

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZİK ANABİLİM DALI**

**DNA APTAMER FONKSİYONLU MANYETİK GRAFEN
OKSİT SENTEZİ VE HEDEFLİ FOTOTERMAL TERAPİ
İLE METİSİLİN DİRENÇLİ STAPHYLOCOCCUS
AUREUS'UN ÖLDÜRÜLMESİ**

**Hazırlayan
Müşerref ARSLAN ÖÇSOY**

**Danışman
Doç. Dr. Rahmi KÖSEOĞLU**

Yüksek Lisans Tezi

**Aralık 2018
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZİK ANABİLİM DALI**

**DNA APTAMER FONKSİYONLU MANYETİK GRAFEN
OKSİT SENTEZİ VE HEDEFLİ FOTOTERMAL TERAPİ
İLE METİSİLİN DİRENÇLİ STAPHYLOCOCCUS
AUREUS'UN ÖLDÜRÜLMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan
Müşerref ARSLAN ÖÇSOY**

**Danışman
Doç. Dr. Rahmi KÖSEOĞLU**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi FYL-2018-
8132 ve TÜBİTAK 215Z572 kodlu projeler tarafından desteklenmiştir.**

**Aralık 2018
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Müşerref Arslan Öçsoy



“DNA Aptamer Fonksiyonlu Manyetik Grafen Oksit Sentezi ve Hedefli Fototermal Terapi ile Metisilin Dirençli Staphylococcus Aureus'un Öldürülmesi” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.



Hazırlayan

Müşerref ARSLAN ÖÇSOY



Danışman

Doç. Dr. Rahmi KÖSEOĞLU



Fizik ABD Başkanı

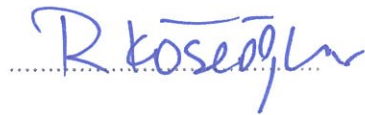
Prof. Dr. Mustafa GENÇASLAN

Doç. Dr. Rahmi KÖSEOĞLU danışmanlığında **Müşerref ARSLAN ÖÇSOY** tarafından hazırlanan **“DNA Aptamer Fonksiyonlu Manyetik Grafen Oksit Sentezi Ve Hedefli Fototermal Terapi İle Metisilin Dirençli Staphylococcus Aureusun Öldürülmesi”** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Fizik** Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

11 / 12 / 2018

JÜRİ:

Başkan : Doç. Dr. Rahmi KÖSEOĞLU



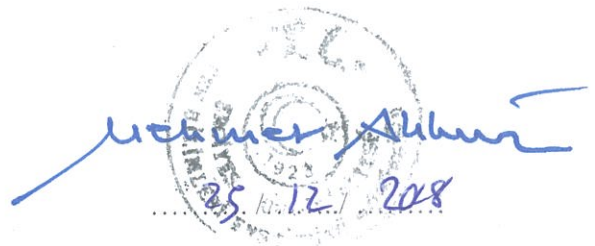
Üye : Doç. Dr. Serkan AKKOYUN



Üye : Dr. Öğretim Üyesi Nilay ILDIZ

**ONAY:**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 25/12/2018 tarih ve 2018/58-09 sayılı kararı ile onaylanmıştır.




Prof. Dr. Mehmet AKKURT

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bana çalışmalarım süresince her türlü yardımı ve fedakârlığı sağlayan, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen, değerli hocam Doç. Dr. Rahmi KÖSEOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmada kullanılan Lazer sistemini yapımında yardımcı olan Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet ÜLGEN'e teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarım süresince imkânlarından faydalandığım ERNAM'a (Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezi) teşekkür ederim.

Yaşamımın her döneminde varlıklarını hissettiğim, maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan ve akademik alanda çalışma yapmaya teşvik eden sevgili eşim Doç. Dr. İsmail ÖÇSOY, çocuklarım Zeynep Beyza ÖÇSOY ve Elif Erva ÖÇSOY' a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Yüksek Lisans Tez Savunmada yer alan değerli jüri üyeleri Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Nilay ILDIZ ve Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Serkan Akkoyun'a teşekkür ederim.

Bu çalışmamıza finansal destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine (FYL-2018-8132 ve TÜBİTAK 215Z572 kodlu projeler) teşekkür ederim.

Müşerref ARSLAN ÖÇSOY

Aralık 2018, KAYSERİ

DNA APTAMER FONKSİYONLU MANYETİK GRAFEN OKSİT SENTEZİ VE HEDEFLİ FOTOTERMAL TERAPİ İLE METİSİLİN DİRENÇLİ STAPHYLOCOCCUS AUREUS'UN ÖLDÜRÜLMESİ

Müşerref ARSLAN ÖÇSOY

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Aralık 2018
Danışman: Doç. Dr. Rahmi KÖSEOĞLU**

ÖZET

Metisilin Dirençli S. Aureus (MRSA) bakterisinin seçici, hassas ve fototermal olarak yok edilmesi için çok fonksiyonlu bir nano platform geliştirilmiştir. MRSA aptamerler ile fonksiyonel hale getirilmiş manyetik grafen oksit (MGO) bu amaç için üretilmiştir. GO üzerine demir oksit (Fe_3O_4) nanopartikülleri (NP'ler) büyütülerek MGO üretilmiştir ve MRSA bakterisi için sentezlenmiş bir ucu amin ($-\text{NH}_2$) grubu taşıyan aptamerler ile fonksiyonlaştırılmıştır. Aptamerler ile fonksiyonlaştırılmış manyetik GO (Apt@MGO) ile MRSA belirli olarak hızlı, hassas ve doğru bir şekilde yakalandı ve yakın kızılötesi lazer (Near Infrared Laser, 808 nm) ışığı altında fototermal olarak yok edilmiştir. Aptamer MRSA'ya belirli olarak bağlanırken, GO üzerindeki Fe_3O_4 NP'ler sayesinde MRSA, reaksiyon ortamından santrifüje ihtiyaç duymaksızın bir mıknatıs yardımı ile manyetik olarak ayrılmıştır. GO ise aptamer ve Fe_3O_4 NP'ler için bir platform olarak kullanılırken, aynı zamanda 808 nm dalga boyunda yakın kızılötesi ışığa maruz bırakıldığında lazer ışığını ısıya dönüştüren bir fototermal ajan olarak da faydalanılmıştır. Ayrıca, GO'nun plaka şeklinden ve üzerindeki çeşitli fonksiyonel grupları taşımasından dolayı, GO'nun MRSA'yı kundak (swaddling clothes) şeklinde sıkıca sardığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Manyetik grafen oksit, DNA, MRSA, patojen ve fototermal tedavi

**SYNTHESIS OF DNA APTAMER CONJUGATED MAGNETIC GRAPHENE
OXIDE AND ITS USE AS A PHOTO-THERMAL AGENT FOR KILLING
METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

Muserref ARSLAN OCSOY

**Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences
Master Thesis, December 2018**

Supervisor: Associate Prof. Dr. Rahmi KOSEOGLU

ABSTRACT

A multifunctional nano platform was developed for detection and photothermally destruction of methicillin resistant staphylococcus aureus (MRSA) bacteria. Magnetic Grafene oxide (GO) functionalized with MRSA aptamers was produced for this purpose. First, the iron oxide (Fe_3O_4) nanoparticles (NPs) was grown on the surface of the graphene oxide (GO) and magnetic GO (MGO) was functionalized the aptamers modified with amin ($-\text{NH}_2$) group on one end that were specifically synthesized for MRSA. The MRSA was rapidly, sensitively and accurately captured with aptamer functionalized MGO (Apt@MGO) and it was photothermally destroyed under the near infrared laser (NIR, 808 nm). While aptamer specifically binds to MRSA, MRSA was magnetically separated with a magnet without centrifugation due to Fe_3O_4 NPs on the surface of the GO. While GO is used as a platform for aptamer and Fe_3O_4 NPs, it was utilized a photothermal agent converting laser light to heat when exposed to 808 nm NIR laser. Also, it is considered that GO tightly wraps the MRSA bacteria due to its plate shape and carrying several functional groups on the surface.

Keywords: Magnetic graphene oxide, DNA, MRSA, pathogen, photothermal therapy

İÇİNDEKİLER

DNA APTAMER FONKSİYONLU MANYETİK GRAFEN OKSİT SENTEZİ VE HEDEFLİ FOTOTERMAL TERAPİ İLE METİSİLİN DİRENÇLİ STAPHYLOCOCCUS AUREUS'UN ÖLDÜRÜLMESİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	ii
KABUL VE ONAY	iii
ONAY:	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
KISALTMALAR	xi
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Problem Durumu	3
1.2. Araştırmanın Amacı	9
1.3. Araştırmanın Önemi.....	11

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Yöntem	13
2.1.1. Grafen Oksitin (GO) Sentezlenmesi	13
2.1.2. Manyetik Grafen Oksit Hazırlanması.....	13
2.1.3. MGO ile Aptamer Konjugasyonunun Hazırlanması.....	14
2.1.4. Bakteri Kültürünün Hazırlanması	14
2.1.5. Apt@MGO-MRSA bakteri İnkübasyonu.....	14
2.1.6. Fototermal Tedavi Deneyi	15
2.2. Materyal.....	18
2.2.1. Kimyasallar ve Materyaller	18
2.2.2. Kullanılan Cihazlar ve Karakterizasyon	19

3. BÖLÜM**BULGULAR**

3.1 Araştırma Modeli.....	20
3.2 Evren ve Örneklem	21
3.2.1 Yöntem Başlık Örneği	22

4. BÖLÜM**TARTIŞMA-SONUÇ ve**

4.1.Tartışma	25
4.2.Sonuç ve Öneriler	27
KAYNAKÇA	29
ÖZGEÇMİŞ.....	33

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Hücre tabanlı aptamer seçiminin şematik gösterimi.....	6
Şekil 1.2.	Aptamerin MRSA' ya ve kontrol bakteriye (Enterococcus faecalis) bağlanması akım sitometri ile gösterilmektedir. A) Aptamerin MRSA'ya seçici olarak bağlanması, B) Aptamerin Enterococcus Faecalis'e bağlanmaması, C) Aptamerin şok edilmiş (fixed) MRSA'ya bağlanması, D) Aptamerin canlı MRSA'ya bağlanması (yeşil çizgi).	7
Şekil 1.3.	Dört farklı MRSA aptamer sekansı MRSA bakterisine için Hücre-EZLSE yöntemi seçilmiştir ve en seçici ve kuvvetli bağlanan MRSA aptamerini belirlemek için seçilen tüm aptamerler farklı klinik suşlara karşı denenmiştir.....	8
Şekil 2.1.	Apt@MGO'nun MRSA yakalama kapasitesinin test edilmesi gösterilmektedir.	15
Şekil 2.2.	Apt@MGO'nun MRSA ile etkileşimi ve fototermal olarak yok edilmesi.....	16
Şekil 2.3.	Apt@MGO-MRSA konjugatların hem dağılmış hem de toplanmış pozisyonlarda yakın kızılötesi lazere (808 nm) maruz bırakılması.	17
Şekil 2.4.	Ülgen Lab yapımı NIR (Yakın Kızılötesi) lazer sistemi	18
Şekil 3.1.	MGO ve Apt@MGO sentezi ve Apt@MGO-MRSA konjugatların inkübasyonu ve hem dağılmış hem de toplanmış pozisyonlarda yakın kızılötesi lazere (808 nm) maruz bırakılmasının şematik olarak gösterilmesi.....	20
Şekil 3.2	A) GO nano yapısının TEM resmi. B) MGO nano yapılarının TEM resimleri. C) GO ve MGO nano yapıların çözeltilerinin resimleri. D) MGO nano yapıların bir mıknatıs ile manyetik özelliklerinin gösterilmesi. E) GO (kırmızı) ve MGO (pembe ve mavi) UV-Vis spektrofotometre ile absorbans noktalarının gösterilmesi. F) MGO nano yapının süperparamanyetik özelliğinin SQUID ile gösterilmesi.	21
Şekil 3.3	A) Canlı MRSA bakteri hücresinin 200 nm boyutunda TEM resmi B) Canlı MRSA bakteri hücresinin 500 nm boyutundaki TEM resmi. C) Ölü MRSA bakteri hücresinin 100 nm boyutundaki TEM resmi.....	22

- Şekil 3.4. MGO nano yapı çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarda NIR lazer altında ısı üretme potansiyelleri A) Dağılmış MGO grafiği. B) Toplanmış MGO grafiği. 23
- Şekil 3.5. Akım sitometrisi ile yalnız MRSA bakterisi (kırmızı), Aptamer bağlı E.faecalis (yeşil), Rasgele seçilmiş DNA bağlı MGO (mavi), MRSA aptamer (kahverengi) ve Aptamer@GO (mor) nano yapıların; MRSA hücrelerine bağlanması gösterilmiştir. 23
- Şekil 3.6. Sadece Hücre (Cell), Aptamer, MGO, Apt@MGO, rDNA@MGO ve Apt@MGO nano yapıların (dağılmış ve toplanmış formda), NIR lazer altında MRSA bakterilerin fototermal olarak yok edilmesi gösterilmektedir. 24

KISALTMALAR

SA	: Staphylococcus Aureus
MRSA	: Metisilin Dirençli S. Aureus
GO	: Grafen Oksit
MGO	: Manyetik Grafen Oksit
Apt	: Aptamer
nm	: nanometre
EZLSE	: Ekspansiyel Zenginleştirme ile Ligandların Sistemik Evrimi
NP	: Nanoparçacık
Fe ₃ O ₄	: Demir Oksit
NIR	: Yakın Kızılötesi
PTT	: Foto-Termal Terapi
rDNA	: Rastgele DNA Sekansı
SQUID	: Süper İletken Kuantum Girişim Cihazı
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	: Geçişli Elektron Mikroskobu
EDC	: 1-Etil-3[3-Dimetilaminopropil] Karbodiimid
NHS	: N-Hidroksi Süksünimid
TREG	: Trietilen Glikol
NB	: Bakteri Besiyeri
YEPDB	: Maya Ekstresi Pepton Dekstroz Besiyeri
LB	: Luria-Bertani
FITC	: Floresein İzotiyosiyanat
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
Fe(acac) ₃	: Demir (III) Asetilasetonat

GİRİŞ

Bakterilerin tespiti ve yok edilmesi sadece insan ve hayvan sağlığı için değil, sanayi ve bitkisel üretim güvenliği için de oldukça önemlidir. Tüm dünyada bakteriyel enfeksiyonlar ölüme yol açan beşinci sebeptir. *Staphylococcus aureus* (S. aureus), ölümcül enfeksiyonlara sebep olan bakterilerin başında gelir. Bu bakteri gıda üzerinde, insan ve hayvan vücudunda kolayca yaşar ve üreyebilir. Gıda üzerinde belli bir konsantrasyona ulaşan S. aureus gıda-zehirlenmelerine sebep olurken, insan ve hayvan vücudunda ise çeşitli enfeksiyonlara neden olur. Özellikle insanda hayati riske sebep olan iltihaplı yaralar pek çok enfeksiyonlara ve menenjit, sepsis, kalp iltihaplanması gibi hastalıklara sebep olabilir. S. aureus beta-laktam grubu içeren antibiyotiklere (amoksisilin, penisilin, oksasilin gibi) karşı direnç göstermektedir. Bu bakterinin metisilin antibiyotiklerine karşı direnç gösteren suşlarına Metisilin Dirençli S. aureus (MRSA) denmektedir. MRSA günümüzün en tehlikeli patojenik (hastalık yapıcı) bakterilerinden biri olup tedavisi çok güç hatta ölüme sebebiyet veren enfeksiyonlara neden olmaktadır. Ayrıca, MRSA insanlar ve hayvanlarda kolayca kolonize olabilir ve aynı zamanda insandan-insana, hayvandan-hayvana ve hayvandan-insana kolayca temas yolu ile geçiş yapabilir.

