T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FAJ RESEPTÖR BAĞLAYICI PROTEİNİN REKOMBİNANT ELDESİ VE HEDEFLİ TERAPÖTİK NANOPARTİKÜL TASARIMI

Senanur DOKUZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK

Eş Danışman

Prof. Dr. Serap DERMAN

Ocak, 2023

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FAJ RESEPTÖR BAĞLAYICI PROTEİNİN REKOMBİNANT ELDESİ VE HEDEFLİ TERAPÖTİK NANOPARTİKÜL TASARIMI

Senanur DOKUZ tarafından hazırlanan tez çalışması 05.01.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK Yıldız Teknik Üniversitesi Danışman	Prof. Dr. Serap DERMAN Yıldız Teknik Üniversitesi Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ, Üye
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Tülin ÖZBEK ve eş danışmanım Prof. Dr. Serap DERMAN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Faj Reseptör Bağlayıcı Proteinin Rekombinant Eldesi Ve Hedefli Terapötik Nanopartikül Tasarımı başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Senanur DOKUZ

İmza

Aileme,

TEŞEKKÜR

Bilim dünyasındaki serüvenimin başlangıcı olarak gördüğüm yüksek lisans sürecim boyunca yol gösterici ve öğretici olan, düştüğümüzde elimizden tutup kaldıran ve bizleri cesaretlendirip başarabileceğimizi kalbindeki inanç ve azim ile gösteren çok değerli danışmanım Doç. Dr. Tülin ÖZBEK'e

Motive edici sohbetleri ile umutsuzluğun içinden çekip çıkaran, hiç bilmediğim bir alanda bana ışık tutarak ilerlememi sağlayan, bulunduğum yerde olmama vesile olan çok değerli eş danışmanım Prof. Dr. Serap DERMAN'a

Çalışmalarım sırasında vakit ayırarak bilgi birikimi ve tecrübelerini benimle paylaşan sevgili arkadaşım İrem ÇOKSU'ya,

Başarılarımızı kutlarken de başarısızlıklarımızı atlatmaya çalışırken de birlikte olduğumuz, gece gündüz demeden çalışırken neşeli, umutlu ve mutlu olmama sebep olan, en büyük ve en güzel şanslarımdan olan dostlarım Hande HANÇER, Berna ERDOĞDU ve Semra TAŞDURMAZLI'ya

Ekibin önemini ve değerini anlamama sebep olan, ihtiyaç duyduğumda yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım İlknur YILMAZ, İlkgül AKMAYAN, Görkem GÜNGÖR, Bahar ÖZTÜRK, Emine SELÇUK, Elnaz MOSHFEGHI, Esra BEDİR ve ekibimizin parçası olmuş ve olan herkese,

Kazandırdığı tecrübeler için Öğr. Gör. Dr. Munise YURTSEVER'e, BL16 ve BL17'nin emektarları, birlikte çalışmaktan keyif aldığım arkadaşlarım Pınar ÖZTEKİN, Zekiye DEMİR, Şebnem GÖK ve Emrah BERTAN'a,

Yıllardır süregelen destekleri ve dostlukları için biricik FTEAL kızlarıma,

Bana sıcacık bir yuva sunan, olduğum kişiyi sevgi ile şekillendiren, attığım her adımda yanımda olan annem Ayşe DOKUZ, babam Mehmet Salih DOKUZ, kardeşlerim Hakan DOKUZ ve Zeynep DOKUZ'a ve kıymetli aileme,

Son olarak 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Senanur DOKUZ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ **vii**
KISALTMA LİSTESİ **viii**
ŞEKİL LİSTESİ **ix**
TABLO LİSTESİ **xi**
ÖZET **xii**
ABSTRACT **xiv**
1 GİRİŞ **1**
1.1 Literatür Özeti ... 1
1.2 Tezin Amacı ... 3
1.3 Hipotez ... 4
2 GENEL BİLGİLER **5**
2.1 Bakteriler ... 5
2.1.1 Bakterilerin Keşfi ve Mikrobiyolojinin Gelişimi ... 6
2.2 *Staphylococcus aureus* ... 7
2.2.2 Antibiyotik Direnci ... 11
2.3 Bakteriyofajlar ... 13
2.3.1 Yaşam Döngüleri ... 15
2.3.3 Bakteriyofaj K ... 18
2.4. Bakteriyofaj Temelli Biyoteknolojik Yaklaşımlar ... 19
2.4.1 Faj Terapi ... 20
2.4.2 Biyosensör Çalışmalarında Kullanımı ... 21
2.4.3 Biyokontrol Çalışmalarında Kullanımı ... 22
2.4.4 Faj Temelli Taşıyıcı Sistemler ... 22
2.5 Nanopartiküller ... 25
2.5.1 PLGA Nanopartikülleri ... 26
2.5.2 PLGA Nanopartiküllerin İlaç Taşıma Sistemleri İçin Tasarımı ... 27
2.6 Rifampisin ... 31
2.6.1 Etki Mekanizması ... 32
3 MATERYAL/METOT **33**
3.1 Materyal ... 33

