T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

APTAMER FONKSİYONLANDIRILMIŞ ALTIN NANO ÇUBUKLARIN ÜRETİLMESİ PATOJENİK BAKTERİ TAYİNİ VE FOTOTERMAL OLARAK YOK EDİLMESİ İÇİN KULLANIMI

Proje No: TSA-2015-6206

Proje Türü
Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Yard. Doç. Dr. İsmail Öçsoy
Analitik Kimya Anabilim Dalı/Eczacılık Fakültesi

Araştırmacı: Doç. Dr. Nalan Özdemir
Kimya Bölümü/Fen Fakültesi

Araştırmacı: Doç. Dr. Fatma Öztürk Küp
Biyoloji Bölümü/Fen Fakültesi

Araştırmacı: Doç. Dr. Eric. S. McLamore
Agricultural & Biological Engineering/University of Florida

Ağustos 2017

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	
ABSTRACT	
1. GİRİŞ/ AMAÇ VE KAPSAM	7-12
2. GENEL BİLGİLER	13-21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22-27
4. BULGULAR	28-33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	34-35
6. KAYNAKLAR	36-42
7. EKLER	43

TESEKKÜR

TSA-2015-6206 numaralı projemiz Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Projemize finansal desteklerinden dolayı Erciyes Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimine teşekkürü bir borç bilirim. Projenin çalışma süresince araştırmacı olarak önemli katkıları olan, Doç. Dr. Nalan Özdemir, Doç. Dr. Fatma Öztürk Küp and Doç. Dr. Eric S. McLamore'e teşekkür ederiz. Ayrıca projede resmi araştırmacı olarak yer almayıp, proje kapsamındaki deneylere dâhil olan, Prof. Dr. Ahmet Ülgen, Yard. Doç. Dr. Vedat Yilmaz, Yard. Doç. Dr. Nilay Ildız ve Eczacılık Fakültesi Lisans Öğrencisi Sadi Yusufbeyoğlu'na da gösterdikleri etkin katkı ve performanslarından dolayı teşekkür ederiz. Projemiz Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı, University of Florida Tarım ve Biyoloji Mühendisliği ve University of Florida Tarım ve Biyoloji Mühendisliği Kimya Bölümü laboratuarlarında gerçekleştirilmiştir.

ÖZET

Önerilen bu projede, metisilin dirençli staphylococcus aureus (MRSA) bakterilerinin fototermal olarak yok edilmesi için aptamer ve altın nano çubuklardan (Au NÇler) oluşan çok fonksiyonlu bir sistem geliştirilmiştir. Spesifik oligonükleik asitler olarak bilinen tek sarmallı DNA ve RNA aptamerler hedefli-tedavi imkânı sağladıkları için virüs, bakteri, kanser hücreleri ve bunlara bağlı hastalıklarla mücadelede önemli rol oynarlar. Önerilen projede öncelikle bir ucu tiyol (-SH) grubu ile modifiye edilmiş MRSA-aptamerler Au NÇler üzerine bağlanmıştır. MRSA Apt@Au NÇlerin MRSA bakterileri üzerinde birikmesi sağlandıktan sonra, bu karışımın 808 nm dalga boyunda yakın kızılötesi ışığa maruz bırakılıp ışığın ısıya dönüştürülmesiyle MRSA bakterilerinin fototermal olarak yok edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Altın nano çubuklar, DNA aptamer, patojen ve fototermal tedavi

ABSTRACT

In this proposed project, a multifunctional system consisting of aptamer and gold nanorods (Au NÇler) was developed for the photothermal destruction of methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) bacteria. Single-stranded DNA and RNA aptamers, known as specific oligonucleic acids, play an important role in combating viruses, bacteria, cancer cells and their associated diseases as they provide targeted treatment options. In the proposed project, the MRSA-aptamers modified by a group of thiols (-SH) were firstly attached to the Au NPPs. Once the MRSA Apt@Au NRs were deposited on the MRSA bacteria, the MRSA bacteria were photothermally destroyed by exposing the mixture to near infrared light at 808 nm wavelength and light-heat.

Keywords: Gold nano rods, DNA aptamer, pathogen, photothermal treatment

1. GİRİŞ/ AMAÇ VE KAPSAM

Projenin temel amacı çok tehlikeli patojenik bakterilerden biri olan MRSA'nın tespiti ve yok edilmesi için aptamer ve altın nano çubuklardan (Au NÇler) oluşan hızlı, hassas, güvenilir sonuç verebilen çok fonksiyonlu yeni bir sistem geliştirmektir. Bu amaç için:

- İstenilen boyutlarda Au NÇler sentezlenmesi ve karakterize edilmesi
- Bir ucunda SH grubu bulunan MRSA aptamerler ve farklı nükleotidlerden oluşan aynı uzunlukta kontrol DNA sekansı Au NÇlerin üzerine SH-altın kimyası sayesinde sağlam bir şekilde iliştirilmesi ve bu konjugatların karakterize edilmesi
- MRSA apt@Au NÇ ve kontrol DNA@Au NÇ konjugatların MRSA bakterisi ile karıştırılıp inkübe edilerek MRSA aptamerin ve kontrol DNA'nın MRSA bakterisine bağlanmasının test edilmesi
- MRSA bakterilerinin hem görsel olarak hem de spektrometrik olarak tayin edilmesi
- MRSA apt@Au NÇ ve MRSA bakteri karışımının yakın kızılötesi ışığına maruz bırakılarak bakterilerin açığa çıkan ısı ile yok edilmesi
- MRSA bakterisi yerine farklı bakteriler kullanılarak, MRSA apt@Au NÇ sisteminin bakteri seçiciliğinin gösterilmesi
- Son olarak, MRSA bakterisinin kan veya serum gibi kompleks bir karışımın içerisine aktarılarak bu ortamdan yakalanması ve yok edilmesi gibi hedeflerin sırasıyla gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.

Patojenik (hastalık yapıcı) bakteriler, özellikle gram-pozitifler çevrede kolayca yaşarlar, çoğalırlar ve ciddi hastalıklara sebep olurlar. Micrococcacease ailesinin üyesi olan Staphylococcus aureus (S. aureus) ölümcül hastalıklara sebep olan en tehlikeli bakterilerin başında gelir. S. aureus'un sağlıklı insanların ~%30'unda burunda ve ~%20'sinde boğaz boşluğu mukozasında kolonize olduğu araştırmalar ile ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca S. aureus

Türkiye'de ve dünyada hastane kökenli enfeksiyonlara neden olan en büyük etkendir. Bu bakteriler birçok gıda türü üzerinde hızla çoğalarak gıda-zehirlenmelerine sebep olduğu gibi insan vücudunda üreyerek menenjit, septisemi, kalp iltihabı ve iltihaplı yaralar gibi hayati-tehlike doğuran pek çok enfeksiyonlara da sebep olur. S. aureus'ların antibiyotiğe karşı direnç gösteren izolatlar oluşturması nedeniyle tedavisi çok güç ve ölümlere sebebiyet veren enfeksiyonlar ortaya çıkmıştır. Bundan dolayı bu bakterilerin hızlı, doğru, hassas ve seçimli olarak tayin ve yok edilmesi gerekmektedir.

Önerilen projede, hedefleme ajanı olarak aptamerler kullanılacaktır. Aptamerlerin çok özgün özellikler taşıması ve bu özellikleri sayesinde diğer hedefleme ajanlarından (antikor, peptid, boronik asit ve folik asit gibi) daha avantajlı olması, aptamerlerin yaygın olarak kullanılmalarının en temel sebeplerindendir. DNA ya da RNA aptamerlerin özel bir süreç olan Eksponansiyel Zenginleştirme ile Ligandların Sistematik Evrimi, EZLSE, (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) olarak adlandırılan yöntemle üretilmesi ile bu hedefleme ajanları hedeflerine çok yüksek afinite, hassaslık ve seçicilikle bağlanmaktadır. Bu konvansiyonel EZLSE yönteminde inorganik, organik ve biyo-moleküller ya da hücrelerden izole edilmiş proteinler kullanılarak aptamerler üretilmektedir. Önerilen projede kullanılacak olan DNA nükleotitleri içeren MRSA aptamerleri konvansiyonel EZLSE yerine hücre-EZLSE (cell-SELEX) yöntemi ile üretilir. Hücre-EZLSE yöntemi ile aptamerler bütün hücreler kullanılarak (çeşitli kanser hücreleri ve virüsle enfekte olmuş hücreler, bakteri hücreleri) kullanılarak seçilmektedir ve bu yöntemde hücre zarındaki mevcut biyolojik belirteçlerin sayısını ve türünü bilmek gerekmemektedir. Aptamer seçimi sadece hücre yüzeyinde bulunan reseptör proteininin çeşitli tipleri için bütün hücrelere karşı çalışır. Böylelikle, hedef hücrelere daha güçlü ve seçici bağlanan aptamerler seçilir ve üretilir.

Önerilen projede, Au NÇlerin MRSA aptamerlerin immobilizasyonu için hem bir platform hem de MRSA bakterilerinin tayini ve yok edilmesi için bir nano sistem olarak kullanılması hedeflenmektedir. Au NÇler kolay sentezlenme, kararlılık, kolay yüzey modifikasyonu ve özgün optik özelliklerinden dolayı başta biyo-analitik ve biyo-medikal olmak üzere birçok araştırma alanlarında çok yoğun olarak kullanılmaktadır. MRSA aptamerlerin Au NÇler üzerine kontrollü olarak iliştirilmesi ve sayılarının hesaplanması, oluşturulacak olan MRSA apt@Au NÇ sistemlerin performansı açısından çok önemlidir. Bir ucunda SH gurubu taşıyan MRSA aptamerler iyi bilinen SH-Au kimyasından (SH-Au chemistry) yararlanılarak Au NÇlerin üzerine çok sağlam tutturulur.

Çözeltide dağılmış MRSA apt@Au NÇler şarap kırmızısı (wine red) rengini verecek ve belli dalga boyunda belli absorpsiyon noktaları gösterecektir. MRSA apt@Au NÇler MRSA bakterileri ile etkileştiğinde çözeltideki dağılmış pozisyondan agregasyon pozisyonuna gelecektir. Böylece MRSA apt@Au NÇ çözeltisinin renginin kırmızıdan maviye kayması ve bu renk dönüşümünün çıplak göz ile görülmesi hedeflenmektedir. Ayrıca MRSA apt@Au NÇlerin absorpsiyon verdiği dalga boylarındaki kaymanın (red-shift) ultraviyole-görünür spektrofotometre ile gözlemlenmesi planlanmaktadır. Böylelikle, geliştirilecek olan MRSA apt@Au NÇlar günümüzde kullanılmakta olan konvansiyonel yöntemlerin zahmetli, zaman alıcı, karmaşık ve uzmanlık gerektiren dezavantajlardan uzak olacağı ön görülmektedir. Au NÇler çok yüksek tükenme kesiti katsayısına sahip olması ve yakın kızılötesi bölgesinde yüksek oranda ışık emme kabiliyetinden dolayı, fototermal tedavide çok yayın olarak kullanılmaktadır. Böylelikle, Au NÇler yakın kızılötesi bölgedeki ışığı emerek yüksek verimlikle lokalize ısıya çevirecek ve hedef MRSA bakterilerini etkili bir biçimde yok edecektir. Bu projenin, polimer, nano malzeme, patoloji ve tıp bilimlerinin yanı sıra özellikle nanoteknolojinin biyosensörlere entegrasyonuna ve geliştirilmesine de etkin bir katkı

sağlayacağı düşünülmektedir. Önerilen bu projenin çıktıları ile etki değeri ve saygınlığı yüksek dergilerde yayınlar yapılması planlanmıştır.