Aptamerler; Deoksiribonükleik Asit (DNA) ve Ribonükleik Asit (RNA) moleküller tek sarmallı formda DNA ve RNA moleküllerinden oluşan hedefleme ligandlarıdır. Bu hedefleme ligandları özel sistem olan tüm hücrenin kullanıldığı Hücre-Eksponansiyel Zenginleştirme ile Ligandların Sistemik Evrimi (Hücre-EZLSE) (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX) veya EZLSE metotlarından üretilmektedir. Hedefleme özelliklerinden dolayı DNA ya da RNA aptamerler hedefli-tedavi (targeted therapy) kullanıma imkânı ve potansiyeline sahiptir. Hücre-EZLSE metodu ile seçilen aptamerler, virüs, bakteri, kanser hücrelerinin teşhisine ve bunlara bağlı hastalıkların erken teşhisinde aktif olarak kullanılmaktadırlar. Hedefleme özelliklerine ek olarak, sekansların uçları farklı fonksiyoneller grupları olan karbonil, azid, alkin, tiol grupları ve biyotin, söndürme ve floresan etiketleri modifiye edilme

özellikleri vardır. Bu özellikle de aptamerler başta antikorlar olmak üzere birçok hedefleme ajanlarına karşı üstünlük göstermektedir. Ayrıca, aptamerler kolay üretilebilir, saklanabilir ve dayanıklılık (pH, sıcaklık ve iyonik çözelti gibi geniş bir yelpazeye karşı) gibi özelliklere de sahiptir.

2004 yılında keşfedilmesinden bu yana grafen, eşsiz fiziksel, mekanik ve elektronik özelliklerinden dolayı çok geniş bir uygulama alanında kullanılmaktadır. Grafen oksit (GO) ise kimyasal olarak modifiye edilmiş grafenin oksitlenmiş formudur. GO iletken polimer, pil, elektrotlar, elektronik ve optik, sensör, anti-bakteriyel maddelerin üretimi başta olmak üzere ilaç ve DNA iletim gibi birçok biyomedikal uygulamalarda da yoğun olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda GO'nun fototermal ajan olarak kullanıldığı görülmektedir.

Metisilin Dirençli S. Aureus (MRSA) bakterisinin seçici, hassas ve fototermal olarak yok edilmesi için çok fonksiyonlu bir nano platform geliştirilmiştir. MRSA bakterileri aptamerler ile fonksiyonel hale getirilmiş grafen oksit (GO) bu amaç için üretilmiştir. GO üzerine demir oksit (Fe_3O_4) nanopartiküller (NPler) büyütülerek manyetik GO (MGO) üretilmiş ve MRSA bakterisi için sentezlenmiş bir ucu amin ($-\text{NH}_2$) grubu taşıyan aptamerler ile fonksiyonlaştırılmıştır. Aptamerler ile fonksiyonlaştırılmış manyetik GO (Apt@MGO) ile MRSA belirli olarak hızlı, hassas ve doğru bir şekilde yakalanmış ve yakın kızılötesi lazer (Near Infrared Laser, 808 nm) altında fototermal olarak yok edilmiştir. Aptamer MRSA'ya belirli olarak bağlanırken, GO üzerindeki Fe_3O_4 NP'ler sayesinde MRSA reaksiyon ortamından santrifüje ihtiyaç duymadan bir mıknatıs yardımı ile manyetik olarak ayrılmıştır. GO ise aptamer ve Fe_3O_4 NP'ler için bir platform olarak kullanılırken, aynı zamanda 808 nm dalga boyunda yakın kızılötesi ışığa maruz bırakıldığında lazer ışığını ısıya dönüştüren bir fototermal ajan olarak da faydalanılmıştır. Ayrıca, GO'nun plaka şeklinden ve üzerindeki çeşitli fonksiyonel grupları taşımasından dolayı, GO'nun MRSA'yı kundak (swaddling clothes) şeklinde sıkıca sardığı düşünülmektedir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Problem Durumu

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ilk kez 1878 yılında Alman bilim adamı Robert Koch tarafından ışık mikroskobu ile tanımlanmıştır. Daha sonra sırasıyla, bu bakteriler 1880’de Fransız mikrobiyolog ve kimyager L. Pasteur tarafından sıvı besiyerinde üretilmiş ve 1881’de bunların patojen olduğu ilk kez İskoç cerrah Alexander Ogston tarafından gösterilmiştir [1]. Bu patojenler gıda maddelerinde üreyerek zehirlenmelere sebep olan bazı Enterotoksinler gibi toksinler üretmektedir. Bu toksinlerin çoğu polipeptid formda olup bağırsakta etkilidirler ve çeşitli enfeksiyonlara (eklem romatizmalarına olumsuz etki yapmasının yanı sıra menenjit, sepsis, kalp iltihaplanması ve iltihaplı yaralara) sebep olmaktadır. Bakterilerin antibiyotiklere direnci toplum için önemli bir sağlık sorunudur. Genel itibari ile *S. aureus* zararsız bir şekilde insan nüfusunun yaklaşık %33’de burun ya da deri üzerinde taşınan bir bakteridir [2]. Bununla birlikte, bu nozokomiyal kökenli patojen (hastane kökenli olan) bazen çok ciddi enfeksiyonlara sebep olur. Bu bakteri insanlar ve hayvanlarda kolonize olabilir ve aynı zamanda insandan-insana, hayvandan-hayvana ve hayvandan-insana kolayca temas yolu ile geçiş yapabilir [3]. *S. aureus* ailesine ait bakteriler sıcaklık ve pH değerlerindeki değişmelere karşı oldukça dayanıklı olup ve üreme, gelişme ve toksin üretme faaliyetlerini sürdürebilirler. Örnek olarak, *S. aureus* bakterileri 29-38 °C aralığında üreme gösterirken, 6-46 °C aralığında gelişebilir ve 10-48 °C aralığında toksin üretebilir. Bu bakteriler pH 4-9.5 aralığında da tıpkı sıcaklıkta olduğu gibi benzer yaşamsal faaliyetlerini gösterirler [3]. *S. aureus* bakterilerinin sebep olduğu ve yukarıdaki belirtilen enfeksiyonları genellikle β -laktam antibiyotik kullanılarak tedavi edilir çünkü bu antibiyotikler Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarının yapımını engeller ve bakterilerin ölmesine neden olur. Ne yazık ki, özellikle *S. aureus* türü bakteriler

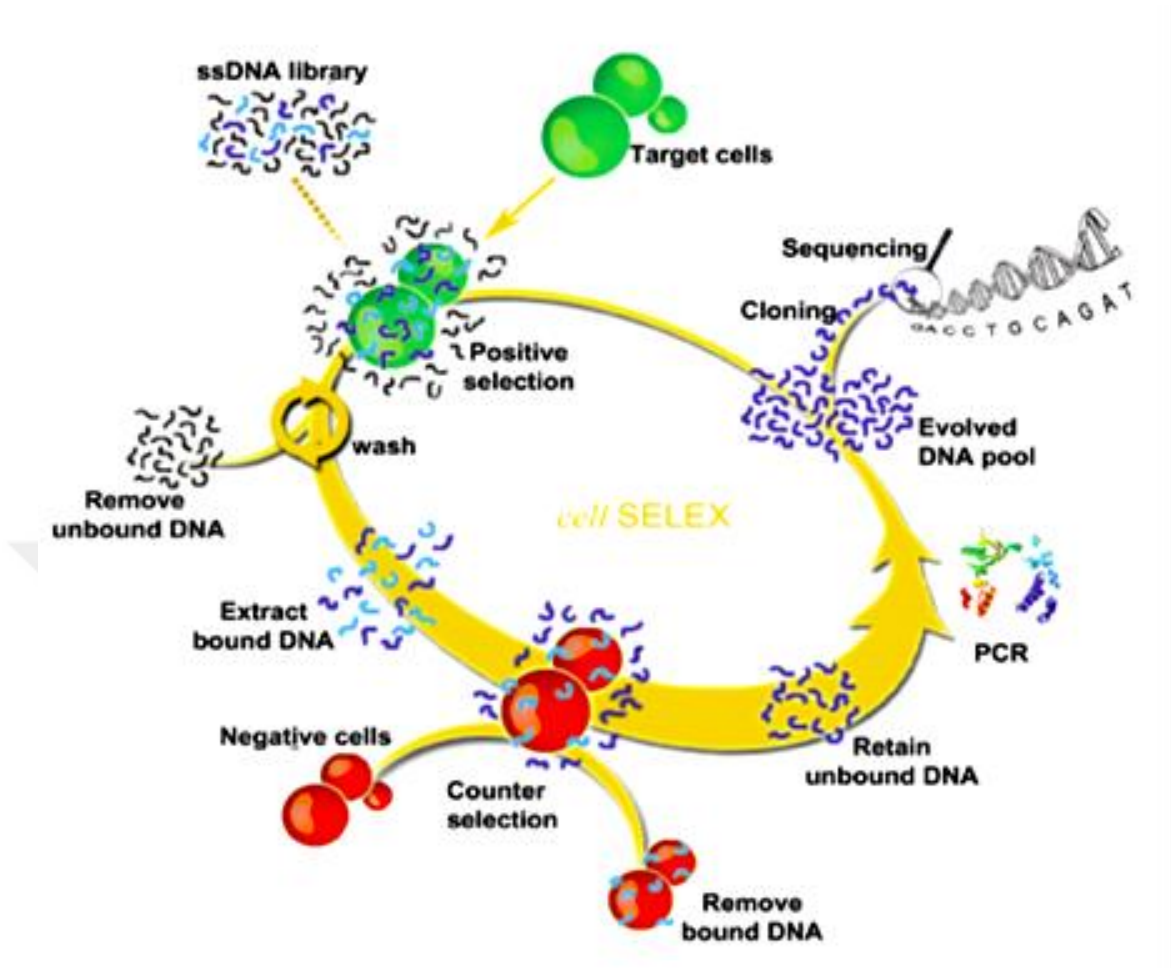
kolaylıkla antibiyotiğe dirençli suşlar geliştirmiş ve bundan dolayı da süper mikrop (superbug) olarak adlandırılır [4, 5].

Alexander Fleming 1928'de penisilini keşfetmiş ve *S. aureus*' a karşı bu tarihten itibaren etkili bir tedavi başlamıştır. Fakat penisilinin yoğun olarak kullanımı, ilk defa 1954 yılında penisiline karşı dirençli yeni suşların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Yeni geliştirilen antibiyotik olan metisilinin geliştirilip kullanılması ile *S. aureus* ve antibiyotiğe dirençli suşlarına karşı mücadelede yeni bir aşamaya geçilmiştir. Fakat çok kısa bir zaman sonra İngiltere'de ve Fransa'da sırasıyla 1961 ve 1962'de metisilin dirençli *S. aureus* suşlar (MRSA) görülmüştür. Bu zamana kadar geliştirilen birçok antibiyotikler vardır ancak antibiyotiğe dirençli suşlar ortaya çıkmaya devam etmektedir. MRSA kaynaklı enfeksiyonların sebep olduğu zararların yanı sıra, uzun süreli antibiyotik tedavisi önemli hasarlara neden olduğu gibi, hastalarda güvenlik kaygılarını artırmaktadır [6-8].