3.1.1 Kullanılan Cihazlar 33
3.1.2 Kullanılan Mikroorganizma Suşları 35
3.1.3 Kullanılan Kimyasal, Reaktif ve Malzemeler 35
3.2 Metot 37
3.2.1 Protein Ekspresyonu, Saflaştırılması, SDS-PAGE, Bradford ve Western Blot Analizi 37
3.2.2 rGp144'ün *S.aureus* Hücre Duvarına Adsorbsiyonunun Tespiti 41
3.2.3 Rifampisin Yüklü PLGA Nanopartikül Sentezi 43
3.2.4 Rifampisin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Yüzeyine rGp144 Protein Konjugasyonu 44
3.2.5 Nanopartikül Karakterizasyon Çalışmaları 45
3.2.6 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi 48
4 SONUÇ VE ÖNERİLER 50
4.1 rGp144 Ekspresyonu, Doğrulanması ve *S.aureus* ile Etkileşiminin Analizi 50
4.1.1 rGp144 Protein Ekspresyonu ve SDS-PAGE Analizi 50
4.1.2 Western Blot Analizi ile rGp144 Ekspresyonunun Doğrulanması ... 52
4.1.3 Hücre ELISA Yöntemi ile *S. aureus*-rGp144 Etkileşiminin Doğrulanması 53
4.1.4 Konfokal Mikroskobu ve Yüksek Verimli Görüntüleme Cihazı ile *S. aureus*-rGp144 Etkileşiminin Gösterilmesi 54
4.2 Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyonu 56
4.2.1 Boyut, Polidispersite İndeksi (PDI) ve Zeta Potansiyel Analizi 57
4.2.2 Enkapsülasyon Etkinliği, İlaç Yükleme Kapasitesi ve Reaksiyon Verimi 60
4.2.3 FT-IR Spektroskopisi Analizi 62
4.2.4 SEM Analizi 63
4.2.5 *In-vitro* Salım Çalışması 64
4.2.6 Antibakteriyel Aktivitenin Değerlendirilmesi 65
4.3 Bulgular 70
KAYNAKÇA 78
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 90

SİMGE LİSTESİ

A	Alfa
M_w	Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı
β	Beta
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
δ	Delta
ϒ	Gama
kDa	Kilo Dalton
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mV	Milivolt
M	Molarite
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
°C	Santigrat derece
V	Volt
%	Yüzdelik

