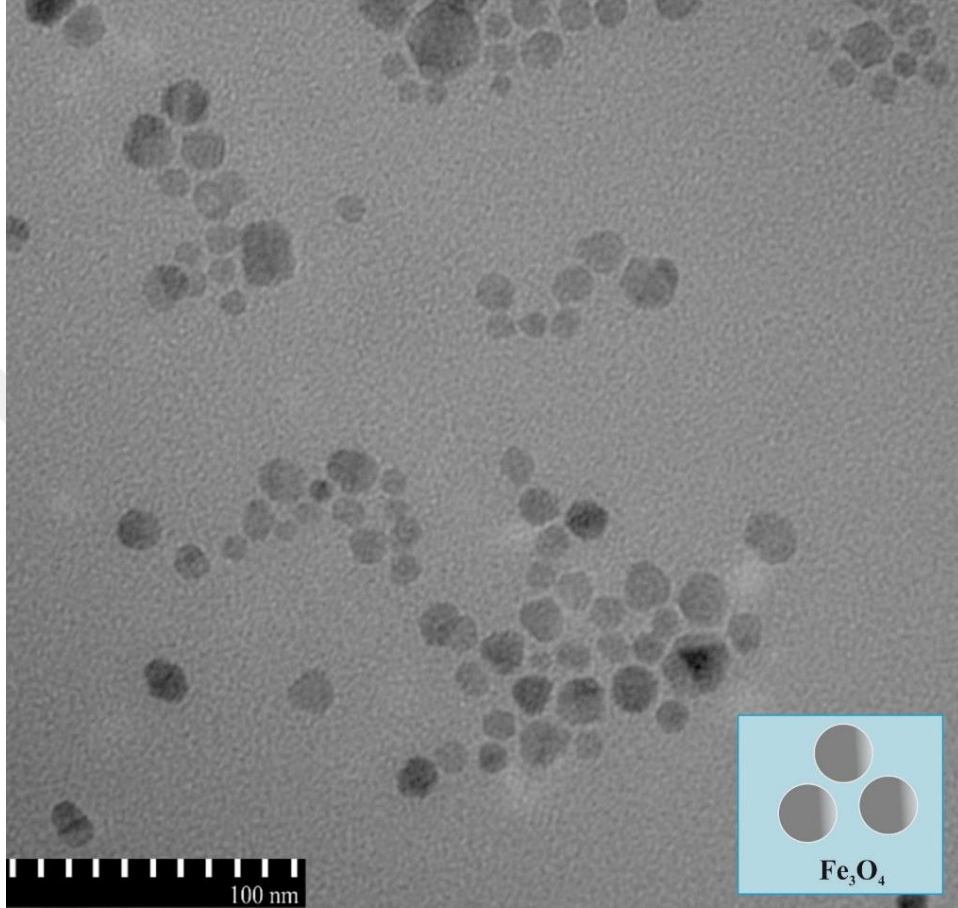
pCMV-GFP'ye azurin geninin entegrasyonu sonucu elde edilen pCMV-Azu-GFP vektörü %1'lik agaroz jel elektorforezinde yürütüldü ve jel görüntüsü Şekil 16'da verildi.



Şekil 16. pCMV-GFP ve pCMV-Azu-GFP'nin agaroz jel elektroforez görüntüsü. (M: markır; 1: pCMV-GFP; 2: pCMV-Azu-GFP)

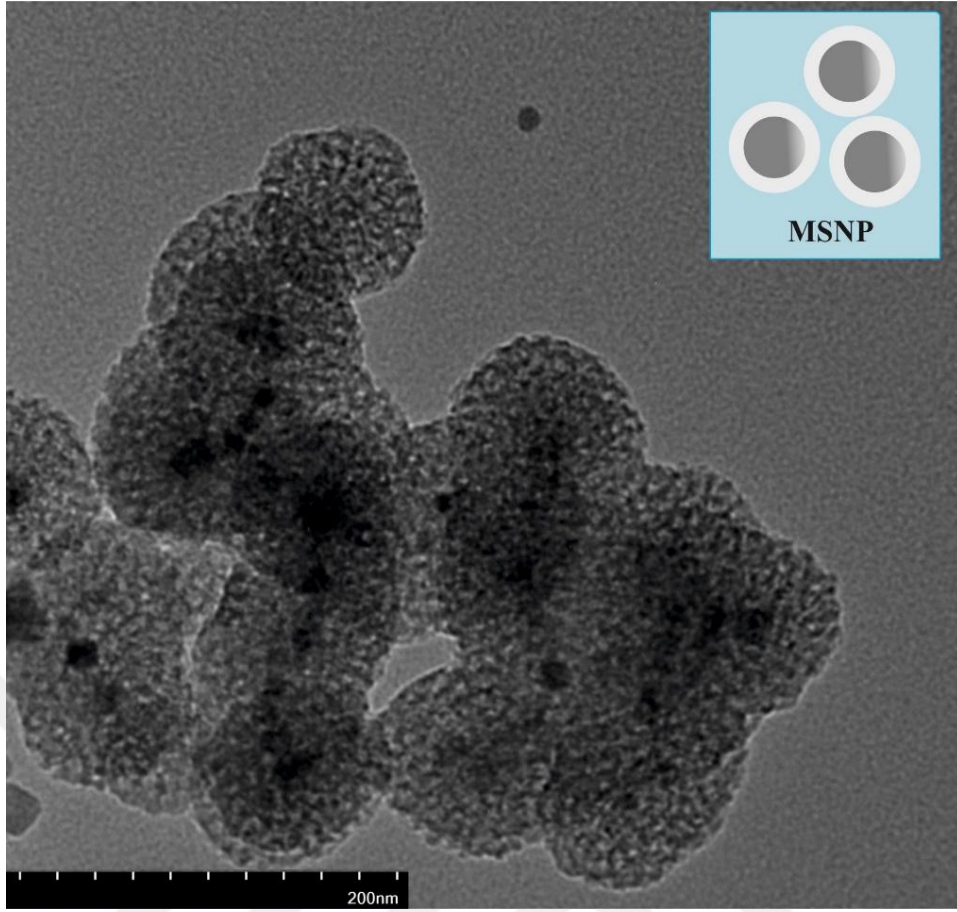
Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Vektöre manyetik özellik sağlayan manyetik çekirdeğin yapısal karakterizasyonuna ait TEM görüntüsü Şekil 17’de verildi. TEM sonucuna bakıldığında, demir oksit MNP’lerin monodispers ve ortalama 20 nm boyutlarında olduğu görüldü. Ayrıca manyetitin küresel şekle sahip olduğu gözlemlendi.



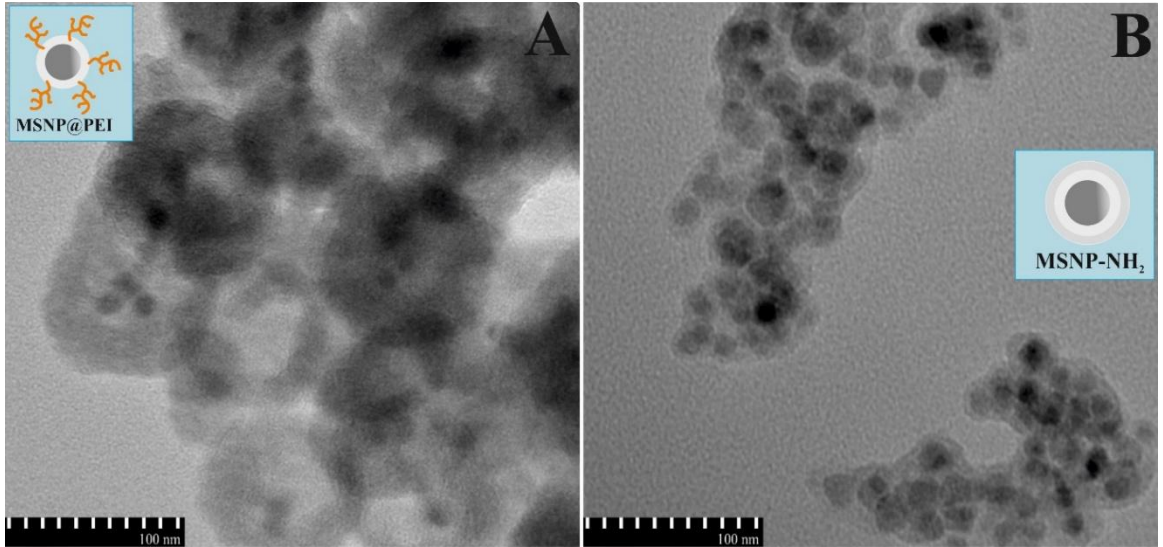
Şekil 17. Fe₃O₄ (manyetit) TEM görüntüsü.

Manyetitlerin yüzeyi silika ile kaplandıktan sonra kaydedilen TEM görüntülerinde, çekirdek kabuk yapısı ve CTAB uzaklaştırıldığı için oluşan gözenekler net olarak görüldü (Şekil 18).



Şekil 18. Çekirdek/kabuk yapısındaki mezogözenekli MSNP'lerin TEM görüntüsü.

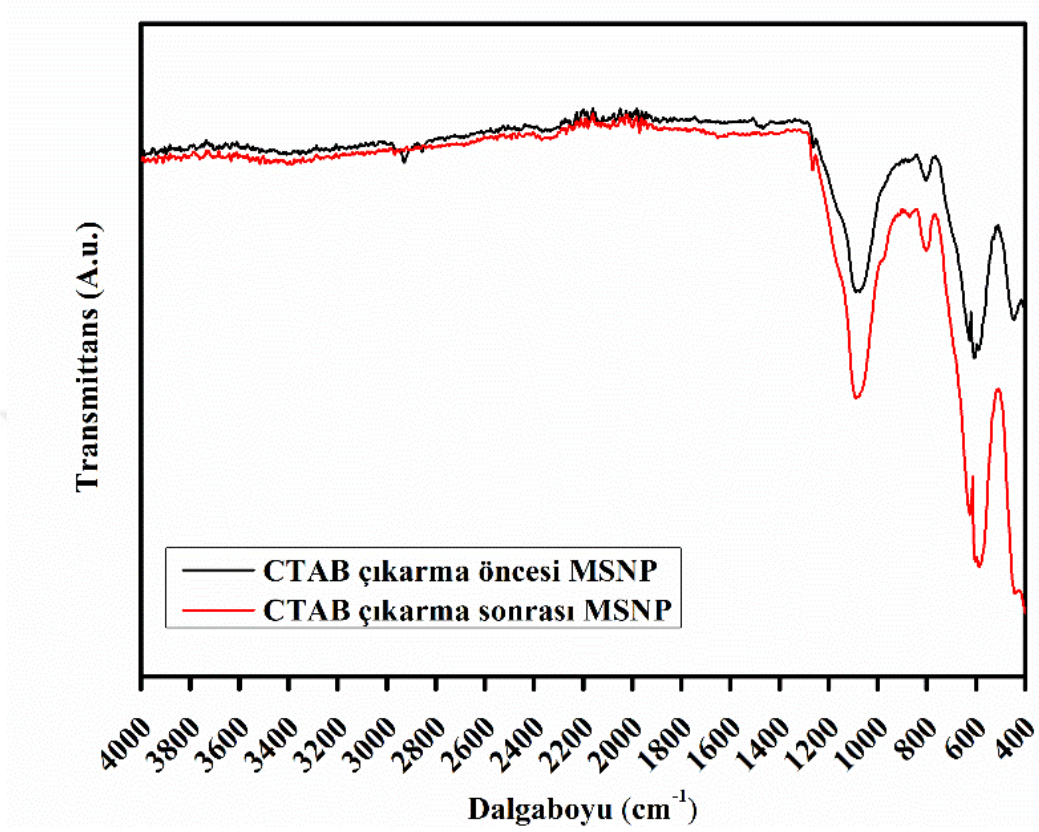
MSNP'lerin PEI kaplama ve APTES ile modifikasyon işlemlerinin ardından kaydedilen TEM görüntülerine bakıldığında, MSNP@PEI ve MSNP-NH₂ boyutunun 100 nm'den küçük olduğu görüldü (Şekil 19 A, Şekil 19 B).



Şekil 19. MSNP@PEI ve MSNP-NH₂'ye ait TEM görüntüsü (A. MSNP@PEI, B. MSNP-NH₂).

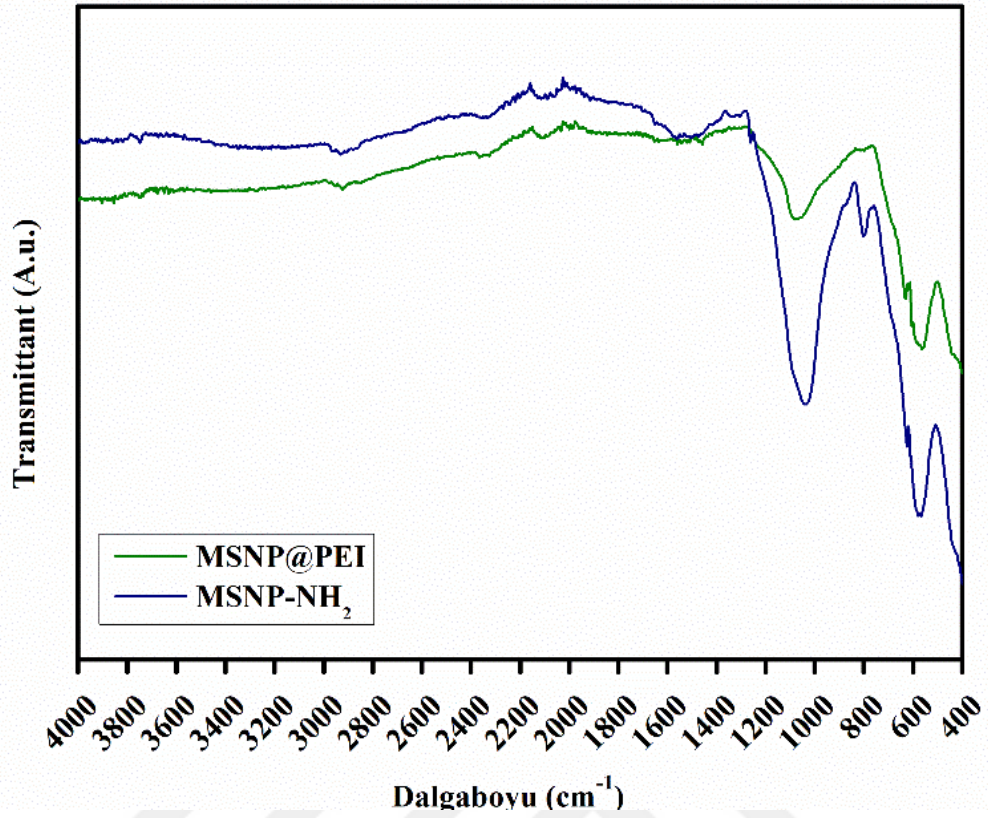
Silika kaplı manyetitin üretim aşamasında, manyetitin su fazına alınması için kullanılan CTAB'ın varlığı ve sentez tamamlandıktan sonra yapıdan uzaklaştırılma başarısı FTIR ile

doğrulandı. Sentezlenen silika kaplı MNP'lerden kaydedilen FTIR spektrumunda, CTAB'a ait -CH zincir yapısı 2888-2995 cm^{-1} 'de net olarak görüldü (Şekil 20) ve bu pikler CTAB çıkarma işleminden sonra gözlenmedi. Silikanın varlığı 800 cm^{-1} ve 1080 cm^{-1} 'de beliren pikler ile anlaşıldı. Yapının yüzeyinin -OH gruplarını barındırdığı, 3403 cm^{-1} 'de görülen pik ile anlaşıldı.



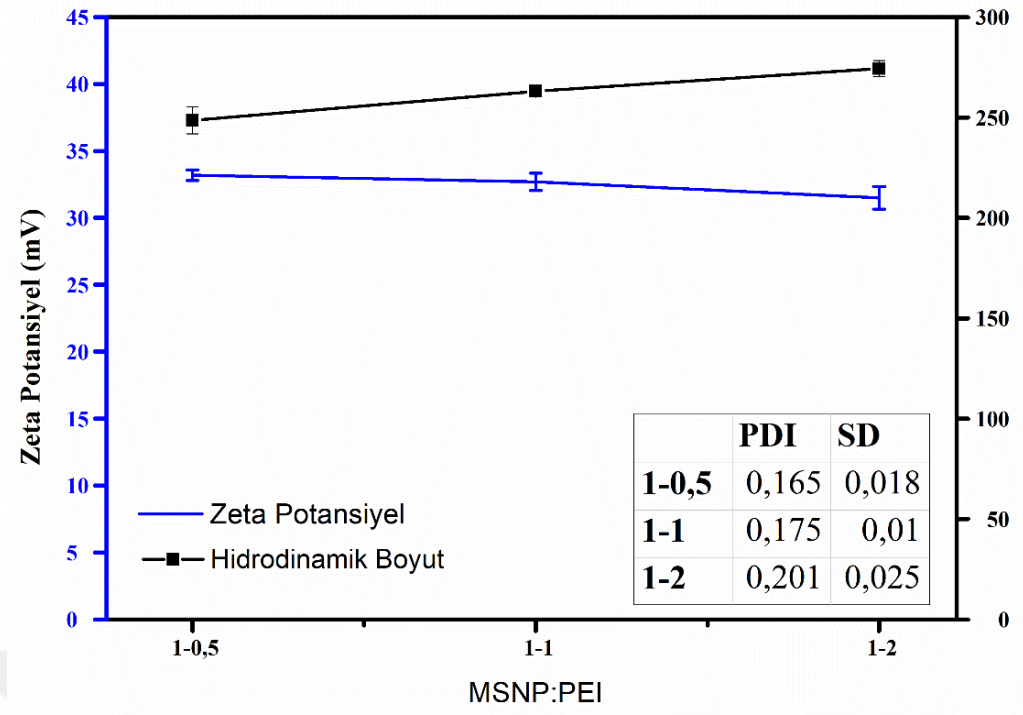
Şekil 20. CTAB çıkarma öncesi ve sonrası MSNP'lerin FTIR analizi

Yüzey modifikasyonları sonunda elde edilen MSNP@PEI ve MSNP-NH₂ yüzeyinin kimyasal yapısının karakterizasyonu FTIR analizi ile yapıldı. PEI ve APTES yapısında bulunan amin bağına ait pik 1562 cm^{-1} 'de görüldü (Şekil 21). Ayrıca PEI ve APTES yapısında bulunan -C-H zincirine ait pikler yine 2811 ve 2892 cm^{-1} 'de görüldü.