Bu bağlamda, MRSA'nın, yok edilmesi oldukça büyük önem taşımaktadır [9, 10]. Örneğin, kültür ve koloni sayma, immünolojik yaklaşımlar, polimeraz zincir reaksiyonu, akım sitometri, kütle spektrometri, mikro arrayler, floresan tabanlı ve elektrokimyasal tabanlı tahliller gibi çeşitli teknikler geliştirilmiş ve halen kullanımdadır. Bu tekniklerin en büyük dezavantajları genel itibari ile çok zaman alması, karışık ve zahmetli olması, komplike aletlere ihtiyaç duyması ve alan çalışmalarına uygun olmaması (taşınabilirlik) olarak sıralanabilir [11-14]. Ayrıca, multi (çoklu) ilaç dirençli bakterilerin yok edilmesi çok zordur; bu nedenle, antibiyotikler dışında diğer tedavi seçeneklerinin araştırılması gerekmektedir. Dr. Ling ve arkadaşları glutaraldehit ile fonksiyonlaştırılmış indirgenmiş manyetik grafen oksidi kullanarak hem Gram-pozitif (*Staphylococcus aureus*) hem de Gram-negatif (*Escherichia coli*) bakterileri yakın kızılötesi lazer ışığı altında yok etmeye çalışmışlardır [15]. Fakat bu sistemde 2 büyük problem vardır. Birincisi grafen oksidin (GO) indirgenmesi ile GO'nun sulu çözeltilerdeki çözünürlüğü azalır ve bu durum çözeltisi içerisinde bakteri yakalamadaki tekrarlanabilirliği ve hassasiyeti azaltmaktadır. İkinci olarak hedefleme ajanı olarak glutaraldehit kullanılmıştır fakat glutaraldehit seçicilik, belirlilik ve hassaslıktan oldukça uzaktır. Ayrıca glutaraldehit belirli olmayan bir şekilde her türlü bakteriye belli oranda bağlanır ve sonuç olarak glutaraldehidin bu sistemde kullanılıp kullanılmaması bakteri tespitiinde seçicilik, belirlilik ve hassaslık açısından bir anlam

ifade etmez. Dolayısıyla önerilen tez kapsamında hem MRSA'nın hızlı, doğru, hassas ve seçimli olarak tayini hem de yok edilmesi için aptamer ile konjuge edilmiş manyetik grafen oksitlerin geliştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Bunun için Hücre-Eksponansiyel Zenginleştirme ile Ligandların Sistemik Evrimi (EZLSE) (Cell-Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, Cell-SELEX) teknolojisi kullanılarak MRSA suşu için belirli olarak üretilmiş aptamerler kullanılmıştır.

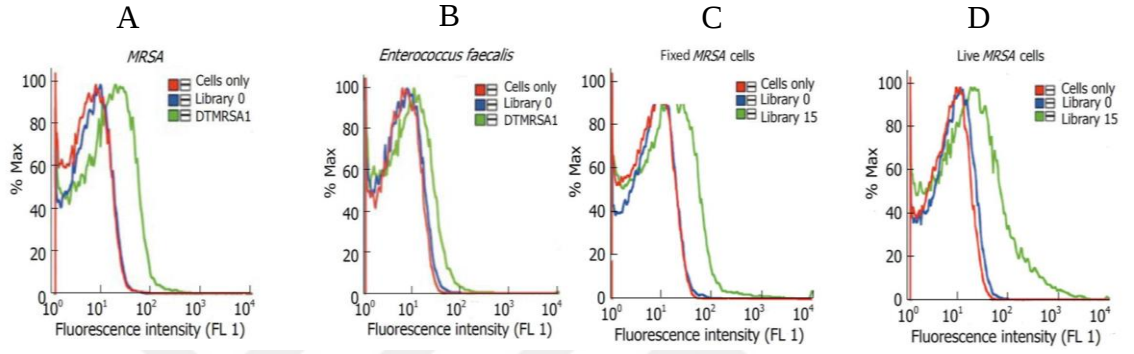
EZLSE metodu ile üretilen aptamerler birçok hedef için, metal iyonları, küçük moleküller, proteinler, özel olarak seçilip üretilir [16-20]. Aptamerlerin diğer hedefleme ligandlarına karşı üstünlükler taşıdığı, bazı istisnai özellikler olarak sıralanabilir. Örnek vermek gerekirse, tekrar sentezlenebilme, düşük bağışıklık tepkisi, amin, karbonil, azid, alkin, tiol grupları ve biyotin, söndürme ve floresan etiketleri ile kolay fonksiyonlaştırılması, 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 [21-24]. Amerika Birleşik Devletleri Florida Üniversitesinde (University of Florida) Prof. Dr. Weihong Tan ve araştırma grubu tarafından, Hücre-EZLSE ile DNA ve RNA aptamerler belirli olarak tüm hücre hedef olarak kullanılarak sentezlenmiştir [25-28]. Şekil 1.1'de tam hücre kullanılarak aptamer seçimi şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 1.1. Hücre tabanlı aptamer seçiminin şematik gösterimi

EZLSE metoduna göre, Hücre-EZLSE metodu ile seçilen aptamerler daha üstün özellikler taşımaktadır. Bu özellikler, aptamer seçiminin hücre yüzeyinde bulunan reseptör proteininin çeşitli tipleri için yapılması ile ortaya çıkmıştır. Bu yöntemde hücre zarındaki mevcut biyolojik belirteçlerin (reseptör proteinler) sayısını ve türünü bilmek gerekmemektedir. Hedefli tedavi ya da teşhis için aptamerler çok umut verici araçlar olarak düşünülmektedir. Tez çalışması kapsamında kullanılan DNA aptamerler, Amerika Bileşik Devletleri Florida Üniversitesinde (University of Florida), Kimya Bölümünde Prof. Dr. Weihong Tan'ın araştırma laboratuvarında gönüllü araştırmacı olarak bulunduğum gruptan MRSA bakterileri için özel olarak Hücre-EZLSE yöntemi ile seçilmiştir. Bu kapsamda yapılan çalışmalar, Dr. Turek liderliğinde "Molecular recognition of live methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cells using DNA aptamers" başlığı altında World Journal of Translational Medicine dergisinde yayınlanmıştır [28]. Doğrudan Hücre-EZLSE metodu kullanılarak yani tüm MRSA hücresine karşı seçilerek üretilen DNA aptamerler elde edilmiştir. Seçilen MRSA

aptamerin seçiciliği, Şekil 1.2’de hem MRSA bakteri hücresine hem de *Enterococcus faecalis* hücresine karşı bağlanma özelliği sistematik olarak test edilmiştir. Ayrıca, DNA aptamerin hem canlı hem de şoklanmış MRSA bakteri hücrelerine bağlandıkları gösterilerek, tehlikeli patojenlerden olan MRSA bakterisi ile güvenli bir şekilde çalışma imkânı sağlanmıştır.



Şekil 1.2. Aptamerin MRSA’ ya ve kontrol bakteriye (*Enterococcus faecalis*) bağlanması akım sitometri ile gösterilmektedir. A) Aptamerin MRSA’ya seçici olarak bağlanması, B) Aptamerin *Enterococcus Faecalis*’e bağlanmaması, C) Aptamerin şok edilmiş (fixed) MRSA’ya bağlanması, D) Aptamerin canlı MRSA’ya bağlanması (yeşil çizgi). [28]

Şekil 1.3’de seçilen dört farklı MRSA aptamer sekansının, MRSA bakterisine ve farklı klinik suşlara bağlanması, daha seçici ve kuvvetli aptamerini belirlemek için test edilmiştir. Bu anlamda, en ideal aptamer sekansının, DTMRSA1 sekansı olduğu belirlenmiştir. Yüksek lisans tez çalışması kapsamında hedefleme ajanı olarak DTMRSA1 aptamer sekansı kullanılmıştır.

Clinical strains	DTMRSA1	DTMRSA2	DTMRSA3	DTMRSA4
MRSA 2	+++	++++	+++	++++
MRSA 4	+++	+++	+++	++++
MRSA 6	++++	++++	+++	++++
MRSA 7	-	++++	+++	++++
<i>S. aureus</i> 164	-	++++	+	+++
<i>S. aureus</i> 165	-	++++	+	+++
<i>S. aureus</i> 166	-	++++	+	+++
<i>E. faecalis</i> 43	-	++++	+	+++
<i>E. faecalis</i> 44	-	++++	+	++
<i>E. faecalis</i> 45	-	++++	+	+++

Şekil 1.3. Dört farklı MRSA aptamer sekansı MRSA bakterisine için Hücre-EZLSE yöntemi seçilmiştir ve en seçici ve kuvvetli bağlanan MRSA aptamerini belirlemek için seçilen tüm aptamerler farklı klinik suşlara karşı denenmiştir. [28]

2004 yılında keşfedilmesinden bu yana grafen, eşsiz fiziksel, mekanik ve elektronik özelliklerinden dolayı çok geniş bir uygulama alanına sahiptir. Grafen oksit (GO) ise grafenin kimyasal olarak oksitlenmesi ile elde edilmiştir. GO'nun yapısında karboksilik asit, epoksit ve hidroksil grupları vardır. Karboksilat grupları, koloidal kararlılık ve pH'ya bağımlı negatif yüzey yükü sağlar. Epoksit ve hidroksil grupları ise hidrojen bağ etkileşimleri gibi, zayıf etkileşimlere ve diğer yüzey reaksiyonlarına olanak sağlar. Temel düzlemde ayrıca grafenin serbest pi-elektronları bulunmaktadır ki bunlar ilaç yüklemeye pi-pi etkileşimine ve kovalent olmayan fonksiyonlanmalara olanak sağlamaktadır [29, 30]. GO, iletken polimer, pil, elektrotlar, elektronik ve optik, sensör, anti-bakteriyel maddelerin üretiminde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, GO'nun ilaç ya da fonksiyonel biyomolekülleri yüklemeye geniş yüzey alanına sahip olması sebebiyle özellikle kontrollü salım sistemlerinde taşıyıcı olarak kullanımı ümit vaat etmektedir [31-35]. GO üzerine doxorubicin (dox), camptothecin ve 5-fluorouracil gibi ilaçların kanser tedavisi için kovalent olmayan fiziksel etkileşim ile yüklendikleri rapor edilmiştir ($\pi - \pi$ istiflenmesi, van der Waals etkileşimi ya da hidrojen bağı) [36-44]. Son zamanlarda, GO, fototermal ajan olarak da kullanılmaktadır.

Önerilen bu tezde, aptamerler ile konjuge edilmiş MGO üzerine iliştirilerek oluşturulan Apt@MGO konjugatlar, iki temel uygulama için kullanılmıştır: İlk olarak Apt@MGO nano platform bir nanosensör olarak kullanılarak optik yoğunluk cihazı ile MRSA tespit edilecektir. İkinci olarak ise Apt@MGO nano platform, bir fototermal ajan olarak kullanılarak üretilen ısı ile MRSA yok edilmiştir. Bir ucunda amin ($-NH_2$) içeren aptamerler EDC/NHS kimyası ile kovalent olarak MGO'daki karboksil ($COOH$) gruplarına sağlam bir şekilde bağlanmıştır. Aptamerlerin diğer ucuna floresan boya eklenerek MRSA üzerindeki hedef protein reseptörlere bağlanması akım sitometri ile gösterilmiştir. Ayrıca, MGO sayesinde aptamerlerin MRSA ya bağlanması çoklu bağlanma etkisi kuramı ile artırılmıştır. Bu durum ortamdaki çok az sayıda bulunan MRSA bakterilerin tayinine ve yok edilmesine fırsat vermiştir. MGO'nun manyetik özelliğinden yararlanılarak, Apt@MGO nano platformlar MRSA'ya bağlandıktan sonra santrifüje ihtiyaç duymadan bir mıknatıs yardımı ile MRSA'yı reaksiyon ortamından ayırtmada (izole etmede) kullanılmıştır. Ayrıca, Apt@MGO nano platform tarafından yakalan MRSA çözelti içinde dağılmış ya da bir mıknatıs ile çözelti içinde bir noktada toplanmış pozisyonları olabilir. Hem dağılmış hem de toplanmış pozisyonlardaki Apt@MGO-MRSA konjugatlarına doğrudan yakın kızılötesi lazer ışığı (808 nm) uygulanarak, hangi pozisyonda MRSA'nın daha etkin bir şekilde yok edildiği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, geliştirilecek olan Apt@MGO nano platform ile MRSA hem tespit edilecek hem de antibiyotik kullanmaksızın fototermal yolla yok edilmiştir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın temel amacı; çok tehlikeli patojenik bakterilerden biri olan MRSA'nın tespiti ve fototermal olarak yok edilmesi için hızlı, hassas, güvenilir sonuç verebilen çok fonksiyonlu yeni bir nano platform geliştirmektir. Bu amaç için aşağıdaki hedeflerin başarılı bir şekilde tamamlanmıştır:

- Suda çözünen (water-soluble) grafen oksidin (GO) sentezlenmesi ve sonikasyon ile nano boyuta dönüştürülmesi,
- Nano boyuttaki GO üzerinde demir oksit (Fe_3O_4) nanopartiküllerinin büyütülmesi ve oluşan MGO'nun karakterize edilmesi
- Suda çözünmüş belli konsantrasyondaki nano GO ve MGO in 808 nm lazer ışığı altında ısı üretme kapasitelerinin test edilmesi,

- Bir ucunda NH_2 grubu, diğer ucunda floresan boya bulunan aptamerlerin ve farklı nükleotidlerden oluşan aynı uzunlukta kontrol DNA'nın MGO'ya 1-Etil -3 (- 3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorit ve N-Hidroksisüksinimid (EDC/NHS) kimyası ile bağlanması,
- Apt@MGO ve kontrol DNA@MGO konjugatların MRSA bakterisi ile karıştırılıp inkübe edilerek, bağlanmanın akım sitometri ile gösterilmesi,
- Apt@MGO ile etkileşen MRSA'nın bir mıknatıs yardımı ile ayrılarak, süpernatant içinde kalan MRSA miktarının optik yoğunluk cihazı ile ölçülmesi. Böylece, Apt@MGO'nun ne kadar MRSA'yı yakaladığının belirlenmesi,
- Apt@MGO ve MRSA bakteri karışımı, yakın kızılötesi ışığına maruz bırakılarak bakterilerin açığa çıkan ısı ile yok edilmesi,
- MRSA yerine farklı bakterilerde kullanılarak, Apt@MGO'nun seçiciliğinin gösterilmesi,
- MRSA bakterisinin, diğer bakterilerin bulunduğu bir karışımdan, seçici bir şekilde Apt@MGO ile ayrıştırılması,
- Son olarak, MRSA bakterisinin kan veya serum gibi kompleks bir karışımın içerisine aktararak, bu ortamdan yakalanması ve yok edilmesi,

Hedefleme ajanı olarak, çok çeşitli biyomoleküller (antikor, peptid, boronik asit ve folik asit gibi) kullanılmaktadır. Fakat aptamerler, taşıdıkları özgün özellikler sayesinde diğer hedefleme ajanlarına göre daha çok dikkat çekmiş ve daha yoğun kullanılmaktadır. DNA ya da RNA aptamerler, özel bir süreç olan Ekspansiyon Zenginleştirme ile Ligandlar Sistemik Evrimi, EZLSE, (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX) diye adlandırılan yöntemle sentezlenir ve bu sayede aptamerler hedeflerine çok yüksek afinite, hassaslık ve seçicilikle bağlanmaktadır. Konvensiyonel EZLSE yönteminde, aptamer sentezlemek için kullanılan hedef; inorganik, organik ve biyomoleküller ya da hücrelerden izole edilmiş proteinler olabilir. Fakat bu çalışmada kullanılacak aptamerler Hücre-EZLSE (Cell-SELEX) yöntemiyle sentezlenmiştir. Bu yöntem ile aptamerler, bütün bir hücre (whole cell) kullanılarak sentezlenir. Hedef hücreler kanser, bakteri ya da virüs hücreleri olabilir. Bu yöntemin en temel avantajı hücre zarındaki mevcut biyolojik belirteçlerin (protein reseptörlerin) sayısını ve türünü bilmek gerektirmemesidir. 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.