Patojenik (hastalık yapıcı) bakteriler, özellikle gram-pozitifler çevrede kolayca yaşarlar, çoğalırlar ve ciddi hastalıklara sebep olurlar. Micrococcacease ailesinin üyesi olan Staphylococcus aureus (S. aureus) ölümcül hastalıklara sebep olan en tehlikeli bakterilerin başında gelir. S. aureus'un sağlıklı insanların ~%30'unda burunda ve ~%20'sinde boğaz boşluğu mukozasında kolonize olduğu araştırmalar ile ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca S. aureus Türkiye'de ve dünyada hastane kökenli enfeksiyonlara neden olan en büyük etkendir. Bu bakteriler birçok gıda türü üzerinde hızla çoğalarak gıda-zehirlenmelerine sebep olduğu gibi insan vücudunda üreyerek menenjit, septisemi, kalp iltihabı ve iltihaplı yaralar gibi hayati-tehlike doğuran pek çok enfeksiyonlara da sebep olur. S. aureus'ların antibiyotiğe karşı direnç gösteren izolatlar oluşturması nedeniyle tedavisi çok güç ve ölüme sebebiyet veren enfeksiyonlar ortaya çıkmıştır. Bundan dolayı bu bakterilerin hızlı, doğru, hassas ve seçimli olarak tayin ve yok edilmesi gerekmektedir.

Spesifik oligonükleik asitler olarak bilinen tek sarmallı DNA ve RNA aptamerler hedefli-tedavi imkânı sağladıkları için virüs, bakteri, kanser hücreleri ve bunlara bağlı hastalıklarla mücadelede önemli rol oynarlar. Ayrıca, aptamerler hedefleme ajanı olarak kullanılma özelliğinden dolayı virüs, bakteri, kanser hücrelerinin varlığının ve onların sebep olduğu hastalıkların erken teşhisinde kullanılırlar. Aptamerler, eşsiz özellikleri sayesinde araştırmacıların oldukça dikkatini çekmiştir. Yeniden üretilebilirlik, düşük molekül ağırlığı, düşük bağışıklık tepkisi, geri dönüşümlü denatürasyon, kolay kimyasal modifikasyon (amin, karbonil, azit, alkin, tiol grupları ve biyotin, söndürme ve floresan etiketleri ile), kararlılık (pH, sıcaklık ve iyonik çözelti gibi geniş bir yelpazeye karşı), biyo-uyumluluk, yüksek, yüksek

afinite, yüksek seçicilik, kolay ve hızlı doku penetrasyonu, kolay saklama aptamerlerin en önemli temel özellikleri ve diğer hedefleme ajanlarına karşı avantajlarıdır. Genel itibariyle, altın nano malzemeler (Au NMler) kolay sentezlenme, kolay yüzey modifikasyonu ve özgün optik özelliklerinden dolayı hem nanosensörler olarak çeşitli inorganik, organik ve biyo-moleküllerin tespitinde hem de tedavi ajanları olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Au NMlerin bir molekülü algılaması hem görsel olarak (Au NM çözeltisindeki renk değişimi) hem de spektrometrik olarak (Au NMnin ışığı emme noktasındaki kayma) çok basit bir şekilde tespit edilebilir.

Önerilen bu projede, metisilin dirençli staphylococcus aureus (MRSA) bakterilerinin tayini ve fototermal olarak yok edilmesi için aptamer ve altın nano çubuklardan (Au NÇler) oluşan çok fonksiyonlu bir sistem geliştirilecektir. Öncelikle bir ucu tiyol (-SH) grubu ile modifiye edilmiş MRSA-aptamerler Au NÇler üzerine iliştirilecektir. MRSA aptamer-Au NÇler (MRSA Apt@Au NÇler) ile MRSA bakterisinin tayini hızlı, hassas ve doğru bir şekilde çözeltideki renk ve absorbans değişimleri ile hem çıplak gözle hem de spektrometrik olarak yapılacaktır. MRSA aptamerlerin MRSA bakterileri üzerinde bulunan hedef reseptörün üzerine anahtar-kilit ilişkisi şeklinde bağlanması ile Au NÇlerin MRSA üzerinde toplanması sağlanacaktır. Suda dağılmış MRSA Apt@Au NÇler şarap kırmızısı (wine red) rengini verecektir ve belli dalga boylarında belli absorpsiyon noktaları gösterecektir. MRSA Apt@Au NÇler MRSA bakterileri ile etkileştiğinde, Au NÇlerin çözeltide dağılmış pozisyondan agregasyon pozisyonuna geçmesi beklenir. Böylece çözeltisinin renginin kırmızıdan maviye kaymasının çıplak gözle görülmesi ve absorpsiyon noktalarındaki kaymanın (red-shift) ultraviyole-görünür spektrofotometre ile gözlemlenmesi planlanmaktadır. Son olarak, özellikle MRSA Apt@Au NÇlerin MRSA bakterileri üzerinde birikmesi sağlandıktan sonra, bu karışımın 808 nm dalga boyunda yakın kızılötesi ışığa maruz bırakılıp ışığın ısıya

dönüştürülmesiyle MRSA bakterilerinin fototermal olarak yok edilmesi sağlanacaktır. Çünkü Au NÇler yakın kızılötesi bölgesinde büyük emme kesiti sayesinde bu bölgedeki ışıkları emerek ısıya dönüştürecektir.

Au NÇler çok yaygın bir teknik olan tohum kaynaklı büyüme (seed mediated growth) tekniği ile setiltrimetilamonyum bromit varlığında sentezlenmesi planlanmaktadır. Au NÇler TEM, STM, SEM, DLS, ZP ve UV-Vis ile karakterize edilecektir. MRSA aptamerlerinin konsantrasyonu UV-Vis and fluoresans spektrometreler ile belirlenecektir. Au NÇler üzerindeki varlığı DLS ve ZP ile sayıları ise UV-Vis ile belirlenecektir. MRSA Apt@Au NÇler ile MRSA bakterileri arasındaki etkileşim MRSA aptmerlerin diğer ucuna eklenen organik floresan boya sayesinde akım sitometri ile ispatlanacaktır. Ayrıca, bu etkileşim TEM, SEM ve UV-Vis teknikleriyle de belirlenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

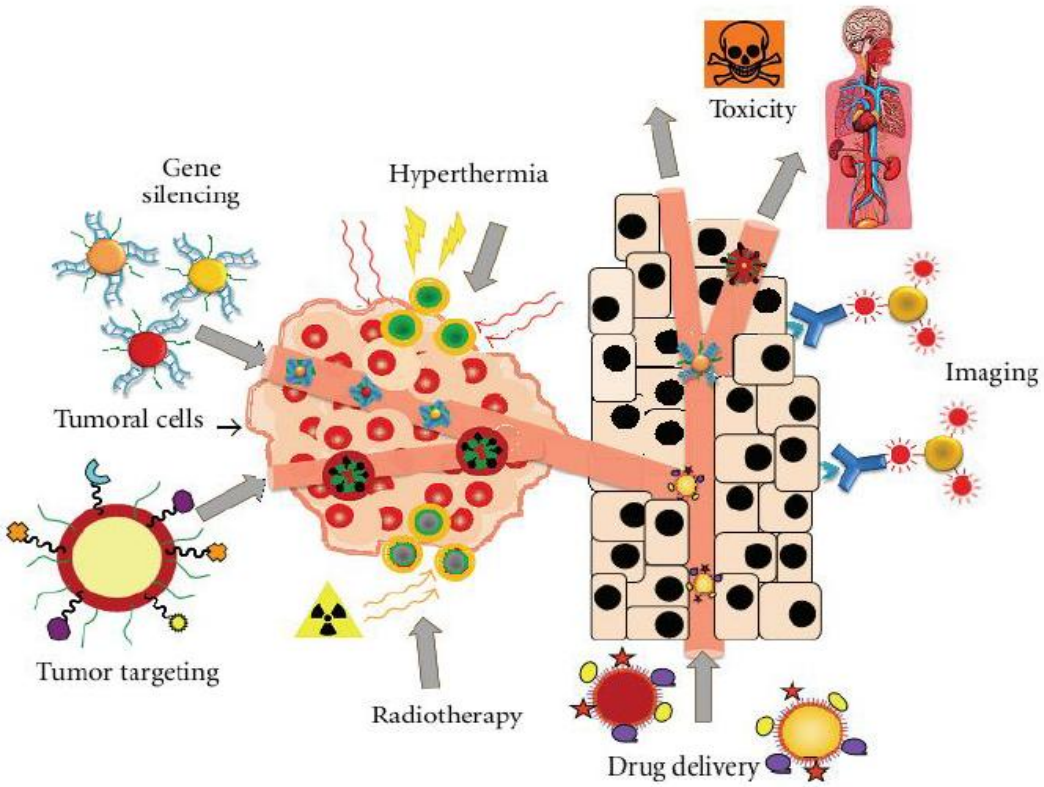
Günümüzde bakterilerin sebep olduğu bulaşıcı hastalıklar insan sağlığını tehdit eden sorunlardan biridir. Bakteriyel patojenler toprak, deniz, dışkı, kirlenmiş su ve gıdalar gibi çok geniş yelpazede dağılmışlardır. Gıda zehirlenmelerinin sıklığının giderek artması ve bazı bakterilerin ilaçlara/antibiyotiklere karşı direnç göstermesi, bugünün en önemli sağlık sorunlarındandır. Hastalık yapan bu bakterilerden en tehlikeli olanlarından biri de micrococcacea ailesi üyesi ve staphylococcus cinsinden olan Staphylococcus aureus'dur. S. aureus'lar Alman bilim adamı Robert Koch tafından ilk kez 1878 yılında ışık mikroskobu ile tanımlanmıştır. Sırasıyla, 1880'de Fransız mikrobiyolog ve kimyager olan Pasteur bu bakterileri sıvı besiyerinde üretmiş, İskoç cerrah Alexander Ogston ise 1881'de bunların patojen olduğunu göstermiştir [1]. S. aureus kendine özgü şartlarda birçok gıda türü üzerinde hızla çoğalarak zehirlenmeye sebep olacak düzeyde toksin üretebilir. Belli bir dozda olan toksinler gıda yolu ile insan vücuduna girerek ciddi gıda zehirlenmelerine yol açarlar. Bu bakteriler bağırsakta üreyerek toksin oranı çok daha yüksek olan farklı yapılardaki enterotoksinleri oluştururlar. Enterotoksinler polipeptid yapıda bağırsakta etkili olan toksinlerdir. S. aureus doku toksinleri üreterek eklem romatizmalarına olumsuz etki yapmasının yanı sıra menenjit, septisemi, kalp iltihabı ve iltihaplı yaralar gibi hayatı tehdit eden enfeksiyonlara da sebep olur [2, 3]. S. aureus insanların %30'unda burun içinde ya da deri üzerinde (el, ayak, yüz gibi) zararsız bir şekilde yaşar [2]. Ayrıca bu bakteriler insanlarda boğaz boşluğundaki mukoz dokuda da yoğun şekilde bulunur. Fakat hastane kökenli olan S. aureus patojeni (nosocomial-acquired pathogen) yukarıda belirtilen ciddi enfeksiyonlara sebep olur. S. aureus insan vücuduna gıdalar yolu ile geçmesinin dışında, direk temas (vücut teması) yolu ile insandan insana veya hayvandan insana geçiş yapabilir. Bu bakterinin antibiyotiğe direnç gösteren türü çok geniş sıcaklık ve pH aralığında rahatlıkla üreyebilir, gelişebilir ve hatta toksin üretebilir. Örneğin, 29-38°C arasında optimum düzeyde üreme gösterirken, 6-

46°C aralığında da gelişebilir. Genel olarak da bu bakteri 10-48°C aralığında toksin üretebilme yeteneğine sahiptir. Asit ve bazik ortam açısından, pH 6.9-7.6 aralığı S. aureus için en ideal gelişim aralığıdır fakat pH 4-9.5 aralığında da yaşamını sürdürebilir ve toksin üretebilir.