Şekil 21. MSNP@PEI ve MSNP@NH₂'ye ait FTIR analizi.

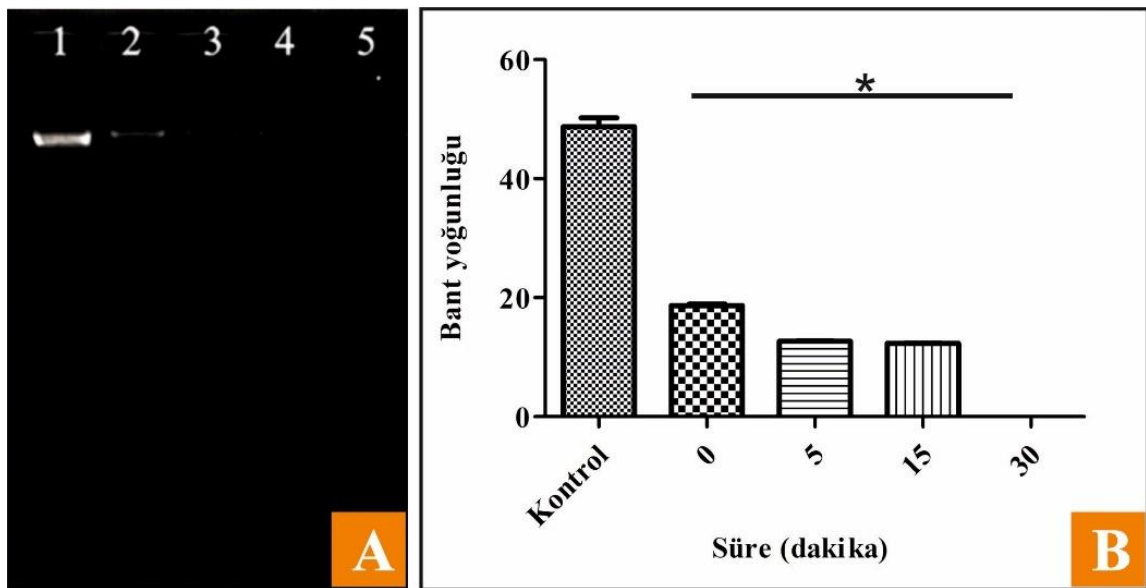
Farklı oranlarda PEI kullanarak MSNP yüzeyi PEI ile kaplandı. Elde edilen MSNP@PEI'lerin yüzey yükünün belirlenmesi için DLS analizi yapıldı. Şekil 22'deki zeta potansiyeline bakıldığında MSNP@PEI'lerin yüzey yükünün pozitif olduğu görülürken, MSNP@PEI'lerin hidrodinamik boyutlarının (R_h) ortalama 260 nm olduğu görüldü. DLS analizi ile nanopartiküllerin polidispersite indeksi (PDI) incelendiğinde, değerlerin 0,165-0,201 arasında olduğu belirlendi (Şekil 22).



Şekil 22. MSNP:PEI'ye ait DLS analizi

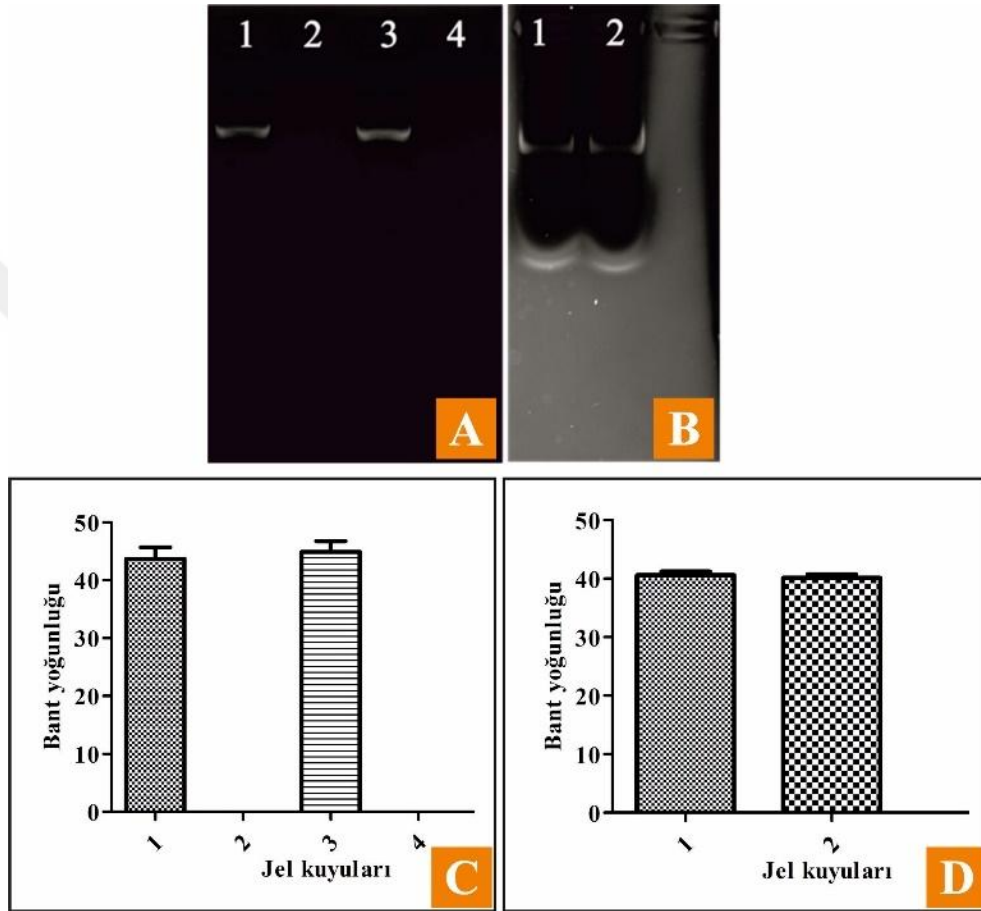
Manyetofektin Hazırlama ve Optimizasyonu

Manyetofektin hazırlama sırasında MNP/DNA etkileşim süresini belirlemek için manyetofektinler, 0, 5, 15, 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Belirlenen sürelerde inkübe edilen manyetofektinler agaroz jel elektoroforezinde yürütölüp görüntülendi. Şekil 23'teki jel görüntüsüne bakıldığında, 30 dakika inkübe edilen manyetofektin grubunda DNA'ya ait bandın kaybolduğu görüldü. Diğer bir deyişle, DNA'nın tamamının MSNP tarafından tutulduğu, dolayısıyla manyetofektin süresi arttıkça DNA bağlanmasının arttığı görüldü.



Şekil 23. DNA bağlanma süresi deneyine ait agaroz jel elektorofrez görüntüsü (A) ve bant yoğunluğunun istatistiksel analizi (B) (1: kontrol, PBS içinde pCMV-GFP (1 µg/25µL); 2-5. kuyular: manyetofektin inkübasyon süreleri, sırasıyla; 0, 5, 15 ve 30 dakika)

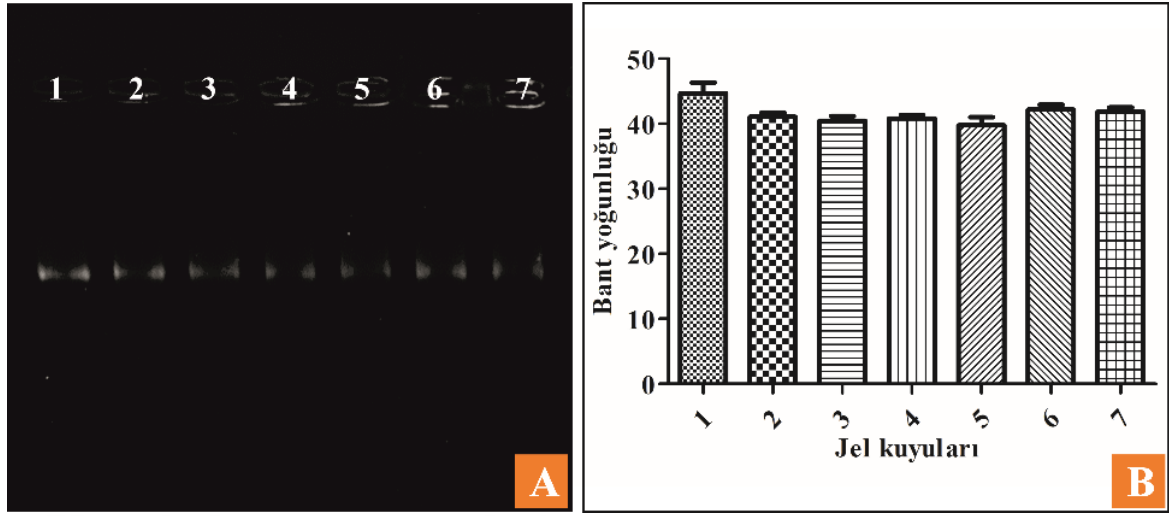
Süre çalışmasından sonra uygun manyetofektin ortamının belirlenmesi için hücre büyüme besiyeri (serum ve antibiyotik içermeyen) ve PBS ortamında manyetofektin hazırlandı. Manyetofektinler, agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntülendi. Şekil 23 A'daki jel görüntüsüne bakıldığında, hücre büyüme besiyeri ve PBS ortamında hazırlanan manyetofektinlerde, DNA'nın çoğunluğunun MNP'lere bağlandığı görüldü. Şekil 23 B'deki DNA salım jel görüntüsüne bakıldığında ise hücre büyüme besiyeri ve PBS ortamında hazırlanan manyetofektinlerin ikisinde de aynı miktarda DNA bağlandığı görüldü.



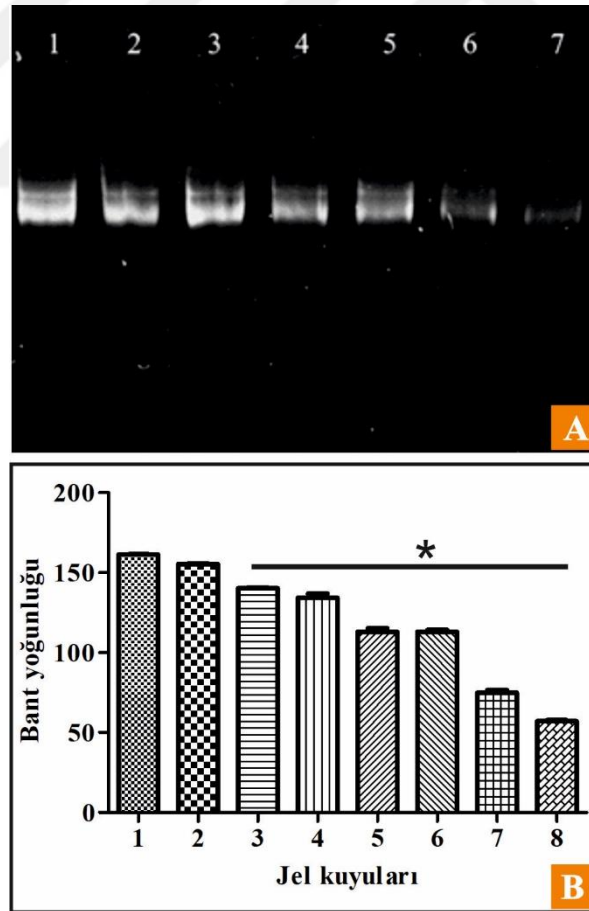
Şekil 24. A. Uygun manyetofektin ortamı belirleme deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (1. kuyu: kontrol, PBS içinde pCMV-GFP (1 µg/25µL); 2. kuyu: PBS içinde hazırlanan manyetofektin; 3. kuyu: hücre büyüme besiyeri içinde pCMV-GFP (1 µg/25µL); 4. kuyu: hücre büyüme besiyeri içinde hazırlanan manyetofektin) B. Manyetofektin DNA salım deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (1. kuyu: PBS içinde hazırlanan manyetofektin DNA salımı; 2. kuyu: hücre büyüme besiyeri içinde hazırlanan manyetofektin DNA salımı). C ve D, A ve B'de yer alan jel görüntülerine ait bant yoğunluğu istatistiksel analizi.

Farklı konsantrasyonlarda MSNP, MSNP@PEI ve MSNP-NH₂ kullanılarak 1 µg DNA'nın bağlanması için manyetofektinler hazırlandı. Hazırlanan manyetofektinler, jelde yürütülerek görüntülendi. Şekil 25'teki jel görüntüsüne bakıldığında, modifiye edilmemiş haliyle MSNP'nin artan konsantrasyonda bile ortamdaki tüm DNA'nın az bir miktarının bağlandığı görüldü. Şekil 26'daki jel görüntüsüne bakıldığında, pozitif yüklü PEI ile kaplanan MSNP@PEI'nin artan konsantrasyonların DNA'nın daha çok bağlandığı görüldü. Şekil

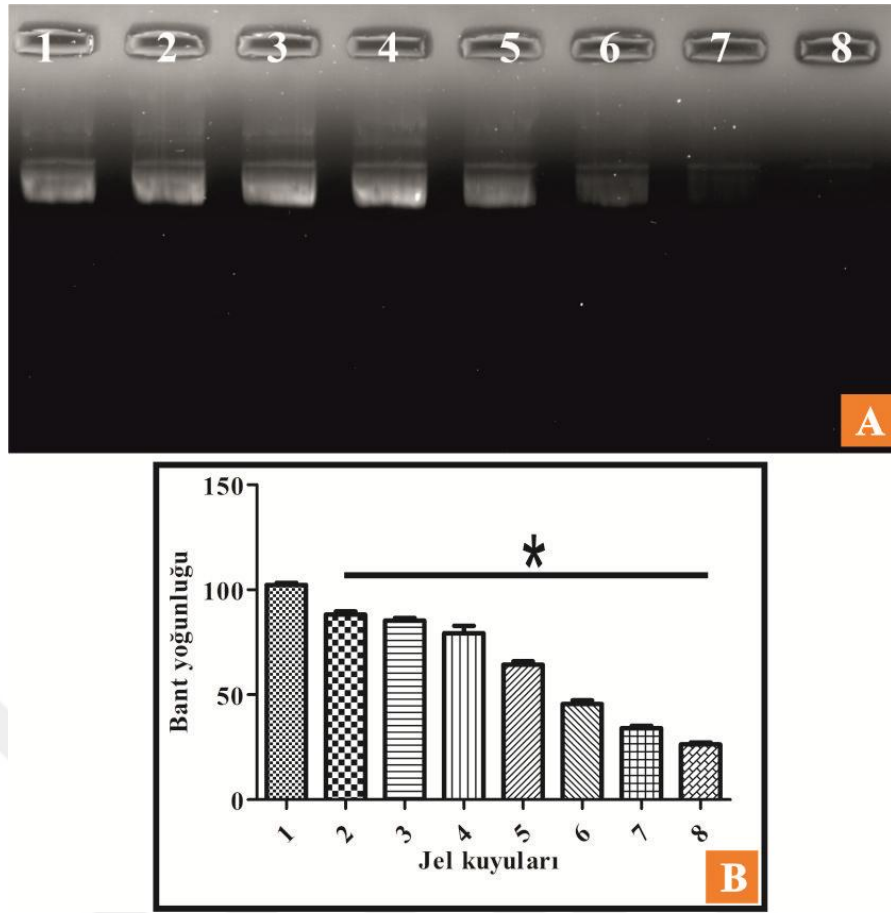
27'deki jel görüntüsüne bakıldığında ise artan MSNP-NH₂ konsantrasyonuyla birlikte bağlanan DNA'nın miktarının arttığı görüldü.



Şekil 25. MSNP miktar optimizasyonu deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (A) ve bant yoğunluğunun istatistiksel analizi (B) (1. kuyu: kontrol, PBS içinde pCMV-GFP (1 µg/25µL); 2-7. kuyular: sırasıyla; 1, 2,5, 5, 10, 20, 25 µg MSNP ile hazırlanan manyetofektinler)

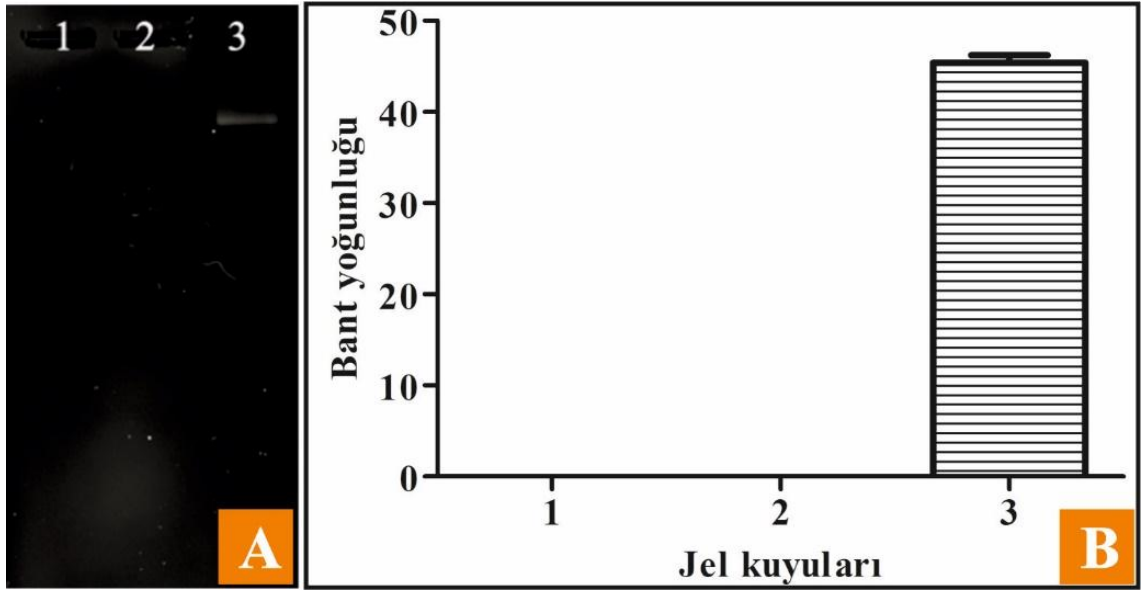


Şekil 26. MSNP@PEI miktar optimizasyonu deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (A) ve bant yoğunluğunun istatistiksel analizi (B) (1. kuyu: kontrol, PBS içinde pCMV-GFP (1 µg/25µL); 2-8. kuyular: sırasıyla; 1, 2,5, 5, 10, 20 ve 25 µg MSNP@PEI ile hazırlanan manyetofektinler)



