

## Gen terapisi yöntemleri: fiziksel ve kimyasal metotlar

### Gene therapy techniques: physical and chemical methods

Azade ATTAR

#### ÖZET

Gen terapisi, genetik temeli bulunan hastalıkların tedavisinde stratejiler geliştirmek için kullanılan ve günümüzde tedavisi olmayan hastalıklar için umut vaat eden bir yöntemdir. Başarılı bir gen terapisi, ilgili transgenleri içeren plazmidlerin hedeflenmiş hücrelere transfeksiyonunu gerektirir. Gen tedavisi çalışmalarında karşılaşılan en önemli sorun olan DNA moleküllerinin hedef hücrelere ulaştırılması, bu alanda çalışan tüm araştırmacıları etkili bir yol bulmaya yöneltmiştir. DNA'nın hücrelere girme yeteneğinin kısıtlı oluşu ve DNA'nın enzimatik degradasyona uğrama ihtimali nedeniyle DNA transfeksiyonu çoğunlukla bir vektör aracılığıyla gerçekleştirilir. Bunlar, viral vektörler ve viral olmayan vektörler olarak iki gruba ayrılmaktadır. Adenovirüs, adeno-assosiyé virüs, herpes simpleks ve retrovirüsler viral vektörlerin başta gelen örnekleridir. Viral olmayan vektörler ise kendi içinde fiziksel ve kimyasal olarak ayrılırlar. Fiziksel metotlar; mikroenjeksiyon, partikül bombardımanı - gen tabancası, elektroporasyon, sonoporasyon, laser ışınması ve magnetofeksiyondur. Kimyasal metotlar ise viral vektörlere alternatif olarak ortaya çıkmış olan lipozomları kapsarlar. Bu vektörler, hücre çekirdeğine yapılacak gen transferini arttırmak amacıyla üç önemli özelliğe sahip olmalıdırlar. Bunlar DNA'nın negatif yükünü maskeleyerek, DNA molekülünü sıkıştırarak taşıyacağı kargoyu kompakt hale getirmek ve onu hücre

#### ABSTRACT

Gene therapy is used for developing strategies for the treatment of genetic diseases and it is a promising technique for people with incurable diseases. A successful gene therapy includes the transfection of plasmids with related transgenes into the target cells. The transfer of the DNA molecule to target cell is the main problem of the gene therapy studies which directed researchers to find an effective way of transfection. The transfection of DNA is commonly achieved by a vector because of the limited insertion ability of the DNA into the cells and the possibility of enzymatic degradation of DNA molecule. These vectors are grouped into two categories as viral and non-viral. Adenovirus, adeno-associated virus, herpes simplex and retrovirus are the main examples of viral vectors. Non-viral vectors are grouped into two as physical and chemical methods. The physical methods are microinjection, particle bombardment - gene gun, electroporation, sonoporation, laser beam and magnetofection. The chemical methods are consisted of liposomes which developed as an alternative to the viral vectors. These vectors must have three important features for the transfer of the related gene into the cell nucleus. Those are disguising the negative charge of the DNA, condensing the DNA molecule and protecting it from the intracellular nuclease activity.

Yıldız Teknik Üniversitesi, Davutpaşa Kampüsü, Kimya Metalürji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Esenler, İstanbul



İletişim / Corresponding Author : Azade ATTAR

Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Metalürji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 34210 Esenler İstanbul - Türkiye  
Tel : +90 212 383 46 49 E-posta / E-mail : azadeattar@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 01.06.2016  
Kabul Tarihi / Accepted : 16.10.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.43255

Attar A. Gen terapisi yöntemleri: fiziksel ve kimyasal metotlar Türk Hij Den Biol Derg, 2017; 74(1): 103-112

içi nükleaz degradasyonundan korumaktır. Lipozomlar gibi viral olmayan transfeksiyon sistemleri virüslerden daha fazla tercih edilir. Çünkü bunlar immünojenik değildir, yapımı kolaydır ve endüstriyel üretim amacıyla ölçek büyütme işlemi daha basittir. Lipozomal taşıma araçları morfoloji ve salınım karakteristiği açısından çeşitlilik sağlar; doku hedeflemede kullanılabilir ve plazmid DNA'yı degradatif nükleazların saldırılarından koruyabilir. 1987'de potansiyel taşıma sistemi olarak tanımlanmalarından beri, DNA-katyonik lipid kompleksleri çeşitli hücre tiplerinde farklı DNA aktarım protokollerinde kullanılmıştır ve halen gen terapisinin klinik çalışmaları için araştırılmaktadır. Bu derleme, yeni ve gelecek vaat eden bir teknik olarak kanser ve genetik temelli hastalıkların tedavisinde kullanılması hedeflenen gen terapisindeki kimyasal ve fiziksel yöntemleri anlatmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** gen terapisi, lipozomal vektörler, plazmid DNA, gen transferi

Non-viral transfection systems such as liposomes are preferred rather than viruses, because of being non-immunogenic, ease in formation and simple scale-up process in industrial production. Liposomal vectors have a diversity in morphology and in release characteristics, which they can be used tissue targeting and they can protect plasmid DNA from the attacks of degradative nucleases. DNA - cationic lipid complexes were used in different DNA transfer protocols in various cell types since defined as a potential transfer system in 1987 and is still being researched for the clinical gene therapy studies. This review highlights the chemical and physical methods of gene therapy as a novel and promising technique for the treatment of cancer and genetic disorders.