KISALTMA LİSTESİ

BSA	Sığır Serum Albümin
DCM	Diklorometan
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTT	Dikloro difenil trikloroetan
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
EE	Enkapsülasyon etkinliği
ELISA	Enzime bağlı immunosorbent testi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
IPTG	İzopropil-beta-D-tiyogalaktopiranozid
Kob	Koloni oluşturan birim
MHA	Mueller-Hinton Agar Besiyeri
MHB	Mueller-Hinton Sıvı Besiyeri
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MORSA	Metisilin ve Oksasilin dirençli *S. aureus*
MRSA	Metisilin dirençli *S. aureus*
MSSA	Metisilin duyarlı *S. aureus*
OSSA	Oksasilin duyarlı *S. aureus*
PAGE	Poli akrilamid jel elektroforez
PBS	Fosfat tamponu (Phosphate buffered saline)
PDI	Çoklu Dağılım İndeksi
pH	Hidrojenin gücü (Power of hydrogen)
PLGA	Poli(laktik asit-co-glikolik asit)
PVA	Polivinilalkol
RBP	Reseptör bağlayıcı protein
RNA	Ribo nükleik asit
RV	Reaksiyon verimi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi
UV	Ultra violet
YK	Yükleme kapasitesi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 *Staphylococcus aureus* temel bileşenleri ve yapısı [25], [26] 7
Şekil 2.2 Gram pozitif bakteri hücre duvarının yapısı [22] 9
Şekil 2.3 *S. aureus* duvar teikoik asiti [39] 10
Şekil 2.4 Penisilinin kimyasal yapısı [41] 11
Şekil 2.5 *S. aureus*'un metisilin direnç mekanizması [46] 12
Şekil 2.6 İçerdikleri genetik materyalin türüne göre bakteriyofajların sınıflandırılması [49] 14
Şekil 2.7 Bakteriyofajların litik, lizojenik ve kronik yaşam döngüleri [54] 16
Şekil 2.8 Bakteriyofaj K TEM mikroskop görüntüsü [58] 18
Şekil 2.9 Faj kokteyli 21
Şekil 2.10 Biyosensör tasarımı [51] 22
Şekil 2.11 PLGA molekülünün hidrolizi [91] 26
Şekil 2.12 (a) Tekli emülsiyon (b) Çiftli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemleri [97] 29
Şekil 2.13 Emülsifikasyon Salting-Out yöntemi [96] 30
Şekil 2.14 Nanoçöktürme metodu [96] 31
Şekil 2.15 Rifampisin antibiyotiğinin iki boyutlu yapısı [79] 31
Şekil 4.1 rGp144 hücre kültüründen farklı saatlerde alınan örneklerin saflaştırma öncesi SDS-PAGE analizi (M: Marker) 50
Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlarda IPTG eklenen, IPTG eklenmeyen ve E. coli BL21 hücre kültürlerinin saflaştırma sonrası SDS-PAGE analizi (M: Marker, C: Crude, FT: Flowthrough, W: Wash, E1: Elüsyon 1, E2: Elüsyon 2, E3: Elüsyon 3) 51
Şekil 4.3 rGp144'ün 6 saat 18°C'de 200 rpm'de 0.5 mM IPTG ile ekspresyonu ve saflaştırmasının ardından SDS-PAGE görüntüsü (M: Marker, C: Crude, FT: Flowthrough, W: Wash, E1: Elüsyon 1, E2: Elüsyon 2, E3: Elüsyon 3) 52
Şekil 4.4 rGp144 proteininin Western Blot görüntüsü (M: Marker, E1/2: Elüsyon 1'in ½ oranda seyreltilmiş hali, E1: Elüsyon 1) 53
Şekil 4.5 Hücre ELISA yönteminin sonuç grafiği 54
Şekil 4.6 *S. aureus* ve FITC etiketli rGp144'ün interaksiyonu (a) konfokal mikroskobu ve (b) yüksek verimli görüntüleme cihazı ile incelenmesi 55
Şekil 4.7 *E. coli* ve FITC etiketli rGp144'ün interaksiyonu (a)konfokal mikroskobu ve (b)yüksek verimli görüntüleme cihazı ile incelenmesi 56
Şekil 4.8 Rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin (a) ve rGp144 ile konjuge edilen rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin (b) boyut dağılımı grafikleri 59
Şekil 4.9 Ortalama zeta potansiyel dağılım grafiği 60
Şekil 4.10 Rifampisin kalibrasyon eğrisi 61
Şekil 4.11 Sentezlenen nanopartiküllerin FT-IR grafiği (a) boş PLGA nanopartikülü, (b) rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü (c) rGp144

konjuge edilmiş rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü (d) Rifampisin yüklü nanopartiküllerin ve rGp144 konjugasyonunun karşılaştırılmalı FT-IR spektrum grafiği..... 62
Şekil 4.12 Rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü SEM görüntüsü..... 63
Şekil 4.13 rGp144 konjuge rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü SEM görüntüsü 64
Şekil 4.14 Salım profili grafikleri (a) rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü (b) rGp144 konjuge rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü..... 65