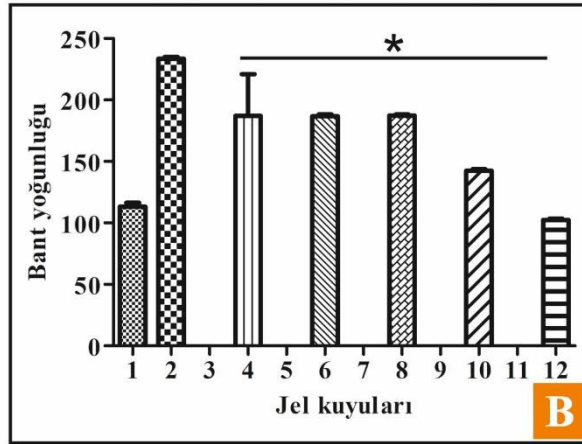
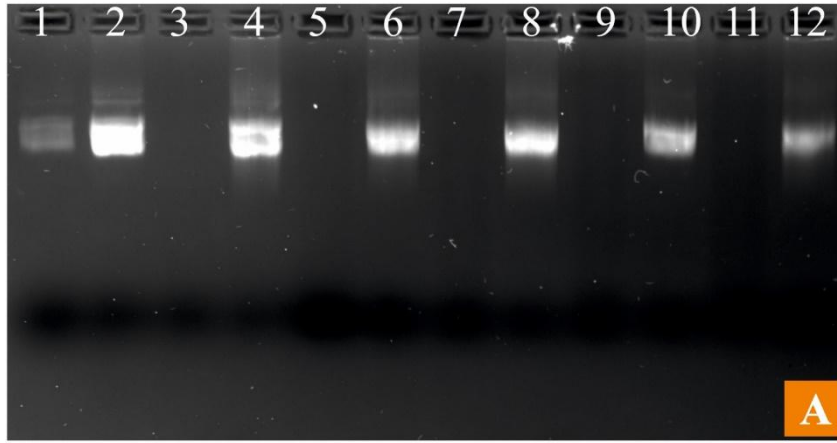
Şekil 27. MSNP-NH₂ miktar optimizasyonu deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (A) ve bant yoğunluğunun istatistiksel analizi (B) (1. kuyu: kontrol, PBS içinde pCMV-GFP (1 µg/25µL); 2-8. kuyular: sırasıyla; 2,5, 5, 10, 25, 50, 75, 100 µg MSNP-NH₂ ile hazırlanan manyetofektinler)

Manyetofektin hazırlarken kullanılan ekstra PEI'nin pH değeri değiştirilerek nötral ve bazik pH'da PEI (nPEI ve bPEI) ile DNA bağlama çalışmaları yapıldı. Karışımlar, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Şekil 28'deki jel görüntüsüne bakıldığında, N/P:4 oranındaki nPEI ve bPEI'nin 1 µg DNA'nın tamamını bağladığı görüldü.



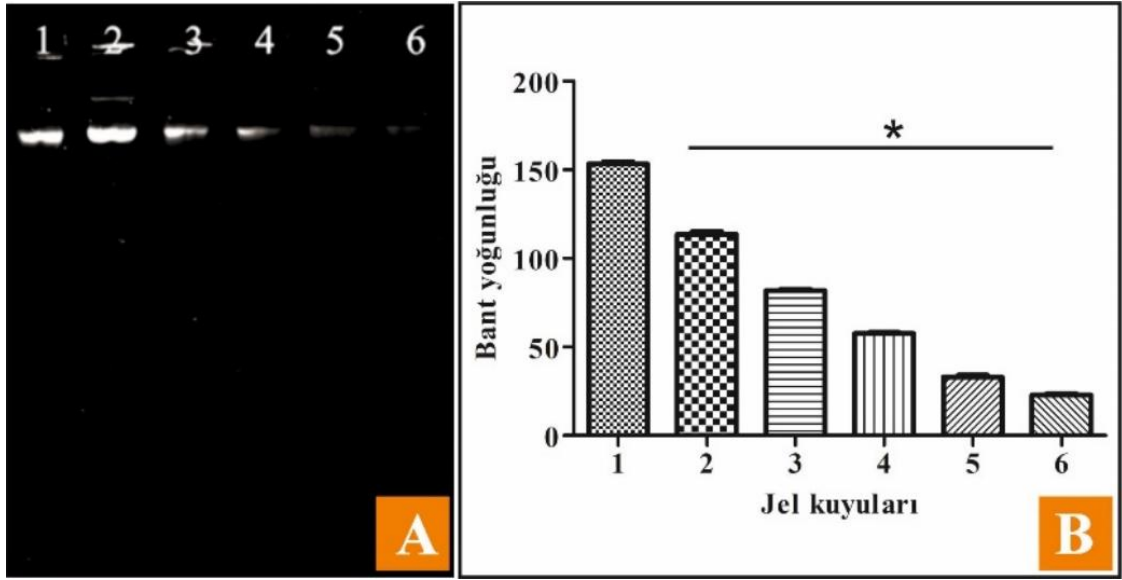
Şekil 28. nPEI ve bPEI DNA bağlanma deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (A) ve bant yoğunluğunun istatistiksel analizi (B) (1. kuyu: nPEI ve 1 µg DNA; 2. kuyu: bPEI ve 1 µg DNA; 3. kuyu: PBS içerisinde hazırlanan 1 µg DNA)

nPEI ile farklı N/P oranlarında 3 ve 5 µg DNA'nın bağlanma kapasiteleri çalışıldı. Karışımlar, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Şekil 28'deki jel görüntüsüne ve bant yoğunluğu grafiğine bakıldığında, tüm N/P oranlarında 3 µg DNA'nın tamamının bağlandığı görülürken, 5 µg DNA'nın N/P:10 oranında bile tamamının bağlanmadığı görüldü.



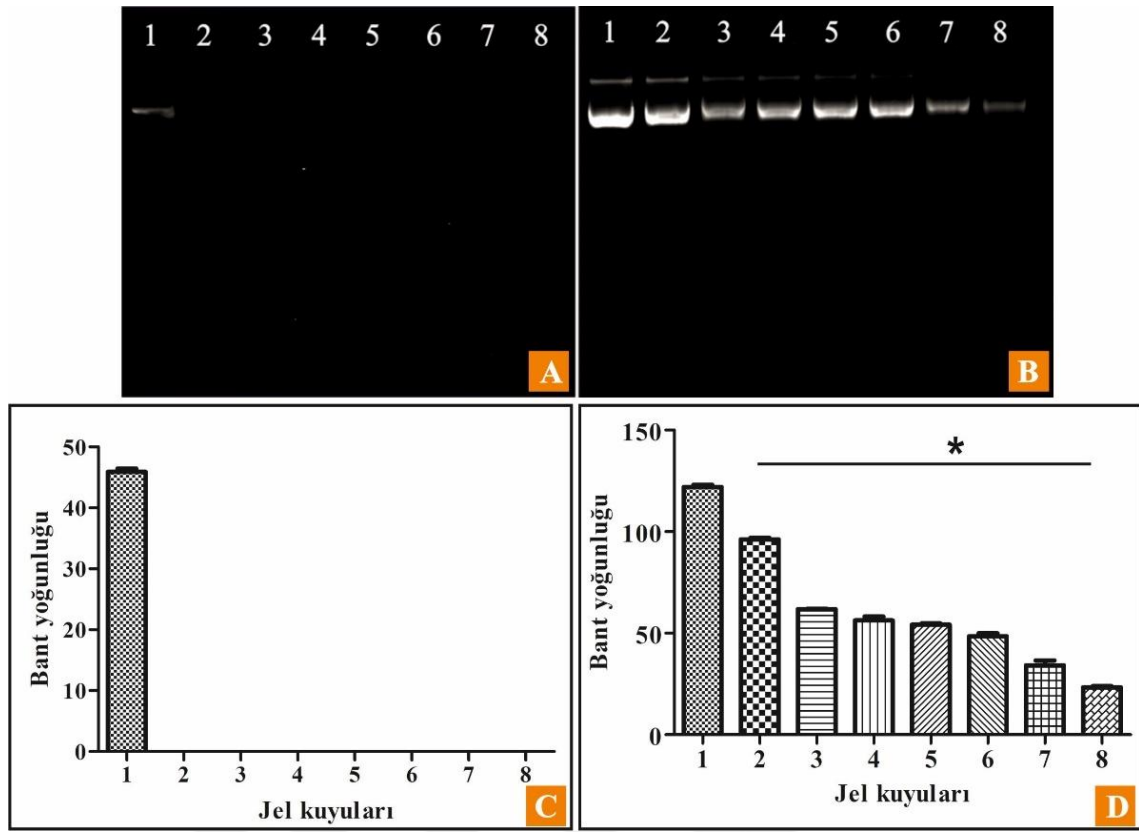
Şekil 29. nPEI ile farklı N/P oranlarında DNA bağlanma deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (A) ve bant yoğunluğunun istatistiksel analizi (B) (3 μ g DNA ile hazırlanan 2,4,6,8,10 ve 12. kuyular sırasıyla; N/P: 0, 2, 4, 6, 8 ve 10, 5 μ g DNA ile hazırlanan 1, 3, 5, 7, 9 ve 11. kuyular sırasıyla; N/P: 0, 2, 4, 6, 8 ve 10).

Farklı MSNP-NH₂ konsantrasyonları ve N/P:10 oranında nPEI kullanarak 3 μ g DNA'nın bağlanması için manyetofektin grupları oluşturuldu. Manyetofektinler, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Şekil 30'daki jel görüntüsü sonucuna bakıldığında, 100 μ g MSNP-NH₂'nin N/P:10 oranında nPEI ile en iyi DNA bağlama kapasitesine sahip olduğu gözlemlendi.



Şekil 30. MSNP-NH₂ konsantrasyonu belirleme deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (A) ve bant yoğunluğunun istatistiksel analizi (B) (1. kuyu: kontrol, PBS içinde pCMV-GFP (3 µg/25µL); 2-5. kuyular: sırasıyla; 25, 50, 75, 100 µg MSNP-NH₂ ve N/P:10 oranında PEI ile hazırlanan manyetofektinler).

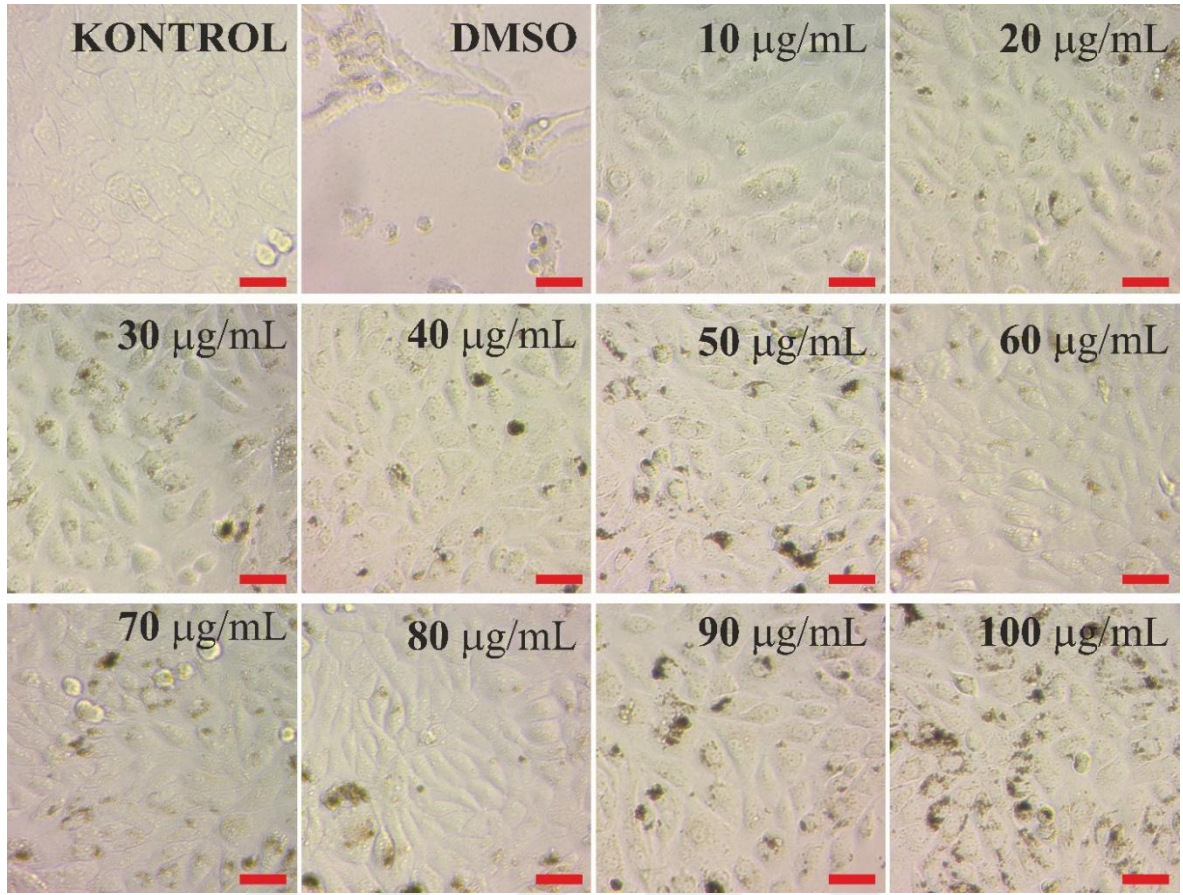
Farklı N/P oranları kullanılarak 25 µg MSNP-NH₂ varlığında en yüksek DNA bağlayan nPEI miktarı belirlendi. DNA miktarı 1 µg ve 3 µg olacak şekilde ayrı ayrı manyetofektinler hazırlandı. Hazırlanan manyetofektinler, agaroz jel elektroforezine yüklenerek yürütüldü. Şekil 31'daki jel görüntüsüne bakıldığında, tüm N/P oranlarında 1 µg DNA'nın tamamının bağlandığı gözlenirken N/P oranı arttıkça 3 µg DNA'nın bağlanma miktarının arttığı, ancak N/P:15 oranında bile tamamının bağlanmadığı görüldü.



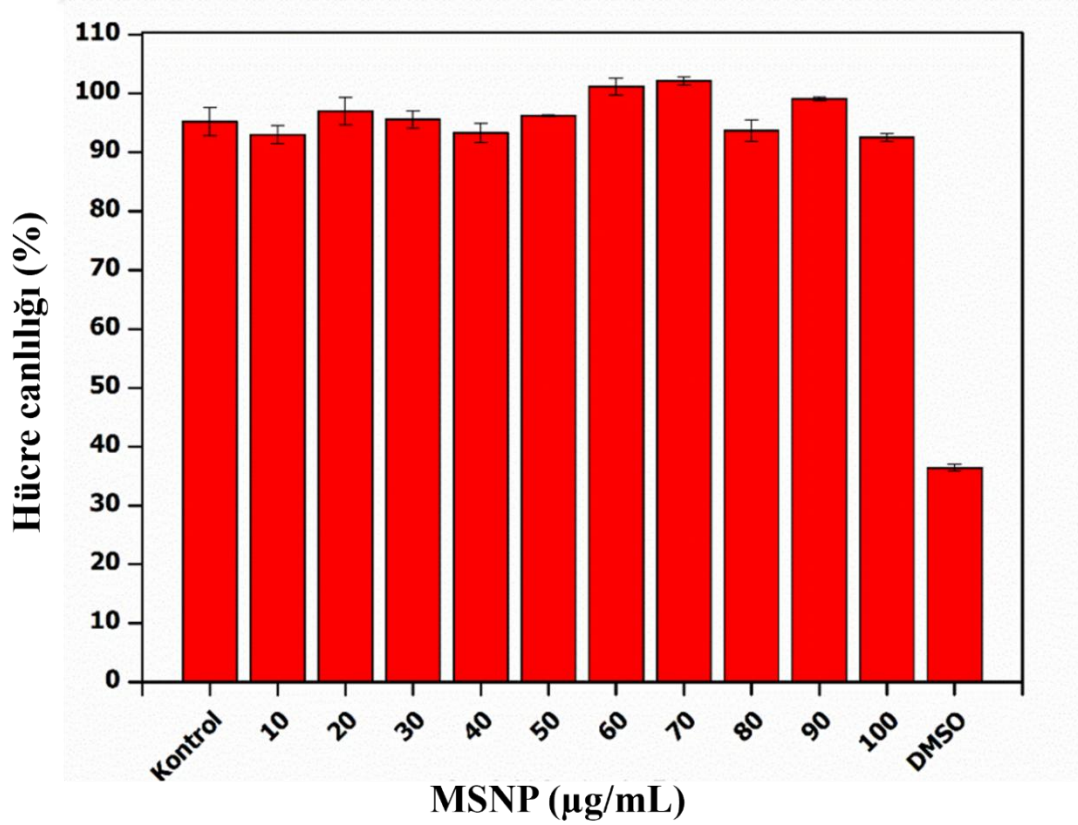
Şekil 31. N/P oranının belirlenmesi deneyine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (A, B) ve bant yoğunluğunun istatistiksel analizi (C, D) (A. 1 µg DNA ile hazırlanan manyetofektinler (1: kontrol-PBS içinde 1 µg/25µL pCMV-GFP, 2-8: sırasıyla; N/P: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15)) (B. 3 µg DNA ile hazırlanan manyetofektinler (1: kontrol-PBS içinde 3 µg/25µL pCMV-GFP, 2-8: sırasıyla; N/P: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15))

Proliferasyon ve Sitotoksite Testleri

Gen taşıma aracı olarak kullanılacak partiküllerin hücreler üzerinde toksik etkileri araştırıldı. Uygulama yapılan hücre gruplarına MTS vermeden önce alınan invert mikroskobu görüntüleri incelendiğinde hücrelerin morfolojilerini kaybetmediği gözlemlendi (Şekil 32). Silika ile biyoyumlu hale getirilen MSNP konsantrasyonlarının hücre canlılığını önemli ölçüde etkilemediği gözlemlendi (Şekil 33).