**Key Words:** gene therapy, liposomal vectors, plasmid DNA, gene transfer

## GİRİŞ

Moleküler biyolojideki son gelişmeler ve insan genomunun sekanslanması ile gen terapisi yöntemi genetik kaynaklı hastalıkların tedavisinde çok büyük bir önem kazanmıştır. Bu yeni tedavi yöntemi, mutasyona uğramış veya eksik olan genlerin yerine hedef hücrelere sağlıklı kopyaları vermek, ifadesini normal proteine yönlendirmek, doğru hücre fonksiyonları yenilemek gibi amaçları güder. Yeterli hedefleme yeteneği ve etkili transfeksiyon etkinliği olan güvenli gen terapi vektörlerinin geliştirilmesiyle bu yöntem insanlar üzerinde uygulanabilecektir (1). İdeal bir gen aktarım vektörünün sahip olması gereken özellikler hedef hücreye özgünlük, metabolik parçalanmaya ve immün sistem saldırılarına karşı direnç, minimal yan etkiler, terapötik geni ihtiyaç

duyulan süre boyunca belirli seviyede ifade etme yeteneği olarak özetlenebilir. Gen aktarım vektörleri iki kategoriye ayrılmaktadır:

1. Biyolojik vektörler
2. Kimyasal veya fiziksel yöntemler

İlk metot enfeksiyon olarak adlandırılan plazmid veya viral-aracılı prosesleri ifade eder. En çok kullanılan vektörler; klinik çalışmalarda denenmiş olan retrovirüsler ve adenovirüslerdir. Virüslerin avantajı yüksek transdüksiyon verimine sahip olmalarıdır ancak viral toksisite, konak immün cevabı ve hazırlanmasındaki zorluklar gibi istenmeyen birçok yan etkileri de vardır (2, 3). Viral olmayan gen transferi hücrelerin kimyasal veya fiziksel yoldan muamelesidir. Kimyasal metotlarda; DNA ile çeşitli

polikasyonlar (polipleksler) veya katyonik lipitler (lipopleksler) arasında kompleks oluşumu gerçekleştirir. Teknik olarak bu yaklaşım spesifik immün cevabı uyarmaz ve ölçek büyütme kolaydır. Buna karşın, etkinliği ve hedefleme potansiyeli zayıftır.

En basit ve güvenilir fiziksel / mekanik yaklaşım, sistemik kana veya lokal dokulara herhangi bir taşıyıcı olmaksızın çıplak DNA enjeksiyonudur. Fakat mononükleer fagositik sistem ve nükleazların hızlı degradasyonu nedeniyle çıplak DNA enjeksiyonundan sonra ifade seviyesi ve tedavi edilebilir doku alanı oldukça kısıtlıdır (4). Sonuç olarak, gen aktarım etkinliğini artırmak için yoğunlaşan ilgi diğer fiziksel manipülasyonlara dönmüştür. Bu metotlar, gen aktarım etkinliğinde önem taşıyan enjeksiyonlara DNA'nın etkili seyreltilmesi, hedef bölgeye ulaşabilme, hücreye ve çekirdeğe girme gibi çeşitli bariyerlerden atlatma yeteneğine sahip elementleri içermelidir (5).

Gen aktarım vektörlerinin diğer kategorisi ise kimyasal ve fiziksel yöntemleri içerir. Fiziksel yöntemler DNA'nın doğrudan hücre içine gönderilmesini amaçlar. Bunlar; mikroenjeksiyon, partikül bombardımanı - gen tabancası metodu, elektroporasyon, sonoporasyon, laser ışıması ve magnetofeksiyondur. Kimyasal yöntemler ise lipozom aracılı gen transferini içermektedir. Lipozom aracılı gen transferi anyonik lipozomlar, katyonik lipozomlar ve arkeozomlar olarak gruplandırılır.

### Mikroenjeksiyon

İster sitoplazmayı ister çekirdeği hedeflesin, DNA'yı hücre içine sokmanın en direkt yolu mikroenjeksiyonudur. Tek bir hücreye uygulanan bu mikrooperasyon prosedüründe cam bir iğne (mikrokapiler pipet), mikropipetin hareketini kontrol etmek için bir mikromanipulator ve bir mikroenjektör kullanılır. Hidrostatik basınçla mikropipete çekilmiş olan genetik materyali içeren sıvı püskürtülür. Enjeksiyonlar, mikroskop aracılığıyla gözlemlenir. Bu teknik ilk olarak 1980 yılında başarıyla uygulanmıştır. Capecchi (6), DNA'yı kültüre

edilmiş memeli hücrelerinin hem çekirdeğine hem de sitoplazmasına mikroenjekte etmiştir. Çıplak DNA'nın direkt olarak çekirdeğe mikroenjeksiyonu, sitoplazmik degradasyonu önler; böylece sitoplazma içi enjeksiyonundan daha yüksek gen ifadesi sağlanır. Fertilize fare oositlerinin pronükleilerine plazmid DNA mikroenjeksiyonu ile transgenik fare üretilmiştir (7, 8) ve günümüzde bu yaklaşım transgenik hayvan üretiminde fare (9), minyatür domuz (10) ve sığır (11) en çok uygulanan metottur.

DNA'nın pronükleer enjeksiyonu çok etkili ve bir o kadar da zahmetli bir prosedürdür. Bir enjeksiyonun tek bir hücreyi kapsadığı düşünüldüğünde; her seferinde birkaç yüz hücreyi transfer etmek için ne kadar uygulama gerektiği anlaşılacaktır. Gen transfer prosesinin basitleştirilmesi ve etkinliğinin artırılması için diğer fiziksel teknikler keşfedilmiştir.

### Partikül Bombardımanı - Gen Tabancası Metodu

Gen aracılı partikül bombardımanı, diğer adıyla gen tabancası metodunun ardında yatan düşünce hızlandırılmış bir partikül taşıyıcıyla hedef hücrelere çıplak DNA yollamaktır. Teknik ilk olarak 1987'de bitki hücrelerindeki transgen ifadesinin zorluğunun üstesinden gelmek için kullanılmıştır (12). 1990'larda ise memeli hücreleri ve canlı dokulara kadar genişlemiştir (13, 14).