Bu çalışmada, aptamerler MRSA hücrelerini belirli bir şekilde tanıyan hedefleme ajanı olarak görev yaparken, Fe_3O_4 NP'ler manyetik alan oluşturarak bir mıknatıs yardımı ile MRSA bakterilerini reaksiyon ortamından ayırtmada (izole etmede) kullanılmıştır. GO ise, aptamer ve Fe_3O_4 NP'ler için bir platform olarak kullanılırken, 808 nm dalga boyunda yakın kızılötesi ışığa maruz bırakıldığında, lazer ışığını ısıya dönüştüren bir fototermal ajan olarak da kullanılmıştır. GO; eşsiz fiziksel, mekanik ve elektronik özelliklerinden dolayı çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. GO iletken polimer, pil, elektrotlar, elektronik ve optik, sensör, anti-bakteriyel maddelerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. GO düşük sitotoksik özelliğinden dolayı biyomolekül tayini, ilaç ve DNA iletimi gibi birçok biyoanalitik ve biyomedikal alanlarda aktif bir şekilde kullanılmaktadır. Son zamanlarda GO fototermal ajan olarak da kullanılmaktadır.

1.3. Araştırmanın Önemi

Tez çalışması, aptamer konjuge edilmiş manyetik grafen oksidin (MGO) sentezlenmesi ve tehlikeli patojenik bakterilerden biri olan MRSA'nın tayini ve yok edilmesi için yeni bir nano platform geliştirilmesi hedeflenmesi bakımından, oldukça yüksek bir özgün değere sahiptir. Bugüne kadar literatürde rapor edilen çalışmalarda MRSA tayini için çok çeşitli hedefleme ajanları (antikor, peptid, boronik asit, folik asit ve bazı polimerler gibi) ve teknikler (kültür ve koloni sayma, immünolojik yaklaşımlar, polimeraz zincir reaksiyonu, akım sitometri, kütle spektrometri, mikroarrayler, floresan tabanlı tahlil ve elektrokimyasal tabanlı tahlil gibi) kullanılmıştır. Fakat bu hedefleme ajanlarının genel itibari ile yüksek özgüllük, yüksek afinite, yüksek seçicilik ve kararlılık göstermemesi bunların en temel dezavantajları arasındadır. Yukarıda bahsedilen bakteri tayin teknikleri ise çok zaman alması, karışık ve zahmetli olması, karmaşık aletlere ihtiyaç duyması ve alan çalışmalarına uygun olmaması (taşınabilirlik) gibi çok önemli dezavantajlara sahiptir. Önerilen tez çalışmasının en temel yeniliği, hedefleme ajanı olarak MRSA için özel olarak sentezlenen aptamerlerin ve MGO nano platformun bir fototermal ajan olarak kullanılmış olmasıdır. Apt@MGO nano platformun sağladığı avantajlar ve özgünlükler aşağıda verilmektedir.

- Önerilen tezde kullanılacak aptamerler, tez yürütücüsü tarafından Amerika Bileşik Devletlerinde yüksek lisans çalışması sürecinde araştırmacı olarak çalıştığı bir tez çalışması kapsamında, MRSA için özel olarak Hücre-EZLSE yöntemi ile seçilmiştir ve ilk defa bu çalışmada MGO ile kullanılacaktır.
- Yapılan geniş çaplı tarama sonucu MRSA bakterisi kullanılarak üretilen başka bir seçilmiş aptamer, literatürde henüz rapor edilmemiştir. Bu aptamerler Hücre-EZLSE yöntemi ile doğrudan MRSA bakteri hücresi kullanılarak seçilen ilk ve tek aptamerlerdir. Dolayısıyla, kullanılacak olan hedefleme ajanı (aptamer) oldukça özgündür.
- Bu çalışmada geliştirilmiş olan Apt@MGO nano platform ile hem aptamer dışındaki hedefleme ajanlarının hem de klasik bakteri tayin tekniklerinin dezavantajlarını ortadan kaldırmıştır.
- Apt@MGO nano platform hem bir tayin aracı hem de bir yok etme ajanı olarak kullanılacaktır. Apt@MGO nano platformun birden çok fonksiyonlu olması da, önerilen tez çalışmasının avantajlı ve özgün taraflarındandır.
- Bu çalışmada biyo-uyumlu ve manyetik özellikli MGO kullanılması da Apt@MGO nano platformun avantajlarındandır.
- MGO'nun manyetik özelliği sayesinde, yakalanan MRSA kolayca reaksiyon ortamından bir mıknatıs yardımı ile ayrıştırılmıştır. Böylece süpernatant içinde kalan MRSA sayısı optik yoğunluk cihazı ile basitçe hesaplanmıştır.
- Apt@MGO nano platform tarafından yakalanan MRSA, çözelti içinde dağılmış ya da bir mıknatıs ile çözelti içinde bir noktada toplanmış pozisyonlarda olabilir. Hem dağılmış hem de toplanmış pozisyonlardaki Apt@MGO-MRSA konjugatlarına, yakın kızılötesi lazer uygulanarak, hangi pozisyonda MRSA'nın daha etkin bir şekilde yok edildiği gözlemlenebilir. Bu durumda, önerilen tez çalışmasının özgün yönlerinden biridir.

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Yöntem

2.1.1. Grafen Oksitin (GO) Sentezlenmesi

GO, Hummers ve Offeman yöntemi modifikasyonu ile grafit tozlardan sentezlenmiştir [40, 41]. Öncelikle, 0,5 gram (g) grafit tozu ve 0,5 g NaNO_3 ; 23 mL(mililitre) H_2SO_4 içinde bir buz banyosunda karıştırılarak süspansiyon edilmiştir. Sonra, karışım üzerine 3 g KMnO_4 yavaşça eklenmiştir. Daha sonra, karışım 35-40 °C sıcaklık aralığında olan bir su banyosuna transfer edilecek ve çamur kıvamını alıncaya kadar yaklaşık 75 dakika(dk) karıştırılmıştır. Sonra, bu 45 mL civarında su karışıma eklenecek ve sıcaklık 95 °C olarak ayarlanmıştır. Bu sıcaklıkta, karışım 45 dk daha karıştırılmıştır. Son olarak, 100 mL daha su ilave edilmiş ve bunu takiben 3 mL H_2O_2 (%30) son karışım üzerine yavaşça eklenmiştir. H_2O_2 eklenmesinden sonra siyah renkli karışım açık kahve rengine dönüşmüştür. Sıcak karışım, daha sonra filtre edilmiş ve 100 mL su ile yıkanmıştır. Filtre üzerindeki çökelek, su içerisinde dağıtılmıştır. Karışım, düşük hızda 1000 rpm de 2 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem 5 kez tekrarlanmış ve santrifüj işlemleri sonunda nihai ürün fırında kurutularak toz olarak elde edilmiştir.

2.1.2. Manyetik Grafen Oksit Hazırlanması

MGO'nun hazırlanmasında Cong ve arkadaşlarının yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır [42]. Bu yönteme göre; 20 mg GO, cam vial içerisinde bulunan 20 mL trietilen glikole (TREG) ilave edilerek 30 dk vorteks ve sonifikasyon yapılır. Belirli miktarda NH_4Ac ilave edilerek 30 dk daha karıştırılır. 100 mL' lik balona aktarılan çözelti, gerekli miktarda demir (III) acetalasetonoat ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) ilave edilerek, argon atmosferinde geri soğutucu altında 278 °C'ye kadar yavaşça karıştırılarak kaynatılır. Bu

sıcaklıkta 60 dk karıştırıldıktan sonra, oda sıcaklığında soğuması sağlanır. Oluşan ürün, mıknatıs yardımı ile toplanarak 4 kez etanolle yıkanması sağlanır ve 50 °C’de vakum etüvünde kurutulur. GO’daki demir oksit yoğunluğu Fe(acac)₃ ve GO kütle oranları değiştirilerek ayarlanmıştır.

2.1.3. MGO ile Aptamer Konjugasyonunun Hazırlanması

DNA aptamer (MRSA aptamer); MGO nano platformuna, EDC–NHS kimyası bağlanır. GO’daki COOH grupları ile aptamerin NH₂ gruplarından amid oluşumu ile kovalent olarak sağlanmıştır. (Aptamer Dizgisi: 5’-FTIC-ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA-NH₂-3). 100 mg MGO; 1 mL 10 mM (milimolar) PBS çözeltisinde (pH 7.4) çözülür ve 60 µL (mikrolitre) 0.1 M 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimid (EDC) ile 30 dk 250 rpm’de karıştırılır. Bu çözeltiye 15 mL 400 µM aptamer ile 60 µL 0.12 M N-hidroksisüksinimid (NHS) ilave edilir ve 4 saat karıştırılır. Aptamer ile fonksiyonlanmış MGO (Apt@MGO) nano platform, mıknatıs yardımı ile toplanır ve en az 3 kez 10 mM PBS (fosfat tamponlu salin) çözeltisi ile yıkanır. Kontrol deneyleri için farklı dizilimlerdeki aptamerlerle de benzer işlemler yapılarak konjugasyonlar gerçekleştirilmiştir.

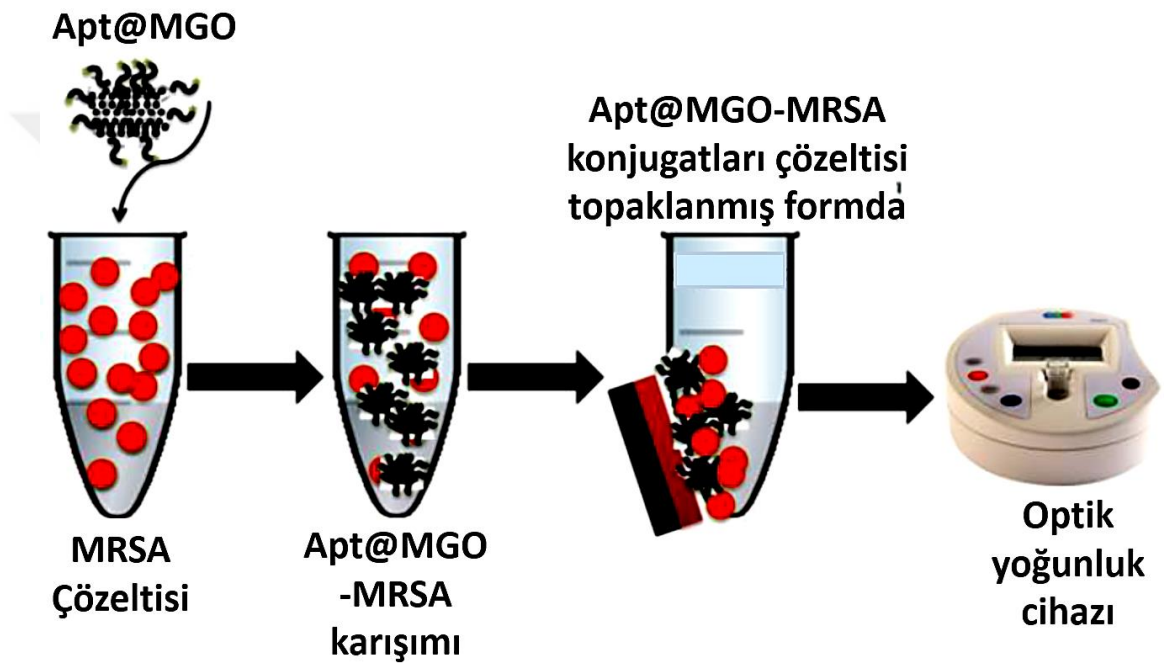
2.1.4. Bakteri Kültürünün Hazırlanması

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.

2.1.5. Apt@MGO-MRSA bakteri İnkübasyonu

Belli miktarda MRSA bakteri çözeltisi (~10⁶ CFU/mL) belli konsantrasyonda Apt@MGO ile karıştırılır ve oda sıcaklığında yaklaşık 40 dk inkübasyona bırakılır. Daha sonra, karışım bir mıknatıs yardımı ile bağlanmamış Apt@MGO veya MGO nano

yapılar ve MRSA hücreleri, Apt@MGO-MRSA konjugatlarından uzaklaştırılır. Yıkama işlemi 2 ya da 3 kez tekrarlanır. Elde edilen çökelek, yani Apt@MGO-MRSA konjugatları; bağlama tamponunda çözülür ve akım sitometri bağlanma gösterilir. Apt@MGO ile etkileşen MRSA'nın bir mıknatıs yardımı ile ayrılarak süpernatant içinde kalan MRSA miktarının optik yoğunluk cihazı ile ölçülmesi yapılır. Böylece, Apt@MGO'nun ne kadar MRSA'yı yakaladığının belirlenmesi tespit edilmiş olur. Şekil 2.1'de Apt@MGO'nun MRSA yakalama kapasitesinin test edilmesi gösterilmektedir.