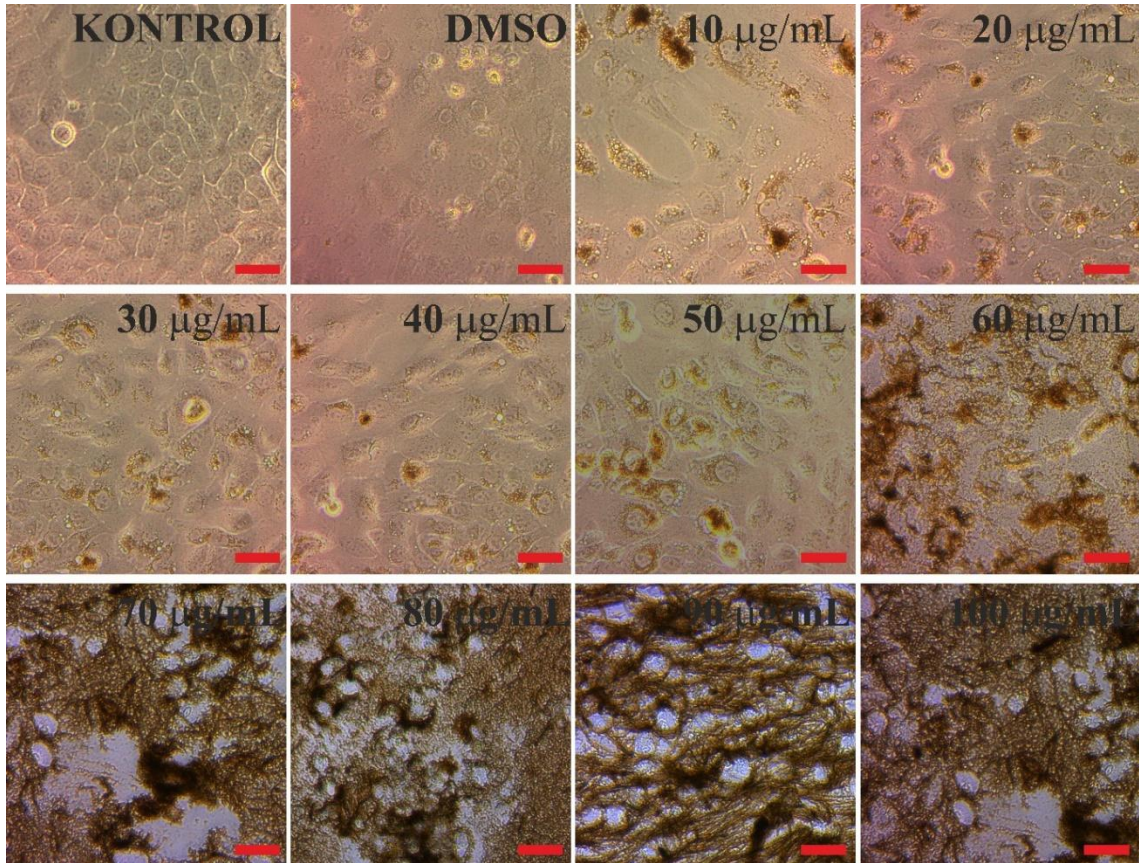


Şekil 32. MSNP uygulaması yapılan MCF-10A hücrelerinin 48 saat sonundaki invert mikroskop görüntüleri (Skala: 20 µm)

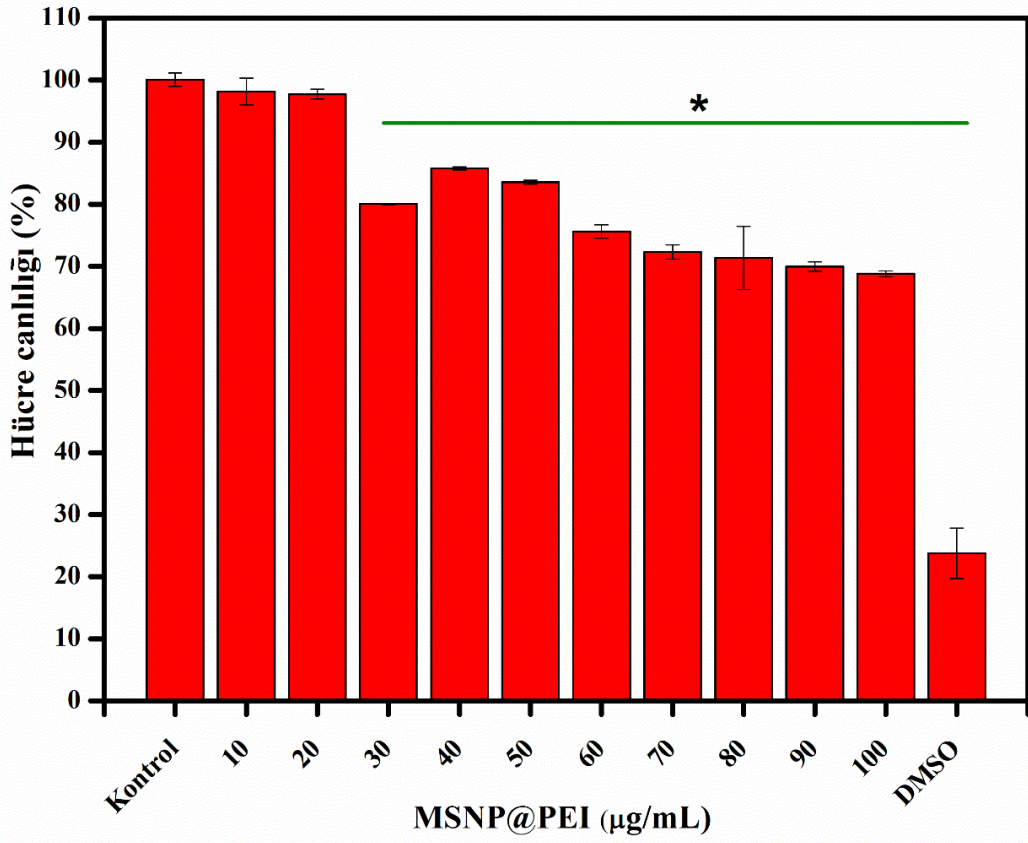


Şekil 33. MSNP uygulaması yapılan MCF-10A hücrelerinin 48 saat sonundaki MTS sonucu

Sentezlenen MSNP yüzeyinin pozitif hale getirilmesi için PEI kaplaması yapılan MSNP@PEI uygulaması yapılan hücre grupları invert mikroskobu altında incelendiğinde 60 $\mu\text{g/mL}$ uygulama grubundan itibaren hücrelerin morfolojilerini kaybettiği, hücre şeklinin yuvarlak hal aldığı gözlemlendi (Şekil 34). Artan konsantrasyonlarda ise hücre canlılığını önemli derecede azalttığı belirlendi (Şekil 35). Uygulama grupları incelendiğinde, 60 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonundan itibaren kontrol grubu ile aralarında istatistiksel olarak önemli fark gözlemlendi.

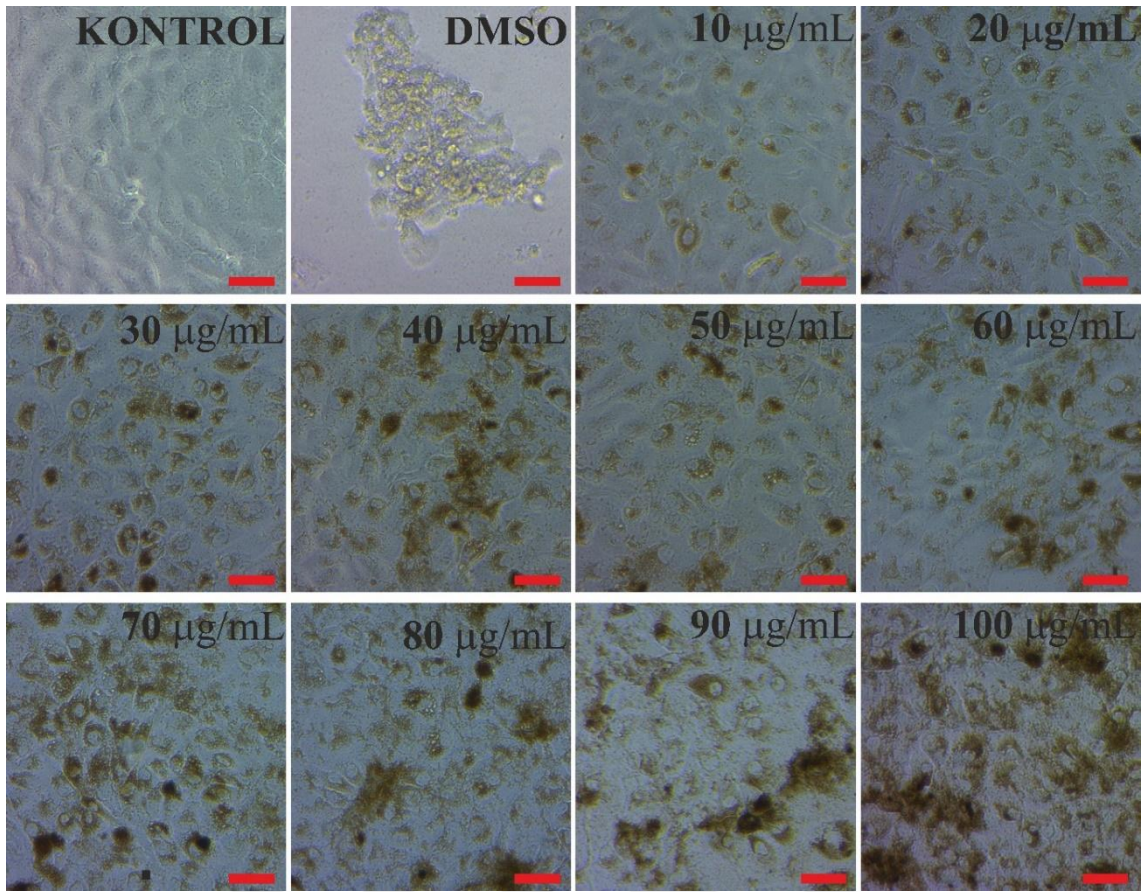


Şekil 34. MSNP@PEI uygulaması yapılan MCF-10A hücrelerinin 48 saat sonundaki invert mikroskop görüntüleri (Skala: 20 μm).

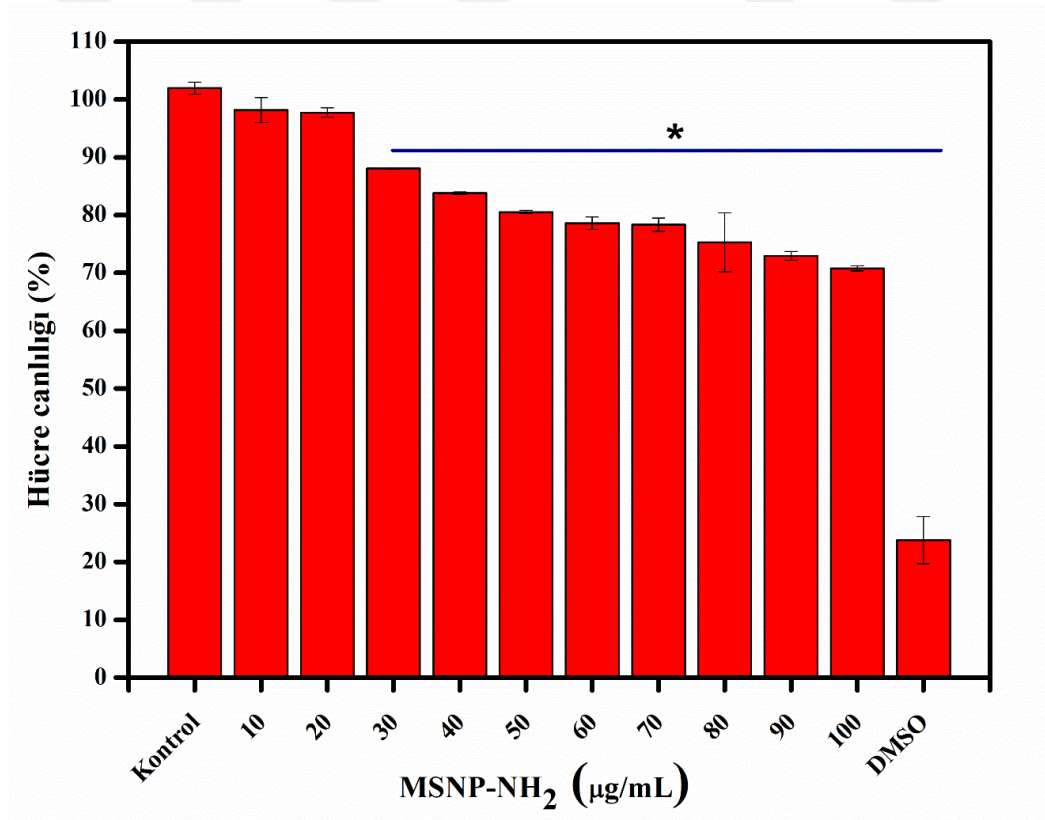


Şekil 35. MSNP@PEI uygulaması yapılan MCF-10A hücrelerinin 48 saat sonundaki MTS sonucu.

Uygulama yapılan hücre grupları invert mikroskop altında incelendiğinde 80 µg/mL konsantrasyondan itibaren hücre morfolojisinin değiştiği, hücrelerin küresel şekil aldığı gözlemlendi (Şekil 36). APTES ile modifiye edilerek elde edilen MSNP-NH₂'lerin artan konsantrasyonlarda hücre canlılığını yaklaşık %80 azalttığı belirlendi (Şekil 37).

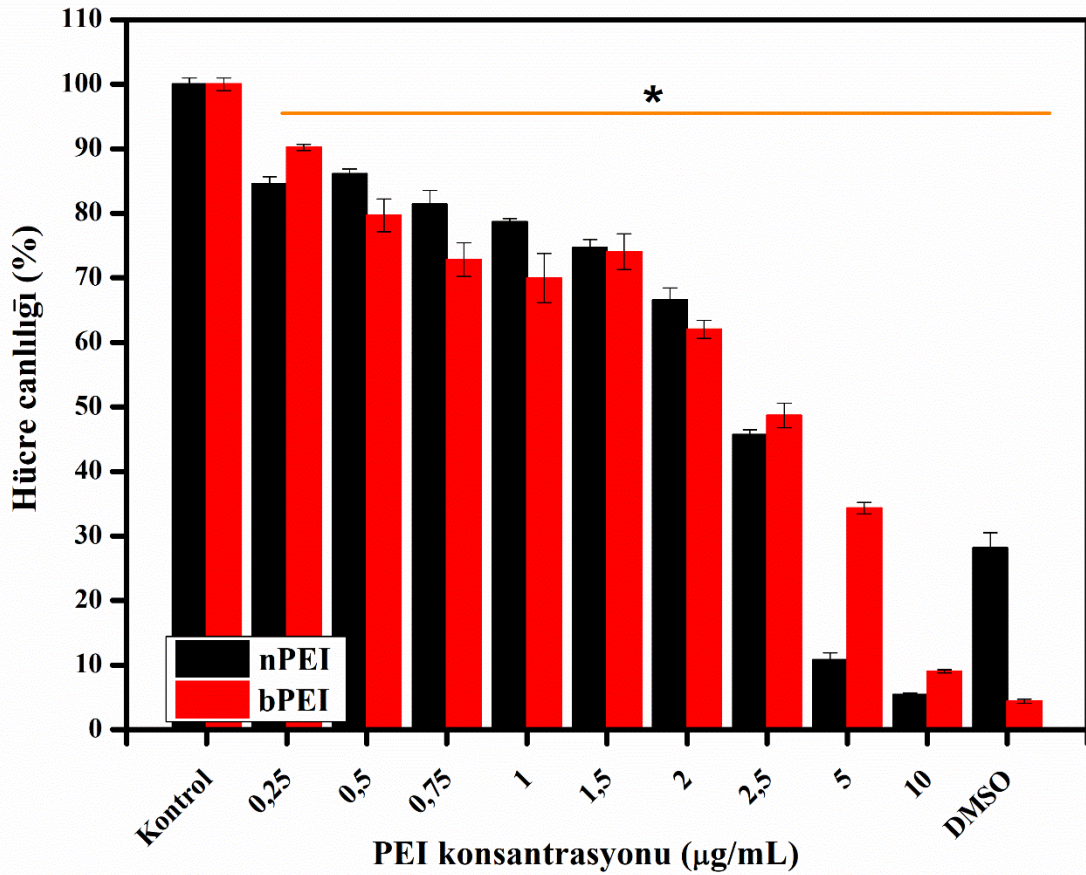


Şekil 36. MSNP-NH₂ uygulaması yapılan MCF-10A hücrelerinin 48 saat sonundaki invert mikroskop görüntüleri (Skala: 20 µm)



Şekil 37. MSNP-NH₂ uygulaması yapılan MCF-10A hücrelerinin 48 saat sonundaki MTS sonucu

Manyetofektin hazırlanırken DNA'yı nükleazlardan korumak amacıyla kullanılan PEI'in toksisitesi belirlendi. bPEI ve nPEI hücrelere uygulandığında Şekil 38'de görüldüğü gibi bPEI'nin artan konsantrasyonlarında hücre canlılığının azaldığı, nPEI'nin artan konsantrasyonlarında ise hücre canlılığının bPEI'nin artan konsantrasyonlarındaki kadar etkilenmediği gözlemlendi.