Biyolistik (biyoloji ve balistiğin birleşimi) aktarım; hedef hücrelere yeterli hızda ağır metal partiküllerini sürükleme yöntemini kullanır. İvme, yüksek elektrik voltajı veya helyum deşarjı ile sağlanır. Partiküllerin toksik veya reaktif olmaması, hedef hücrenin çapından küçük (çoğunlukla 1-1,5 µm) olması gereklidir. Çıplak DNA, bu mikropartiküllerin üzerine çöktürülüp hücre içinde port-bombardıman ile serbest bırakılır. Metodun orijinalinde, DNA ile kaplanmış tungsten partiküllerini plazma membranına sokmak ve gen ifadesi sağlamak için gunpowder ivme sistemi kullanılır (12). Farklı tipte araçlar geliştirilmiştir ki bunlardan en çok kullanılanı altın küreciklerdir.

Bu teknolojinin en yaygın olarak uygulandığı durum, deriyi hedef alan genetik immünizasyondur (15). Gen tabancası metodu, primer olarak etkili DNA immünizasyonunun gerçekleştiği epidermis üzerine DNA kaplı kürecikleri sürükler (16). Bu yaklaşım genetik aşılama, immünomodülasyon ve kanser tedavisinde intihar gen terapisi için kullanılmaktadır (17).

Bu tekniğin etkinliği, partiküllere yüklenen DNA miktarı, partikül büyüklüğü ve aktarımın zamanlaması gibi çeşitli parametrelere bağlıdır. Buna ilaveten, DNA kaplı küreciklerin dağılımı gen tabancası ile uygulanan ivmenin iyi ayarlanmasına bağlıdır (18). Alınacak cevap, taşınan DNA kaplı küreciklerin sayısına ve partiküllerin plazmid ile kaplanma seviyesine bağlıdır.

### Elektroporasyon

DNA'yı hücre içine sokmak için sıkça kullanılan fiziksel araç elektrik alanıdır. Elektroporasyon olarak bilinen bu teknik, hücre membranını elektrik akımına maruz bırakarak geçici, bölgesel destabilizasyona sebep olur. Bu düzensizlik sırasında hücre membranı dış kaynaklı moleküllere geçirgen hale gelir. Hücre membranının geçirgenliğindeki bu geçici artışın elektrik alan tarafından indüklenen porların oluşumu sonucunda gerçekleştiğine inanılmaktadır. Kırmızı kan hücrelerinde oluşan porlar dondurup kırma elektron mikroskopisi ile incelendiğinde; büyüklüklerinin 20 ile 120 nm olduğu görülmüştür (19). Bu geçirgenliğin oluşması için kritik, eşik değeri bir seviyede elektrik akım uygulanması gereklidir. Bu akım, bir hücre süspansiyonu için 1 V (19, 20) iken akımın genişliği ve membranın kompozisyonu gibi etkenlerle değişiklik gösterir. Gen transferinin elektroporasyon ile gerçekleşebileceği Neumann ve ark., (21) tarafından fare lyoma hücreleri kullanılarak ispatlanmıştır. *In vivo* gen transferi 1990'ların başında başlamış ve 1996'ya kadar geniş biçimde araştırılmıştır (22, 23).

Elektroporasyonu etkileyen faktörler fiziksel (akımın süresi ve gücü) ve biyolojik (DNA konsantrasyonu ve konformasyonu, hücre

büyüklüğü) olabilir (20). Her hücre tipi için en uygun elektroporasyonu sağlayacak koşullar farklıdır. Farklı büyüklükteki moleküller için farklı elektroporasyon koşulları gereklidir. Küçük antikanser ilaçlarının aktarımında kısa akım (100  $\mu$ s) ve yüksek güçte elektrik alan (> 700 V/cm) en iyi sonucu verirken gen transferi için uzun akım (20-60 ms) ve düşük güçte elektrik alan (100-200 V/cm) tercih edilir (24). Akım süresi uzadıkça oluşan porların büyüklüğünün ve açık kalma süresinin de arttığı düşünülmektedir.

### Sonoporasyon

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

Sonoporasyonda rol oynayan mekanizmanın akustik kaviteasyon olduğu düşünülmektedir. Kaviteasyon, mekanik düzensizliğe ve aktif baloncukların yığılmasına sebep olur ve enerji çıkışı bitişik hücre membranlarının geçirgenliğini artırır. Bu alandaki ilk gen aktarım çalışmaları 1990'ların ortalarında bildirilmiştir (25, 26). Ultrason aracılı gen transferini etkileyen faktörler: transformatör, akustik basınç ve akım süresidir. Kalma süresinin de arttığı düşünülmektedir.

### Laser İşması

Gücü bir akım jeneratörü ile kontrol edilen bir laser kaynağı (örneğin neodimiyum-yttrium-aluminyum garnet (Nd:YAG) (27), argon iyonu (28), holmiyum (29), titanyum safir (30) ile hedef hücrelere laser atışı yapma esasına dayanır. Laser ışını genellikle bir lens aracılığıyla hedef hücrelere odaklanır. Hücre membranının geçirgenliği, lokal termal bir etkiyle ışın şokunun olduğu bölgede modifiye olur. Bu düzensizlik,

besiyeri ortamında mevcut olan bir genin hücre içine transfer olması için yeterlidir. Etkisi, besiyeri ortamı ile sitoplazma arasındaki ozmatik basınç farkına bağlıdır (28). Laser ışımalarının hücre membranında geçici porlar oluşturduğuna dair raporlar bildirilmiştir; bunlar oldukça büyük (yaklaşık 2 µm çapında), fakat çok kısa bir zamanda kapanan türdendir.