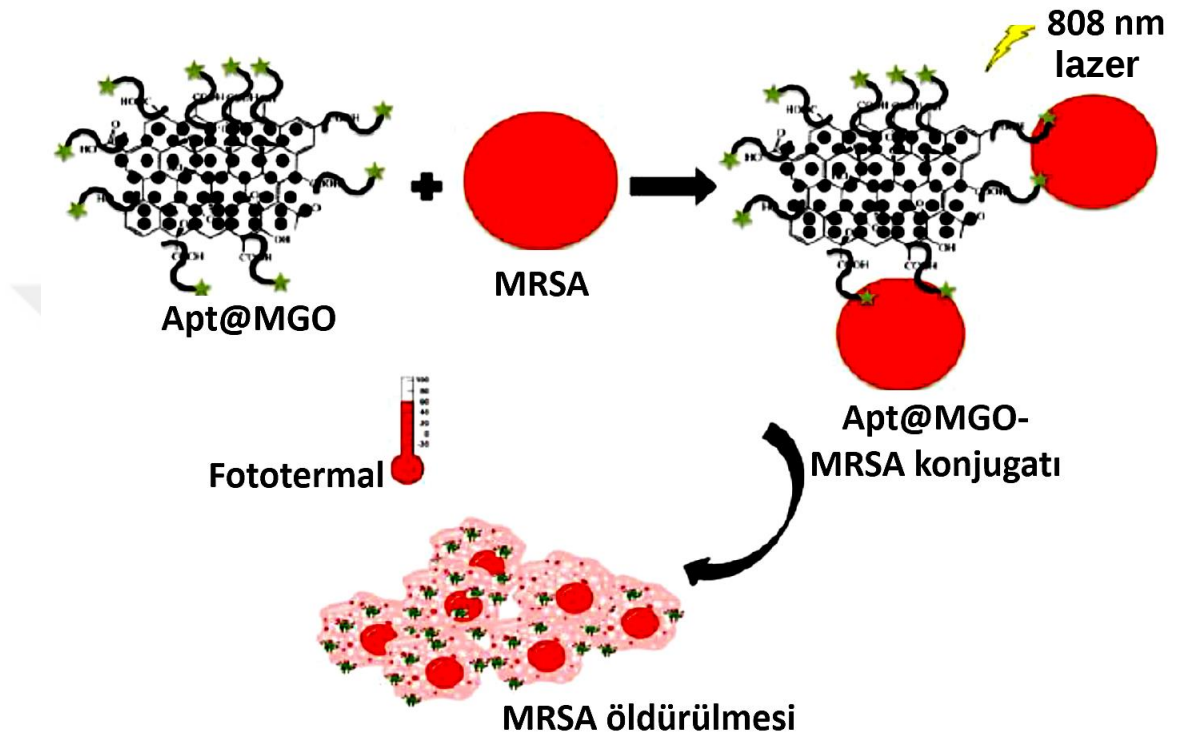


Şekil 2.1. Apt@MGO'nun MRSA yakalama kapasitesinin test edilmesi gösterilmektedir.

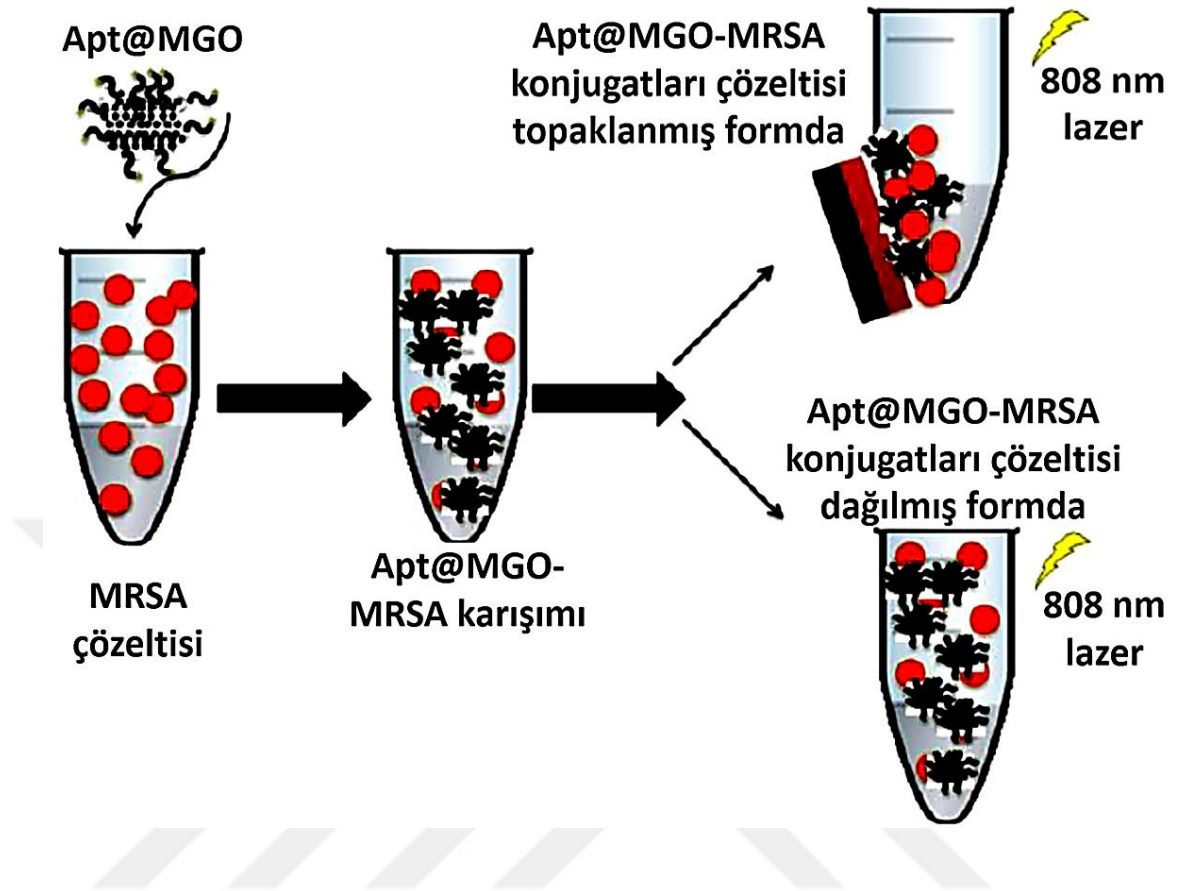
2.1.6. Fototermal Tedavi Deneyi

MRSA bakterileri; bir tampon içinde süspansiyon haline getirilir. Bakteri çözeltisi $\sim 10^6$ - 10^7 CFU/mL'lik konsantrasyona seyreltilir. Daha sonra 200 μ L bakteri çözeltisi ($\sim 10^6$ CFU/mL), 1 mL belli konsantrasyondaki Apt@MGO çözeltisi ile karıştırılır ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilir. İnkübasyondan sonra karışım 808 nm dalga boyundaki ($1,1 \text{ W/cm}^2$) ışığa farklı süreler ile maruz bırakılır. Son olarak 100 μ L karışım alınır ve 50 kez seyreltilerek trypticase soy agar besiyeri üzerine yayılır ve 37 °C 'de 24 saat boyunca inkübe edilir. Kontrol deney için, aynı işlemler MGO ve kontrol DNA@MGO kullanılarak yapılır. Her sayılabilir plaka için koloni sayımı yapılarak fototermal

tedavinin sonuçları açığa çıkarılır. Şekil 2.2’de, Apt@MGO’nun MRSA ile etkileşimi ve fototermal olarak yok edilmesi gösterilmektedir. Şekil 2.3’de ise, Apt@MGO-MRSA konjugatların hem dağılmış hem de toplanmış pozisyonlarda yakın kızılötesi lazere (808 nm) maruz bırakılması resmedilmektedir.

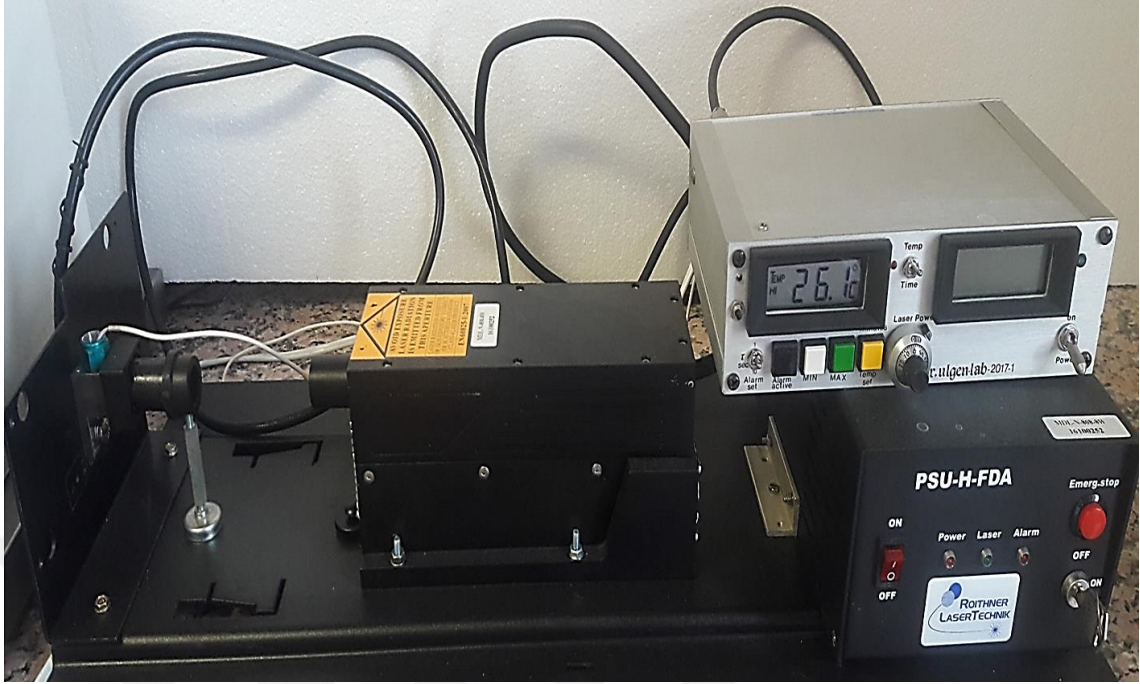


Şekil 2.2. Apt@MGO’nun MRSA ile etkileşimi ve fototermal olarak yok edilmesi.



Şekil 2.3. Apt@MGO-MRSA konjugatların hem dağılmış hem de toplanmış pozisyonlarda yakın kızılötesi lazere (808 nm) maruz bırakılması.

Şekil 2.4’de ARGEA firmasına dizayn ettirilen Ülgen Laboratuvar(lab) marka NIR (yakın kızılötesi) lazer sisteminin fotoğrafı verilmektedir. Bu lazer sistemi ile tez çalışmasındaki fototermal deneyler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.4. Ülgen Lab yapımı NIR (Yakın Kızılötesi) lazer sistemi

2.2. Materyal

2.2.1. Kimyasallar ve Materyaller

Fe(acac)₃ (Iron (III) acetylacetonate) % 97, NaNO₃ (sodyum nitrat), H₂SO₄ (sülfürik asit) Sigma, 1-etil-3[3-dimetilaminopropil] karbodiimid/N-Hidroksisüksünimid (EDC/NHS) ve trietilen glikole (TREG) Sigma-Aldrich Firmasından sağlanmıştır. Nükleotidler, fosforamiditler, amin ve floresein izotiyosiyanat (FITC) modifiye ediciler ise Glen Research şirketinden sağlanmıştır. 1 µM ölçekte aptamerlerin sentezi için, ABI3400 DNA/RNA sentezleyicisi (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılmıştır. Bakteri besiyeri (NB) ve Maya Ekstresi Pepton Dekstroz Besiyeri (YEPDB) Merck Firması tarafından sağlanmıştır. Gram- Escherichia coli (E. coli) ATCC 11230, gram (+) Staphylococcus aureus (S.aureus) ATCC 29213 ve mantar Candida albicans (C. albicans) ATCC 90028; Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. -20 °C'de muhafaza edilerek ve uygulamalardan önce %10 gliserol ile rejenere (canlandırma) yapılmıştır. Nano grafen oksit, toz halinde 100 mg ambalajlı olarak Graphene Supermarket'ten sağlanmıştır.