S. aureus ve izolatları insanlarda basit gıda zehirlenmesi ve yüzeysel deri enfeksiyonlarından çok ciddi besin zehirlenmesi, yumuşak doku ve sindirim, kas, iskelet, solunum, sinir ve üreme sistemleri enfeksiyonlarına sebep olurlar. S. aureus enfeksiyonları genellikle β-laktam içeren (penisilin, amoksisilin, oksasilin, metisilin gibi) antibiyotikler ile tedavi edilir. 1928 yılında Alexander Fleming tarafından penisilinin keşfi ile S. aureus'a karşı etkili bir tedavi başlamıştır. Fakat penisilinin yoğun olarak kullanımı, S. aureus'un penisiline karşı dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Penisilin dirençli izolatlar ilk defa 1954 yılında görülmüştür. Yeni nesil antibiyotik olan metisilinin geliştirilip kullanılması ile S. aureus'lara karşı mücadelede yeni bir aşamaya geçilmiştir. Fakat çok kısa bir zaman sonra 1961'de İngiltere'de ve 1962'de Fransa'da S. aureus'un metisiline dirençli izolatları görülmüştür. Metisiline dirençli S. aureus'lar (MRSA) çoğu zaman süper mikrop (superbug) olarak adlandırılır [4, 5]. MRSA kaynaklı enfeksiyonların sebep olduğu zararların yansıra, uzun süreli antibiyotik tedavisi de hastalara zarar vermektedir [6-8]. MRSA'nın tedavisi güç ve çok ciddi enfeksiyonlara sebep olması, çok geniş bir yelpazede esnek şartlar altında gelişebilmesi ve toksin üretebilmesi gibi nedenlerden dolayı bu bakterinin tayini ve yok edilmesi çok büyük önem taşmaktadır. Çevrede, gıdada ve klinik örneklerindeki bakteri varlığını, konsantrasyonunu ve kimliğini (türünün) hızlı ve doğru tespit etmek ve bunları yok etmek hem toplum sağlığı ve güvenliği için hem de bulaşıcı enfeksiyonların erken tanısı için hayati önem taşımaktadır [9-10].

Bu anlamda, bakteriyel patojenlerin saptanması ve tanımlanması için çeşitli klasik teknikler mevcuttur. Örneğin, kültür ve koloni sayma (culture and colony counting), immünolojik yaklaşımlar (immunological approach), polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR) ve ters transkriptaz (RT-PCR) (reverse transcriptase polymerase chain reaction), akım sitometri (flow cytometry), kütle spektrometri (mass spectrometry), mikroarrayler (microarrays), floresan tabanlı tahlil (fluorescence based assay) ve elektrokimyasal tabanlı tahlil (electrochemical based assay) gibi çeşitli teknikler geliştirilmiş ve halen bu teknikler kullanılmaktadır. Fakat bu tekniklerin çok zaman alması, karışık ve zahmetli olması, komplike aletlere ihtiyaç duyması ve alan çalışmalarına uygun olmaması (taşınabilirlik) gibi sorunlar bu tekniklerin en önemli dezavantajlarındandır [11-18].

Hedefleme ajanlarının nano parçacıklara entegrasyonu ile yeni nesil nano tanı platformları geliştirilmiştir. Bunlar bakterilerin daha hızlı, basit ve yüksek hassasiyetle tespiti ve tanısına çok önemli katkı sağlamıştır. Böylelikle, nano tanı platformları yukarıda sıraladığımız mevcut klasik tekniklerin dezavantajlarını ve sınırlamalarını minimize etmede de çok etkin bir rol oynamıştır [19-28]. Son yıllarda, Au nano malzemeler (Au NMler) sahip oldukları özgün özellikleri sayesinde biyo-analitik ve biyomedikal başta olmak üzere elektronik ve optik alanlarda da sıklıkla kullanmaktadır. Au NMlerin kolay sentezlenmesi, kısa sürede üretilmesi, kararlı bir yapıya sahip olması (uzun süre oda sıcaklığında saklanabilir), yüksek yüzey alanına sahip olması, fonksiyonel grupların yüzeye kolayca iliştirilmesi ve en önemlisi özgün optik özellik taşıması bilinen başlıca avantajlarındandır [29]. Altın NMlerin eşsiz optik özelliğinden yararlanılarak birçok bilimsel araştırmalar yapılmıştır [30-33]. Şekil 1 de Au NMlerin çeşitli amaçla kullanım şeması verilmiştir.

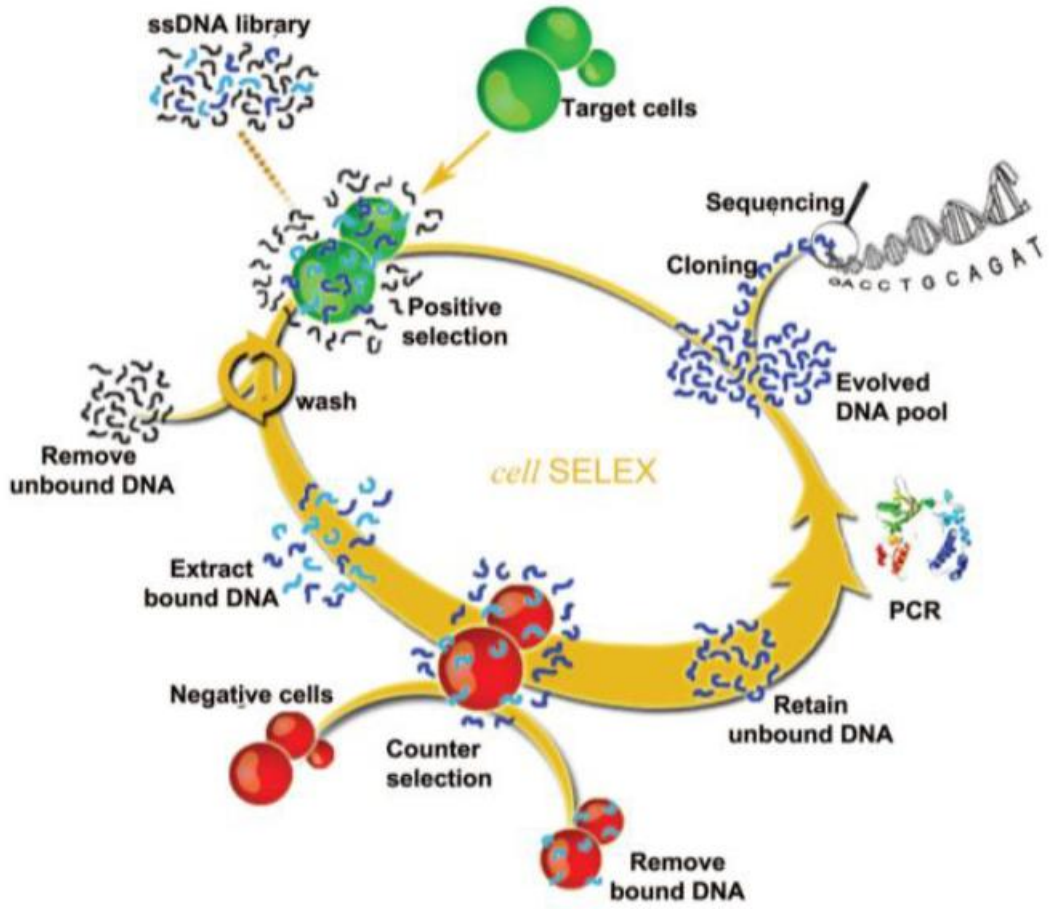


Şekil 1. Au NMlerin biyomedikal uygulamaları gösterilmektedir [34]

Au nano çubuklar (Au NÇler) Au NM türleri arasında biyomedikal alanda en yaygın kullanılan nano malzemedir. Au NÇler yakın kızılötesi frekanslarda büyük emilim kesitine sahiptir ve bundan dolayı da fototermal tedavi için mükemmel bir adaydır. Au NÇler yüzey plazmon titreşim rezonans ile lazer ışığına maruz kaldıklarında, güçlü bir şekilde ışığı emer ve hızla foto fiziksel süreçler vasıtasıyla ısıya dönüştürür. Sonuç olarak, mikro çevrede hızlı lokal sıcaklık artışı geri dönüşü olmayan hedef hücre hasarı ve hücre ölümüne neden olur. Fototermal tedavi kemo tedaviye alternatif ve güvenli bir tıbbi yöntemdir. Bakterileri spesifik olarak algılamak amacı ile çok çeşitli organik ve biyolojik hedefleme ajanları (targeting agents) geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Bu hedefleme ajanlarından en aktif kullanılanları dört temel kategoride incelenebilir: 1) küçük moleküller (galaktoz, glikoz, mannoz, borik asit

ve folik asit), 2) peptidler (arginil glisil aspartik asit, RGD ve leptin türetilmiş peptidi), 3) proteinler (antikorlar, düşük yoğunluklu lipoproproteinleri ve lektinler) ve 4) oligonükleik asitler (DNA ve RNA aptamerler). Örneğin, Dr. Xu ve arkadaşları vancomycin antibiyotiğini Au nano küreler (NKler) üzerine tutturarak, vankomisin dirençli enterokok (vancomycin-resistant enterococci) bakterilerini hem yakalamak hem de yok etmek için kullanmıştır. Fakat antibiyotik ile Au NKler ve antibiyotik ile bakteri arasındaki bağlanmalar, istenen düzeyde olmadığı için yeteri kadar etkili sonuç alınamamıştır [35]. Dr. Bunz ve arkadaşları floresan özelliği olan anyonik poli (para-fenilen etinilen)'i katyonik Au NKler üzerine elektrostatik (negatif-pozitif) etkileşim ile tutturarak bakteri algılamada kullanmıştır. Fakat katyonik Au NKlerin negatif yüklü bakteriye bağlanması elektrostatik etkileşimle olmaktadır. Buna ek olarak, Dr. Bunz ve arkadaşları Au NKlerin üzerine katyonik heksil-ikame edilmiş amonyum-işlevselleştirilmiş tiyollu ligandları iliştirerek hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerin yüzeyine Au NKlerin agregasyonunu sağlamıştır. Kullanılan organik ligand hem hidrofobik hem de elektrostatik (pozitif yük sayesinde) olarak bakterilerin yüzeyine bağlanmıştır. Benzer bir çalışmada Dr. Murphy ve grubundan gelmiştir, katyonik ve amfifilik bir polimer olan setil trimetilamonyum bromit ile kaplanmış Au NÇlerin bakteri yüzeyine bağlanması gerçekleştirilmiştir. Fakat, her üç projede spesifik bir bakteriyi tanıyacak hedefleme ajanları içermediği için seçicilik, tekrarlanabilirlik ve hassaslık açısından oldukça zayıf kalmıştır [36-38]. Son zamanlarda boronik asit grubu içeren ligandlar bakteri algılamadaki seçiciliği ve hassaslığı artırmak için yoğun bir şekilde kullanılmıştır. Boronik asitler bakteri duvarında bulunan peptidoglikanlardaki diol (-OH) grupları ile reaksiyona girerek boronat ester bileşikleri oluştururlar. Örneğin, Dr. Wang ve grubu disülfid fenilboronik asidi Au NKlerin üzerine bağlayarak, S. aureus'u tayin etmiştir [39]. Fakat bu bağlanmanın spesifikliği varsayımlar üzerine dayanmaktadır ve tekrarlanabilirlikten uzak kalmıştır. Hedefleme ajanlarının en önemlisi olan aptamerler, tek sarmallı DNA ve RNA'dan