Laser kaynağının fiziksel büyüklüğü ve yüksek maliyeti nedeniyle günümüzde laser ışımaları ile gen aktarımı yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bu metotla yapılan gen aktarım çalışmaları ilk olarak 1980'lerde bildirilmiştir (27, 31). 2000'li yıllarda, femto-second infrared laser kullanılarak yapılan *in vivo* gen transferi uygulanmıştır (30). Bu yöntemin transfeksiyon etkinliği, enerji seviyesi, akım sayısı ve akım süresi gibi bir takım parametrelere bağlıdır.

### Magnetofeksiyon

Magnetofeksiyon, gen vektörlerinin hücrelere girişini artıran bir metottur (32). Manyetik nanopartikülleri DNA ile ve hatta transfeksiyon reaktifi ile bir araya getirme fikriyle ortaya çıkmıştır. Kullanılan nanopartiküller; polimer kaplı, biyolojik olarak bozunabilir demir oksitten yapılır. Bunların gen vektörleri ile bağlanması, tuz ile indüklenmiş koloidal çöktürme ile gerçekleşir. Manyetik partiküller, oluşturulan dış kaynaklı bir manyetik alanın etkisiyle hedef hücrelere yoğunlaşır. Bu teknolojinin genetik materyalin hedef hücre yüzeyine hatta içine aktarılmasına olanak sağladığı çevresel dokulardaki manyetik partiküllerin ekstrasvasyonu (damardan fışkırtma) gösterilerek ispatlanmıştır (33). Sebebi, manyetik alanın manyetik partikülleri plazma membranından hücrenin içine doğru çekmesi olabilir. DNA, sitoplazmada serbestleşir ve manyetik partiküllerin hücresel fonksiyonları etkilemeyeceği düşünülmektedir. Bu yöntem, viral olan veya viral olmayan vektörlerle yapılan standart transfeksiyon prosedürünün etkisini artırır; DNA vektörü bir manyetik partikül ile kompleks oluşturmadığı takdirde manyetik alan tek başına etkili olamaz.

Magnetofeksiyon endotelial hücreler gibi primer hücre kültürlerini transfekte etmekte uygun olabilir (32, 34). *In vitro* olarak yüksek etkinlik göstermekte olan yöntem *in vivo* olarak da gastrointestinal sistem ve kan damarlarında lokal transfeksiyon göstermiştir (32). Magnetofeksiyon, *in vitro* ve *in vivo*'da antisens oligonükleotitlerin aktarımında başarıyla uygulanmıştır (34).

### Lipozom Aracılı Gen Transferi

Fiziksel metotların en önemli avantajı genetik materyalin hücrelere direkt olarak aktarılabilmesidir. Bu durum fiziksel metotları kesin bir çizgiyle lipofeksiyon-polifeksiyon gibi viral olmayan gen transfer teknolojilerinden ayırır. Sentetik bir vektörle gen aktarımı hücrenin bağlanması, endositoz ve endositik veziküllerin girişi, endozomun lizozoma olgunlaşması, veziküler kompartmanlardan ayrılması, çekirdek çeperine doğru göç, lipit-aracılı gen transferinde lipit ile DNA'nın ayrılması ve son olarak DNA'nın çekirdeğe girişi ile gerçekleşir. Böylece transfeksiyon etkinliği çeşitli bariyerlerle sınırlanmış olur (35). Lipozomun bileşimi, enkapsülasyon oranı, lipit vezikülün büyüklüğü ve yüzey yükü lipozomların transfeksiyon etkinliğinde rol oynayan önemli faktörlerdir (36). Nükleer lokalizasyon sinyalleri kullanılarak DNA'nın sitosoldan çekirdeğe hareketi artırılmaktadır (37). Endozomal salınımı artırmak için farklı stratejiler adapte edilerek (örneğin fotokimyasal internalizasyon) gen ifadesi kinetiklerinin ivme kazanması amaçlanmıştır.

### Katyonik Lipozomlar

Katyonik lipit veya polimer aracılığıyla gen transferi hücre türüne bağlıdır. Örneğin, primer kültür hücrelerinden bazıları (primer nöronlar, primer dendritik hücreler ve primer endotelial hücreler) katyonik lipitlerin de dahil olduğu geleneksel viral olmayan transfeksiyon metotlarına dirençlidir. Bu durum, büyük ölçüde endositozun hücre türüne bağlı olmasından kaynaklanır (35, 36). Kompleks

formülasyonlarının lipopleks büyüklüğü, yükü ve DNA/vektör dağılımı gibi fizikokimyasal parametreler transfeksiyon etkinliğini etkiler. Bunun aksine fiziksel teknikler, plazma membranından direkt gen transferinin sağlanması nedeniyle hücre tipine bu derece bağlı değildir.

Katyonik lipit ajanlar kullanılarak gerçekleştirilen lipofeksiyon işlemi (kültüre edilmiş hücrelerde katyonik lipitli ortamda DNA transferi), monokatyonik lipit ajanın polikatyonik biri ile yer değiştirmesi ile geliştirilmiştir (38). Bu metot, DNA'nın iyonik etkileşimine ve kültüre edilmiş hücrelerde DNA'yı fonksiyonel olarak koruyabilen komplekslerden lipozomlara dayanır. Yani lipozomlar aracılığı ile yapılan gen transferidir. Katyonik lipit ajanlar, sulu çözeltilerde küçük unilamellar lipozomlar oluştururlar. Lipozomların pozitif yükü nükleik asit ve hücre membranında etkileşmesini sağlar; böylece lipozom/nükleik asit/hücre membran kompleksi (transfeksiyon kompleksi) oluşur. DNA lipozomların içine enkapsüle olmaz fakat negatif yüklü olduğu için lipozomlara bağlanarak kompleksler oluşturur (39). Bu kompleks, endozomlardan ve lipozomlardan salınır. DNA-lipit oranı, inkübasyon süresi, serum varlığı, antibiyotik varlığı, hücre kültürünün durumu, hücre yoğunluğu, promotör seçimi ve DNA kalitesi her hücre hattı için optimize edilmelidir.