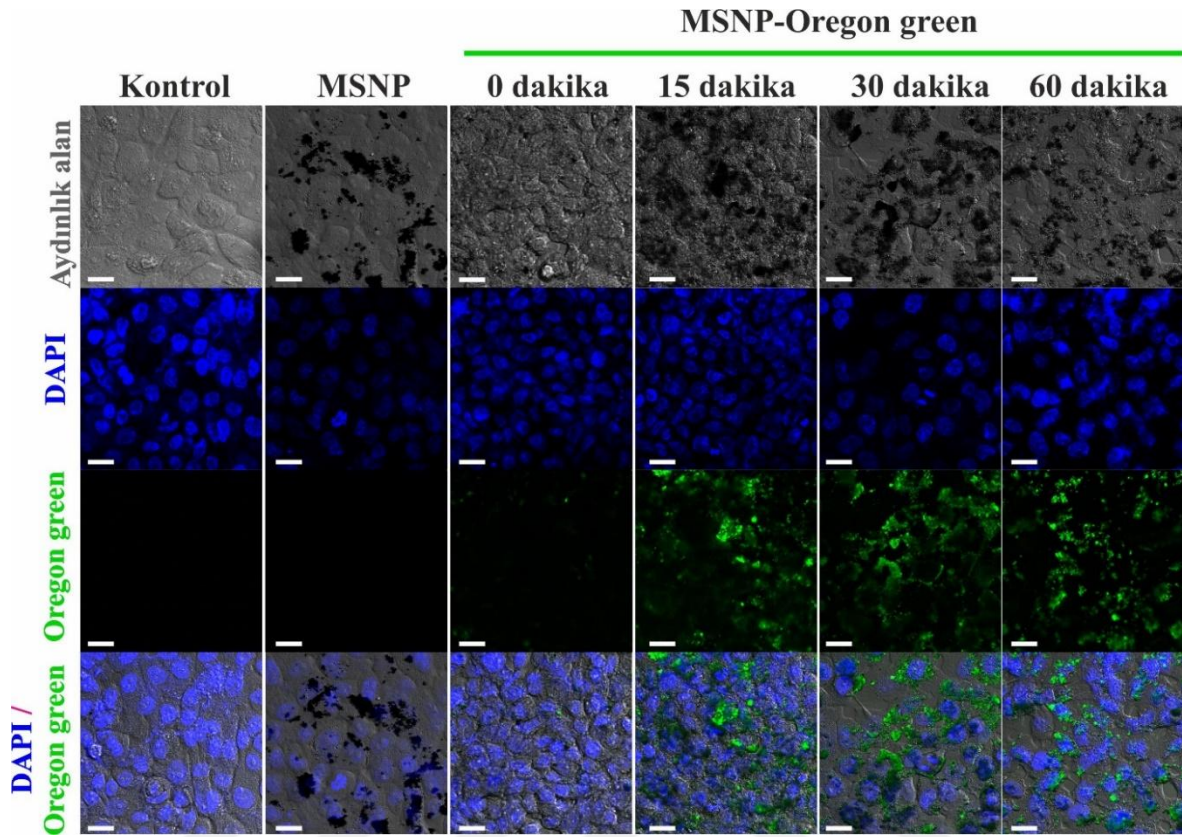


Şekil 38. PEI uygulaması yapılan MCF-10A hücrelerinin 48 saat sonundaki MTS sonucu.

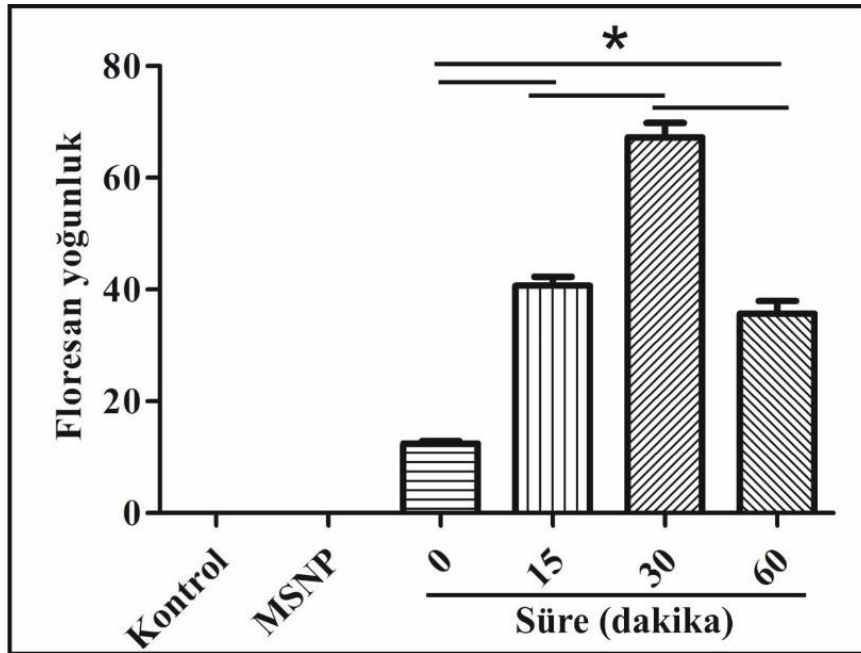
Manyetik Nanopartiküllerin Hücresel Alınımının Belirlenmesi

Hücresel alımın doğrulanması için kullanılmak üzere sentezlenen Oregon Green etiketli MSNP'lerin 0, 15, 30, 60 dakika mıknatıs tutularak MCF-10A hücreleri tarafından alınması beklendi. Her grubun bekleme süresi tamamlandıktan 4 saat sonra hücreler, lazer taramalı konfokal mikroskop ile görüntüldü. Şekil 39'daki konfokal mikroskop görüntülerine bakıldığında, mıknatıs yardımıyla 30 dakika boyunca hücresel alımı gerçekleştirilen gruptaki hücrelerin daha fazla Oregon Green etiketli MSNP'leri aldığı görüldü (Şekil 39). Farklı sürelerde uygulama yapılan hücre gruplarının konfokal mikroskop görüntülerinden alınan yeşil floresan yoğunluk grafiğine bakıldığında en iyi hücresel alımın 30 dakika mıknatıs tutulan grupta olduğu görüldü (Şekil 40). Konfokal mikroskopta alınan 3D hücre görüntülerine

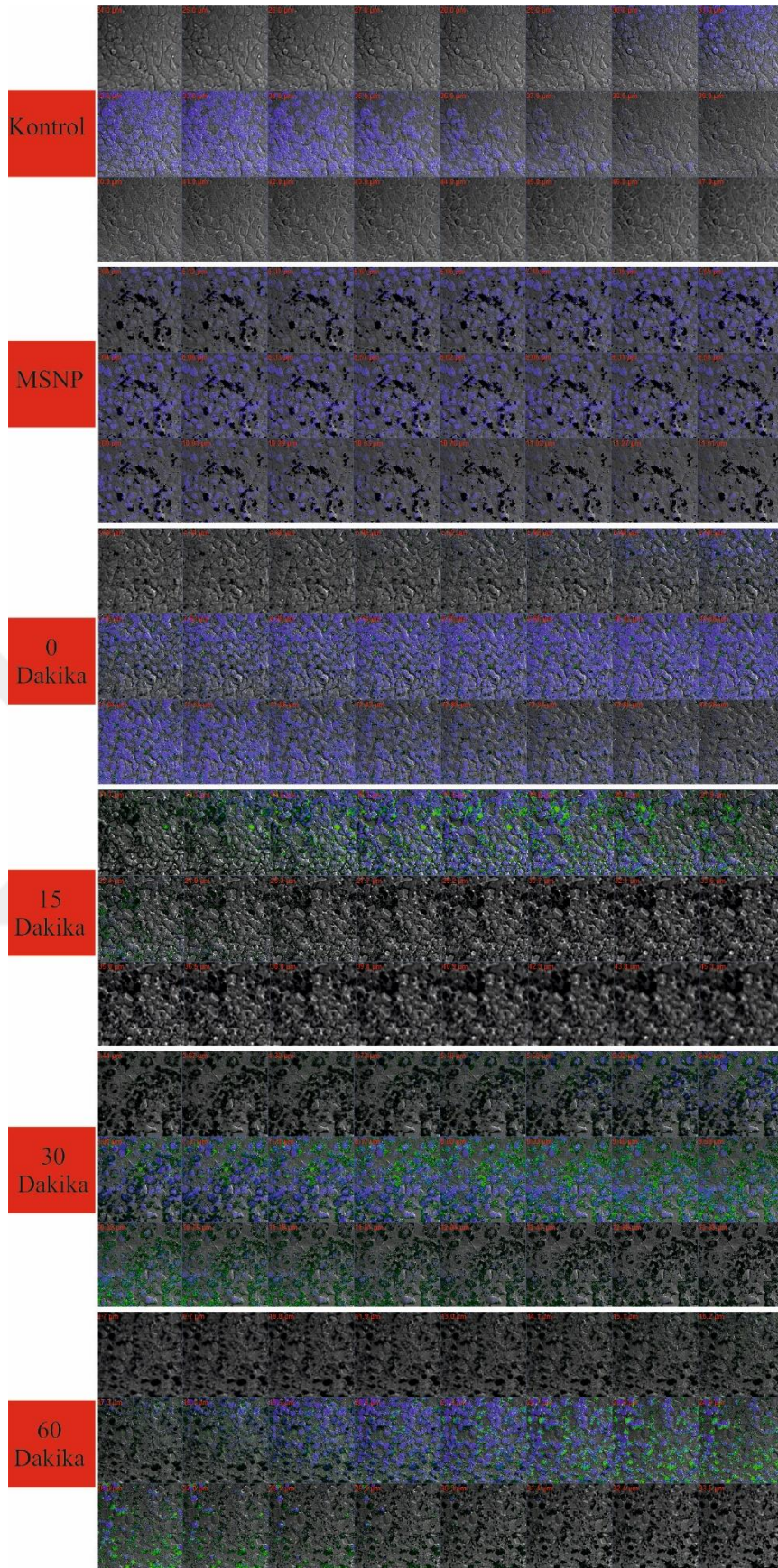
bakıldığında DAPI ışımalarının başladığı ve bittiği noktalarda gelen yeşil floresan ışımaya ile partiküllerin hücre içinde olduğu belirlendi (Şekil 41).



Şekil 39. Oregon Green etiketli MSNP ile muamele edilen MCF-10A hücrelerinin hücresel alımına ait konfokal mikroskop görüntüsü (Skala: 10 µm).



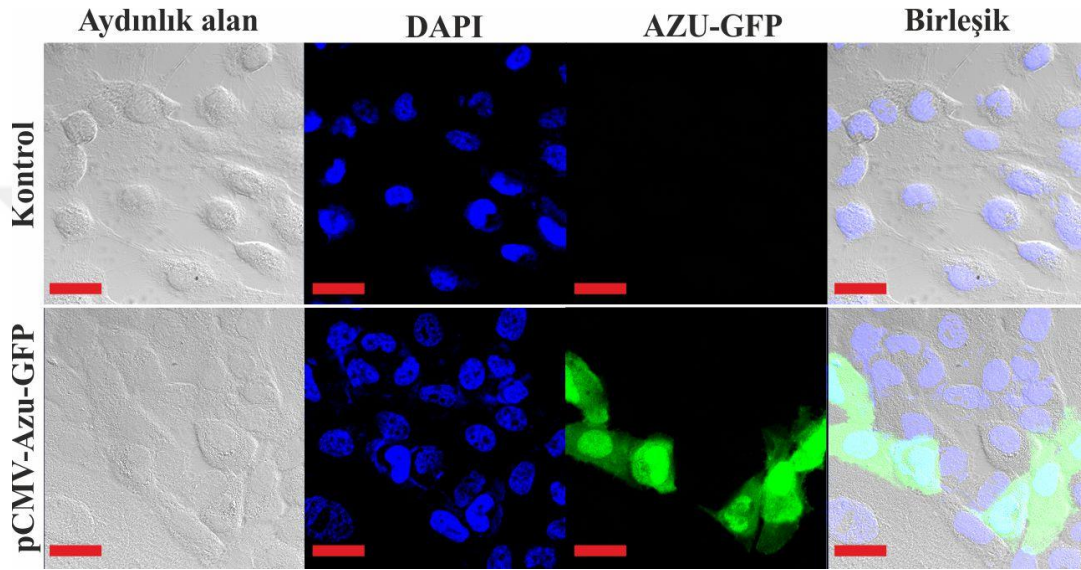
Şekil 40. Hücresel alım süresi istatistiksel analizi.



Şekil 41. Hüresel alım 3D görüntüsü

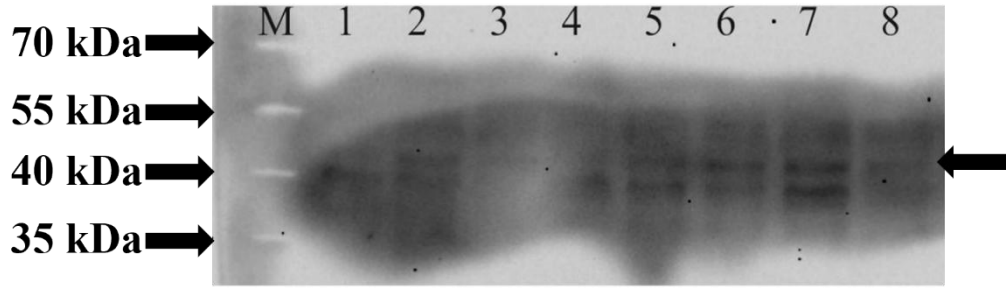
Füzyon Protein Varlığının Gösterilmesi

Optimize edilen şartlarda manyetofektinler hazırlanarak lamel üzerine ekilen MCF-10A hücrelerine rekombinant pCMV-Azu-GFP'nin manyetofeksiyonu gerçekleştirildi. Manyetofeksiyon işlemi ardından hücreler 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler fiks edilerek lazer taramalı konfokal mikroskop ile görüntülendi. Konfokal mikroskop görüntülerine bakıldığında yeşil floresan ışımının kontrol grubunda olmayıp manyetofeksiyon yapılan hücre grubunda olması Azu-GFP füzyon proteininin MCF-10A hücrelerinde başarılı bir şekilde ifade edildiğini gösterdi (Şekil 42).

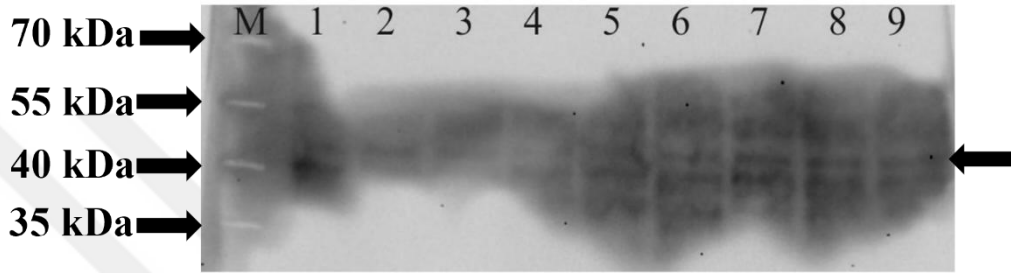


Şekil 42. Manyetofeksiyon yapılan hücrelere ait konfokal mikroskop görüntüsü

Azurine spesifik antikor kullanılarak western blot analizi yapıldı. Bunun için manyetofektin grupları oluşturularak pCMV-Azu-GFP MCF-10A hücrelerine manyetofeksiyon ile gönderildi. Uygulamadan 48 saat sonra hücreler toplanarak RIPA tamponu ile parçalandı. Elde edilen hücre lizatları TCA ile çöktürülerek SDS-PAGE jeline yüklenip yürütüldü. SDS-PAGE jeli PVDF membrana blotlandı. Analiz sonucunda Şekil 43 ve Şekil 44'teki membran görüntülerine bakıldığında MCF-10A hücreleri tarafından üretilen füzyon protein beklenen yerde görüldü.



Şekil 43. Rekombinant Azu-GFP füzyon proteininin western blot analizi (M: Markır; 1: kontrol; 2: 25 µg MNP- 3 µg DNA- N/P:23; 3: 25 µg MNP- 3 µg DNA- N/P:46; 4: 25 µg MNP- 9 µg DNA- N/P:103; 5: 25 µg MNP- 9 µg DNA- N/P:310, 6: 50 µg MNP- 3 µg DNA- N/P:23; 7: 50 µg MNP- 3 µg DNA- N/P:35, 8: 50 µg MNP- 3 µgDNA- N/P:46.)



Şekil 44. Rekombinant Azu-GFP füzyon proteininin western blot analizi (M: Markır; 1: kontrol; 2: 50 µg MNP- 9 µgDNA- N/P:103; 3: 50 µg MNP- 9 µg DNA- N/P:207; 4: 50 µg MNP- 9 µg DNA- N/P:310; 5: 75 µg MNP- 3 µg DNA- N/P:35, 6: 75 µg MNP- 3 µg DNA- N/P:46; 7: 75 µg MNP- 9 µgDNA- N/P:103; 8: 75 µg MNP- 9 µg DNA- N/P:207; 9: 75 µg MNP- 9 µg DNA- N/P:310.)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Rekombinant DNA teknolojisi, canlılarda doğal yollarla meydana gelmesi mümkün olmayan, genellikle farklı canlı türlerinden alınan DNA moleküllerinin, gen mühendisliği teknolojileriyle kesilmesini ve elde edilen farklı DNA parçalarının birleştirilmesi işlemlerini kapsayan bir teknolojidir. Rekombinant DNA ise; bu işlem sonucu üretilmiş olan yeni DNA molekülüne verilen isimdir ve kısaca rDNA olarak yazılır (Lodish H, 2000). rDNA teknolojisi aracılığıyla rekombinant (heterolog) protein üretimi için farklı konakçılar kullanılmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, bakteri, maya, böcek hücreleri, memeli hücreleri ve bitki ekspresyon sistemleri sıklıkla kullanılır (Assenberg *et al.*, 2013). Rekombinant protein üretiminde, ilgilenilen gen sekansının üretim konakçısı için uygun ekspresyon vektöründe yer alan promotör arkasına yerleştirilerek rDNA elde edilir. Bunu takiben, rDNA'nın konakçıya aktarımı için uygun olarak belirlenen biyolojik, kimyasal ya da fiziksel yöntemlerden biriyle konakçıya aktarılması gerekmektedir.

Son zamanlarda kullanılan gen aktarım yöntemlerinden biri olan manyetofeksiyon ucuz, kolay ve başarılı bir gen aktarım yöntemidir. Manyetofeksiyon ile memeli hücrelerine kolay ve yüksek verimlilikle gen aktarılmasından dolayı araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilen yöntemlerdendir. Bu gen aktarım yönteminin temeli, farklı yöntemler kullanılarak sentezlenen manyetik nanopartiküllerin DNA ile kompleks oluşturarak manyetik alan etkisiyle hücrelere daha fazla DNA girmesini sağlamaktır (X. Zhao *et al.*, 2017).

Bu tez çalışması kapsamında, heterolog protein ekspresyonu için konakçı olarak memeli hücresi olan MCF-10A hücreleri kullanıldı. Rekombinant DNA elde etmek amacıyla memeli hücreleri için uygun olan ve yapısal CMV (sitomegalovirüs) promotörünü içeren pCMV-GFP ekspresyon plazmitine terapötik azurin proteinini kodlayan kodon optimize azurin geni yerleştirildi. CMV, herpes virüsleri Herpesviridae familyasının Betaherpesvirinae alt familyasına dahil olan bu virüs, insan ve maymunları enfekte ederek konakçı olarak kullanılmaktadır. CMV, memeli ekspresyon sistemleri için güçlü bir promotör olarak kullanılmaktadır (Kyung *et al.*, 2005). Xia ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, insan CMV promotöründe intonA varlığında memeli hücresi olan 293EBNA ve CHO-K1 hücrelerinde geçici transfeksiyon ile yüksek seviyelerde protein ifade edildiğini belirtmişlerdir (Xia *et al.*, 2006). Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise tavşanlarda ön çapraz bağ (ACL) rekonstrüksiyonundan sonra plazmit sitomegalovirüs (pCMV)-kemik morfogenetik protein 2 (BMP-2) gen tedavisinin tendon-kemik ara yüzünün iyileşmesi üzerindeki etkisini araştırmış

ve pCMV–BMP-2 gen tedavisinin uygulanması, ACL rekonstrüksiyonunda etkili bir yardımcı tedavi olabileceğini bildirmiştir (Wang *et al.*, 2010).