2.2.2. Kullanılan Cihazlar ve Karakterizasyon

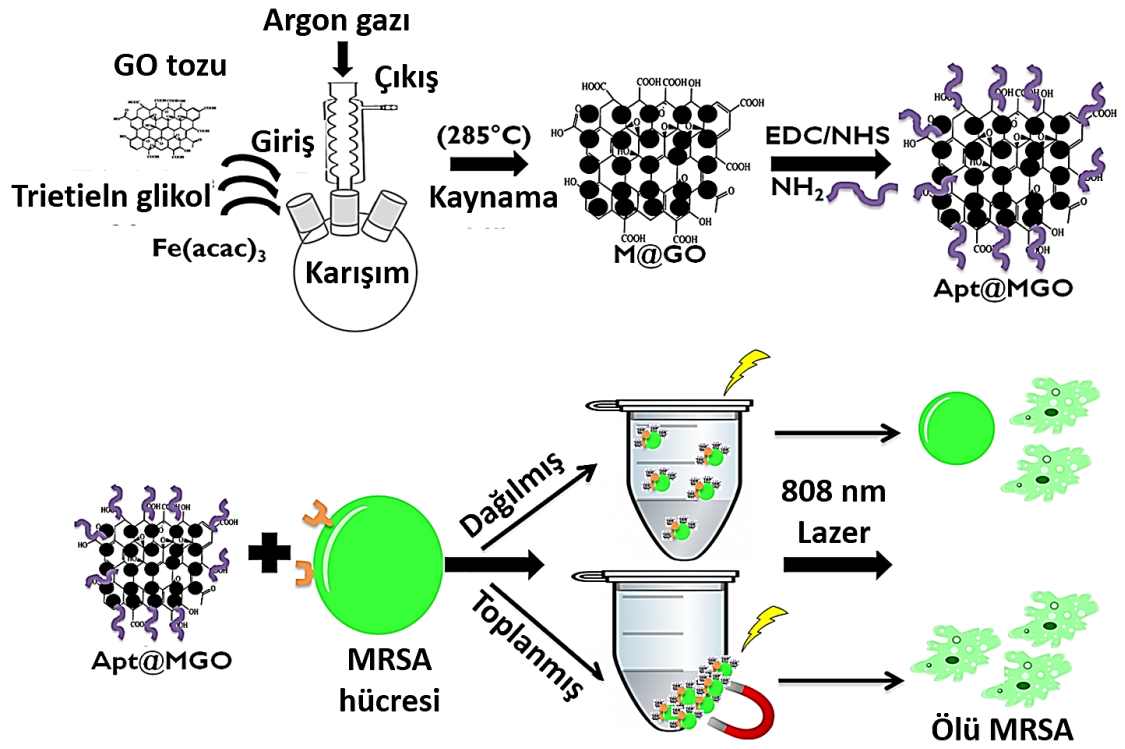
ZEISS EVO LS10 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) 25 kV geriliminde (Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezi, ERNAM) ve Geçişli Elektron Mikroskobu (TEM) (University of Florida) 120 kV çalışma geriliminde kullanılarak görüntüler elde edilmiştir. Çalışmalarda ayrıca UV-Vis spektrofotometre (Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezi, ERNAM), Akım sitometrisi (University of Florida), Yakın Kızılötesi (NIR) lazer sistemi (Ülgen Lab-ARGEA şirketi) ve Süper İletken Kuantum Girişim Cihazı (SQUID) Florida Üniversitesi (University of Florida) nde kullanılmıştır.



3. BÖLÜM

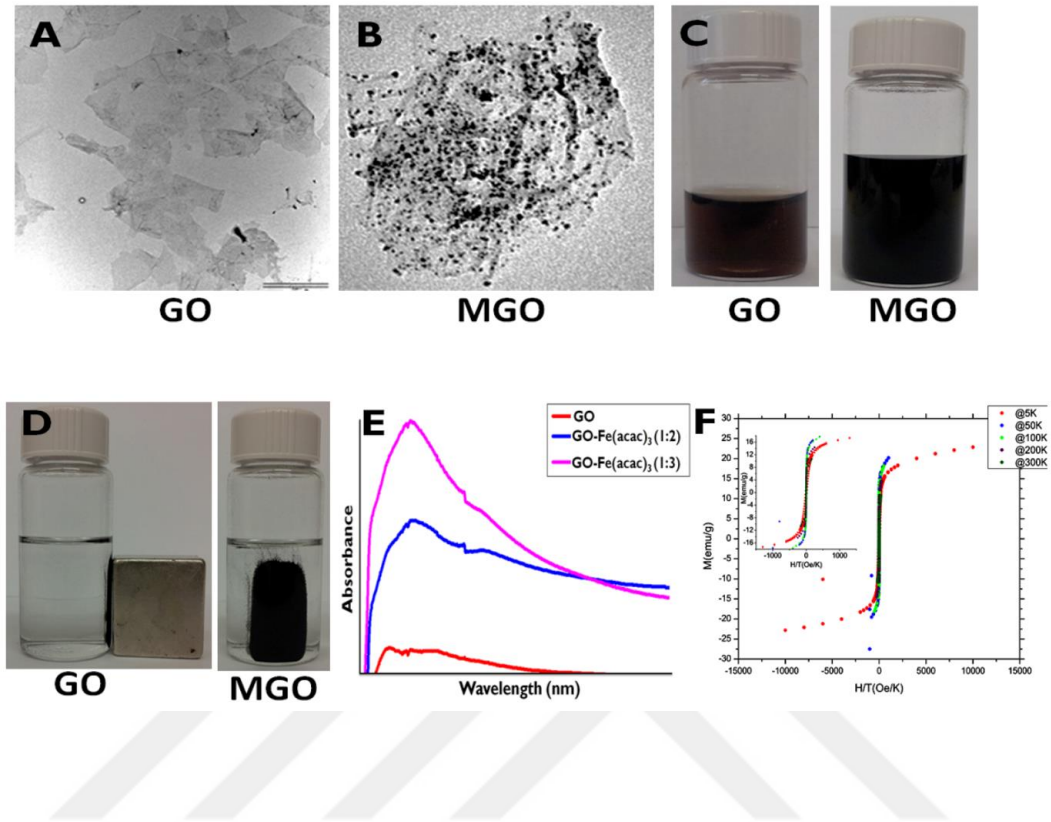
BULGULAR

3.1 Araştırma Modeli



Şekil 3.1. MGO ve Apt@MGO sentezi ve Apt@MGO-MRSA konjugatların inkübasyonu ve hem dağılmış hem de toplanmış pozisyonlarda yakın kızılötesi lazere (808 nm) maruz bırakılmasının şematik olarak gösterilmesi.

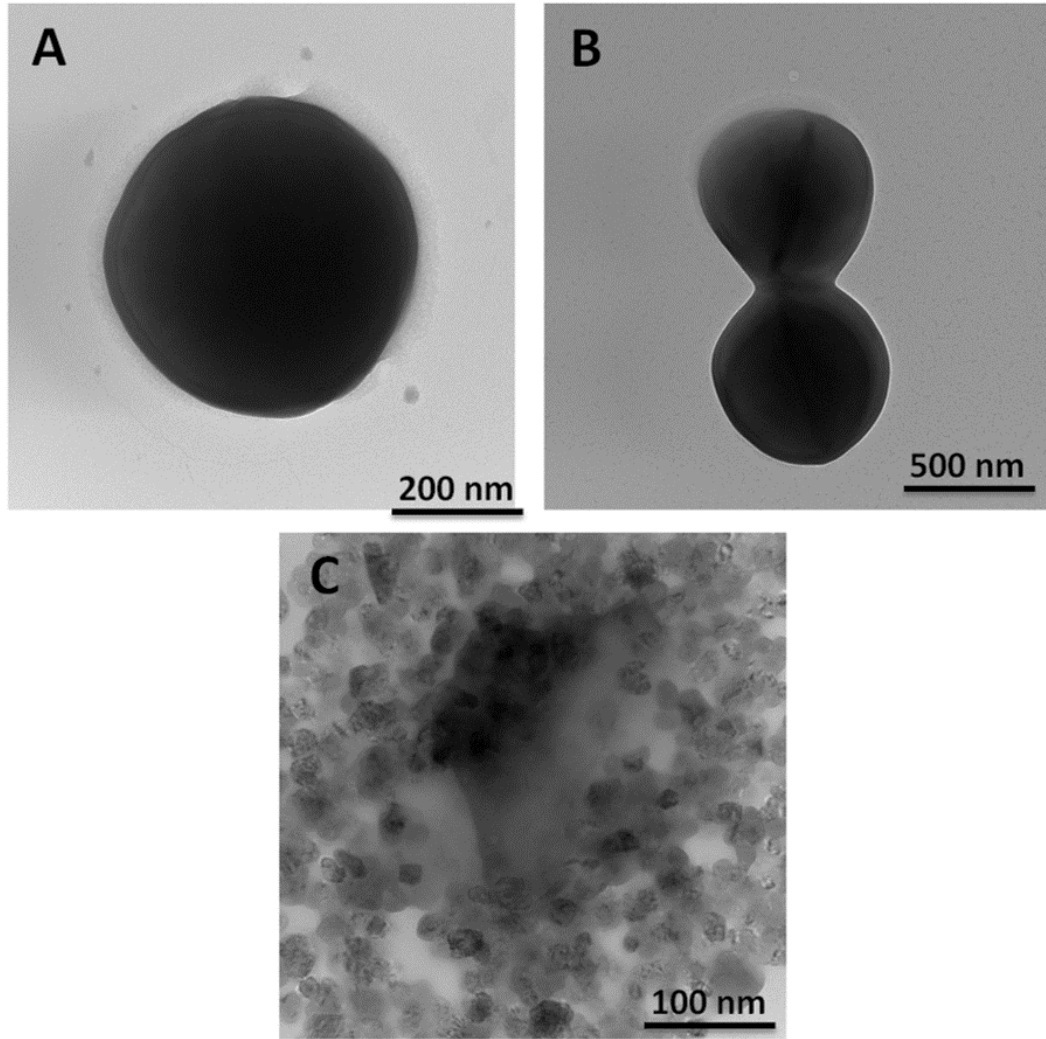
3.2 Evren ve Örneklem



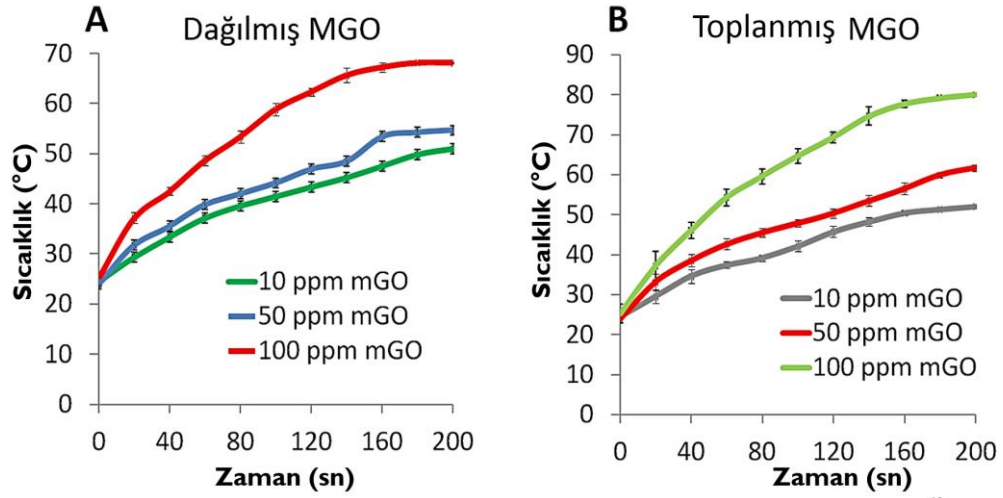
Şekil 3.2

A) GO nano yapısının TEM resmi. B) MGO nano yapılarının TEM resimleri. C) GO ve MGO nano yapıların çözeltilerinin resimleri. D) MGO nano yapıların bir mıknatıs ile manyetik özelliklerinin gösterilmesi. E) GO (kırmızı) ve MGO (pembe ve mavi) UV-Vis spektrofotometre ile absorbans noktalarının gösterilmesi. F) MGO nano yapının süperparamanyetik özelliğinin SQUID ile gösterilmesi.

3.2.1 Yöntem Başlık Örneği

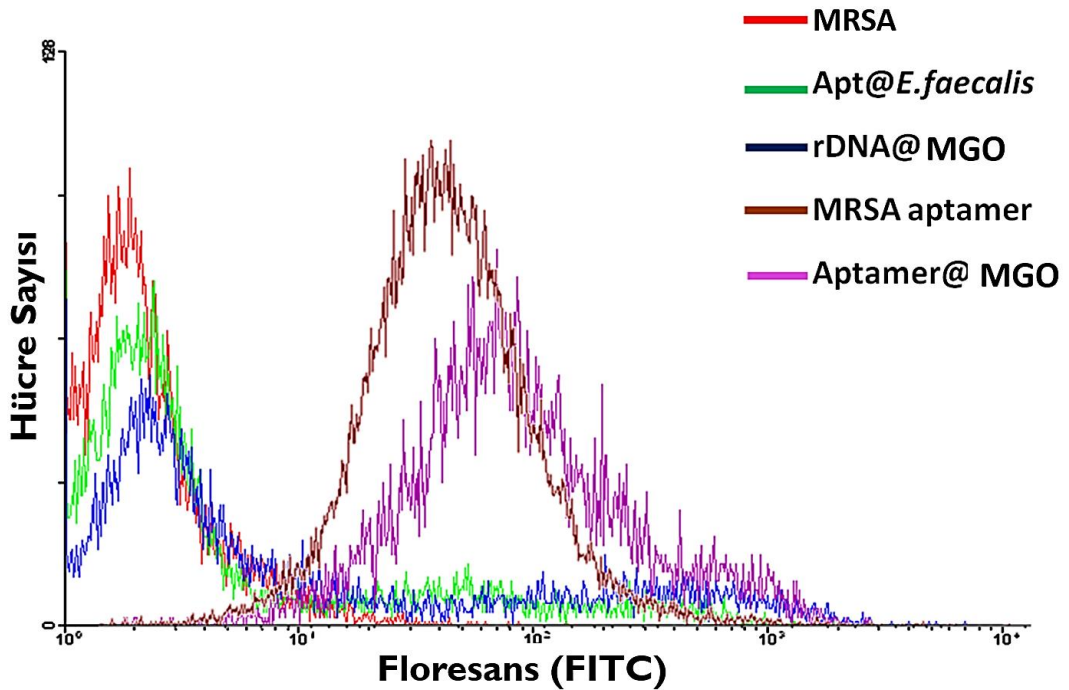


Şekil 3.3 A) Canlı MRSA bakteri hücresinin 200 nm boyutunda TEM resmi B) Canlı MRSA bakteri hücresinin 500 nm boyutundaki TEM resmi. C) Ölü MRSA bakteri hücresinin 100 nm boyutundaki TEM resmi.