### Anyonik Lipozomlar

Bazı çalışmalar; katyonik lipozomlara alternatif olarak anyonik lipozomal aktarım vektörlerinin kullanıldığını bildirmektedir (40-42). Anyonik lipozomlar önceleri DNA'nın hücreler arası reseptör aracılı olmayan transportunda hücre yüzeyinin stimülasyonu için model olarak kullanılmaktaydı (43). Günümüzde anyonik lipozomlar, DNA enkapsülasyonunda kullanılmaktadır. Enkapsülasyondan önce pozitif yüklü polilizin eklenerek negatif yüklü DNA'nın küçük kompleksler oluşturmasını sağlar.

Patil ve ark., (42); DNA transfeksiyonu için anyonik lipozomal sistemlerden yararlanarak yaptıkları çalışmada; anyonik lipitlerin DNA aktarımı ve ifade etkinliğini araştırmıştır (42). Çalışma,  $Ca^{+2}$  aracılığıyla plazmid DNA ile fizyolojik orijinli lipitlerden oluşturulan kompleksin anyonik lipozomal taşıma vektörü olarak tasarlanmasını ve kullanılmasını içerir. Çalışmada anyonik lipozomların  $Ca^{+2}$  iyonları ile bağlanarak yüksek miktarda DNA'yı hapsedebildiği gösterilmiştir. Oluşturulan lipopleksler yeşil floresan proteini (GFP) plazmidini Çin hamster yumurtalık K-1 (CHO-K1) hücrelerine düşük seviyede toksisite ile taşımıştır.  $Ca^{+2}$  gibi divalent katyonların anyonik lipozomal sistemlerde füzyonu indüklemeye mekanizması (-) yüklü lipidin yüzey yükünün nötralizasyonu ile ilişkilidir. Yüzey yükünün nötralizasyonu, yüklü lipit türlerine göre daha az etkili bir uç grubun oluşmasına yol açar. Redüklenmiş yüzey yükü interveziküler elektrostatik çekimi de redükleyerek füzyon için gerekli aggregasyon basamağını organize eder. Bu olay, yük nötralizasyon etkisi olarak bilinir. Anyonik lipopleksler,  $Ca^{+2}$  köprüleri aracılığıyla plazmid DNA iskeletindeki fosfatlar ile lipozomların yüzeylerindeki anyonik rezidülerin etkileşimi sonucu oluşur.  $Ca^{+2}$  artışı, lipozomlarla kompleks oluşturan DNA miktarını ve transfeksiyon etkinliğini artırabilir (44).

Anyonik lipozom formülasyonları DNA aktarımı amacıyla oligonükleotitlerin hippokampal nöronlara (41) ve bakteri hücrelerine (40) transferinde kullanılmıştır. Fakat bu çalışmalar, DNA'nın anyonik lipozom içine yeterli miktarda hapsedilememesi ve toksisite verilerinden yoksun olması nedeniyle kısıtlıdır. Bu iki negatif yüklü türün arasındaki itici elektrostatik etkileşimden kaynaklanan yetersiz birleşmenin üstesinden gelmek için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır (45). Literatürdeki bu veriler ışığında anyonik lipozomlarla elde edilmiş başarılı transfeksiyon sonuçları da rapor edilmiştir (42, 46).



## Arkeozomlar

Aşırı habitatlara uyum sağlamış olan arkaik mikroorganizmaların proteinleri yüksek sıcaklık, yüksek tuz konsantrasyonu, organik çözücüler ve yüzey aktif maddelerin varlığında üç boyutlu yapısını kaybetmez ve fonksiyoneldir (47). Arkeal lipid formülasyonlarının da oldukça yüksek kararlılıkta oksidatif stres, yüksek sıcaklık, alkali pH, fosfolipaz aktivitesi, safra tuzları ve serum ortamında bulunabildiği gösterilmiştir (48, 49). Arkeal lipid özellikleri sayesinde arkeozomlar her sıcaklıkta oluşturulabilmektedir, böylece termal olarak kararsız bileşikler en kapsüle etmeyi sağlar. Yüksek kararlılıkları arkeozomların sterilize ve filtre edilebilmesini sağlar (50). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar; arkeozomların güvenli olduğunu, farelerde toksisite göstermediğini ispatlamıştır (51). Arkeozomların biyoyoumluluğu ve yüksek kararlılıkları üretim aşamasında ve aşı, ilaç, gen aktarımı gibi biyoteknolojik uygulamalarda avantaj sağlar. Arkeozomlar, bu özelliklerinden ötürü DNA transferinde umut vaat etmektedirler. Arkeal lipidlerden elde edilen polar, lipid fraksiyonu kullanılarak hazırlanan arkeozomların *in vitro* transfeksiyon etkinliği nötral arkeal lipidlere oranla daha yüksektir. Halofilik arkelerin polar lipitlerinden elde edilen lipozomların total lipitlerden hazırlanan lipozomlara göre daha dayanıklı olduğu bildirilmiştir (52).