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.....33
Tablo 3.2 Kullanılan kimyasallar/reaktifler/malzemeler ve kullanım amaçları35
Tablo 4.1 PLGA/Rifampisin oranına göre boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri 57
Tablo 4.2 PLGA/Rifampisin oranları ve fazların hacimlerinde göre boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri..... 58
Tablo 4.3 Nanopartikül/rGp144 oranları ve EDC miktarına göre boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri..... 59
Tablo 4.4 Enkapsülasyon etkinliği (% EE), ilaç yükleme kapasitesi (% YK) ve reaksiyon verimi (% RV)..... 61
Tablo 4.5 MİK değerleri 65
Tablo 4.6 MİK değerindeki standart petri görüntüleri 65
Tablo 4.7 Agar kuyucuk difüzyon petri sonuçları 67
Tablo 4.8 Agar kuyucuk difüzyon zon çapları 68

ÖZET

Faj Reseptör Bağlayıcı Proteinin Rekombinant Eldesi Ve Hedefli Terapötik Nanopartikül Tasarımı

Senanur DOKUZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Tülin ÖZBEK

Eş-Danışman: Prof. Dr. Serap DERMAN

Staphylococcus aureus, salgıladığı birçok toksin ve virülans faktörü ile fırsatçı bir patojen özelliği göstererek konukçusunu istila eder. İmmün sistemden kaçarak pnömoni, deride enfeksiyon, impertigo, toksik şok sendromu gibi çeşitli hastalıklara sebep olabilen *S.aureus*, uzun yıllar antibiyotiklerle tedavi edilmiştir. Ancak yoğun ve bilinçsiz antibiyotik kullanımınıyla gelişen dirençli *S.aureus* suşları günümüzde nozokomiyal enfeksiyonların en önemli nedenlerindendir. Bakterileri özgül bir şekilde tanıyarak enfekte eden bakteriyofajların terapötik kullanımı, antibiyotik direnciyle mücadele için çeşitli stratejilerin bir parçası olmaya uygundur. Bakteriyofajların bakterileri enfekte etmesi, fajların reseptör bağlayıcı proteinleri (RBP) ile konakçı bakteriler üzerindeki reseptörüne spesifik ve geri döndürülemez şekilde bağlanması ile başlar. Reseptör bağlayıcı proteinlerin bakteriyi tanımadaki bu özgüllüğü, hedeflendirilmiş nanopartikül temelli ilaç taşıma sistemlerinde kullanılabilirliğinin anahtarı olmuştur. Nanotaşıyıcılar, özellikle hedeflenebilir oluşlarıyla içerdikleri etkin maddenin etki

bölgesine ulaşan konsantrasyonunu arttırarak tedavide gerekli dozajı düşürme, hedefleri dışındaki bölgelere etkin madde maruziyetini azaltarak yan etkileri indirgeme, biyobozunur ve biyouyumlu oluşu ile güvenli kullanımı, kontrollü ve sürekli salım yapabilme, etkin madde çözünürlüğünü iyileştirme gibi avantajlara sahiptirler.

Sunulan tez çalışmasında konakçısı *S. aureus* olan fajın reseptör bağlayıcı proteini rekombinant DNA teknolojisi tekniklerinden faydalanılarak eksprese edilmiş, western blot tekniği ile protein üretimi doğrulanmış ve beklenildiği üzere 53 kDa boyutunda protein tespit edilmiştir. *S. aureus*-rRBP etkileşimi ELISA yönteminde 450 nm'de alınan absorbans değerlerlerinin bakteri ve protein konsatrasyonları arttıkça anlamlı bir şekilde artışı ile ve mikroskobik analizlerde floresan işaretli proteinin *S. aureus* yüzeyindeki görüntüsü ile kanıtlanmıştır. Devamında, rifampisin antibiyotiği yüklü PLGA nanopartikülün sentezi ve karakterizasyonu çalışmaları yapılarak sentezlenen yaklaşık 250 nm, zeta potansiyeli -30 mV ve PDI değeri 0.3 olan nanopartiküllerin yüzeyine rRBP'nin konjugasyonu gerçekleştirilmiştir. Konjugasyon sonrası üretilen nanopartiküllerin boyutlarının 300 nm'ye yükseldiği, zeta potansiyellerinin -10 mV ve PDI değerlerinin 0.5 olduğu tespit edilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği %35 ve ilaç yükleme kapasiteleri %26 değerlerinde olan nanopartiküllerin konjugasyon sonrası FT-IR incelemeleri sonucunda 1650 ve 1550 cm^{-1} bölgelerinde var olan ana amid bantlarına sahip oluşları ile proteinin nanopartikül yüzeyine dekorasyonu gösterilmiştir. Salım profilleri belirlenen ve antimikrobiyal etkinlikleri incelenen nanopartiküllerin *S. aureus* suşlarına karşı MİK değerlerinin serbest rifampisin ile kıyaslandığında daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *S. aureus*, reseptör bağlayıcı protein, antibiyotik direnci, hedeflendirilmiş nanopartikül, rifampisin