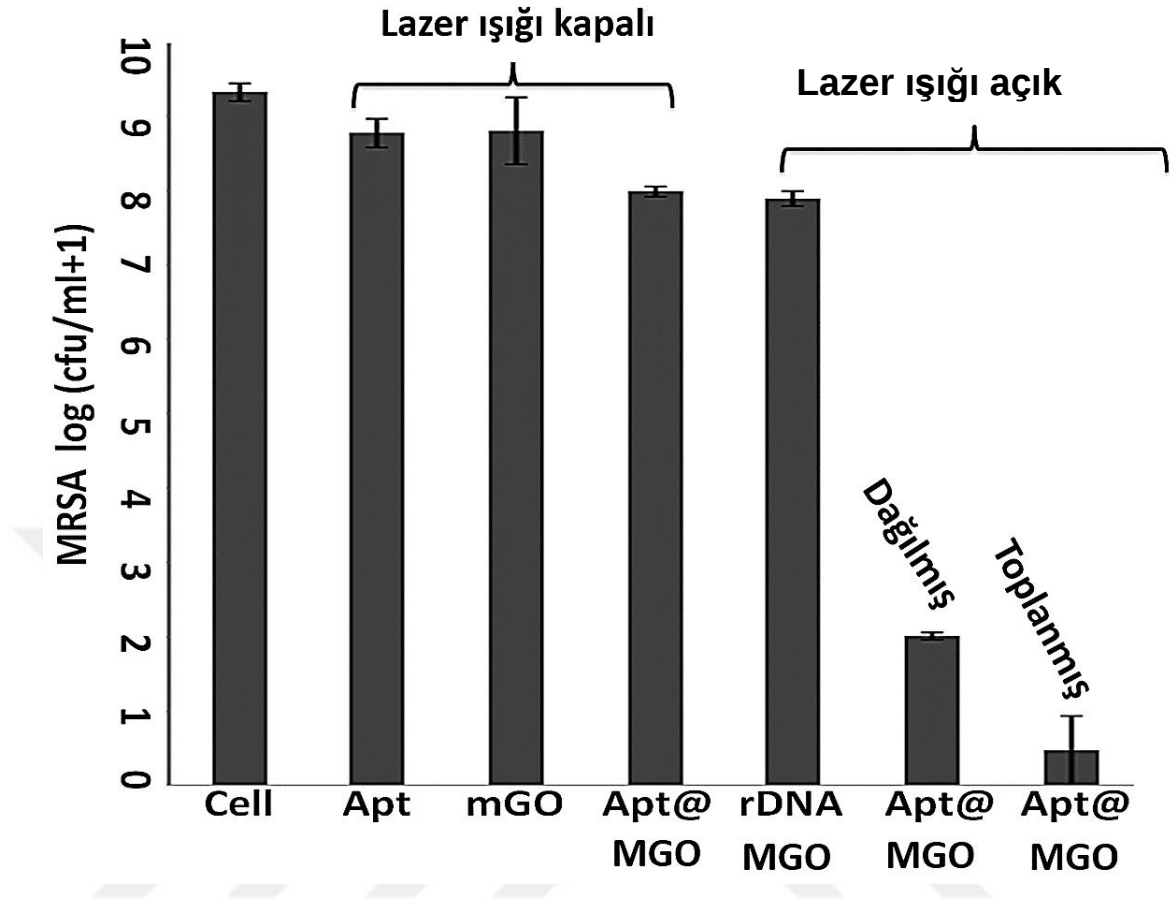


Şekil 3.4. MGO nano yapı çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarda NIR lazer altında ısı üretme potansiyelleri A) Dağılmış MGO grafiği. B) Toplanmış MGO grafiği.

Tüm konsantrasyonlarda toplanmış MGO nano yapı çözeltisi, dağılmış MGO çözeltisine göre daha kısa zamanda daha yüksek sıcaklığa ulaşmıştır.



Şekil 3.5. Akım sitometrisi ile yalnız MRSA bakterisi (kırmızı), Aptamer bağlı *E.faecalis* (yeşil), Rasgele seçilmiş DNA bağlı MGO (mavi), MRSA aptamer (kahverengi) ve Aptamer@GO (mor) nano yapıların; MRSA hücrelerine bağlanması gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Sadece Hücre (Cell), Aptamer, MGO, Apt@MGO, rDNA@MGO ve Apt@MGO nano yapıların (dağılmış ve toplanmış formda), NIR lazer altında MRSA bakterilerin fototermal olarak yok edilmesi gösterilmektedir.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1.Tartışma

DNA Aptamer Fonksiyonlu Manyetik Grafen Oksit Sentezi ve hedefli fototermal terapi ile Metisilin Dirençli Staphylococcus Aureus'un Öldürülmesi başlıklı tezimiz başarılı bir şekilde yürütülmüş ve tamamlanmıştır.

Tez çalışması kapsamında ilk olarak elde edilen GO üzerine Fe_3O_4 NP'ler sentezlenmiştir. Bu kısımda Fe_3O_4 NP'ler in situ sentez tekniği ile $Fe(acac)_3$ maddesi kullanılarak GO üzerinde büyütülmüş MGO hibrit nano yapılar sentezlenmiştir. Bu sentezdeki iki temel nokta oldukça önemlidir: Birinci nokta, $Fe(acac)_3$, GO ve TREG karışımının sentez sırasında çok fazla oksijene maruz bırakmamak gerekir ki, bu durum manyetik özelliğin elde edilmesi için ya da kaybolmaması için gereklidir. Diğer bir nokta ise, GO üzerinde oluşturulan Fe_3O_4 NP'lerin yoğunluğunun $Fe(acac)_3/GO$ arasındaki kütle oran ile belirlenmesidir. $Fe(acac)_3$ miktarı arttıkça, GO üzerinde oluşan Fe_3O_4 NP miktarı da artar fakat çok fazla olması, GO kenarlarındaki $-COOH$ grupların bloke edilmesine ve amin-DNA aptamer sekansının bağlanmamasına sebep olabilir. Eğer kullanılan $Fe(acac)_3$ miktarı gereğinden az olursa, GO üzerinde oluşan Fe_3O_4 NP'de az olur ve bu durum da düşük bir manyetik özelliğin oluşmasına ve bir mıknatıs yardımı ile MGO'ların çözeltide bir alana toplanmamasına sebep olur. Elde edilen GO ve MGO'ların temel karakterizasyonları; TEM, Uv-Vis spektrofotometre ve SQUID ile başarılı bir şekilde yapılmıştır.

Nano malzemelere ek olarak, MRSA bakterilerinin fototermal tedaviden önce ve sonra morfolojileri, TEM resimleri ile gösterilmiştir. Mükemmel görülen yuvarlak şeklindeki MRSA bakterisinin morfolojisi, fototermal tedaviden sonra yani NIR lazer uygulamasından sonra Apt@MGO'ların ürettiği yüksek ısı ile yok olmuştur. Bu durum ayrıca MRSA bakterisinin öldürülmesinin de bir işaretidir.

NIR lazer deneyi kapsamında ilk olarak çözeltide dağılmış ve toplanmış formda duran MGO'ların NIR lazer ışığı altında ısı yayma potansiyelleri ölçülmüş ve tez çalışması kapsamında iddia edildiği gibi, toplanmış formunda bulunan MGO'ların çözelti ortamının sıcaklığını daha hızlı ve yüksek değerlere taşıdığı gösterilmiştir.

Akım sitometrisi deneyi, fototermal tedavi deneyi öncesi bir gereklilik göstermektedir. Bu kapsamda kullanılan DNA aptamerin hedef MRSA bakteri hücrelerine bağlanıp bağlanmadığı gösterilmiştir. MGO nano yapılar ve rastgele sekanslardan oluşan rDNA konjüge edilmiş MGO (rDNA@MGO) MRSA hücrelerine bağlanmazken, MRSA aptameri ve aptamer konjüge edilmiş MGO (Apt@MGO); belirli ve güçlü bir şekilde MRSA bakterilerine bağlanmıştır. Ayrıca, çoklu bağlanma etkisi mekanizması kapsamında, üzerinde çok sayıda aptamer taşıyan Apt@MGO nano yapıların serbest aptamere göre daha iyi derecede bağlanma yaptığı akım sitometrisi ile gösterilmiştir.

Akım sitometrisi deneyleri ile elde edilen başarılı sonuçlar çerçevesinde, MRSA bakteri hücrelerine karşı fototermal deneyler yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu kapsamda, Aptamer, MGO, rDNA@MGO ve Apt@MGO (dağılmış ve toplanmış formda) MRSA bakterileri ile inkübe edilerek, karışım NIR lazer (808 nm) ışımasına maruz bırakılmıştır ve Böylece MRSA deaktivasyon oranları belirlenmiştir. Buna ek olarak, fototermal tedavinin kontrollü olduğu, yani lazer açık iken aktif ve kapalı iken inaktif olduğunu göstermiştir. Bu kullanılan malzemelerin biyo-uyumluluk testini yapmak amacı ile kullanılan malzemeler ile MRSA hücreleri NIR lazere maruz bırakılmadan inkübe edilmiştir. Tahmin edildiği gibi, aptamer veya MGO den herhangi bir toksik etki görülmemiştir. Lazer ışığı kapalı iken, MRSA hücrelerinde dikkate değer bir inhibasyon gözlenmemiştir.

Fakat, NIR lazer açıkken, kullanılan Apt@MGO etkili bir şekilde ısı üretmeye başlamıştır. Sadece MGO ve rDNA@MGO-MRSA bakteri karışımında dikkate değer bir MRSA kaybı yoktur. Çünkü bu malzemeler MRSA bakterisine bağlanmamıştır ve yıkama sonucu süpernatant olarak çözeltiden atılmıştır. Sadece az sayıda bir belirli olmayan bağlanma ile, az bir hücre de-aktivasyonu söz konusudur. Fakat Apt@MGO-MRSA karışımı, NIR lazer altında ciddi oranda hücre ölümlerine sebep olmuştur. Dağınık pozisyonundaki Apt@MGO-MRSA karışımında %80'e varan bir MRSA hücre ölümü söz konusu iken, toplanmış pozisyonunda Apt@MGO-MRSA karışımında

%97'e varan bir hücre yok edilmesi söz konusudur. Bu durum, tez çalışması kapsamında tasarladığımız iki sebepten kaynaklanmaktadır.: 1) lokal alanda hızlı ve etkili ısı üretimi ve 2) hedefleme ajanı olarak MRSA aptamerinin Apt@MGO formunda MRSA bakterisine belirli olarak bağlanması ve böylece etkili, gelişmiş ve hedefli fototermal tedavi elde edilmesi.

4.2.Sonuç ve Öneriler

Tez çalışması kapsamında, GO ve MGO sentezleri başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş olup, bu malzemelerin elektron mikroskop (TEM ve SEM) resimleri alınmıştır. Sentezlenen GO ve MGO nano yapıların sulu çözeltisinin fotoğrafının GO'nun açık kahverengi ve MGO çözeltisinin manyetik demir oksit NP'lerden (Fe_3O_4) dolayı siyah olduğu gözlemlenmiştir. Farklı boyutlardaki GO'nun TEM görüntüleri elde edilmiştir. GO üzerinde, yöntem kısmındaki protokole göre Fe_3O_4 NP'ler büyütülmüş ve MGO elde edilmiştir. Siyah renkli MGO çözeltisinin fotoğrafı verilirken, bir mıknatıs yardımı ile MGO in manyetik özellik gösterdiği ispatlanmıştır. MGO'nun elektron mikroskop resimleri sunulmuştur. Uv-Vis spektrofotometre ile GO'nun absorbans noktası 213 nm dalgaboyu olarak kayıt edilirken, MGO'nun yaklaşık 273 nm dalgaboyunda absorbans verdiği kaydedilmiştir. Sentezlenen MGO'ların farklı sıcaklık aralıklarında 5-300 K (Kelvin) SQUID ölçümlerinin değerlendirilmeleri sonucu süperparamanyetik olduğu görülmüştür.

Gram+ bakteri grubundan olan MRSA bakterileri yuvarlak bir morfolojiye sahiptir ve morfolojisi TEM fotoğrafı ile görülmüştür. Düzenli bir morfolojide olan MRSA bakterilerinin morfolojisinin yok olduğu, fototermal tedavi sonucu TEM resmi ile tekrardan görüntülenmiştir.

Tez kapsamında iddia edilen dağılmış ve toplanmış formunda bulunan MGO nano yapıların NIR lazer ışığı altında farklı hız ve oranlarda ısı ürettikleri, yaptığımız bu deneysel çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Üç farklı konsantrasyonlarda (10, 50 ve 100 ppm) dağılmış ve toplanmış formunda bulunan MGO çözeltileri, 200 saniye civarında 808 nm NIR lazer ışığına maruz bırakıldıklarında, çözeltide toplanmış formda bulunan MGO'ların her bir zaman periyodunda ve MGO konsantrasyonunda daha hızlı ve etkin ısı ürettiği ispatlanmıştır. Örneğin, dağılmış formda 50 ppm MGO çözeltisinin sıcaklığı

ilk 60 s'de 37 °C'ye ulaşırken, aynı zaman diliminde çözeltide toplanmış olarak bulunan 50 ppm MGO çözeltinin sıcaklığını 45 °C'ye yükselttiği gözlenmiştir.

MRSA aptamerinin, rDNA@MGO, Apt@MGO ve MGO'nun hedef MRSA bakterisine bağlanması akım sitometrisi ile gösterilmiştir. Bu kapsamda, sadece MRSA aptamerin ve Apt@MGO'nun MRSA bakteri hücrelerine bağlandığı gösterilerek, seçilen aptamerin oldukça seçici ve kuvvetli bir şekilde MRSA bakterisine bağlandığı ispatlanmıştır.