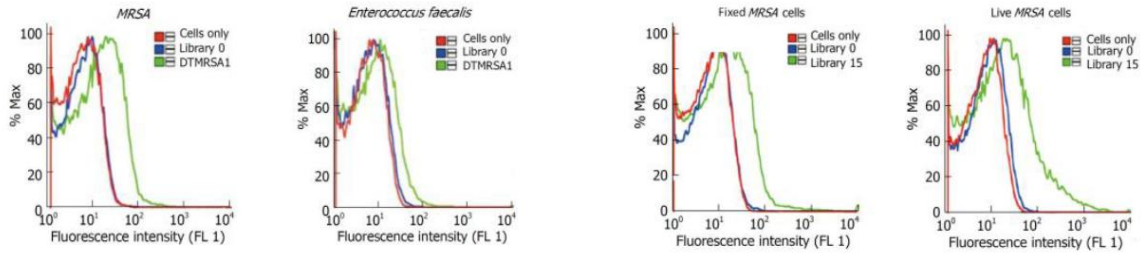
oluşan spesifik oligonükleotitlerdir. Bunlar Dr. Szostak ve arkadaşları tarafından geliştirilen Eksponansiyel Zenginleştirme ile Ligandların Sistematik Evrimi (EZLSE) (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) diye adlandırılan bir metot ile üretilmiştir. Aptamerler, bir hedef belirlenerek metal iyonları (Pb2+ ve Cd2+), küçük moleküller (kokain, adenozin trifosfat) ve proteinler (protein tirozin kinaz 7, immünoglobülin G Nucleolin ve trombin) gibi o hedefe özel olarak geliştirilmiştir [40-44]. Aptamerler istisnai özellikleri nedeniyle antikorlar dahil diğer hedefleme ajanlarının çok üzerinde avantajlara sahiptir. Tekrar üretilebilirlik, düşük molekül ağırlık, düşük bağışıklık tepkisi, geri dönüşümlü denatürasyon, kolay kimyasal modifikasyon (amin, karbonil, azid, alkin, tiol grupları ve biyotin, söndürme ve floresan etiketleri ile), kararlılık (pH, sıcaklık ve iyonik çözelti gibi geniş bir yelpazeye karşı), biyo-uyumluluk, yüksek özgüllük, yüksek afinite, yüksek seçicilik, kolay saklama aptamerlerin en önemli temel özellikleri ve diğer hedefleme ajanlarına karşı avantajlarıdır [45-48]. Son yıllarda, aptamerler Dr. Tan ve arkadaşları tarafından geliştirilen bütün hücrelerin (çeşitli kanser hücreleri ve virüs ile enfekte olmuş hücreler) kullanıldığı hücreEZLSE (cell-SELEX) diye adlandırılan yeni bir yöntem ile üretilmektedir [49-51]. Bu yöntemle aptamerlerin seçimi için hedef olarak küçük moleküler veya hücreden izole edilen proteinler yerine tüm hücre hattı kullanılmaktadır. Şekil 2 de hücre bazlı aptamer seçimi şematik gösterilmektedir. Kısaca, tek sarmallı DNA havuzu CCRF-CEM hücreleri (hedef hücre) ile inkübe edilmektedir.



Şekil 2. Hücre tabanlı aptamer seçiminin şematik gösterimi [52].

Bu yöntemde hücre zarındaki mevcut biyolojik belirteçlerin (reseptör proteinler) sayısını ve türünü bilmek gerekmemektedir, aptamer seçimi sadece hücre yüzeyinde bulunan reseptör proteininin çeşitli tipleri için yapılır ve böylece seçilen aptamer hedef kanser hücrelerini hedef olmayan kanser hücrelerinden ve sağlıklı hücrelerden kolayca ayırt etmektedir. Aptamerler, hedefli tedavinin yanı sıra biyo-belirteçlerin keşfinde (biomarkers discovery) ve nano tıpta moleküler düzeyde tedavi için çok umut verici araçlardır. Önerilen projede kullanılacak olan MRSA aptamerler, bir önceki proje kapsamında MRSA bakterileri için özel olarak hücre-EZLSE yöntemi ile seçilmiştir. Seçilen MRSA aptamerlerin kültür edilmiş ve klinik MRSA bakterilerine bağlanması (binding strength) akıcı sitometri ile test edilmiştir ve "Molecular recognition of live methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cells using DNA

aptamers” başlığı altında World Journal of Translational Medicine dergisinde yayınlanmıştır [36]. Şekil 3 de MRSA aptamerin MRSA bakterisine seçici olarak bağlandığı ve *Enterococcus faecalis*'in bağlanmadığı gösterilmektedir (solda) ve MRSA bakterisi şoklandığında MRSA aptamerinin bağlanmasında bir değişim olmadığı da gösterilmektedir (sağda).



Şekil 3. MRSA aptamerin hem canlı MRSA ve şok edilmiş MRSA bakterisi ile hem de kontrol bakteri ile bağlanma testleri akım sitometri ile gösterilmektedir [36].

Önerilen bu projede, MRSA aptamerler Au NÇler üzerine iliştirilerek oluşturulan MRSA apt@Au NÇ konjugatları iki temel uygulama için kullanılacaktır: 1) MRSA bakterilerini hem görsel hem de spektrofotometrik tayin edebilen bir nano-sensör olarak kullanılacaktır ve 2) Bu bakterileri yok etmek için fototermal ajan olarak kullanılacaktır. Bir ucunda tiyol (-SH) içeren MRSA aptamerlerin Au NÇler üzerine sağlam bir şekilde bağlanması beklenmektedir.

MRSA aptamerinin diğer ucuna florasan boya eklenerek MRSA aptamerinin MRSA bakterisinin üzerindeki hedef protein reseptöre bağlanması akım sitometri ile gösterilecektir. Ayrıca, MRSA aptameri Au NÇlerin üzerine konjuge edilerek aptamerlerin MRSA bakterisine bağlanması çoklu bağlanma etkisi kuramı ile artırılacaktır. Bu durum ortamdaki çok az sayıda bulunan MRSA bakterilerin tayinine fırsat verecektir. Böylece, MRSA tayininin ve yok edilmesinin daha etkin olması sağlanacaktır.

Au NMler olağanüstü optik özelliklerinden dolayı renk algılamada metal iyonundan küçük organik ve biyolojik moleküllerin tespitine, protein gibi büyük moleküllerden bakteriyel hücre tespitine kadar geniş bir alanda çok yaygın olarak kullanılmıştır [29-32, 34-38]. Au NMler arasında en yaygın kullanılan Au NMden birde Au NÇlerdir. Au NÇlerin yüzeyi genellikle katyonik ve amfifilik bir sürfaktan ile kaplıdır. MRSA apt@Au NÇler negatif yüklü gram pozitif MRSA bakterilerine hem hedefleme ajanı olan MRSA aptamerler ile kovalent olarak hem Au NÇler üzerindeki sürfaktanın katyonik ve amfifilik özelliğinden dolayı elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerle bağlanacaktır. Au NÇ-MRSA etkileşimi hem görsel olarak hem de spektrometrik olarak ispatlanacaktır. Bunlara ek olarak, MRSA apt@Au NÇlerin MRSA bakterisine bağlaması ve oluşturduğu agregasyon geçişli ve taramalı elektron mikroskopları ile görüntülenecektir. Au NÇler çok yüksek tükenme kesiti katsayısına sahip olduğu ve yakın kızılötesi bölgesinde yüksek oranda ışık emme kabiliyetinden dolayı fototermal tedavide çok yayın olarak yararlanılmaktadır. Böylelikle, MRSA apt@Au NÇler ile MRSA bakterilerinin inkübasyonundan sonra karışım yakın kızılötesi bölgesindeki ışığı emerek yüksek verimlilikle lokalize ısıya çevirecek ve hedef MRSA bakterilerini etkili bir biçimde yok edecektir. Yapılan geniş çaplı araştırmalar sonucunda, MRSA bakterileri kullanılarak hücre-EZLSE yöntemi ile seçilen bir aptamere proje yürütücüsünün araştırmacı ve yazar olarak içinde olduğu makalenin dışında literatürde rastlanmamıştır. Ayrıca seçilmiş olan MRSA aptamerlerin uygulaması da literatürde yoktur. Önerilen projede, ilk defa MRSA aptamerler Au NÇler ile birleştirilerek, patojenik bakteri olan MRSA tayininde bir nano-sensör olarak (görsel ve spektrometrik algılama için) ve fototermal ajan olarak (üretilen ısı yoluyla yok etmek için) kullanılacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

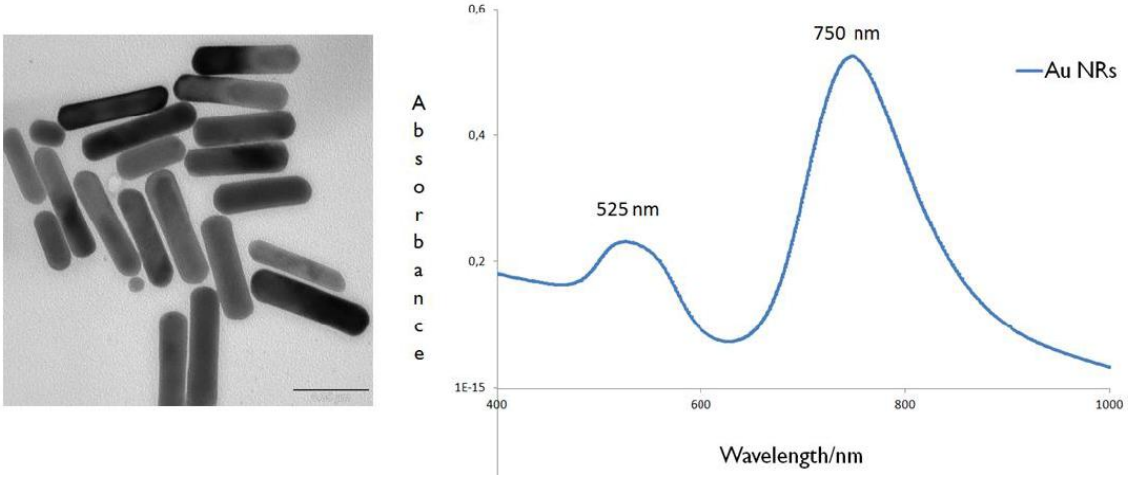
1. Altın Nano Çubukların Sentezlenmsi

Altın nano çubuklar çok iyi bilinen tohum büyüme (seed growth) tekniği ile sentezlenecektir [61]. İlk basamakta tohum çözeltisi (seed solution) hazırlanır. Bu amaçla, 0.2M 5mL setiltrimetil amonyum bromit çözeltisi hazırlanır ve 0.5mM 5mL sodyum tetra-(III) dihidrat ($NaAuCl_4$. $2H_2O$) çözeltisi 25 mL bir cam şişe içerisinde karıştırılır. Bu karışım sonike edilirken üzerine 0.01M 0.6mL soğuk sodyum boro hidrid çözeltisi eklenir. Birkaç dakika içerisinde karışımın rengi kahverengimsi sarıya döner ve bu tohum parçacıkların oluştuğunu gösterir. İkinci basamak olarak büyüme çözeltisi (growth solution) hazırlanır. Bu amaçla, 0.2M 50mL setiltrimetilamonyum bromit çözeltisi, 1.0mM 50mL sodyum tetra-(III) dihidrat ve 0.1M 0.1mL gümüş nitrat ($AgNO_3$) çözeltisi 250 mL cam şişede karıştırılır ve hafifçe sallanarak karışımın homojen olması sağlanır. Daha sonra, 78.8mM 0.7mL zayıf bir indirgeme ajanı olarak kullanılan askorbik asit karışıma eklenir. Askorbik asit eklendikten hemen sonra büyüme çözeltisinin rengi çok hızlı bir şekilde koyu sarıdan renksize döner. Bu keskin renk dönüşü $AuCl^{2-}$ iyon oluşumunu gösterir. 0.12mL tohum çözeltisi büyüme çözeltisine eklenir. Karışımın rengi yavaş yavaş koyu pembeye döner ve bu renk dönüşümü altın nano çubuk tohumlarının oluşumunu gösterir. Bu nano çubuk tohum çözeltisi yıkamaya gerek duymadan altın nano çubuk oluşumunda kullanılır. 50 mL altın nano çubuk tohum çözeltisi 0.2M 50mL (pH 8) glisin çözeltisi ile karıştırılır. Son karışım oda sıcaklığında karıştırılmadan bir gece inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonucu oluşan altın nano çubuklar santrifüj edilerek fazla olan ve reaksiyona girmeyen glisin ve setiltrimetilamonyum bromit ortamdan uzaklaştırılır. Oluşan çökelti suda dağıtılır ve tekrar santrifüj edilir. Bu saflaştırma işlemi 3 kez uygulanır ve daha sonra sentezlenen altın nano çubuklar

çeşitli yöntemler ile karakterize edilir.