Heterolog protein üretiminde verimliliği arttırmak için orijinal diziyi içeren organizmadaki nükleotid sekanslarını, konakçı organizmanın nükleotid sekanslarına dönüştürerek ifade edilmesi istenen genlerin traslasyon verimliliğini arttırmak amacıyla kodon optimizasyonu yapılmaktadır (Fuglsang, 2003). Heterolog protein üretimi, konakçı organizma ile doğal gen arasındaki kodon kullanımındaki farktan etkilendiği belirlenmiştir. Kodon optimizasyonu yapılırken, haberci RNA'nın ikincil yapısı, kodon adaptasyon indeksi (CAI) ve transfer RNA havuzu dahil diğer faktörler de dikkate alınmalıdır (Tu *et al.*, 2016). Translasyon verimliliğinin iyi olması için kodon adaptasyon indekslerinin 1'e yakın olması tavsiye edilmektedir (Al-Hawash *et al.*, 2017). Kim ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, insan eritropoietin (EPO) geninin insan ve maya için kodon optimizasyonlarını yaparak ekspresyon seviyelerini karşılaştırmıştır. Yeniden yapılandırılmış EPO genlerinin nispi performansları, çeşitli promotör kombinasyonları ile değerlendirildi. Karşılaştırılabilir kombinasyonlar kümesi altında, insan yüksek frekanslı kodonlarına sahip olgun EPO geni, maya yüksek frekanslı kodonlara göre memeli hücrelerinde oldukça yüksek düzeyde ekspresyon olduğunu belirlemiştir (Kim *et al.*, 1997). Bu tez çalışmasında, *P. aeruginosa* bakterisine ait azurin proteininin memeli (insan) hücrelerinde ekspresyonunu arttırmak ve nadir bulunan kodonları sıkça kullanılanlar ile değiştirmek için kodon optimizasyonu yöntemi kullanıldı. Kodon optimize edilen azurin genine ait nükleotid sekansının optimizasyondan önceki ve sonraki CAI değerlerinin 0,84 ve 0,95 olduğu aynı şekilde GC içeriğinin %61,97 iken %62,26 olduğu belirlendi.

GFP (yeşil floresan protein) ile füzyon olarak ifade edilen proteinlerin GFP'nin sağladığı floresan ışığa yardımıyla lokalizasyonları belirlenebilmektedir. Choidas ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, GFP-aktin füzyon proteini ile ifade edilen aktin proteininin GFP floresan ışığı sayesinde hücre iskeletindeki konumunu belirlemiş ve hücre göçü takibini yapmışlardır (Choidas, 1998). Kanda ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise H2B-GFP füzyon proteinini kullanarak canlı hücrelerde kromatini etiketlemek için yeni bir sistem kurmuştur. H2B-GFP sistemi, DM (double minute) kromozomlar da dahil olmak üzere kromozomların, hücre döngüsü kontrolünü veya hücre içi yapıları bozmadan yüksek çözünürlükte görüntülenmesine izin verir. Bu sistemin uygulanması kromatinin, kendine has özelliklerini ortaya çıkarmıştır (Kanda *et al.*, 1998). Bu tez çalışmasında geçici transfeksiyon ile MCF-10A hücrelerinde azurin proteininin GFP ile füzyon olarak ekspresyonu hedeflenmiştir.

Bunun için, ilk olarak *P. aeruginosa* tarafından ifade edilen azurin geni, pCMV-GFP'ye yerleştirilerek rekombinant pCMV-Azu-GFP elde edildi. Öncelikle azurin geninin amplifikasyonu için uygun primer bağlanma sıcaklığının 68 °C olduğu belirlendi (Şekil 8). Daha sonra belirlenen şartlarda gerçekleştirilen PCR ile amplifiye edilen azurin geni saflaştırıldı ve saf olarak elde edilen azurin geni, *EcoRI* ve *KpnI* restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesim sonrası PCR ürünlerinin, fenol/kloroform ekstraksiyonu yapıldı. Aynı zamanda pCMV-GFP de aynı enzimlerle kesildi ve CIAP ile muamele edilerek agaroz jelde yürütüldü. CIAP, kesilen uçların tekrar birleşmesini engellemek amacıyla kullanıldı. pCMV-GFP, jelden ekstrakte edilerek saflaştırıldı. Kesildikten sonra hazır hale gelen pCMV-GFP ve azurin geni ile ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Ligasyon ürünü, CaCl₂ metodu ile kompetent hale getirilen *E. coli* hücrelerine transfer edildi. Transformantlardan amfisilin antibiyotik dirençli olanların LB-amfisilin agar besiyerinde koloni oluşturdıkları gözlemlendi (Şekil 10). İnkübasyon sonrası gelişen kolonilerden gene ve vektör DNA'ya spesifik primerler ile koloni PCR yapıldı. Reaksiyon sonucu elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve görüntüleme sonuçlarına göre 457 bp'de gene ait bant ve 684 bp'de vektör DNA'ya ait bantlar gözlemlendi (Şekil 11 ve Şekil 12). Klonlamanın doğruluğunu tespit etmek için LB-amfisilin sıvı besiyerlerinde çoğaltılan 6. koloni toplanarak plazmitler saflaştırıldı ve Sanger sekanslama ile doğrulandı. Nükleotid blast sonucuna göre genin %100 doğrulukla pCMV-GFP'ye yerleştirildiği tespit edildi (Şekil 13 ve Şekil 14). Elde edilen Rekombinant DNA, pCMV-Azu-GFP olarak isimlendirildi.

Manyetik nanopartiküller (MNP) gen aktarım aracı, hipertermi, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), katalitik uygulamalar vb. gibi çok sayıda potansiyel uygulama alanına sahiptir. Bu tez çalışmasında gen aktarım aracı olarak kullanılan, Fe₃O₄ (manyetit) MNP'leri literatürde tarif edilen, basit ve hızlı bir yöntem olan termal bozulma yöntemiyle üretildi (Amara *et al.*, 2009). Bu yöntem için demir kaynağı olarak Fe(acac)₃ veya Fe(CO)₅ kullanılabilir. Ancak, Fe(CO)₅'nin yüksek toksisitesi nedeniyle öncül demir kaynağı olarak Fe(acac)₃ kullanıldı. Sentez ortamında kullanılan oleylaminin ise çözücü, yüzey aktif madde ve indirgeyici madde olarak işlev görebileceği belirtilmiştir (Sun *et al.*, 2014). Fe(acac)₃, oleylamin ve benzil eter üçlü kombinasyonu kullanılarak manyetit sentezi gerçekleştirildi. Sentez sonucu hekzan içerisinde tek tek dağılan süperparamanyetik MNP'ler elde edildi. Üretilen MNP'ler, yapılarının korunması amacıyla hekzan içerisinde dağıtıldı ve N₂ gazı verilerek +4 °C'de muhafaza edildi. Hazırlanan manyetitlerin yapısal analizi için geçirimsiz elektron mikroskobu (TEM) kullanıldı. TEM görüntülerine bakıldığında manyetitlerin, ortalama 20 nm boyutlarında, tek tek dağılım gösterdiği ve küresel şekle sahip olduğu belirlendi (Şekil 17). Sun ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Fe(acac)₃'ün demir kaynağı olarak

kullanıldığında manyetitlerin kübik ters spinel kristal yapıya sahip olduğunu bildirmişlerdir (Sun *et al.*, 2014). Solak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, manyetit sentezi termal bozulma yöntemiyle yapılmış ve elde edilen manyetitlerin süperparamanyetik ve yapısal olarak hekzagonal şekle sahip olduğunu bildirilmiştir (Solak *et al.*, 2021). Dolayısıyla, MNP sentezi ile elde edilen sonuçların literatür sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmektedir.

Silika kaplı nanopartiküller, biyouyumlulukları, düşük toksisiteleri ve kararlılıkları nedeniyle çeşitli biyomedikal uygulamalar için kullanılmaktadır. Bu çalışmada sentezlenen manyetitler, silika ile kaplanarak biyouyumlu hale getirildi. Silika kaplama için Stöber metodunun modifiye hali kullanıldı (Solak *et al.*, 2021). Sentez sırasında misel yapısı oluşturarak düzgün yapılı partiküller elde etmek amacıyla CTAB kullanıldı (Libermana, 2015). Silika kaplama sonrası CTAB'i uzaklaştırmak için asidasyon ile CTAB çıkarma işlemi yapıldı. CTAB çıkarma işlemi sonrası mezogözenekli silika kaplı manyetik nanopartiküller (MSNP) elde edildi. Hazırlanan MSNP'lerin yapısal analizi için TEM ile görüntüleme yapıldı. CTAB çıkarma sonrası partiküllerin TEM görüntüsüne bakıldığında, düzgün yapılı mezogözenekler görülmektedir (Şekil 18). MSNP yüzeyinin kimyasal yapısının karakterizasyonu, FTIR ile analiz edildi. Sentezlenen silika kaplı MSNP'lerden kaydedilen FTIR spektrumunda, CTAB'a ait -CH zincir yapısı $2888-2995\text{ cm}^{-1}$ 'de net olarak görüldü (Şekil 20) ve bu pikler, CTAB çıkarma işleminden sonra gözlenmedi. CTAB pikinin kaybolması, CTAB çıkarma işlemi ile başarılı bir şekilde CTAB'ın uzaklaştırıldığını ifade etmektedir. FTIR analizine bakıldığında, silikadan gelen -Si-O- bağına ait titreşim, 1080 cm^{-1} 'de gözlenmektedir (Şekil 20). -Si-O- bağının varlığı manyetitlerin başarılı bir şekilde silika ile kaplandığını doğrulamaktadır. Hong ve arkadaşları, $1095,9\text{ cm}^{-1}$ ve $802,6\text{ cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon piklerinin, Si-O-Si bağının simetrik ve asimetrik titreşimlerinin karakteristik pik noktaları olduğunu bildirmiştir (Hong *et al.*, 2009). MSNP'lerin suda iyi dağılmasını sağlayan -OH bağlarına ait pik, 3403 ve 1618 cm^{-1} 'de görülmektedir (Şekil 20). Hidrofilik Si-OH bağına ait 800 cm^{-1} 'de görülen pik ise, MSNP yüzeyindeki silika varlığını göstermektedir (Möller *et al.*, 2007).

Sentezlenen MSNP'lerin yüzeyi PEI kaplama ve APTES ile modifiye edilerek pozitif hale getirildi. MSNP@PEI elde etmek için tek başına güçlü bir gen aktarım aracı olarak kullanılan dallı yapıya sahip PEI kullanıldı. Dallı yapıya sahip olan PEI polimerleri yüksek pozitif yüke sahip olduğu için negatif hücre duvarından geçmesi kolaydır (Mady *et al.*, 2011). PEI yüzey modifikasyonu sayesinde suda daha kararlı dağılan ve DNA bağlama kapasitesi yüksek partiküller elde edildi. MSNP'lerin PEI kaplama ve APTES ile modifikasyon işlemlerinin ardından kaydedilen TEM görüntülerine bakıldığında, MSNP@PEI boyutunun yaklaşık 40 nm olduğu görülürken (Şekil 19 A), MSNP-NH₂ boyutunun yaklaşık 35 nm olduğu

görüldü (Şekil 19 B). Elde edilen MSNP@PEI ve MSNP-NH₂ yüzey yapısı FTIR analizi ile incelendiğinde, PEI ve APTES yapısında bulunan amin bağına ait pik 1562 cm⁻¹'de görüldü (Şekil 21). Ayrıca PEI ve APTES yapısında bulunan -C-H zincirine ait IR pikleri 2811 ve 2892 cm⁻¹ ortaya çıktı. Farklı oranlarda MSNP:PEI kullanarak elde edilen MSNP@PEI'lerin yüzey yükünün (zeta potansiyeli), hidrodinamik boyutlarının (R_h) ve polidispersite indeksi (PDI) değerinin belirlenmesi için DLS analizi yapıldı. Şekil 22'deki zeta potansiyeline bakıldığında MSNP@PEI'lerin yüzey yükünün pozitif olduğu görülürken MSNP@PEI'lerin hidrodinamik boyutlarının (R_h) ortalama 260 nm olduğu görüldü. DLS analizi ile nanopartiküllerin PDI değerlerinin 0,05-0,7 aralığında bulunması, partiküllerin monodispers özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. DLS analizi incelendiğinde değerlerin 0,165-0,201 arasında olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlara bakıldığında sentezlenen MSNP@PEI'lerin monodispers yapıda olduğu görüldü (Şekil 22). Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, MSNP zeta potansiyelinin -24,3±2,7 mV, MSNP@PEI zeta potansiyelinin ise +34.7±0.9 mV olduğunu bildirmiştir (Wang *et al.*, 2018).

Nükleik asitlerin negatif yüklü oldukları iyi bilinmektedir. Gen aktarım materyali de buna bağlı olarak pozitif yüzeye sahip olmalıdır. Manyetofeksiyon yöntemi ile gen aktarımı yapabilmek için kullanılacak MNP'lerin yüzeyleri pozitif yüklü olmalıdır. MNP yüzeyinin pozitif olabilmesi için modifikasyonlar yapılabilmektedir. Modifikasyon sonucu MNP'ler daha kararlı olma ve daha fazla DNA bağlama özelliği kazanacaktır (Ma *et al.*, 2011). Sentezlenen MSNP, MSNP@PEI ve MSNP-NH₂'nin DNA'yı en verimli şekilde bağlaması için manyetofektin optimizasyonları yapıldı. Çalışmaya öncelikle süre ve uygun manyetofektin ortamının belirlenmesi ile başlandı. Daha sonra partikül miktarı ve PEI miktarlarının optimizasyon çalışmaları yapıldı. Partikül/DNA etkileşimi için uygun süreyi belirleyebilmek amacıyla oluşturulan manyetofektin grupları farklı sürelerde ve oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra agaroz jele yüklenerek elektroforez sonrası görüntüleme yapıldı. Jel görüntüsüne bakıldığında, 30 dakika inkübe edilen grupta DNA bandının kaybolduğu görüldü (Şekil 23). Bu, manyetofektin ortamında bulunan DNA'nın büyük oranda tutulduğu anlamına gelmektedir. D. Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, MSNP@PEI/MDR1-siRNA kompleksini oluşturmak için 45 µg MSNP@PEI ile 75 pmol MDR1-siRNA'yı karıştırarak 37 °C'de 30 dakika inkübe etmiş ve DNA'nın başarılı bir şekilde bağlanıp hücrelere taşındığını göstermiştir (D. Wang *et al.*, 2018).

Manyetofektinin elde edilmesi için gerekli inkübasyon süresi belirlendikten sonra uygun manyetofektin hazırlama ortamını belirleme deneylerine geçildi. Manyetofektin hazırlama ortamı olarak, PBS ve serum içermeyen hücre büyüme besiyeri kullanıldı.

Manyetofektinler hazırlandıktan sonra 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası manyetofektinler agaroz jele yüklendi ve elektroforez sonrası görüntüleme yapıldı. Elde edilen jel görüntüsüne bakıldığında, manyetofektin yüklenen kuyularda DNA bantları görülmedi (Şekil 24). Bu sonuca dayanarak, manyetofektinin hem PBS ile hem de serum içermeyen hücre büyüme besiyeri ile hazırlanabileceği anlaşıldı. Daha sonra, en çok bağlanan DNA'nın hangi grupta olduğunu belirlemek amacıyla DNA salımı gerçekleştirildi. Salım sonrası örnekler agaroz jele yüklendi ve elektroforez sonrası görüntüleme yapıldı. Jel görüntüsüne bakıldığında, her iki ortamda hazırlanan manyetofektinlerden salınan DNA bantların yoğunluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (Şekil 24). Dolayısıyla, sonraki manyetofektin hazırlama deneylerinde daha düşük maliyetli olması sebebiyle PBS kullanıldı.

Bağlanan DNA miktarının, artan partikül miktarı ile doğrusal bir ilişkisi olup olmadığına bakmak için artan partikül miktarları ile optimizasyon deneyi yapıldı. Bu amaç doğrultusunda farklı miktarlarda partikül ve 1 µg DNA kullanarak manyetofektinler hazırlandı ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası manyetofektinler agaroz jele yüklendi ve elektroforez sonrası görüntüleme yapıldı. Görüntüleme sonucuna göre, yüzey modifikasyonu yapılmayan MSNP'lere negatif yüklü DNA'nın bağlanamadığı görüldü (Şekil 25). Şekil 26 ve Şekil 27'deki jel görüntülerine bakıldığında MSNP@PEI ve MSNP-NH₂'nin artan konsantrasyonlarında daha çok DNA'nın bağlandığı görüldü. Bu doğrultuda, manyetofektin hazırlanırken kullanılan partiküllerin miktarı arttıkça bağlanan DNA miktarının da arttığı sonucuna varıldı. Böylece, gen aktarım aşamasında manyetofektin hazırlarken hücre için toksik olmayacak doza kadar partikül miktarı kullanılarak daha fazla DNA'nın hücre içine gönderilebileceği düşünüldü.