Bu tez çalışmasının temel amaçlarından biri olan fototermal terapi etkisinin gözlenmesi için MGO, Aptamer, rDNA@MGO ve Apt@MGO'ler MRSA bakterileri ile inkübe edilmiş ve sonrasında hem dağılmış hem de toplanmış pozisyonda yakın kızılötesi ışığa maruz bırakılmıştır. Özellikle tez kapsamında toplanmış edilmiş MGO, yani bir mıknatıs yardımı ile çözelti içerisinde belli bir noktada toplanmış MGO, doğrudan belli zaman periyotlarında 808 nm dalgaboyundaki lazer ışığına maruz kaldığında kısa sürede yüksek lokal ısı üretildiği tespit edilmiştir. Böylece, MRSA'nın toplanmış MGO sistemi ile çok hızlı ve etkin bir şekilde fototermal olarak yok edilmesi sağlanmıştır. Dağılmış formda MGO kullanıldığında, MRSA bakterilerinin %80'i de-aktive olurken, toplanmış formda MGO kullanıldığında %97 civarında de-aktivasyon elde edilmiştir. Hücre canlılığı deneyi ile hedefleme ajanının kullanımının ne kadar önemli ve gerekli olduğu açığa çıkmıştır. Ayrıca, hedefleme ajanı olarak kullanılan ligandın seçiciliği ve belirliliği, fototermal tedavinin etkinliğindeki önemini ortaya koymuştur.

KAYNAKÇA

1. Lowy, F. D. 1998. "staphylococcus aureus infections", **New England Journal of Medicine**, **339** (8): 520-532.
2. Millar, B. C., Loughrey, A., Elborn, J. S., Moore, J. E. 2007. "proposed definitions of community-associated meticillin-resistant Staphy-lococcus aureus", **Journal of Hospital Infection**, **67** (2):109-113.
3. Lane, W. R. 1962. "methicillin resistance in staphylococci", **Medical Journal of Australia**, **49** (25): 962-965.
4. Bartlett, J. G. 2002. "clinical practice. antibiotic-associated diarrhea", **New England Journal of Medicine**, **346** (5): 334-339.
5. Marteau, P., Seksik, P., Jian, R. 2002. "probiotics and intestinal health effects: A clinical perspective", **British Journal of Nutrition**, **88** (1): 51-57.
6. Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K and Adley, C. 2010. "an overview of foodborne pathogen", **Biotechnology Advances**, **28** (2): 232–254.
7. Batt, C. A. 2007. "food pathogen detection", **Science**, **316** (5831): 1579–1580.
8. Dykman, L., Khlebtsov, N. 2012. "gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives", **Chemical Society Reviews**, **41**, 2256–2282.
9. Saha, H., Agasti, S. S., Kim, C., Li, X., Rotello, V. M. 2012. "gold nanoparticles in chemical and biological sensing", **Chemical Reviews**, **112** (5): 2739–2779.
10. 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.
11. Gao, J., Liu, D and Wang, Z. 2010. "screening lectin-binding specificity of bacterium by lectin microarray with gold nanoparticle probes", **Analytical Chemistry**, **82** (22): 9240–9247.
12. 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** (13): 1068–1074.

13. 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** (1): 27–35.
14. 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** (2): 126–139.
15. Wu, M-C., Deokar, A. R., Liao, J-H., Shih, P-Y and Ling Y-C. 2013. “graphene-based photothermal agent for rapid and effective killing of bacteria”, **ACS Nano**, **7** (2): 1281-1290.
16. Ellington, A. D and Szostak, J. W. 1990. “in vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands”, **Nature**, **346**, (6287): 818-822.
17. Tuerk, C and Gold, L. 1990, “systematic evolution of ligands by exponential enrichment: rna ligands to bacteriophage t4 DNA polymerase”, **Science**, **249**, (4968): 505-510.
18. Beaudry, A and Joyce, G. 1992. “directed evolution of an RNA enzyme”, **Science**, **257**, (5070): 635-641.
19. Fang, X and Tan, W. 2009. “aptamers generated from cell-selex for molecular medicine: a chemical biology approach”, **Accounts of Chemical Research**, **43** (1): 48-57.
20. Jayasena, S. D. 1999. “aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics”, **Clinical Chemistry**, **45** (9): 1628-1650.
21. Bunka, D. H. J and Stockley, P. G. 2003. “aptamers come of age—at last”, **Nature Reviews Microbiology**, **4**, (8): 588-596.
22. 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”, **Nature Reviews Drug Discovery**, **5**, (2): 123-132.
23. Shangguan, D., Meng, L., Cao, Z. C., Xiao, Z., Fang, X., Li, Y., Cardona, D., Witek, R. P., Liu, C., Tan, W. 2008. “identification of liver cancer-specific aptamers using whole live cells”, **Analytical Chemistry**, **80** (3): 721-728.
24. 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”, **Analytical Chemistry**, **82** (20): 8642-8649.

25. 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 study", **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **103** (32): 11838-11843.
26. 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 Chemical Neuroscience**, **2** (3): 175-181.
27. Goenka, S., Sant, V., Sant, S. 2014. "graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering", **Journal of Controlled Release**, **173**, 75–88.
28. Turek, D., Simaey, D. V., Johnson, J., Ocsoy, I., Tan, W. 2013. "molecular recognition of live methicillin-resistant staphylococcus aureus cells using DNA aptamers", **World Journal of Translational Medicine**, **2** (3): 67-74.
29. Justin, R., Chen, B. 2014. "characterisation and drug release performance of biodegradable chitosan–graphene oxide nanocomposites", **Carbohydrate Polymers**, **103**, 70-80.
30. Geim, A. K., Novoselov, K. S. 2007. "the rise of graphene", **Nature Materials**, **6** (3): 183-191.
31. Sanchez, V. C., Jachak, A., Hurt, R. H., Kane, A. B. 2011. "biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review", **Chemical Research in Toxicology**, **25** (1): 15-34.
32. Peng, C., Hu, W., Zhou, Y., Fan, C., Huang, Q. 2010. "intracellular imaging with a graphene-based fluorescent probe", **Small**, **6**, (15): 1686-1692.
33. Dikin, D. A., Stankovich, S., Zimney, E. J., Piner, R. D., Dommett, G. H. B., Evmenenko, G., Nguyen, S. T., Ruoff, R. S. 2007. "preparation and characterization of graphene oxide paper", **Nature**, **448**, (7152): 457-460.
34. Lu, C.-H., Zhu, C.-L., Li, J., Liu, J.-J., Chen, X., Yang, H.-H. 2010. "using graphene to protect DNA from cleavage during cellular delivery", **Chemical Communications**, **46**, (18): 3116-3118.
35. Li, J.-L., Bao, H.-C., Hou, X.-L., Sun, L., Wang, X.-G., Gu, M. 2012. "graphene oxide nanoparticles as a nonbleaching optical probe for two-photon luminescence imaging and cell therapy", **Angewandte Chemie International Edition**, **51**, (8): 1830-1834.

36. Liu, J., Cui, L., Losic, D. 2008. "graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications", **Acta Biomaterialia**, **9**, (12): 9243-9257.
37. Sun, X., Liu, Z., Welsher, K., Robinson, J. T., Goodwin, A., Zaric, S., Dai, H. 2008. "nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery", **Nano Research**, **1** (3): 203-212.
38. Kavitha, T., Kang, I-K., Park, S-Y. 2014. "poly(acrylic acid)-grafted graphene oxide as an intracellular protein carrier", **Langmuir**, **30**, (1): 402–409.
39. Yang, X.Y., Zhang, X.Y., Liu, ZF., Ma, Y., Huang, Y., Chen, Y. 2008. "high-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide", **The Journal of Physical Chemistry C**, **112** (45): 17554-17558.
40. Hummers, W. S., Offeman, R. E. 1958. "preparation of graphitic oxide", **Journal of the American Chemical Society**, **80** (6): 1339–1339.
41. Kovtyukhova, N. I., Ollivier, P. J., Martin, B. R., Mallouk, T. E., Chizhik, S. A., Buzaneva, E. V., Gorchinskiy, A. D. 1999. "layer-by-layer assembly of ultrathin composite films from micron-sized graphite oxide sheets and polycations", **Chemistry of Materials**, **11**, (3): 771–778.
42. Cong, H.-P., He, J.-J., Lu, Y., Yu, S.-H. 2010. "water-soluble magnetic-functionalized reduced graphene oxide sheets: in situ synthesis and magnetic resonance imaging applications", **Small**, **6** (2): 169–173.
43. Ocsoy, I., Gulbakan, B., Shukoor, M. I., Xiong, X., Chen, T., Powell, D. H., Tann, W. 2013. "aptamer-conjugated multifunctional nanoflowers as a platform for targeting, capture, and detection in laser desorption ionization mass spectrometry", **ACS Nano**, **7** (1): 417–427.
44. Li, Y., Xu, X., Deng, C., Yang, P., Zhang, X. 2007. "immobilization of trypsin on superparamagnetic nanoparticles for rapid and effective proteolysis", **Journal of Proteome Research**, **6**, (9): 3849-3855.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Müşerref Arslan Öçsoy
Uyruğu: Türkiye (T.C)
Doğum Tarihi ve Yeri: 14.12.1981-Ankara
Medeni Durum: Evli
e-mail: muserrefarslan@gmail.com
Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi, Fizik Bölümü	2018
Lisans	Kırıkkale Üniversitesi, Fizik Bölümü	2005

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2011-2014	University of Florida	Gönüllü Araştırmacı
2018-...	NanoEZM	Şirket Ortağı

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

- İsmail Öçsoy, Mathews L. Paret, Muserref Arslan Ocsoy, Sanju Kunwar, Tao Chen, Mingxu You and Weihong Tan “ Nanotechnology in Plant Disease Management: DNA Directed Silver Nanoparticles on Graphene Oxide as an

Antibacterial against *Xanthomonas perforans*.” 7 (10), pp 8972–8980 ACS Nano, 2013,

➤ Özellikli: has made an impact on scientific knowledge and has been selected by The Latest Science (www.thelatestscience.com) (category: Plant Science).

2. İsmail Öçsoy, Muserref Arslan Ocsoy, and Weihong Tan “Nucleic Acid Functionalized Nanomaterials.” Journal of NanoLIFE, 2013 Vol. 3, issue 1.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler:

1. İsmail Öçsoy, Basri Gulbakan, Ersen Gokturk, Huseyin Erdal, Sena Cansiz, Muserref Arslan Öçsoy and Weihong Tan “Pyrene-1-Boronic Acid Conjugated Magnetic Graphene Oxide a New Material for Glycoprotein Capturing.” at NanoFloroda Conference (5th Annual NanoScience Technology Symposium), Tampa, FL, USA on September 29th 2012 (Poster).
2. İsmail Öçsoy, Muserref Arslan Öçsoy, Mathews L. Paret and Weihong Tan “DNA Directed Silver Nanoparticles on Graphene Oxide: An Antimicrobial Wrap around a Model Plant Pathogenic Bacteria.” at 64th Pittsburgh Conference, Philadelphia, PA, USA on March 15th 2013 (Sözlü Sunum).
3. Huseyin Erdal, İsmail Öçsoy, Muserref Arslan Öçsoy, Emir Yasun and Weihong Tan“ Indocyanine Green Dye Conjugated Magnetic Graphene Oxide for Photothermal Therapy and Magnetic Resonance Imaging.” at 64th Pittsburgh Conference, Philadelphia, PA, USA on March 21st 2013 (Poster).
4. İsmail Öçsoy, Basri Gulbakan, Tao Chen, Muserref Arslan Öçsoy and Weihong Tan “Engineering Multifunctional Nano Materials for Bioanalytical and Biomedical Applications.” at UF Shands Cancer Center Research Poster Day, Gainesville, Florida, USA on April 1st 2013 (Poster).
5. İsmail Öçsoy, Mathews L. Paret, Muserref Arslan Öçsoy and Weihong Tan “DNAdirected Silver Nanoparticles on Graphene Oxide and its Antibacterial

properties against *Xanthomonas perforans*.” at 4th International Symposium on Tomato Diseases & 28th U.S. Annual Tomato Disease Workshop, Orlando, Florida, USA, June 24-27, 2013 (Sözlü Sunum).

6. İsmail Öçsoy, Mathews L. Paret, Muserref Arslan Öçsoy and Weihong Tan “DNADirected Silver Nanoparticles on Graphene Oxide and its Antibacterial properties against *Xanthomonas perforans*.” at Advanced Materials World Congress (AMWC 2013) Izmir/Cesme, Turkey September 16-19, 2013 (Sözlü Sunum).
7. İsmail Öçsoy, Mathews L. Paret, Muserref Arslan Öçsoy and Weihong Tan “DNADirected Silver Nanoparticles on Graphene Oxide: An Antimicrobial Wrap around a Model Plant Pathogenic Bacteria.” at NanoFloroda Conference (6th Annual NanoScience Technology Symposium), Gainesville, FL, USA on September 30th 2013 (Sözlü Sunum).
8. İsmail Öçsoy, Basri Gulbakan, Tao Chen, Muserref Arslan Öçsoy and Weihong Tan “Engineering Multifunctional Nano Materials for Bioanalytical and Biomedical Applications.” Florida Inorganic and Materials Symposium (FIMS) October 18th-19th, 2013 at the University of Florida, Gainesville, Florida, USA (Poster).
9. Müşerref Arslan Öçsoy, İsmail Öçsoy (2015). Biyojenik Yöntem İle Ag/Cu Hibrit Nano Partiküllerin DNA Adsorbe Edilmiş Grafen Oksit Üzerinde Sentezlenmesi Ve Karakterizasyonu. 27. ulusal genel kimya kongresi, Çanakkale, 22-28th Ağustos 2015.