1.1. Sentezlenen Altın Nano Çubukların Karakterizasyonu

Yukarıdaki sentez şartları ile uzunluğu 50-60 nm eni 10-13 nm arası Au NÇler üretilmesi hedeflenmiştir. Geçişli elektron mikroskobu veya taramalı elektron mikroskobu ile Au NÇlerin resimleri çekilerek hem boyutu ölçülür hem de şekli belirlenir. UV-Vis spektroskopisi ile ise Au NÇlerin absorpsiyon noktaları belirlenir. Au NÇlerin 510 nm ve 790 nm dalga boylarında enine ve boyuna emme bantları göstermelidir. Au NÇlerin absorpsiyon noktaları belirlenir. Ayrıca dinamik ışık saçlım cihazı ile Au NÇlerin etkin çapı ölçülürken, zeta potansiyeli ile Au NÇlerin üzerindeki yükün türü ve şiddeti ölçülür. Ön deneyler olarak sentezlenen Au NÇlerin geçişli elektron mikroskop resmi ve UV-Vis spektrum şekil 4 de gösterilmektedir.



Şekil 4 Sentezlenmiş Au NÇlerin geçişli elektron mikroskop resmi (Au NÇ boyu 52 nm ve eni 13 nm) ve UV-Vis spektrum (enine nokta 525 nm, longitudinal nokta 750 nm).

1.2. DNA Aptamerlerin Sentezlenmesi

AptamerlerA: DNA aptamerler (75-76mer), SELEX'e dayalı MRSA hedeflemesi için seçildi.

1. ATCCAGACGTGACGCAGC$(N)_{38}$TGGACACGGTGGCTTAGTA
   $(N)_{38}$ = ATGCGGTTGGTTGCGGTTGGGCATGATGTATTTCTGTG
2. ATCCAGAGTGACGCAGCA$(N)_{36}$TGGACACGGTGGCTTA
   $(N)_{36}$ = CGACACGTTAGGTTGGTTAGGTTGGTTAGTTTCTTG
3. ATCCAGAGTGACGCAGCA$(N)_{40}$TGGACACGGTGGCTTAGTA
   $(N)_{40}$ = GTAGATGGTTTGGTTGGTGTGGTTTCCTACTGATGTTGGG
4. ATCCAGAGTGACGCAGCA$(N)_{39}$TGTGGACACGGTGGCTTA
   $(N)_{39}$ = TTATGGGGTGTGGTGGGGGGTTAATGCGTTGGTTATCCG

5’-C - ATC CAG ACG TGA CGC AGC $(N)_{38}$ TGG ACACGG TGG CTT AGTA-SH-3 $(N)_{38}$= ATG CGG TTG GTT GCG GTT GGG CAT GAT GTA TTT CTGTG. Diziler, bir ABI3400 DNA / RNA sentezleyicisi (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılarak 1.0 um mol skalasında sentezlendi. Sentezden sonra, diziler, 30 dakika süreyle 65 ° C'de amonyum hidroksit /% 40 aque-metilamin 1: 1 (AMA) karışımı içinde koruması kaldırıldı. Daha sonra, diziler HPLC kullanılarak saflaştırıldı. UV-vis spektrofotometresi kullanılarak emici madde, sabotajcı konsantrasyonlarının hesaplanması için kullanılmıştır.

2. MRSA aptamer ile Altın Nano Malzemelerin Konjügasyonu

2.1. MRSA aptamer-Altın Nano Çubuklar Konjugasyonu ve Karakterizasyonu

MRSA aptamerlerin Au NÇler üzerine immobilizasyonundan önce, aptamerlerdeki disülfit grupları tiyol gruplarına tiyol disülfit değişim tepkimeleri ile indirgenir. Bu reaksiyon için aşırı oranda ditiyotretol bileşiği kullanılır. Öncelikle, belli konsantrasyondaki MRSA aptamerleri 10 mM tampon çözeltisinde 1M ditiyotretol ile karıştırılarak 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası, karışımdan aşırı ditiyotretolu uzaklaştırmak için 0.5 mL etil asetat ile en az 5 kez yıkanacaktır. Daha sonra, belli

konsantrasyondaki aptamerler belli konsantrasyondaki Au NÇ çözeltisi bir tampon çözelti içerisinde ayrı ayrı karıştırılacak ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edilecektir.

Reaksiyon sonlandıktan sonra, çözelti santrifüj edilir ve reaksiyona girmeyen fazlalık MRSA aptamerler süpernatant da toplanarak saklanır, çökelek ise tekrar suda ya da tampon da çözülerek yeniden santrifüj edilir ve tekrar santrifüjedilir. Bu saflaştırma işlemi 2 ya da 3 kez tekrar edilir. MRSA aptamerlerin Au NÇlerin yüzeyine bağlandığını göstermek için bazı karakterize teknikleri uygulanır. UV-Vis spektroskopisi ile aptamerlerin Au NÇler üzerinde bağlandığını kanıtlamak için karakteristik absorbans noktası 260 nm gözlemlenir. Ayrıca, süpernatantdaki reaksiyona girmeyen MRSA aptamerlerinin absorbansları ölçülür, Au NÇler üzerindeki MRSA aptamer sayıları hesaplanır. Böylece bir Au NÇ üzerine kaç tane aptamer bağlandığı hesaplanır.

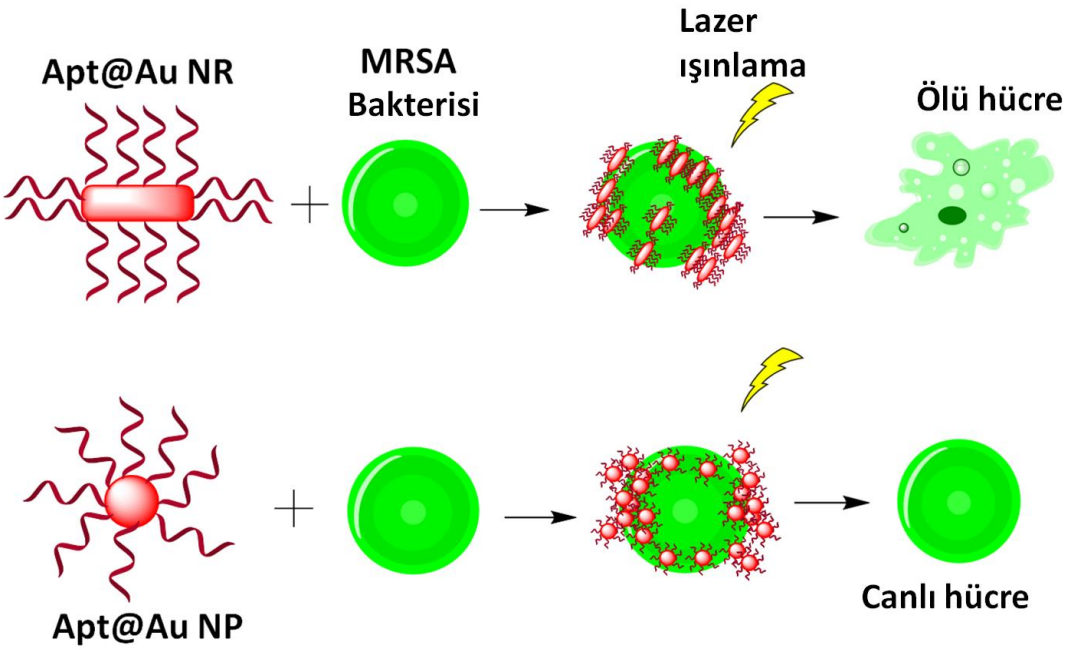
3. Bakteri Kültürünün Hazırlanması

Bakteri kültürünün hazırlanmasında üretici firmanın kültür kurallarına uyulması en ideal yöntemdir. *Staphylococcus aureus* Luria-Bertani (LB) kültür ortamı içinde 37°C de bir gece çalkalayıcı inkübatör içinde hazırlanır. *S. Aureus* çözeltisi 4000 rpm de 8 dk santrifüj edilir ve fosfat tamponu (pH 7.4) ile yıkanır. Daha sonra tekrar fosfat tamponunda dağıtılır ve konsantrasyonu optik yoğunluk (optical density, OD) cihazı ile (OD600, 1OD600 = 108 hücre/mL) ayarlanır. Kontrol deneyleri için kullanılacak farklı bakteri kolonileri için benzer bakteri kültürü hazırlama protokolü olsa da kullanılan kültür çözeltisinin içeriği ve bakterilerin inkübasyon sıcaklıkları farklı olabilir.

4. MRSA apt@Au NÇ-MRSA bakteri İnkübasyonu

100 µL MRSA bakteri çözeltisi (~106 CFU / mL) 1 mL belli konsantrasyonda MRSA apt@NÇ çözeltileri ile ayrı ayrı karıştırılır ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilir. Eğer

inkübasyon süresi uzatılırsa Au NÇlerin bakteri yüzeyine bağlanmak yerine hücre içerisine girme ihtimali olduğu için inkübasyon süreleri optimize edilir. İnkübasyondan sonra, karışım 3000 rpm de santrifüj edilerek bağlanmamış MRSA apt@NÇ süpernatant ile uzaklaştırılır. Çökelek ise bağlama tamponunda çözülür ve sonraki deney için saklanır. Şekil 5 de MRSA apt@NÇlerin (sağda) MRSA bakterilerine bağlanmaları resmedilmiştir.



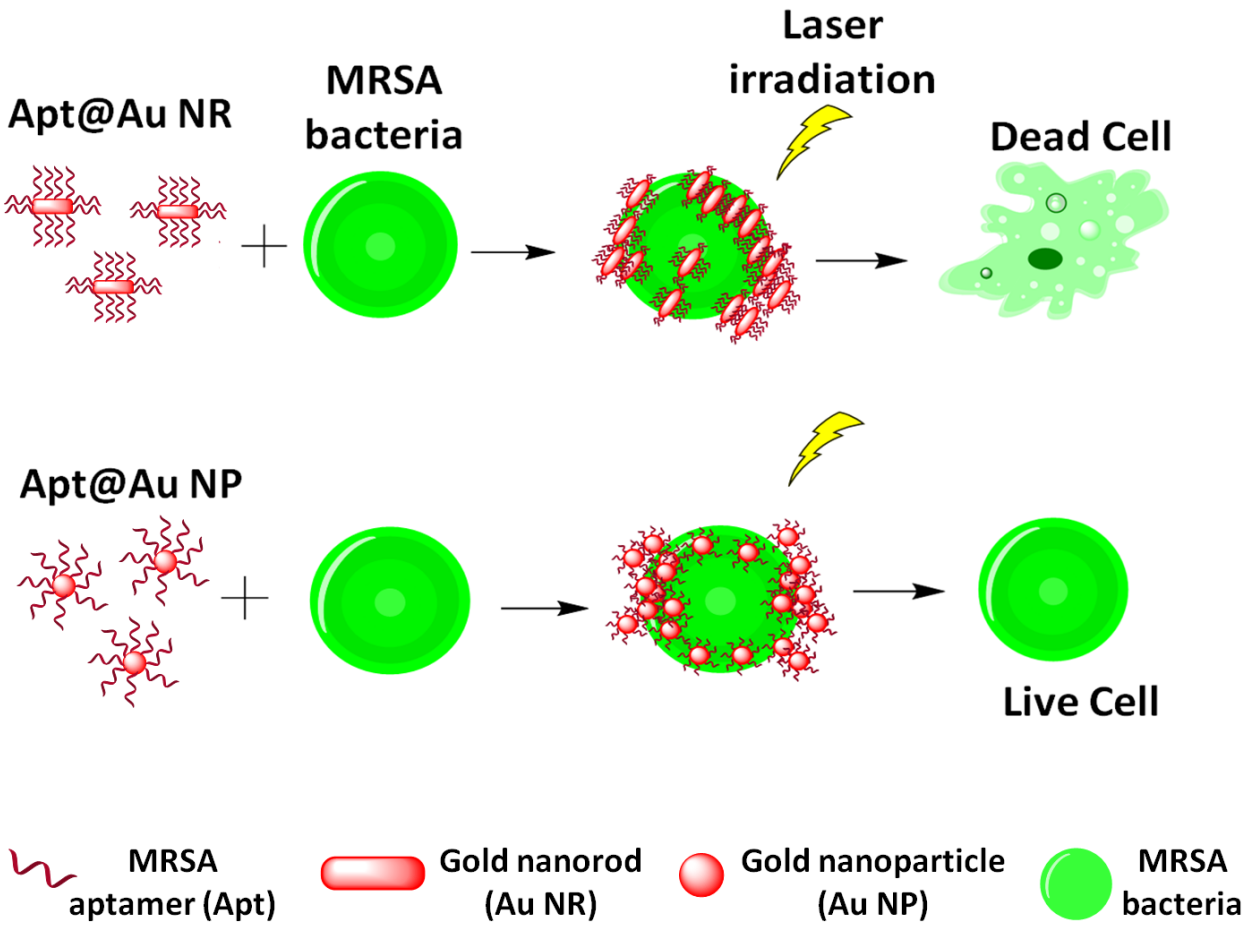
Şekil 5. DNA ile konjuge edilmiş altın nano küre ve nano çubukların MRSA bakterilerine bağlanması ve lazer ışıması ile yok edilmesi.