Transfeksiyon yöntemlerinin tamamında gen aktarımının verimli olabilmesi için aktarımı yapılacak DNA'nın hasar görmeden hücre içerisine girmesi ve çekirdeğe kadar ulaştırılması gerekmektedir. Transfeksiyon ajanı olarak sıklıkla kullanılan ve yüksek transfeksiyon etkinliği olan PEI polimerleri DNA'yı korumada oldukça başarılıdır. PEI yapısının dallı olması ve yüzeyinin pozitif olması nedeniyle DNA'yı daha çok bağlayıp koruma altına almaktadır. Ayrıca PEI'nin yüksek pozitivitesi nedeniyle kolaylıkla negatif hücre zarından geçip DNA'yı endozomlardan koruyarak çekirdeğe kadar ulaştırabilmektedir (Mady *et al.*, 2011). PEI'nin bilinen bu özellikleri nedeniyle hem bağlanan DNA miktarını arttırmak hem de DNA'yı hasar görmeden çekirdeğe kadar ulaştırabilmek için manyetofektin ortamına ekstra PEI eklendi. PEI'de bulunan nitrojenin (N), 1 µg DNA'daki fosfat gruplarına (P) olan oranına göre hesaplanan N/P oranlarında manyetofektin ortamına PEI eklendi (W. Wang *et al.*,

2011). PEI'nin yüksek pozitivitesi, gen aktarımı yapılacak hücre için toksik olabildiğinden pH'sı 7,4'e düşürülerek pozitivitesi azaltıldı (Kandemir B., 2013). Nötral pH ve bazik pH'da (nPEI ve bPEI) hazırlanan PEI'ler, N/P:4 oranında kullanılarak MSNP'lerin DNA bağlama kapasiteleri karşılaştırıldı. DNA bağlama sonrası örnekler agaroz jele yüklendi ve elektroforez sonrası görüntüleme yapıldı. Jel görüntüsüne bakıldığında, DNA bantlarının yokluğu ile nPEI ve bPEI'nin DNA'yı etkin bir şekilde bağladığı sonucuna varıldı (Şekil 28). nPEI ile farklı N/P oranları çalışıldı. Öncelikle farklı N/P oranları kullanılarak 1 ve 3 µg DNA bağlayan PEI/DNA kompleksleri oluşturuldu. Hazırlanan örnekler, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra agaroz jele yüklendi ve elektroforez sonrası görüntüleme yapıldı. Jel görüntüsü incelendiğinde, 1 µg DNA'nın çoğunluğunun bağlandığı, 3 µg DNA'nın ise tamamının bağlanmadığı görüldü (Şekil 29).

N/P:10 oranında PEI ile 3 µg DNA'nın bağlanması için farklı konsantrasyonda MSNP-NH₂ kullanılarak manyetofektinler hazırlandı. Hazırlanan manyetofektinler, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra agaroz jele yüklendi ve elektroforez sonrası görüntüleme yapıldı. Jel görüntüsüne bakıldığında, artan MSNP-NH₂ konsantrasyonunda PEI varlığıyla daha çok DNA'nın bağlandığı görüldü (Şekil 30).

Daha sonra farklı N/P oranları kullanılarak partikül/DNA/PEI kompleksi (manyetofektin) hazırlandı. Manyetofektinler, agaroz jele yüklendi ve elektroforez sonucu elde edilen jel görüntüsüne bakıldığında, artan N/P oranlarında DNA'ya ait bandın kaybolması ile 1 µg DNA'nın çoğunluğunun bağlanabildiği görülürken, N/P:15 oranında bile DNA'ya ait bandın varlığı ile 3 µg DNA'nın tamamının bağlanmadığı görüldü (Şekil 31). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, daha fazla DNA bağlanması için yüksek N/P oranlarında PEI kullanılması gerektiği sonucuna varıldı. Ma ve arkadaşları, manyetofektin hazırlarken N/P: 0, 5, 10, 20, 30 oranlarında ekstra PEI kullanmıştır. Manyetofektinler jele yüklenip görüntüledikten sonra çalışılan tüm N/P oranlarında 200 ng DNA'nın tamamının bağlandığı bildirilmiştir (Ma *et al.*, 2011).

Tüm manyetofektin optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen veriler bir bütün olarak değerlendirildiğinde; artan MNP ve PEI miktarı ile 1 µg DNA'nın büyük bir kısmının bağlanabildiği, DNA'ya ait bantların agaroz jelde görülmemesi ile belirlendi. Daha yüksek DNA miktarlarının bağlanabilmesi için ise hücreler için toksik olmayacak daha yüksek dozda MNP ve PEI'nin kullanılabileceği düşünüldü.

Manyetofektin hazırlarken kullanılan partikül ve PEI'lerin MCF-10A hücreleri için sitotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla MTS testi yapıldı. Bu test, mitokondriyal tetrazolyum tuzunun canlı hücreler tarafından metabolize edilerek 490-500

nm’de absorbans veren formazan boyasının ölçülmesine dayanır. 96 kuyulu plaklarda kültüre edilen MCF-10A hücrelerine 10-100 µg/mL konsantrasyonda sentezlenen MSNP, MSNP@PEI ve MSNP-NH₂ uygulandı. Uygulamadan 48 saat sonra hücrelere MTS testi yapıldı. MSNP uygulaması yapılan hücrelerin MTS verilmeden önce ışık mikroskopunda alınan görüntüleri incelendiğinde, artan konsantrasyonlarda bile hücre yapısının ve morfolojisinin iyi olduğu görüldü (Şekil 32). MTS testi sonucu alınan ölçümlerden elde edilen grafiğe bakıldığında canlılığın artan MSNP konsantrasyonlarında bile %80’nin üzerinde olduğu görüldü (Şekil 33). Canlılığın %80’nin üzerinde olması, silika kaplama esnasında kullanılan CTAB’ın tamamen uzaklaştırılmış olması ve partikülün silika ile biyouyumlu hale getirildiğinin kanıtı niteliğindedir. MSNP@PEI uygulaması yapılan hücrelerin MTS uygulanmadan önce ışık mikroskopunda alınan görüntüleri incelendiğinde hücre yapısının ve morfolojisinin artan konsantrasyonlarda önemli ölçüde bozulduğu, hücrelerin çekirdeklerinin kaybolduğu ve hücrelerin büzüştüğü görüldü (Şekil 34). Bu durumun nedeni olarak, yüksek pozitif yüzeye sahip PEI’nin hücre büyüme ortamını bazik hale getirmesiyle hücrelerin strese girmesi ve dolayısıyla apoptoz yolağının aktifleşmiş olabileceği düşünüldü. MTS testi sonucu alınan ölçümlerden elde edilen grafiğe bakıldığında artan MSNP@PEI konsantrasyonlarında hücre canlılığının %70’in altında olduğu görüldü (Şekil 35). MSNP-NH₂ uygulaması yapılan hücrelerin MTS verilmeden önce ışık mikroskopunda alınan görüntüleri incelendiğinde ise artan konsantrasyonlarda hücre morfolojisinin çok fazla etkilenmediği görüldü (Şekil 36). MTS testi sonucu alınan ölçümlerin grafiğine bakıldığında da artan MSNP-NH₂ konsantrasyonlarında hücre canlılığının %80 civarlarında olduğu gözlemlendi (Şekil 37). Manyetofektin hazırlarken DNA’yı koruma amacıyla kullanılan ekstra PEI’lerin hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek için hücrelere 0,25-10 µg aralığında nPEI ve bPEI uygulandı. Uygulamadan 48 saat sonra hücrelere MTS testi yapıldı. MTS testi sonucunda elde edilen grafiğe bakıldığında, bPEI’nin yüksek miktarlarının hücreler için önemli düzeyde toksik olduğu, nPEI’nin ise bPEI kadar hücre canlılığını olumsuz yönde etkilemediği görüldü (Şekil 38). Moghimi ve arkadaşları, PEI sitotoksitesinin moleküler temelini anlamak amacıyla yaptığı çalışmada dallı (25 kDa) ve lineer (750 kDa) PEI’nin hem hücre membran hasarını indükleyebildiğini hem de klinik olarak çalışılan üç insan hücre hattında (Jurkat T hücreleri, göbek damarı endotel hücreleri ve THLE3 hepatosit benzeri hücreler) apoptozu başlatabildiğini bildirmiştir (Moghimi, 2005)

İyi bir transfeksiyon etkinliği için dikkat edilmesi gereken önemli bir husus, stres faktörleri oluşturmayan ve hücreleri öldürmeyecek konsantrasyonlarda gen aktarım materyalleri ile çalışmaktır. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlara göre, sentezlenen MSNP’nin biyouyumlu olduğu, fakat yüzey modifikasyonu olmadan DNA’nın

bağlanamadığı bundan dolayı manyetofektin hazırlamada tercih edilemeyeceği belirlendi. Diğer yandan, sentezlenen MSNP@PEI'nin de hücrelerde meydana getirdiği yüksek toksisite nedeniyle gen aktarım aracı olarak kullanılamayacağı sonucuna varıldı. Son olarak, sentezlenen MSNP-NH₂'nin ise 50-80 µg/mL konsantrasyon aralığında manyetofektin hazırlama için uygun olduğu belirlendi.

Hücelere gen aktarımının başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için gen aktarım aracının MCF-10A hücrelerine girdiğinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle yeşil floresan ışımaya veren Oregon-Green ile etiketlenen MSNP'ler hücelere uygulandı. Uygulama sonrası hücreler, farklı sürelerde mıknatıs üzerinde inkübasyona bırakıldı. Uygulamadan sonra, hücreler fiks edilerek DAPI ile boyandı ve lazer taramalı konfokal mikroskopta görüntülendi. Konfokal mikroskop görüntülerine bakıldığında, hiç mıknatıs uygulamadan bile hücresel alımın gerçekleştiği, en iyi hücresel alımın ise 30 dakika mıknatıs tutulan grupta gerçekleştiği görüldü (Şekil 39, Şekil 40). 30 dakika mıknatıs uygulamasında daha çok Oregon Green etiketli MSNP'lerin hücrenin içerisinde olduğu, Şekil 41'deki görüntüde DAPI ışımalarının başladığı ve bittiği noktalarda yeşil floresan ışımalarının da başlayıp bitmesiyle anlaşılmaktadır. Partiküllerin çekirdeğe girmesi taşıdıkları DNA'nın da çekirdeğe ulaştırıldığı anlamına gelmektedir. Yıldız ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, MNP aracılığıyla *Pichia pastoris* hücrelerine gen aktarımını hedeflemiş ve hücresel alımı belirlemek için TIRTC ile sentezlenen MNP'leri mıknatıs aracılığıyla göndermiştir. En iyi hücresel alımın 15 dakika mıknatıs tutulan grupta olduğu bildirilmiştir (Yıldız *et al.*, 2021). Kralj ve arkadaşları ise floresan etiketli nanopartiküller aracılığıyla hücresel alımda partikül yüzey yükünün etkisini MCF-10A, neoT ve PC-3 hücrelerini kullanarak araştırmış ve sonuç olarak partikül yükünün hücresel alımda etkili olduğunu rapor etmişlerdir (Kralj *et al.*, 2012).

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, düşük toksisitesi ve DNA'nın bağlanabileceği uygun yüzeye sahip olduğu için gen aktarım aracı olarak MSNP-NH₂ seçildi. Ekstra kullanılacak PEI'nin nispeten düşük toksisitesinden dolayı nPEI olmasına karar verildikten sonra optimize edilen şartlarda pCMV-Azu-GFP ile manyetofektin hazırlandı. Uygulamadan 48 saat sonra hücreler fiks edilerek DAPI ile boyandı. Transfekte hücrelerde ifade edilen Azu-GFP füzyon proteini, lazer taramalı konfokal mikroskopta görüntülendi. Konfokal mikroskopta görülen GFP ışımaları sayesinde azurin proteininin üretildiği anlaşılmaktadır (Şekil 42). Y. Wang ve arkadaşları yaptığı çalışmada, elde ettikleri Ruc-GFP plazmitini kalsiyum fosfat çökeltme yöntemiyle hücelere transfekte etmiş ve GFP füzyon protein üreten hücreleri floresan mikroskop kullanarak görüntülemiştir (Y. Wang *et al.*, 2002).

Hücrelerde azurin proteininin ekspresyonu, western blot analizi ile de doğrulandı. Bunun için belirlenen şartlarda manyetofektinler hazırlanarak MCF-10A hücrelerine manyetofeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Uygulama gruplarında manyetofektin için 25, 50 ve 75 µg/mL konsantrasyonda MSNP-NH₂ kullanıldı. 3 ve 9 µg/mL konsantrasyonda pCMV-Azu-GFP kullanıldı. PEI ise N/P:23, 35, 46, 103, 207, 310 oranlarında kullanıldı. Manyetofektin hazırlanırken kullanılan yüksek N/P oranlarıyla manyetofektin ortamındaki DNA'nın büyük oranda bağlanması amaçlandı. Hazırlanan manyetofektinler, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 6 kuyulu plaklarda büyütülen hücrelere manyetofektinler uygulandı ve plak 30 dakika mıknatıs üzerinde tutuldu. Süre sonunda 6 kuyulu plak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan 4 saat sonra hücre ortamı uzaklaştırıldı ve taze büyüme besiyeri eklendi. Daha sonra hücreler 48 saat boyunca inkübatör içerisinde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hücreler, RIPA tamponu ile parçalanarak hücre lizati elde edildi. Lizattaki proteinler, TCA ile çöktürüldü ve SDS-PAGE jeline yüklenerek yürütüldü. Elektroforez sonrasında anti-azurin antikoru kullanılarak western blot analizi yapıldı. Analiz sonucuna bakıldığında kontrol grubu hariç diğer tüm gruplarda füzyon proteinin (Azu-GFP) beklenen yerde (yaklaşık 41 kDa; azurin: ~14 kDa ve GFP: ~27 kDa) bant verdiği görüldü. Şekil 43 ve Şekil 44'teki membran görüntülerine bakıldığında, tüm manyetofeksiyon yapılan gruplarda füzyon proteine ait farklı yoğunlukta bantların görülmesi, partiküller aracılığıyla genin farklı miktarlarda hücrelere girmiş olabileceğini düşündürmektedir. Böylece MCF-10A hücrelerine manyetofeksiyon yöntemi ile aktarılan bakteri kaynaklı azurin proteininin memeli hücrelerinde ekspresyonu teyit edilmiş oldu. Ünver ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, pPICZαA-Azu rekombinant vektörü, *Pichia pastoris*'e transfer edilmiş ve hücreler tarafından üretilen heterolog protein, anti-azurin antikoru ile yapılan western blot analizi ile görüntülenmiştir (Ünver *et al.* 2020).

Literatürde gen aktarımı zor olan hücrelere manyetofeksiyon yöntemi ile gen aktarımının diğer yöntemlere göre daha kolay ve ucuz olduğu bildirilmektedir (Yildiz *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2017) Ancak bu çalışmada elde edilen konfokal mikroskop ve western blot sonuçlarından yola çıkarak MCF-10A hücrelerine manyetofeksiyon yöntemi ile gen aktarımında yüksek transfeksiyon etkinliğinin görülmemesinin nedeni, sağlıklı hücrelerin uygulama sırasında kullanılan maddelere karşı hassasiyet göstermesi sonucu strese girmesi olarak düşünülebilir. Literatürde MCF-10A hücrelerine diğer transfeksiyon yöntemleri ile gen aktarımında zorluk yaşanmaktadır. Örneğin, ticari olarak temin edilebilen bir lipozom gen aktarım aracıyla elde edilebilecek transfeksiyon etkinliğinin %10-20 arasında olduğu bildirilmiştir (Invitrogen, n.d.). Son yıllar da azurin ve p28 üzerinde yapılan araştırmalar, azurin ve p28'in birkaç farklı sinyal yolağına müdahale edebilen çok hedefli antikanser ajanları

olduğunu göstermiştir. Bu nedenle azurin ve p28, tek başına veya diğer antikanser ilaçları ile sinerjistik olarak antikanser ajanları olarak uygulanabilir. Ayrıca, lipozomlarla veya nanopartiküllere konjugasyondan sonra, p28, kanser hedefli ilaç dağıtımını gerçekleştirme potansiyeline sahiptir (Huang *et al.*, 2020).

Bu tez çalışmasında manyetofeksiyon yöntemi ile MCF-10A hücrelerine azurin geninin girişi sağlanmış ve hücrelerin azurin proteinini ifade ettiği gözlenmiştir. Dolayısıyla, meme kanseri tedavisi için hedeflenecek sonraki gen terapisi çalışmalarında, bu tez çalışması kapsamında elde edilen konstraktın (pCMV-Azu-GFP) manyetofeksiyon yöntemi ile meme kanseri hücrelerine gönderilebileceği ve bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar doğrultusunda, terapi amacıyla kullanılacak azurin genini taşıyan konstraktın kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelere girmesi durumunda azurin ekspresyonu gerçekleşse de hücrelerin olumsuz yönde etkilenmeyeceği öngörülmektedir.