Bazı arkeozomların anyonik olmaları nedeniyle plazmid DNA ile kompleks oluşturma eğilimleri düşüktür, bu nedenle *in vitro* transfeksiyon deneylerinde DOTAP, polibren, kitozan, CaCl<sub>2</sub>, LiCl gibi katyonik bileşiklerden yararlanılabilir. Bir transfeksiyon reaktifi olan DOTAP ile arkeozomların birlikte kullanılması pahalı bir ürün olan DOTAP'ın daha az kullanılmasını sağlayabilmektedir (46). Polibren (53) ve kitozan (54) gibi polimerlerin DNA'ya bağlandığı ve memeli hücrelerinde değişen seviyelerde transfeksiyon etkinliği gösterdiği belirtilmiştir. Yine de, lipozomlar viral olmayan

gen transferi vektörleri içinde en yaygın olarak kullanılanlardır (55). Mansouri ve ark., (56) yayınladıkları çalışmada kitozan gibi katyonik polimerlerin DNA ile kompleks oluşturabileceğini ve viral olmayan vektör olarak gen terapisinde kullanılabileceğini belirtmiştir. Kitozan doğal ve toksik olmayan bir polisakkarit olması nedeniyle biyoyoumlu ve biyobozundur ve DNA'yı DNaz aktivitesine karşı korur.

Ticari lipozomların düşük pH ve safra tuzlarına karşı zayıf kararlılık sergilemesi, lipozomların özellikle oral yoldan verilmesinde aşılması gereken başlıca sorunlardan biridir. Li ve ark., (57) peptit ilaçlarının ağız yoluyla verilmesinde arkeozomların taşıyıcı olarak kullanılması üzerine yaptıkları çalışmada; arkeozomların ticari lipozomlardan daha kararlı olduğunu göstermiştir (57). Danis ve ark., (58) ise halofilik bir arkeden elde ettikleri polihidroksi bütiratı kullanarak başarılı ilaç taşınımı ve salınımı sağlamışlardır. Arkeozomların geleneksel lipozomlardaki fosfat esterleri yerine eter bağlı fosfolisiterlere sahip olmaları onları daha kararlı yapılar haline getirmektedir. Bu nedenle, arkeozomlar sadece aşı olarak kullanılacak çeşitli peptit antijenlerin ve ilaçların taşınmasında değil aynı zamanda DNA moleküllerinin transferi için de önemli bir potansiyele sahiptir.

## SONUÇ

Gen terapi, farmasötik bir genin tedavi amacıyla insan hücrelerine girmesini sağlayan stratejidir. Günümüzde tedavisi bulunmayan veya kalıtsal olarak nesilden nesile aktarılan hastalıkların tedavisinde kullanılması hedeflenen gen terapi yöntemi, gelecekte birçok insanın sağlıklı yaşaması için umut vaat etmektedir. İlaç niteliğindeki fonksiyonel genlerin canlıya aktarımı bu stratejiyi kısıtlayan en önemli etkidir. Bu nedenle, dünya üzerinde birçok araştırmacı 1980'lerden bu yana; transgenleri aktarma metotları üzerine çalışmakta ve uygun vektörlerin araştırmasını yapmaktadır. Uzun yıllar

viral vektörler kullanılmış olsa da bu vektörlerin büyüklük olarak gen taşıma kapasitesinin az olması, virüslerin hastalık yapıcı olmaları ve immün sistemi tetikleyici etkileri araştırmacıları daha etkin ve güvenilir vektörler bulmaya yöneltmiştir. Bu sayede ortaya çıkan viral olmayan vektörler, fiziksel ve kimyasal yöntemleri kapsar. İlk kimyasal yöntemler, lipozomlar kullanılarak yapılmıştır. Klasik transfeksiyon yöntemlerinin, düşük verimlilik

veya hücre toksisitesi gibi sorunlarına karşın katyonik lipid ajanlar pek çok ökaryotik hücrenin transfeksiyonunda etkindirler. Diğer yöntemlere oranla virüsler, proteinler, sentetik oligonükleotitler ve RNA ile yüklenerek transfekte olabilmeleri diğer bir avantajlarıdır. Bu özellikleri sayesinde lipozom aracılı gen transferi çalışmaları halen geliştirilmeye devam etmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Mehier-Humbert S, Guy, RH. Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005; 57: 733-53. Doi:10.1016/j.addr.2004.12.007.
2. Chuah MK, Collen D, VandenDriessche T. Biosafety of adenoviral vectors. *Curr Gene Ther*, 2003; 6: 527-43. Doi:10.2174/1566523034578140.
3. Gallo-Penn AM, Shirley PS, Andrews JL, Tinlin S, Webster S, Cameron C, et al. Systemic delivery of an adenoviral vector encoding canine factor VIII results in short-term phenotypic correction, inhibitor development, and biphasic liver toxicity in hemophilia a dogs. *Blood*, 2001; 97: 107-13. Doi: 10.1182/blood.V97.1.107.
4. Lechardeur D, Sohn KJ, Haardt M, Joshi PB, Monck M, Graham RW, et al. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: A potential barrier to gene transfer. *Gene Ther*, 1999; 6: 482-97.
5. Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. *Int J Pharm*, 2014; 459: 70-83. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.11.041.
6. Capecchi MR. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, 1980; 22: 479-88. Doi: 10.1016/0092-8674(80)90358-X.
7. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; 77: 7380-4.
8. Gordon JW, Ruddle FH. Gene transfer into mouse embryos: Production of transgenic mice by pronuclear injection. *Methods Enzymol*, 1983; 101: 411-33. Doi: 10.1016/0076-6879(83)01031-9.
9. Auerbach AB. Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear microinjection. *Acta Biochim Pol*, 2004; 51: 9-31.
10. Uchida M, Shimatsu Y, Onoe K, Matsuyama N, Niki R, Ikeda JE, et al. Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection. *Transgenic Res*, 2001; 10 (6): 577-82. Doi: 10.1023/A:1013059917280.
11. Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, et al. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol Reprod*, 2004; 71 (2): 405-9. Doi: 10.1095/biolreprod.104.028472.
12. Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 1987; 327: 70-3. Doi: 10.1038/327070a0.
13. Yang NS, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87 (24): 9568-72.
14. Williams RS, Johnston SA, Riedy M, DeVit MJ, McElligott SG, Sanford JC. Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88 (7): 2726-30.
15. Wang S, Joshi S, Lu S. Delivery of DNA to skin by particle bombardment. *Methods Mol Biol*, 2004; 245: 185-96. Doi: 10.1385/1-59259-649-5:185.
16. Lu B, Scott G, Goldsmith LA. A model or keratinocyte gene therapy: Preclinical and therapeutic considerations. *Proc Assoc Am Physicians*, 1996; 108 (2): 165-72.