5. Fototermal Tedavi Deneyi

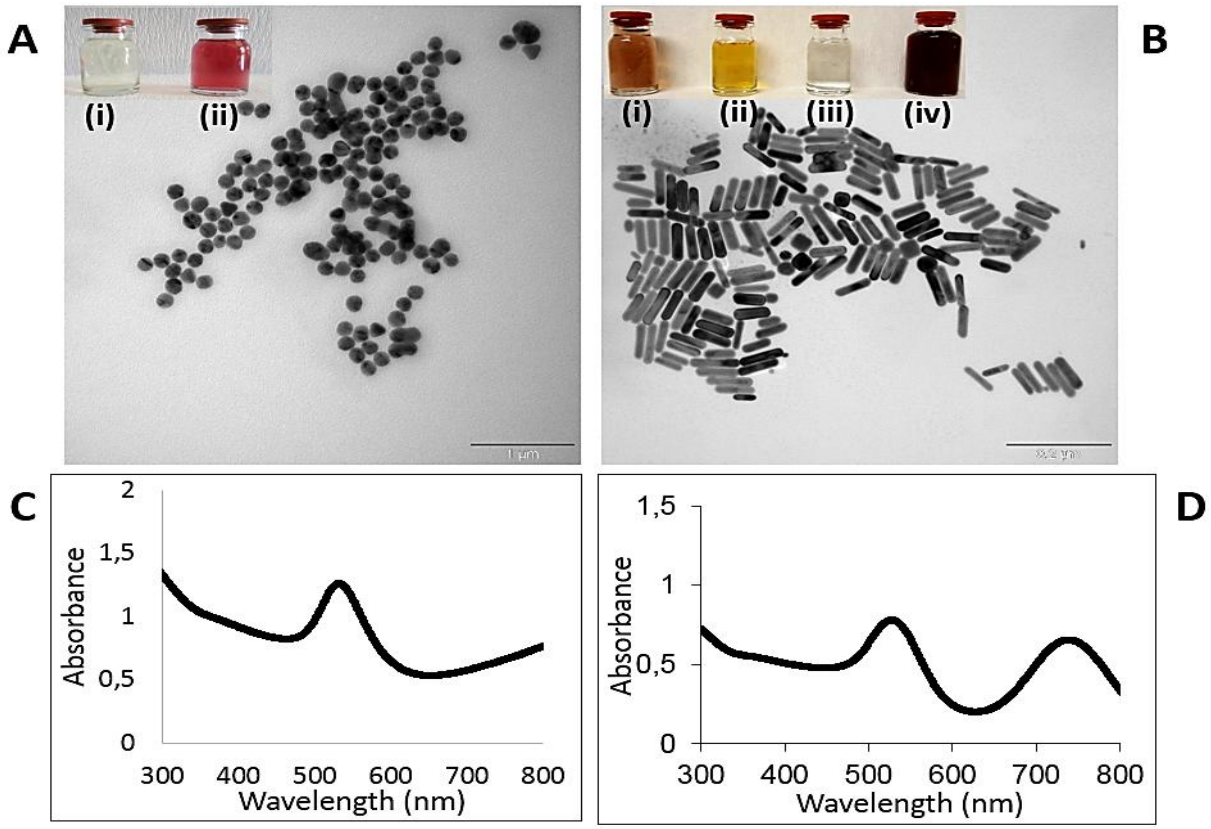
MRSA bakterileri bir tampon içinde süspansiyon haline getirilir ve bakteri çözeltisi~106-107 CFU / mL'lik konsantrasyona seyreltilir. Daha sonra 200 µL bakteri çözeltisi (~106 CFU / mL) 1 mL belli konsantrasyondaki MRSA apt@Au NÇ çözeltisi ile karıştırılır ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilir. İnkübasyondan sonra karışım 808 nm dalga boyundaki (1.1 W/cm^2) ışığa farklı süreler ile maruz bırakılır. Son olarak 100 µL karışım alınır ve 50 kez

seyredilerek trypticase soy agar besiyeri üzerine yayılır ve 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilir. Kontrol deney için, aynı işlemler Au NÇ kullanılmadan sadece MRSA bakteri çözeltisine uygulanır. Her sayılabilir plaka için koloni sayımı yapılarak fototermal tedavinin sonuçları açığa çıkarılır. Aşağıdaki şekilde MRSA apt@Au NÇlerin MRSA bakterisine bağlanması ve yakın kızılötesi bölgesindeki ışığa maruz kalarak bakterinin yok edilmesi gösterilmektedir.

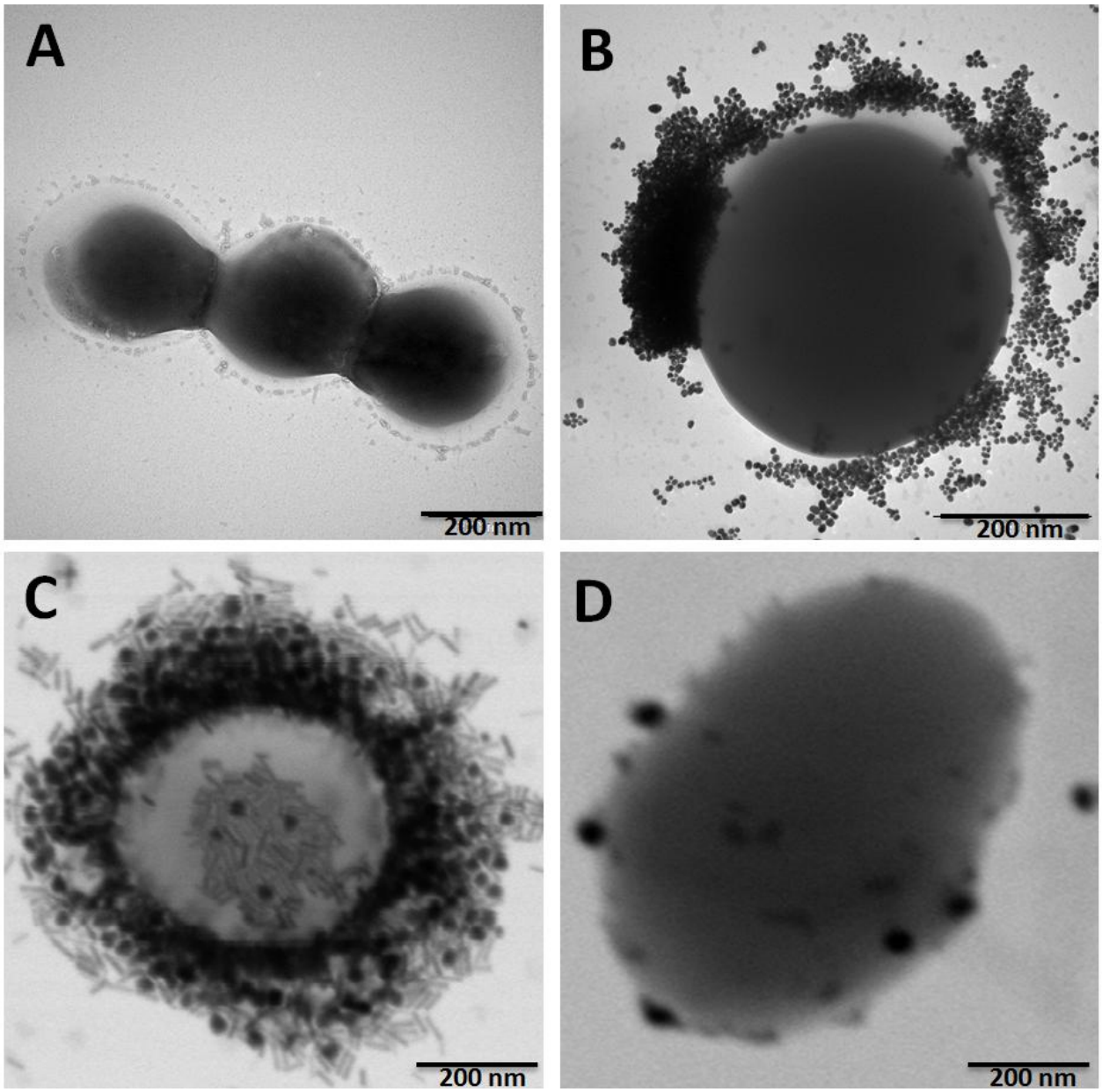
4. BULGULAR



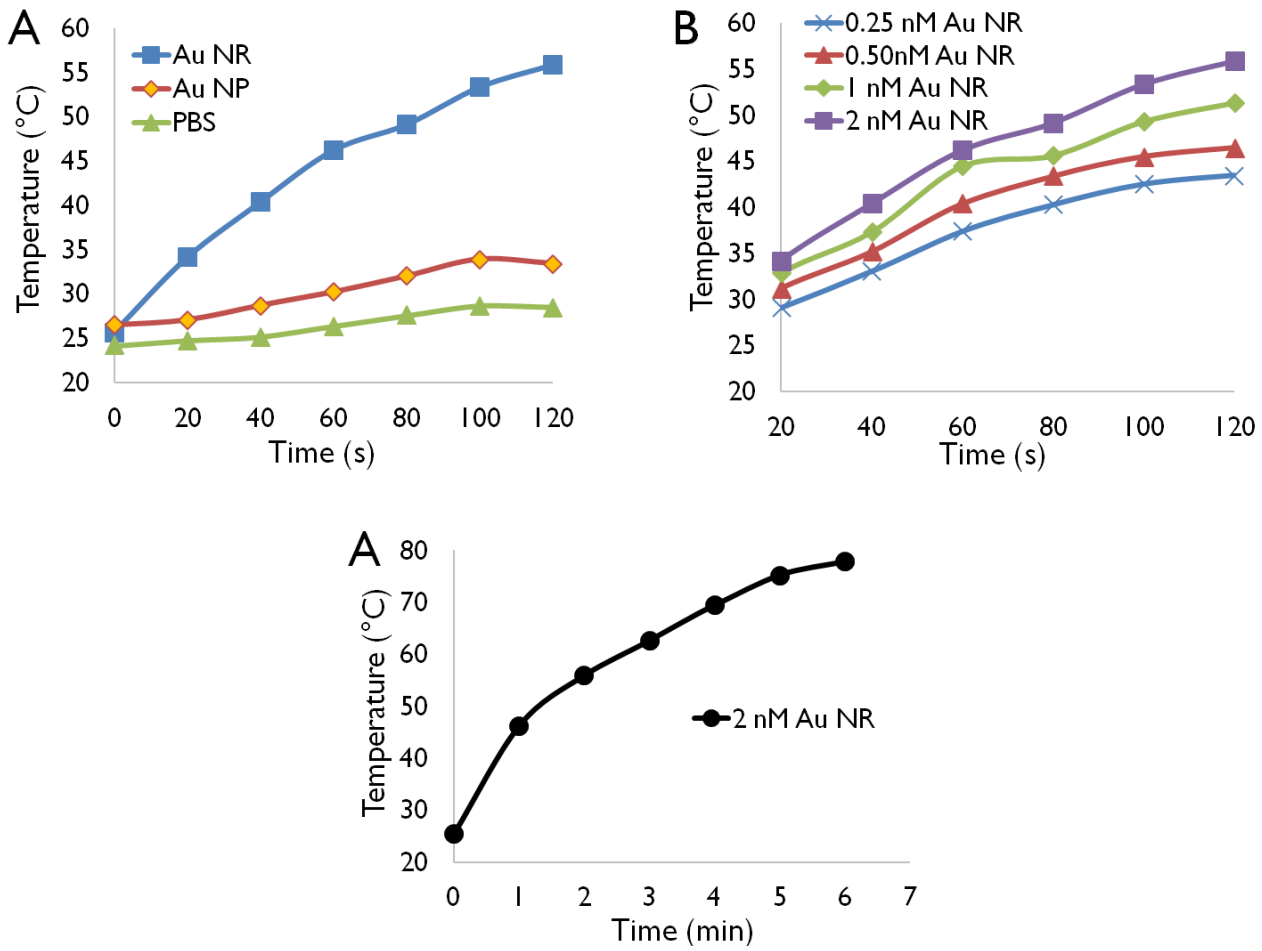
Şekil 1. MRSA aptamer konjüge Au NR ve Au NP ve MRSA bakteri hücresinin etkileşimi ve PTT performansı