Sonuç ve Öneriler

1. Bu tez çalışmasında *P. aeruginosa* azurin geni manyetofeksiyon yöntemiyle MCF-10A hücrelerine transfer edilmiş ve hücrelerde AZU-GFP füzyon proteininin ekspresyonu gösterilmiştir.
2. pCMV-GFP'ye kodon optimize azurin geni yerleştirilerek pCMV-Azu-GFP elde edilmiştir.
3. Gen aktarım aracı olarak kullanılan Fe_3O_4 MNP'ler termal dekompozisyon yöntemiyle sentezlenmiş ve 10 nm boyutlarında manyetitler elde edilmiştir.
4. Manyetitlerin yüzeyi farklı sentez yöntemleriyle kaplanarak MSNP@PEI ve MSNP-NH₂'ler elde edilmiştir.
5. Sentezlenen nanopartiküllerin TEM, FTIR ve DLS analizleriyle karakterizasyonu yapılmış ve elde edilen sonuçlara göre gen aktarım aracı olarak kullanılabileceği görülmüştür.
6. Yapılan manyetofektin optimizasyon çalışmaları sonucunda sentezlenen partiküllerin başarılı bir şekilde DNA'yı bağladığı belirlenmiştir.
7. Sentezlenen nanopartiküllerin ve manyetofektin ortamında kullanılan PEI'nin yüksek konsantrasyonlarının MCF-10A hücreleri için toksik olduğu belirlenmiştir.
8. Literatürde herhangi bir yöntemle gerçekleştirilen transfeksiyonun etkinliğinin düşük olduğu bilinen MCF-10A hücrelerine manyetofeksiyon yöntemiyle gen aktarımı yapılabilmektedir.
9. Tümör tedavisinde kullanılabilen azurinin sağlıklı hücrelerde toksik etki göstermeden ifade edildiği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- Aarti P. Nikam. (2013). Nanoparticles: An Overview. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 3(2), 1121–1127. <https://doi.org/10.22270/jddt.v3i2.407>
- Acar, M. (2020). *Pectobacterium chrysanthemi* Pektin Metilesteraz Enziminin *Pichia pastoris* ile Rekombinant Üretimi. (Y. Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Al-Hawash, A.B., Zhang, X., Ma, F. (2017) Strategies of codon optimization for high-level heterologous protein expression in microbial expression systems. *Gene Reports*. 9: 46-53.
- Amara, D., Felner, I., Nowik, I., & Margel, S. (2009). Synthesis and characterization of Fe and Fe₃O₄ nanoparticles by thermal decomposition of triiron dodecacarbonyl. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 339(1–3), 106–110. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.02.003>
- Andersen, D. C. (2004). Recombinant Protein Expression. *Dictionary of Bioinformatics and Computational Biology*, 117–123. <https://doi.org/10.1002/0471650129.dob0608>
- Assenberg, R., Wan, P. T., Geisse, S., & Mayr, L. M. (2013). Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(3), 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.03.008>
- Kandemir B. B., (2013). Polyethylenimine – starch nanoparticles for cancer gene therapy. (Y. Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Bi, Q., Song, X., Hu, A., Luo, T., Jin, R., Ai, H., & Nie, Y. (2020). Magnetofection: Magic magnetic nanoparticles for efficient gene delivery. *Chinese Chemical Letters*, 31(12), 3041–3046. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2020.07.030>
- Brondyk, W. H. (2009). Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 463, Issue C). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63011-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63011-1)
- Butler, M. (2006). Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology*, 50(1–3), 57–76. <https://doi.org/10.1007/s10616-005-4537-x>
- Carter, B. J. (2005). Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Human Gene Therapy*, 16(5), 541–550. <https://doi.org/10.1089/hum.2005.16.541>
- Chakrabarty, A. M., Bernardes, N., & Fialho, A. M. (2014). Today and tomorrow Bacterial proteins and peptides in cancer therapy. 5979. <https://doi.org/10.4161/bioe.29266>
- Choidas, A. (1998). The suitability and application of a GFP-actin fusion protein for long-term imaging of the organization and dynamics of the cytoskeleton in mammalian cells. *European Journal of Cell Biology*, 77(2), 81–90. [https://doi.org/10.1016/S0171-9335\(98\)80075-7](https://doi.org/10.1016/S0171-9335(98)80075-7)
- Dalton, A. C., & Barton, W. A. (2014). Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Science*, 23(5), 517–525. <https://doi.org/10.1002/pro.2439>
- Danthanarayana, A. N., Manatunga, D. C., de Silva, R. M., Chandrasekharan, N. V., & de Silva, K. M. N. (2018). Magnetofection and isolation of DNA using polyethyleneimine functionalized magnetic iron oxide nanoparticles. *Royal Society Open Science*, 5(12). <https://doi.org/10.1098/rsos.181369>

- Dingermann, T. (2008). Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *Biotechnology Journal*, 3(1), 90–97. <https://doi.org/10.1002/biot.200700214>
- Farver, O., Blatt, Y., & Pecht, I. (1982). Resolution of two distinct electron transfer sites on azurin. *Biochemistry*, 21(15), 3556–3561. <https://doi.org/10.1021/bi00258a005>
- Fialho, A. M., & Chakrabarty, A. M. (2012). Patent controversies and court cases cancer diagnosis, therapy and prevention. *Cancer Biology and Therapy*, 13(13), 1229–1234. <https://doi.org/10.4161/cbt.21958>
- Fuglsang, A. (2003). Codon optimizer: A freeware tool for codon optimization. *Protein Expression and Purification*, 31(2), 247–249. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00213-4](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00213-4)
- Fussenegger, M., Morris, R. P., Fux, C., Rimann, M., von Stockar, B., Thompson, C. J., & Bailey, J. E. (2000). Streptogramin-based gene regulation systems for mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 18(11), 1203–1208. <https://doi.org/10.1038/81208>
- Fux, C., Moser, S., Schlatter, S., Rimann, M., Bailey, J. E., & Fussenegger, M. (2021). Streptogramin- And tetracycline-responsive dual regulated expression of p27Kip1sense and antisense enables positive and negative growth control of Chinese hamster ovary cells. *Nucleic Acids Research*, 29(4), 1–7. <https://doi.org/10.1093/nar/29.4.e19>
- Gao, M., Zhou, J., Su, Z., & Huang, Y. (2017). Bacterial cupredoxin azurin hijacks cellular signaling networks: Protein–protein interactions and cancer therapy. *Protein Science*, 26(12), 2334–2341. <https://doi.org/10.1002/pro.3310>
- Gupta, A. K., & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 3995–4021. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012>
- Hacein-Bey-Abina, S. (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *English Journal*, 346(13), 957–966. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012616>
- Heffner, K. M., Wang, Q., Hizal, D. B., Can, Ö., & Betenbaugh, M. J. (2018). Glycoengineering of Mammalian Expression Systems on a Cellular Level. https://doi.org/10.1007/10_2017_57
- Hitchman, R. B., Possee, R. D., & King, L. A. (2009). Baculovirus Expression Systems for Recombinant Protein Production in Insect cells. *pdf*. 46–54.
- Hong, R. Y., Li, J. H., Zhang, S. Z., Li, H. Z., Zheng, Y., Ding, J. min, & Wei, D. G. (2009). Preparation and characterization of silica-coated Fe₃O₄ nanoparticles used as precursor of ferrofluids. *Applied Surface Science*, 255(6), 3485–3492. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.09.071>
- Huang, F., Shu, Q., Qin, Z., Tian, J., Su, Z., Huang, Y., & Gao, M. (2020). Anticancer actions of azurin and its derived peptide p28. *Protein Journal*, 39(2), 182–189. <https://doi.org/10.1007/s10930-020-09891-3>
- Invitrogen. (n.d.). *SK-BR-3 Breast cancer cells*.
- Inoue, T., & Krumlauf, R. (2001). An impulse to the brain—using in vivo electroporation. *Nature Neuroscience*, 4(11s), 1156–1158. <https://doi.org/10.1038/nn1101-1156>
- Jenkins, N., Parekh, R. B., & James, D. C. (1996). Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nature Biotechnology*, 14(8), 975–981. <https://doi.org/10.1038/nbt0896-975>

- Johnson, I. S. (1983). Human insulin from recombinant dna technology. *Science*, 219(4585), 632–637.
- Joseph, M., Trinh, H. M., & Mitra, A. K. (2017). Peptide and protein-based therapeutic agents. In *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42978-8.00007-3>
- Kanda, T., Sullivan, K. F., & Wahl, G. M. (1998). Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Current Biology*, 8(7), 377–385. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70156-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70156-3)
- Kaspar, A. A., & Reichert, J. M. (2013). Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discovery Today*, 18(17–18), 807–817. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.05.011>
- Kaymak, E., (2008). *Arabidopsis thaliana* lipases: Cloning and expression in *Pichia pastoris*. (Y. Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kim, C. H., Oh, Y., & Lee, T. H. (1997). Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells. *Gene*, 199(1–2), 293–301. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00384-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00384-3)
- Kim, & Eberwine. (2010). Mammalian cell transfection : The present and the future. 3173–3178. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
- Kim, J., Lee, J. E., Lee, J., Yu, J. H., Kim, B. C., An, K., Hwang, Y., Shin, C. H., Park, J. G., Kim, J., & Hyeon, T. (2006). Magnetic fluorescent delivery vehicle using uniform mesoporous silica spheres embedded with monodisperse magnetic and semiconductor nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*, 128(3), 688–689. <https://doi.org/10.1021/ja0565875>
- Kralj, S., Rojnik, M., & Romih, R. (2012). Effect of surface charge on the cellular uptake of fluorescent magnetic nanoparticles. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1151-7>
- Kyung, H. C., Basma, H., Singh, J., & Cheng, P. W. (2005). Activation of CMV promoter-controlled glycosyltransferase and β -galactosidase glycogenes by butyrate, trichostatin A, and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Glycoconjugate Journal*, 22(1–2), 63–69. <https://doi.org/10.1007/s10719-005-0326-1>
- Laemmli. (1970). © 1970 Nature Publishing Group. 228, 726–734. <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-change-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certain-antibiotics/>
- Lai, J., Shah, B. P., Zhang, Y., Yang, L., & Lee, K. B. (2015). Real-time monitoring of ATP-responsive drug release using mesoporous-silica-coated multicolor upconversion nanoparticles. *ACS Nano*, 9(5), 5234–5245. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b00641>
- Li, T., Shen, X., Geng, Y., Chen, Z., Li, L., Li, S., Yang, H., Wu, C., Zeng, H., & Liu, Y. (2016). Folate-functionalized magnetic-mesoporous silica nanoparticles for drug/gene codelivery to potentiate the antitumor efficacy. In *ACS Applied Materials and Interfaces* (Vol. 8, Issue 22). <https://doi.org/10.1021/acsami.6b02963>
- Liberman, A. (2015). *NIH Public Access*. 69, 132–158. <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2014.07.001.Synthesis>
- Lodish H, et al. (2000). Molecular Cell Biology 5th Ed. In W.H. Freeman. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/%5Cnhttp://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=K3JbjG1JiUMC&pgis=1>
- Ma, Y., Zhang, Z., Wang, X., Xia, W., & Gu, H. (2011). Insights into the mechanism of magnetofection using MNPs-PEI/pDNA/free PEI magnetofectins. *International*

- Mady, M. M., Mohammed, W. A., El-Guendy, N. M., & Elsayed, A. A. (2011). Effect of Polymer Molecular Weight on the Dna/Pei Polyplexes Properties. *J. Biophys*, 21(2), 151–165.
- Mehier-Humbert, S., & Guy, R. H. (2005). Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(5), 733–753. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.12.007>
- Moghimi, S. M. (2005). A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Enhanced Reader*.
- Möller, K., Kobler, J., & Bein, T. (2007). Colloidal suspensions of nanometer-sized mesoporous silica. *Advanced Functional Materials*, 17(4), 605–612. <https://doi.org/10.1002/adfm.200600578>
- Mykhaylyk, O., Antequera, Y. S., Vlaskou, D., & Plank, C. (2007). Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. *Nature Protocols*, 2(10), 2391–2411. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.352>
- Nahler, G. (2009). Cell Line. *Dictionary of Pharmaceutical Medicine*, October, 23–23. https://doi.org/10.1007/978-3-211-89836-9_174
- Pavlou, A. K., & Reichert, J. M. (2004). Recombinant protein therapeutics - Success rates, market trends and values to 2010. *Nature Biotechnology*, 22(12), 1513–1519. <https://doi.org/10.1038/nbt1204-1513>
- Punj, V., Bhattacharyya, S., Saint-Dic, D., Vasu, C., Cunningham, E. A., Graves, J., Yamada, T., Constantinou, A. I., Christov, K., White, B., Li, G., Majumdar, D., Chakrabarty, A. M., & das Gupta, T. K. (2004). Bacterial cupredoxin azurin as an inducer of apoptosis and regression in human breast cancer. *Oncogene*, 23(13), 2367–2378. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207376>
- Recillas-Targa, F. (2006). Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Molecular Biotechnology*, 34(3), 337–354. <https://doi.org/10.1385/MB:34:3:337>
- Schenborn, E. T., & Goiffon, V. (2000). DEAE-dextran transfection of mammalian cultured cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 130(7), 147–153. <https://doi.org/10.1385/1-59259-686-x:147>
- Scherer, F., Anton, M., Schillinger, U., Henke, J., Bergemann, C., Krüger, A., Gänsbacher, B., & Plank, C. (2002). Magnetofection: Enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Therapy*, 9(2), 102–109. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301624>
- Schneckenburger, H., Hendinger, A., Sailer, R., Strauss, W. S. L., & Schmitt, M. (2002). Laser-assisted optoporation of single cells. *Journal of Biomedical Optics*, 7(3), 410. <https://doi.org/10.1117/1.1485758>
- Solak, K., Mavi, A., & Yılmaz, B. (2021). Disulfiram-loaded functionalized magnetic nanoparticles combined with copper and sodium nitroprusside in breast cancer cells. *Materials Science and Engineering C*, 119(August 2020), 111452. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111452>
- Sun, S. N., Wei, C., Zhu, Z. Z., Hou, Y. L., Venkatraman, S. S., & Xu, Z. C. (2014). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical

- applications. *Chinese Physics B*, 23(3), 1–19. <https://doi.org/10.1088/1674-1056/23/3/037503>
- Tu, Y., Wang, G., Wang, Y., Chen, W., Zhang, L., Liu, Y., Jiang, C., Wang, S., Bu, Z., & Cai, X. (2016). Extracellular expression and antiviral activity of a bovine interferon- α through codon optimization in *Pichia pastoris*. *Microbiological Research*, 191, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.009>
- Ünver, Y. (2014). İnsan paraoksonaz 1 (PON1) geninin klonlanması, *Pichia pastoris*'te ekspresyonu, rekombinant enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu. (Doktora Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- van de Kamp, M., Silvestrini, M. C., Brunori, M., van Beeumen, J., Hali, F. C., & Canters, G. W. (1990). Involvement of the hydrophobic patch of azurin in the electron- transfer reactions with cytochrome c551 and nitrite reductase. *European Journal of Biochemistry*, 194(1), 109–118. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19434.x>
- Walsh, G. (2006). Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nature Biotechnology*, 24(7), 769–776. <https://doi.org/10.1038/nbt0706-769>
- Wang, C., Weng, L., Hsu, S., Sun, Y., Yang, Y., Chan, Y., Yang, Y., & Ph, D. (2010). pCMV–BMP-2 transfected cell mediated gene therapy in anterior cruciate ligament reconstruction in rabbits. *YJARS*, 26(7), 968–976. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2009.11.014>
- Wang, D., Xu, X., Zhang, K., Sun, B., Wang, L., Meng, L., Liu, Q., Zheng, C., Yang, B., & Sun, H. (2018). Codelivery of doxorubicin and MDR1-siRNA by mesoporous silica nanoparticles-polymerpolyethylenimine to improve oral squamous carcinoma treatment. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 187–198. <https://doi.org/10.2147/IJN.S150610>
- Wang, W., Li, W., Ou, L., Flick, E., Mark, P., Nesselmann, C., Lux, C. A., Gatzert, H. H., Kaminski, A., Liebold, A., Lützow, K., Lendlein, A., Li, R. K., Steinhoff, G., & Ma, N. (2011). Polyethylenimine-mediated gene delivery into human bone marrow mesenchymal stem cells from patients. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(9), 1989–1998. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01130.x>
- Wang, Y., Yu, Y. A., Shabahang, S., Wang, G., & Szalay, A. A. (2002). Renilla luciferase–Aequorea GFP (Ruc-GFP) fusion protein, a novel dual reporter for real-time imaging of gene expression in cell cultures and in live animals. *Molecular Genetics and Genomics*, 268(2), 160–168. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0751-9>
- Warso, M. A., Richards, J. M., Mehta, D., Christov, K., Schaeffer, C., Rae Bressler, L., Yamada, T., Majumdar, D., Kennedy, S. A., Beattie, C. W., & das Gupta, T. K. (2013). A first-in-class, first-in-human, phase i trial of p28, a non-HDM2-mediated peptide inhibitor of p53 ubiquitination in patients with advanced solid tumours. *British Journal of Cancer*, 108(5), 1061–1070. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.74>
- Washbourne, P., & McAllister, A. K. (2002). Techniques for gene transfer into neurons. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(5), 566–573. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(02\)00365-3](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00365-3)
- Weikert, S., Papac, D., Briggs, J., Cowfer, D., Tom, S., Gawlitzek, M., Lofgren, J., Mehta, S., Chisholm, V., Modi, N., Eppler, S., Carroll, K., Chamow, S., Peers, D., Berman, P., & Krummen, L. (1999). Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize sialic acid content of recombinant glycoproteins. *Nature Biotechnology*, 17(11), 1116–1121. <https://doi.org/10.1038/15104>

- Woods, N. B., Muessig, A., Schmidt, M., Flygare, J., Olsson, K., Salmon, P., Trono, D., von Kalle, C., & Karlsson, S. (2003). Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: Risk of insertional mutagenesis. *Blood*, 101(4), 1284–1289. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2238>
- Wu, W., He, Q., & Jiang, C. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Research Letters*, 3(11), 397–415. <https://doi.org/10.1007/s11671-008-9174-9>
- Xia, W., Bringmann, P., McClary, J., Jones, P. P., Manzana, W., Zhu, Y., Wang, S., Liu, Y., Harvey, S., Madlansacay, M. R., McLean, K., Rosser, M. P., MacRobbie, J., Olsen, C. L., & Cobb, R. R. (2006). High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines. *Protein Expression and Purification*, 45(1), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.07.008>
- Xu, Z., Shen, C., Hou, Y., Gao, H., & Sun, S. (2009). Oleylamine as both reducing agent and stabilizer in a facile synthesis of magnetite nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 21(9), 1778–1780. <https://doi.org/10.1021/cm802978z>
- Yamada, T., Mehta, R. R., Lekmine, F., Christov, K., King, M. L., Majumdar, D., Shilkaitis, A., Green, A., Bratescu, L., Beattie, C. W., & das Gupta, T. K. (2009). A peptide fragment of azurin induces a p53-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(10), 2947–2958. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0444>
- Yildiz, S., Solak, K., Acar, M., Mavi, A., & Unver, Y. (2021). Magnetic nanoparticle mediated-gene delivery for simpler and more effective transformation of *Pichia pastoris*. *Nanoscale Advances*, 3(15), 4482–4491. <https://doi.org/10.1039/d1na00079a>
- Yin, J., Li, G., Ren, X., & Herrler, G. (2007). Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127(3), 335–347. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.012>
- Zhao, W., Cui, B., Peng, H., Qiu, H., & Wang, Y. (2015). Novel method to investigate the interaction force between etoposide and APTES-functionalized Fe₃O₄@nSiO₂@mSiO₂ nanocarrier for drug loading and release processes. *Journal of Physical Chemistry C*, 119(8), 4379–4386. <https://doi.org/10.1021/jp512447s>
- Zhao, X., Meng, Z., Wang, Y., Chen, W., Sun, C., Cui, B., Cui, J., Yu, M., Zeng, Z., Guo, S., Luo, D., Cheng, J. Q., Zhang, R., & Cui, H. (2017). Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers. *Nature Plants*, 3(12), 956–964. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0063-z>

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Saadet KALAKENGER
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Kahramanmaraş İmam Hatip Kız Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Gen Mühendisliği Bilim Dalı (2021)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta
Bildiriler	
1. Acar, Melek & Solak, Kübra & Kalakenger, Saadet & Yıldız, Şeyda & Unver, Yagmur & Mavi, Ahmet. Synthesis of Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications and Their Use in Magnetic Hyperthermia.(2020) 2. Yıldız, Şeyda & Solak, Kübra & Kalakenger, Saadet & Acar, Melek & Mavi, Ahmet & Unver, Yagmur. (2020). Investigation of Magnetofection Conditions to Improve Transfection Efficiency by Using Magnetofectin Including a Reporter Gene. 9th International Molecular Biology and Biotechnology Congress (Molbiotech-2020) 3. Turhan, Fatma & Solak, Kübra & Kalakenger, Saadet & Unver, Yagmur & Mavi, Ahmet. Loading and Elution of DNA from Nanoparticles in a Cell-free System., IGSCONG'21 International Graduate Studies Congress, (2021).	