ABSTRACT

Recombinant Production of Phage Receptor Binding Protein and Design of Targeted Therapeutic Nanoparticles

Senanur DOKUZ

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr.Tülin ÖZBEK

Co-supervisor: Prof. Dr.Serap DERMAN

Staphylococcus aureus invades its host by showing an opportunistic pathogen feature with many toxins and virulence factors it secretes. *S.aureus,* which can escape from the immune system and cause various diseases such as pneumonia, skin infection, impertigo, toxic shock syndrome, has been treated with antibiotics for many years. However, resistant *S.aureus* strains, which developed with the excessive and unconscious use of antibiotics, are one of the most important causes of nosocomial infections today. The therapeutic usage of bacteriophages that specifically recognize and infect bacteria is appropriate to be part of a variety of strategies to fray antibiotic resistance. Infection of bacteriophages to bacteria begins with the specific and irreversible binding of phages with their receptor binding proteins (RBP) to their receptor on host bacteria. This specificity of receptor-binding proteins in recognizing bacteria has been key to their usability in targeted nanoparticle-based drug delivery systems. Nanocarriers have advantages

such as being particularly targetable, decreasing the required dosage in the treatment by increasing the concentration of the active substance they contain, reaching the effect area, reducing the exposure of the active substance to the non-target sites, being biodegradable and biocompatible, being able to make controlled and continuous release, and improving the solubility of the active substance. In the presented thesis, the receptor binding protein of the phage, whose host is *S. aureus*, was expressed using recombinant DNA technology techniques, protein production was confirmed by western blot technique, and 53 kDa protein was detected as expected. The interaction of *S. aureus*-rRBP was proven by the ELISA method, with the increase in absorbance values at 450 nm as the bacterial and protein concentrations increased, and the appearance of the fluorescent labeled protein on the surface of *S. aureus* in microscopic analyzes. Afterwards, rRBP conjugation was carried out on the surface of the synthesized nanoparticles with a zeta potential of -30 mV and a PDI value of 0.3 by performing synthesis and characterization studies of PLGA nanoparticle loaded with rifampicin antibiotic. It was determined that the sizes of nanoparticles produced after conjugation increased to 300 nm, their zeta potential was -10 mV and PDI values were 0.5. As a result of post-conjugation FT-IR examinations of nanoparticles with encapsulation efficiency of 35% and drug loading capacity of 26%, the presence of main amide bands in the 1650 and 1550 cm-1 regions and the decoration of the protein on the nanoparticle surface were shown. It was determined that the MIC values of the nanoparticles, whose release profiles were determined and whose antimicrobial activities were examined, were lower than the free rifampicin against *S. aureus* strains.

Keywords: *S. aureus*, receptor binding protein, antibiotic resistance, targeted nanoparticle, rifampicin

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Enfeksiyonların tedavi edilmesinde antibiyotiklerin kullanımı A. Fleming'in penisilin keşfiyle 1928'de başlamış ve 1940'lı yıllara kadar altın çağını yaşamıştır. Ancak bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmeye başlaması [1] özellikle ülkemizde ve dünyada hastane kaynaklı enfeksiyonların artmasında ciddi etkisi olan *Staphylococcus aureus* suşunun penisilin ve metisiline karşı direnç geliştirdiğinin tespiti, sebep olduğu hastalıklar ile mücadelede alternatif tedavilerin arayışını beraberinde getirmiştir [2], [3]. Geleneksel antimikrobiyal ajan keşif ve geliştirme zorlukları göz önüne alındığında, konvansiyonel olmayan yaklaşımlarla antibiyotiğe dirençli mikroorganizmaların elimine edilmesi yaklaşımı günümüzde bir çözüm olarak görülmektedir. Son on yılda nanoteknoloji uygulamaları, özellikle de ilaç dağıtımı için nanopartiküllerin kullanılması, tıbbi açıdan önemli bir etki oluşturmaya başlamıştır [4]. Nanopartikül taşıyıcı sistemlere fiziksel enkapsülasyon, adsorpsiyon veya kimyasal konjugasyon yoluyla yüklenen ilaç moleküllerinin tedavi amacıyla kullanımı serbest ilaç kullanımına kıyasla çok daha gelişmiş bir farmakokinetik etki sergiler [4], [5]. Terapötiklerin nano taşıyıcılara yüklenerek enfeksiyon bölgesine hedefli bir şekilde tasarlanması, bakteriyel hastalıklar ile mücadelede geliştirilen en etkili biyoteknolojik yaklaşımlardandır. İyileştirilmiş ilaç çözünürlüğü, uzun süreli sistemik dolaşım, sürekli ve kontrollü salım, hassas ilaç hedefleme ve birden fazla ilacın aynı anda verilmesi dahil olmak üzere nanopartikül temelli ilaç dağıtım sistemlerinin avantajları çeşitli çalışmalarla doğrulanmıştır. Klinik kullanımda, bir dizi nanopartikül temelli ilaç dağıtım sistemi kullanım onayı almıştır ve birçok antimikrobiyal nanopartikül formülasyonu klinik öncesi ve klinik testlerin çeşitli aşamalarındadır [4]–[6].