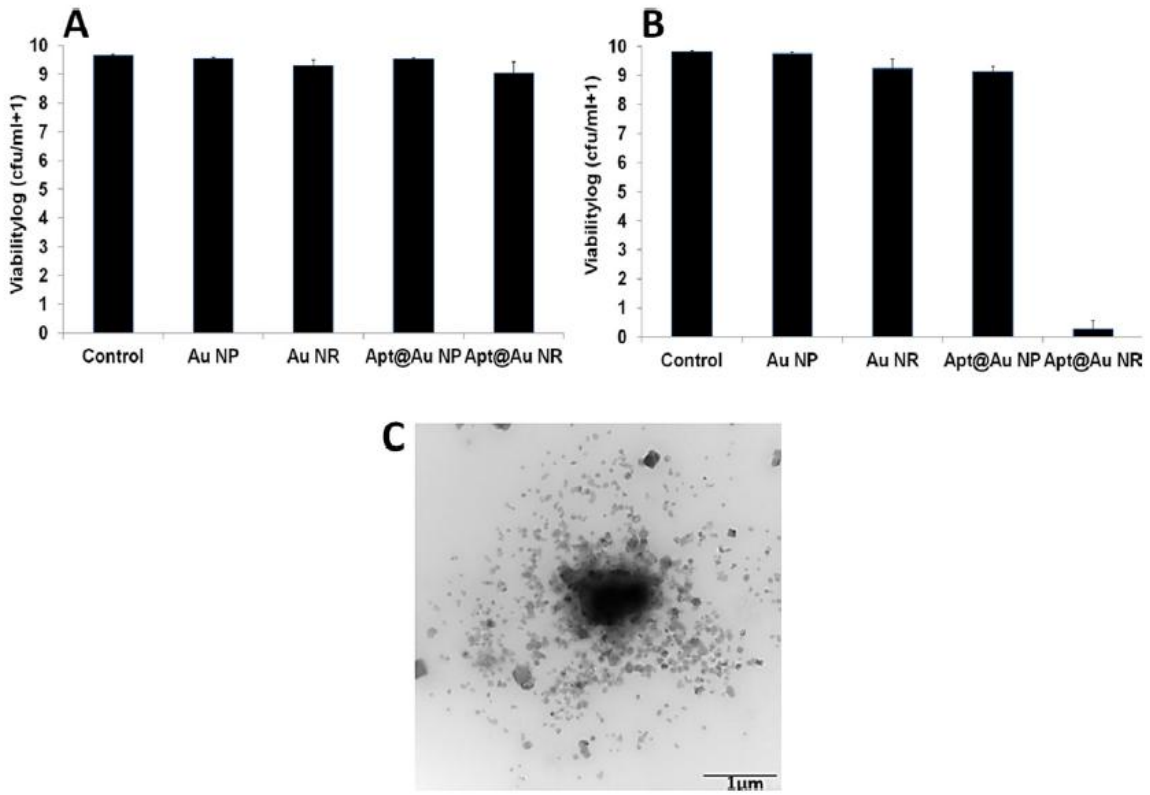
Şekil 2. A) Au NPlerin TEM resmi. Au^{+3} ve Au NP çözeltisinin fotoğrafları A(i) ve A(ii) de verilmiştir sırasıyla. B) Au NRlerin TEM resmi. Altın nano çubukların sentezinde kullanılan çözeltilerin renkleri: B (i) çekirdek çözeltisi, (ii)büyüme çözeltisi, (iii) askorbik asit katkılı büyüme çözeltisi ve (iv) altın nano çubuk çözeltisi. C-D) Au NPlerin ve Au NRlerin UV-Vis spektraları.



Şekil 3. A) sadece MRSA bakterileri elektron mikroskop resmi, 3B) DNA@Altın nano kürelerin MRSA bakterisine bağlanması ve 3C) DNA@Altın nano çubukların MRSA bakterisine bağlanması. D) Apt@Au NPs-E. faecalis hücre konjügasyonu.



Şekil 4. A) Au NR (mavi çizgi), Au NP (kırmızı çizgi) ve PBS (yeşil çizgi) ısı üretim performansı. B) 0.25 nM (mavi çizgi), 0.50 nM (kırmızı çizgi), 1.00 nM (yeşil çizgi) ve 2.00 nM (mor çizgi) içeren çeşitli konsantrasyonlarda Au NR'nin ısı üretme performansı. (Bu figür açıklamasındaki renk referanslarını yorumlamak için okuyucu, bu makalenin web versiyonuna başvurmuştur.) C) 2 nM Au NR ısı üretimi.



Şekil 5. DNA@Altın nano küre ve DNA@Altın nano çubuk ile MRSA bakterilerinin karışımının fototermal terapi sonuçları. A) lazer kapalı iken ve B) lazer açık iken. C) PTT den sonra MRSA hücresinin morpholojisinin bozulması TEM resmi ile gösterilmektedir.

Şekil 6. 808 nm dalgaboylu RLTMDL-808-8W cw yakın kızılöztesi NIR sisteminin laboratuvar da yapılması.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Altın nano küreler ve çubuklar DNA aptamerler ile konjüge edilmiştir ve MRSA hücrelerine bağlanması gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen altın nano küreler ve çubukların TEM resimleri ve çözeltilerinin resimler ve her bir nano yapıların UV-Vis absorbans noktaları açık bir şekilde belirilmiştir. Altın nano küreler 525 nm civarında ışık absorbansı gösterirken, altın nano çubuklar ise hem 525 nm hem de 800 nm civarında absorbans göstermektedir. Altın nano kürelerin boyutu 18 nm civarında iken altın nano kürelerin boyutu uzunluk olarak 57 nm ve en olarak 12 nm olarak ölçülmüştür.

University of Florida'da Çevre ve İnsan Toksikoloji Merkezi ve Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı laboratuarlarında Yakın Kızılötesi lazer sistemi kullanılarak Au NP, Au NÇlerin, MRSA aptamer/DNA-Au NP ve NÇler konjugatların ve ısı üretme kapasiteleri ölçülmüştür. Fakat Au NPlerin ya da Au NÇlerin aptamerler ile etiketlenmesi ısı yayma kabiliyetlerini engellememiştir. Fototermal proses için COHERENT Quarto-FAP sisteminden yararlanılmıştır. Au NP ve Au NÇ çözeltilei 1,1 W cm^{2-} güç yoğunluğuna ve ile 808 nm sürekli bir dalga boyun sahip yakın kızılötesi lazer ışınına 5 dakika maruz kalmıştır. Figür 4A Au çözeltisinin MRSA bakterilerini etkin bir şekilde yok edecek ölçüde ısı üretemediği tespit edilmiştir. Fakat Au NÇler yapısından ve özelliklerinden dolayı kısa süre çok yüksek kapasitede ısı üretildiği şekil 4 de gösterilmiştir. Au NP 5 dakika lazer ışıması sonrası çözeltinin 37°C de ulaştığı görülürken, Au NÇ çözeltinin sıcaklığını aynı zaman diliminde 50. 5 °C ulaşmıştır.

DNAaptamer ile konjüge edilmiş altın nano küreler ve nano çubukların MRSA bakteriler ile etkileşimi şekil 3 verilmiştir. Kontrol deney olarak DNA DNAaptamer ile konjüge edilmiş

altın nano küreler ve nano çubuklar ile E. faecalis hücreleri inkübe edilmiştir ve bu bakterilere spesifik bağlanmaların olmadığı görülmektedir.

DNA@Altın nano küre ve DNA@Altın nano çubuk çözeltilerinin MRSA çözeltileri ile karıştırılması ve 1 saat inkübe edilerek 1,1 W cm^{2-} güç yoğunluğuna ve ile 808 nm sürekli bir dalga boyun sahip yakın kızılötesi lazer ışınına 5 dakika maruz kalmıştır. Figüre 5 A de lazer kapalı iken MRSA bakterilerinde bir değişim olmazken, lazer açık olduğunda altın nano malzemeler ısı yaymaya başlamıştır (Figür 4B). Figüre 4 B de sadece bakteri çözeltisine lazer ışını gönderildiğinde MRSA hücrelerinde bir değişiklik olmamıştır. Benzer bir durum DNA@Altın nano küre-MRSA karışımı içinde geçerlidir. Altın nanokürelerin lazer ışığını ısıya çevirme kapasiteleri oldukça sınırlı kalmıştır, oda sıcaklığının en fazla 3-4 °C yukarısına çıkan ortam ısısı bakterileri etkili bir şekilde yok etmeden yoksundur. Fakat DNA@Altın nano çubukların-MRSA karışımı lazer ışığı etkisiyle nano çubuklar hızlı bir şekilde ısı üretmeye başlamış ve 2n mM DNA@Altın nano çubuklar kullanılarak ve 5 dakika lazer ışığı altında MRSA hücrelerinin %90 ı yok edilmiştir. Bu sonuç bize DNA aptamerin hedefli terapide kullanımının önemini gösterirken, fototermal ajan olarak da en ideal malzemenin altın nano çubuklar olduğunu göstermiştir.

6. KAYNAKLAR

[1] Çavuşoğlu, Z. B. "Comparison of PCR and Southern Blot methods for detection of the presence of toxin genes including SCIN, CHIPS, SEI, SEK in bacteriophages obtained from Staphylococcus aureus strains isolated from clinical samples". Ankara üniversitesi biyoteknoloji enstitüsü. http://biotek.ankara.edu.tr/basarilarimiz/tezler/ Son erişim tarihi: 20 Ağustos 2014.

[2] Whitt, D. D., Salyers, A. A. 2002. Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach (2nd edition). USA: ASM Press.

[3] Lowy, F. D. 1998. "Staphylococcus aureus infections", New England Journal of Medicine, 339, 520-532.

[4] Millar, B. C., Loughrey, A., Elborn, J. S., Moore, J. E. 2007. "Proposed definitions of communityassociated meticillin-resistant Staphy-lococcus aureus", Journal of Hospital Infection, 67, 109-113.

[5] Lane, W. R. 1962. "Methicillin resistance in staphylococci", Medical Journal of Australia, 49, 962-965.

[6] Bartlett, J. G. 2002. "Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea", New England Journal of Medicine, 346, 334-339.

[7] Levy, S. 2002. The antibiotic paradox: How the misuse of antibi-otics destroys their curative powers (2nd edition). Cambridge, MA: Perseus Publishing.

[8] Marteau, P., Seksik, P., Jian, R. 2002. "Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective", British Journal of Nutrition, 88, 51-57.

[9] Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K and Adley, C. 2010. "An overview of foodborne pathogen", Biotechnology Advances, 28, 232–254.

[10] Batt, C. A. 2007. "Food Pathogen Detection", Science, 316, 1579–1580.

[11] Dykman, L., Khlebtsov, N. 2012. “Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives”, Chemical Society Reviews, 41, 2256–2282.

[12] Hayat, M. A. 1989. Colloidal gold, principles, methods, and applications (1st edition). London: Academic Press.

[13] K. Saha, et al. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing Chem. Rev., 112 (2012), pp. 2739–2779.

[14] Zeng, S., Yong, K.-Y., Roy, I., Dinh, X.-Q., Yu, X., Luan, F. 2011. “A review on functionalized gold nanoparticles for biosensing applications”, Plasmonics, 6, 491–506.