17. Lin MT, Pulkkinen L, Uitto J, Yoon K. The gene gun: Current applications in cutaneous gene therapy. *Int J Dermatol*, 2000; 39 (3): 161-70. Doi: 10.1046/j.1365-4362.2000.00925.x.
18. Uchida M, Natsume H, Kobayashi D, Sugibayashi K, Morimoto Y. Effects of particle size, helium gas pressure and microparticle dose on the plasma concentration of indomethacin after bombardment of indomethacin-loaded poly-lactic acid microspheres using a helios gun system. *Biol Pharm Bull*, 2002; 25 (5): 690-3. Doi: 10.1248/bpb.25.690.
19. Chang DC. Structure and Dynamics of Electric Field-Induced Membrane Pores as Revealed by Rapid-Freezing Electron Microscopy. In: Chang DC, Chassy BM, Saunders JA, Sowers AE, eds. *Guide to Electroporation and Electrofusion*, Academic Press, Inc. San Diego, 1992.
20. Gehl J. Electroporation: Theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand*, 2003; 177 (4): 437-47. Doi: 10.1046/j.1365-201X.2003.01093.x.
21. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J*, 1982; 1 (7): 841-5.
22. Heller R, Jaroszeski M, Atkin A, Moradpour D, Gilbert R, Wands J, et al. In vivo gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett*, 1996; 389 (3): 225-8. Doi: 10.1016/0014-5793(96)00590-x.
23. Nishi T, Yoshizato K, Yamashiro S, Takeshima H, Sato K, Hamada K, et al. High-efficiency in vivo gene transfer using intraarterial plasmid DNA injection following in vivo electroporation. *Cancer Res*, 1996; 56 (5): 1050-5.
24. Rabussay D, Dev NB, Fewell J, Smith LC, Widera G, Zhang L. Enhancement of therapeutic drug and DNA delivery into cells by electroporation. *J Phys D: Appl Phys*, 2003; 36: 348-63. Doi: 10.1088/0022-3727/36/4/305.
25. Kim HJ, Greenleaf JF, Kinnick RR, Bronk JT, Bolander ME. Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Hum Gene Ther*, 1996; 7 (11): 1339-46. Doi: 10.1089/hum.1996.7.11-1339.
26. Bao S, Thrall BD, Miller DL. Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound Med Biol*, 1997; 23 (6): 953-9. Doi: 10.1016/S0301-5629(97)00025-2.
27. Tao W, Wilkinson J, Stanbridge EJ, Berns MW. Direct gene transfer into human cultured cells facilitated by laser micropuncture of the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84 (12): 4180-4.
28. Palumbo G, Caruso M, Crescenzi E, Tecce MF, Roberti G, Colasanti A. Targeted gene transfer in eucaryotic cells by dye-assisted laser optoporation. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 1996; 36 (1): 41-6. Doi: 10.1016/S1011-1344(96)07335-6.
29. Sagi S, Knoll T, Trojan L, Schaaf A, Alken P, Michel MS. Gene delivery into prostate cancer cells by holmium laser application. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2003; 6 (2): 127-30. Doi: 10.1038/sj.pcan.4500653.
30. Zeira E, Manevitch A, Khatchatourians A, Pappo O, Hyam E, Darash-Yahana M, et al. Femtosecond infrared laser-an efficient and safe in vivo gene delivery system for prolonged expression. *Molec Ther*, 2003; 8 (2): 342-50. Doi: 10.1016/S1525-0016(03)00184-9.
31. Kurata S, Tsukakoshi M, Kasuya T, Ikawa Y. The laser method for efficient introduction of foreign DNA into cultured cells. *Exp Cell Res*, 1986; 162 (2): 372-8. Doi: 10.1016/0014-4827(86)90342-3.
32. Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Kruger A, et al. Magnetofection: Enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 2002; 9 (2): 102-9. Doi: 10.1038/sj/gt/3301624.
33. Goodwin SC, Bittner CA, Peterson CL, Wong G. Single-dose toxicity study of hepatic intra-arterial infusion of doxorubicin coupled to a novel magnetically targeted drug carrier. *Toxicol Sci*, 2001; 60 (1): 177-83. Doi: 10.1093/toxsci/60.1.177.
34. Krötz F, Sohn HY, Gloe T, Plank C, Pohl U. Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells. *J Vasc Res*, 2003; 40 (5): 425-34. Doi: 10.1159/000073901.
35. Kedika B, Patri SV. Benzothiazole head group based cationic lipids: synthesis and application for gene delivery. *Eur J Med Chem*, 2014; 74: 703-716. Doi: 10.1016/j.ejmech.2013.08.034.
36. Renukuntla J, Vadlapudi AD, Patel A, Boddu SH, Mitra AK. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *Int J Pharm*, 2013; 447: 75-93. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.02.030.
37. Hebert E. Improvement of exogenous DNA nuclear importation by nuclear localization signal-bearing vectors: a promising way for non-viral gene therapy. *Biol Cell*, 2003; 95 (2): 59-68. Doi: 10.1016/S0248-4900(03)00007-8.
38. Ciccarone V, Hawley-Nelson P, Jessee J. Cationic liposome-mediated transfection: Effect of serum on expression and efficiency. *Focus*, 1993; 15 (3): 80-3.

39. Balbino TA, Azzoni AR, de La Torre LG. Microfluidic devices for continuous production of pDNA/cationic liposome complexes for gene delivery and vaccine therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013; 111: 203-210. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.04.003.
40. Fillion P, Desjardins A, Sayasith K, Lagace J. Encapsulation of DNA in negatively charged liposomes and inhibition of bacterial gene expression with fluid liposome-encapsulated antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta*, 2001; 1515: 44-54. Doi: 10.1016/S0005-2736(01)00392-3.
41. Lakkaraju A, Dubinsky JM, Low WC, Rahman Y-E. Neurons are protected from excitotoxic death by p53 antisense oligonucleotides delivered in anionic liposomes. *J Biol Chem*, 2001; 276: 32000-7. Doi: 10.1074/jbc.M100138200.
42. Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ. Anionic liposomal delivery system for DNA transfection. *The AAPS Journal*, 2004; 6 (4): 1-10. Doi: 10.1208/aapsj060429.
43. Akhtar S, Basu S, Wickstrom E, Juliano RL. Interactions of antisense DNA oligonucleotide analogs with phospholipid membranes (liposomes). *Nucleic Acids Res*, 1991; 19: 5551-9. Doi: 10.1093/nar/19.20.5551.
44. Tari AM, Fuller N, Boni LT, Collins D, Rand P, Huang L. Interactions of liposome bilayers composed of 1,2-diacyl-3-succinylglycerol with protons and divalent cations. *Biochim Biophys Acta*, 1994; 1192: 253-62. Doi: 10.1016/0005-2736(94)90126-0.
45. Perrie Y, Gregoriadis G. Liposome-entrapped plasmid DNA: Characterization studies. *Biochim Biophys Acta*, 2000; 1475: 125-32. Doi: 10.1016/S0304-4165(00)00055-6.
46. Attar A, Ogan A, Yucel S, Turan K. The potential of archaeosomes as carriers of pDNA into mammalian cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2016; 44: 710-6. Doi: 10.3109/21691401.2014.982800.
47. Ozgen M, Attar A, Elalmis Y, Birbir M, Yucel S. Enzymatic activity of a novel halotolerant lipase from *Haloarcula hispanica* 2TK2. *Pol J Chem Tech*, 2016; 18: 20-25. Doi: 10.1515/pjct-2016-0024.
48. Benvegnu T, Rethore G, Brard M, Richter W, Plusquellec D. Archaeosomes based on novel synthetic tetraether-type lipids for the development of oral delivery systems. *Chem Commun*, 2005; 44: 5536-8. Doi: 10.1039/B511440C.
49. Brard M, Laine C, Rethore G, Laurent I, Neveu C, Lemiegre L, et al. Synthesis of archaeal bipolar lipid analogues: a way to versatile drug/gene delivery systems. *J Org Chem*, 2007; 72: 8267-79. Doi: 10.1021/jo071181r.
50. Moghimipour E, Kargar M, Ramezani Z, Handali S. The potent in vitro skin permeation of archaeosome made from lipids extracted of *Sulfolobus acidocaldarius*. *Archaea*, 2013; Article ID 782012, 7 pages. Doi: 10.1155/2013/782012.
51. Omri A, Agnew BJ, Patel GB. Short-term repeated-dose toxicity profile of archaeosomes administered to mice via intravenous and oral routes. *Int J Toxicol*, 2003; 22: 9-23. Doi: 10.1080/10915810305080.
52. Krishnan L, Dicaire CJ, Patel GB, Sprott GD. Archaeosome vaccine adjuvants induce strong humoral, cell-mediated, and memory responses: comparison to conventional liposomes and alum. *Infect Immun*, 2000; 68: 54-63. Doi: 10.1128/IAI.68.1.54-63.2000.
53. Mumper RJ, Duguid JG, Anwer K, Barron MK, Nitta H, Rolland AP. Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. *Pharm Res*, 1996; 13: 701-9. Doi: 10.1023/A:1016039330870.
54. Corsi K, Chellat F, Yahia L, Fernandes JC. Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials*, 2003; 24: 1255-64. Doi: 10.1016/S0142-9612(02)00507-0.
55. Singh M, Ariatti M. A cationic cytofectin with long spacer mediates favourable transfection in transformed human epithelial cells. *Int J Pharm*, 2006; 309: 189-98. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.11.023.
56. Mansouri S, Lavigne P, Corsi K, Bendoric M, Beaumont E, Fernandes JC. Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: Strategies to improve transfection efficacy. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004; 57: 1-8. Doi: 10.1016/S0939-6411(03)00155-3.
57. Li Z, Chen J, Sun W, Xu Y. Investigation of archaeosomes as carriers for oral delivery of peptides. *Biochem Bioph Res Co*, 2010; 394: 412-7. Doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.041.
58. Danis O, Ogan A, Tatlican P, Attar A, Cakmakci E, Mertoglu B, et al. Preparation of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) films from halophilic archaea and their potential use in drug delivery. *Extremophiles*, 2015; 19 (2), 515-24. Doi: 10.1007/s00792-015-0735-4.