[15] Gao, J., Liu, D and Wang, Z. 2010. “Screening lectin-binding specificity of bacterium by lectin microarray with gold nanoparticle probes”, Analytical Chemistry, 82, 9240–9247.

[16] Madonna, A. J., Basile, F., Furlong, E and Voorhees, K. J. 2001. “Detection of bacteria from biological mixtures using immunomagnetic separation combined with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry”, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 15, 1068–1074.

[17] Yamaguchi, N., Sasada, M., Yamanaka, M and Nasu, M. 2003. “Rapid detection of respiring Escherichia coli O157:H7 in apple juice, milk, and ground beef by flow cytometry”, Cytometry, 54, 27–35.

[18] Glynn, B., Lahiff, S., Wernecke, M., Barry, T., Smith, T. J and Maher, M. 2006. “Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety”, International Journal of Dairy Technology, 59, 126–139.

[19] Chung, H. J., Castro, C. M., Im, H., Lee, H and Weissleder, R. 2013. “A magneto-DNA nanoparticle system for rapid detection and phenotyping of bacteria”, Nature Nanotechnology 8, 369–375.

[20] Fan, Z., Khan, S. A., Dai, X., Tchouwou, C., Lu, Y and Ray, P. C. 2013. “Theranostic nanoplatforms for MRSA detection and destruction from whole blood”, Particle & Particle Systems Characterization, 31, 357-364.

[21] El-Boubbou, K., Gruden, C and Huang, X. 2007. “Magnetic glyco-nanoparticles: A unique tool for rapid pathogen detection, decontamination, and strain differentiation”, Journal of American Chemical Society, 129, 13392–13393.

[22] Lee, H., Yoon, T.-J and Weissleder, R. 2009. “Ultrasensitive detection of bacteria using core–shell nanoparticles and an NMR-filter system”, Angewandte Chemie International Edition, 48, 5657 –5660.

[23] Choi, K.-H., Lee, H.-J., Park, B. J., Wang, K. K., Shin, E. P., Park, J. C., Kim, Y. K., Oh, M.-K and Kim, Y. R. 2012. “Photosensitizer and vancomycin-conjugated novel multifunctional magnetic particles as photoinactivation agents for selective killing of pathogenic bacteria”, Chemical Communications, 48, 4591-4593.

[24] Kaittanis, C., Nath, S., Perez, J. M. 2008. “Rapid nanoparticle-mediated monitoring of bacterial metabolic activity and assessment of antimicrobial susceptibility in blood with magnetic relaxation”, PLoS ONE, 3, e3253.

[25] Zhao, X., Hilliard, L. R., Mechery, S. J., Wang, Y., Bagwe, R. P., Jin, S and Tan, W. 2004. “A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles”, Proceedings of the National Academy of Sciences, 101, 15027–15032.

[26] Liu, L., Xu, K., Wang, H., Tan, J. P. K., Fan, W., Venkatraman, S., Li, L and Yang, Y.-Y. 2009. “Self-assembled cationic peptide nanoparticles as an efficient antimicrobial agent”, Nature Nanotechnology, 4, 457 - 463.

[27] Villamizar, R. A., Maroto, A., Rius, F. X., Inza, I., Figueras, M. J. 2008. “Fast detection of salmonellaInfantis with carbon nanotube field effect transistors”, Biosensors and Bioelectronics, 24, 279–283.

[28] So, H.-M., Park, D.-W., Jeon, E.-K, Kim, Y.-H., Kim, B. S, Lee, C.-K., Choi, S. Y., Kim, S. C., Chang, H and Lee, J.-O. 2008. “Detection and titer estimation of Escherichia coli using aptamerfunctionalized single-walled carbon-nanotube field-effect transistors”, small, 4, 197–201.

[29] Saha, K., Agasti, S. S., Kim, C., Li, X and Rotello, V. M. 2012. “Gold nanoparticles in chemical and biological Sensing”, Chemical Reviews, 112, 2739−2779.

[30] Liu, D., Qu, W., Chen, W., Zhang, W., Wang, Z., Jiang, X. 2010. “Highly sensitive, colorimetric detection of mercury(II) in aqueous media by quaternary ammonium group-capped gold nanoparticles at room temperature”, Analytical Chemistry, 82, 9606–9610.

[31] Shimada, T., Ookubo, K., Komuro, N., Shimizu, T., Uehara, N. 2007. “Blue-to-red Chromatic sensor composed of gold nanoparticles conjugated with thermoresponsive copolymer for thiol sensing”, Langmuir, 23, 11225-11232.

[32] Thaxton, C. S., Georganopoulou, D. G., Mirkin, C. A. 2006. “Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets”, Clinica Chimica Acta, 363, 120-126.

[33] Schofield, C. L., Haines, A. H., Field, R. A., Russell, D. A. 2006. “Silver and gold glyconanoparticles for colorimetric bioassays”, Langmuir , 22, 6707-6711.

[34] Conde, J., Doria, G and Baptista, P. 2012. “NobleMetal Nanoparticles Applications in Cancer”, Journal of Drug Delivery, 7, 1-12.

[35] Yasun, E., Kang, H., Erdal, H., Cansiz, S., Ocsoy, I., Huang, F and Tan, W. 2013. “Cancer cell sensing and therapy using affinity tag-conjugated gold nanorods”, Interface Focus,3, 1-9.

[36] Lee, K., Drachev, V. P,and Irudayaraj, J. 2011. “DNA-Gold Nanoparticle Reversible Networks Grown on Cell Surface Marker Sites: Application in Diagnostics”, ACS Nano, 5, 2109–2117.

[36] Turek, D., Simaeys, D. V., Johnson, J., Ocsoy, I., Tan, W. 2013. “Molecular recognition of live methicillin-resistant staphylococcus aureuscells using DNA aptamers”, World Journal of Translational Medicine , 12, 67-74.

[37] Gu, H., Ho, P. L., Tong, E., Wang, L and Bing Xu. 2003. “Presenting Vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities”, Nano Letters, 3, 1261–1263.

[38] Phillips, R. L., Miranda, O. R., You, C.-C., Rotello, V. M and Bunz, U. H. F. 2008. “Goldnanoparticle– poly(para-phenyleneethynylene) constructs”, Angewandte Chemie International Edition, 47, 2590–2594.

[39] Hayden, S. C., Zhao, G., Saha, K., Phillips, R. L., Li, X., Miranda, O. R., Rotello, V. M., El-Sayed, M. A., Schmidt-Krey, I and Bunz, U. H. F. 2012. “Aggregation and interaction of cationic nanoparticles on bacterial surfaces”, Journal of American Chemical Society, 134, 6920–6923.

[40] Berry, V., Gole, A., Kundu, S., Murphy, C. J and Saraf, R. F. 2005. “Deposition of CTAB terminated nanorods on bacteria to form highly conducting hybrid systems”, Journal of American Chemical Society, 127, 17600–17601.

[41] Wang, J., Gao, J., Liu, D., Han, D and Wang, Z. 2012. “Phenylboronic acid functionalized gold nanoparticles for highly sensitive detection of Staphylococcus aureus”, Nanoscale, 4, 451–454.

[42] Ellington, A. D and Szostak, J. W. 1990. “In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands”, Nature, 346, 818-822.

[43] Tuerk, C and Gold, L. 1990, “Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase”, Science, 249, 505-510.

[44] Beaudry, A and Joyce, G. 1992. “Directed Evolution of an RNA Enzyme”, Science, 257, 635-641.

[45] Fang, X and Tan, W. 2009. “Aptamers Generated From Cell-SELEX for Molecular Medicine: A Chemical Biology Approach”, Acc. Chem. Res. 2009, 43, 48-57.

[46] Jayasena, S. D. 1999. “Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics”, Clin. Chem, 45, 1628-1650.

[47] Bunka, D. H. J and Stockley, P. G. 2003. “Aptamers Come of Age–at Last”, Nat. Rev. Microbiol, 4, 588-596.

[48] Sampson, T. 2003. “Aptamers and SELEX: The Technology, World Patent Information”, 25, 123- 129.

[49] Ng, E. W. M., Shima, D. T., Calias, P., Cunningham, E. T., Guyer, D. R., Adamis, A. P. 2006.“Pegaptanib, a Targeted Anti-VEGF Aptamer for Ocular Vascular Disease”, Nat. Rev. Drug Discovery, 5, 123-132.

[50] Shangguan, D., Meng, L., Cao, Z. C., Xiao, Z., Fang, X., Li, Y., Cardona, D., Witek, R. P., Liu, C., Tan, W. 2008. “dentification of Liver Cancer-Specific Aptamers Using Whole Live Cells” Anal. Chem, 80, 721-728.

[51] Parekh, P., Tang, Z., Turner, P. C., Moyer, R. W., Tan, W. 2010. “Aptamers Recognizing Glycosylated Hemagglutinin Expressed on the Surface of Vaccinia Virus-Infected Cells”, Anal. Chem, 82, 8642-8649.

[52] Shangguan, D., Li, Y., Tang, Z., Cao, Z. C., Chen, H. W., Mallikaratchy, P., Sefah, K., Yang, C. J., Tan, W. 2006. “Aptamers Evolved From Live Cells as Effective Molecular Probes for Cancer Stüdyo”, Proc. Natl. Acad. Sci, 103, 11838-11843.

[53] Bayrac, A. T., Sefah, K., Parekh, P., Bayrac, C., Gulbakan, B., Oktem, H. A., Tan, W. 2011. “In Vitro Selection of DNA Aptamers to Glioblastoma Multiforme” ACS Chem. Neurosci, 2, 175-181.

[54] Svedberg, F., Li, Z., Xu, H and Käll, M. 2006. “Creating Hot Nanoparticle Pairs for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy through Optical Manipulation”, Nano Lett., 6,

[55] Kim, T., Lee, C-H., Joo, S-W., Lee, K.2008. “ Kinetics of gold nanoparticle aggregation: Experiments and modelin”,. Journal of Colloid and Interface Science, 318 238–243.

[56] Gu, G. H and Suh, J. S. 2008. “Enhancement at the Junction of Silver Nanorods”, Langmuir, 24, 8934-8938.

[57] Lee, K., Drachev, V. P and Irudayaraj, J. 2011. “Networks Grown on Cell Surface Marker Sites: Application in Diagnostics”, ACSNano, 5, 2109–2117.

[58] Lee, S., Chon, H., Yoon, S. H., Lee, E. U., Chang, S-I., Lim, D. W and Choo, J. 2012. “Fabrication of SERS-fluorescence dual modal nanoprobes and application to multiplex cancer cell imaging”, Nanoscale, 4, 124 2012.

[59] Maltzahn, G., Centrone, A., Park, J-H., Ramanathan, R., Sailor, M. K., Hatton, T. A and Bhatia, S. N. 2009. “SERS-Coded Gold Nanorods as a Multifunctional Platform for Densely Multiplexed Near- Infrared Imaging and Photothermal Heating”, Adv. Mater. 21, 3175–3180.

[60] Turkevich, J., Stevenson, P. C., Hillier, J.1951. “The nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold”, Discussions of the Faraday Society, 11, 55-75.

[61] Nikoobakht, B,. El-Sayed, M. A. 2003. “Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method”, Chemistry of Materials, 15, 1957-1962.

7. EKLER

Şuan itibari ile iki uluslar arası kongrede sözlü bildiri sunulmuştur.

1- 28-30 Ekim tarihlerinde Adana da düzenlenen 1st International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2016) da sözlü sunum yapılmıştır.
2- 3-6 Haziran tarihlerinde Gebze'de düzenlenen 12th International Nanoscience and Nanotechnology Conference (NanoTR-12) de da sözlü sunum yapılmıştır.
3- 12-14 Mayıs 2017 tarihlerinde The 22nd Biomedical Science and Technology Symposium'da sözlü bildiri yapılmıştır.
4- 16-21 Temmuz 2017, de Fransa, Strazburg şehrinde 28th International Conference on Photochemistry konferansında sözlü bildiri yapılmıştır.

Proje kapsamında üretilen makale

1. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 159 (2017) 16–22. "DNA aptamer functionalized gold nanostructures for molecularrecognition and photothermal inactivation of methicillin-ResistantStaphylococcus aureus".