Bakterileri spesifik bir şekilde tanıyarak enfekte eden fajlar, gezegendeki en bol çeşitlilikte bulunan biyolojik varlıklardır [7], [8]. Faj genomları, çift sarmallı veya

tek sarmallı olabilen DNA veya RNA'dan oluşur. Bu genetik materyal, ikozahedral, baş-kuyruk veya filamentli bir yapıda olan kapsidin içerisine paketlenmiştir [8], [9]. Faj kuyruk yapısının taban plakasında veya kuyruk liflerinde lokalize olan reseptör bağlayıcı protein (RBP) ile bakteri yüzeyindeki reseptörler arasında meydana gelen özgül etkileşim mekanizmasına adsobsiyon denilir ve geri dönüşümsüzdür. RBP sayesinde konağı tanımada sağlanan bu spesifite, ilaç hedefleme sistemlerinde ihtiyaç duyulan bölgesel hedeflemenin gerçekleştirilmesini sağlayabilmektedir. Gram pozitif bakterilerileri hedefleyen fajlar, konağın peptidoglikan tabakasının %60'ını oluşturan teikoik asit (TA) birimlerini konağı tanıma ve bağlanma için kullanırlar. Teikoik asit birimleri duvar teikoik asitleri ve lipoteikoik asitler olarak iki gruba ayrılır. Duvar teikoik asitleri, birincil stafilokokal faj reseptörüdür. Bakteriyofaj K, çeşitli stafilokoklara karşı litik yaşam döngüsünü takip eden Miyoviridae ailesinin polivalent bir üyesidir. Hem koagülaz negatif hem de koagülaz pozitif stafilokoklara karşı aktiviteye sahiptir ve adsorbsiyon için duvar teikoik asitlerinin GlcNAc birimlerini kullanır [10]. Bakteriyofaj K'nın, *S. aureus* duvar teikoik asitlerini tanıyıp konağa bağlanmasını sağlayan RBP'si Gp144'ü taban plakasında ihtiva eder. RBP'ler istenilen reseptöre bağlanması amacıyla genetik olarak tasarlanabildiğinden dolayı, fajların daha geniş spektrumlu taşıyıcı sistemler olarak kullanılabildiği ve faj gösterim, kimyasal konjugasyon gibi tekniklerle; nükleik asitler (DNA aşıları, siRNA'lar), nanomalzemeler (nanorodlar), terapötik ilaçlar (antibiyotikler) ve teşhis probları gibi elemanların vücut içerisinde hedeflenmesinin (örneğin kanser hücrelerine) sağlanabileceği [11], [12] görülmektedir.

Enfeksiyon bölgelerini hedefleme için kullanılan nanosistemler, arttırılmış çözünürlük, gelişmiş stabilite, biyoyararlanım, antibiyotik yarılanma ömrünün uzatılması, doku hedefleme ve minimum yan etkiler dahil olmak üzere geleneksel formülasyonlara göre birçok fayda sağlamaktadır. Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), biyobozunur, kontrollü ve sabit ilaç salınımı sağlayabilen, düşük toksisiteli, biyouyumlu oluşu ile ilaç taşıma sistemlerinde kullanımı yaygın olan bir polimerdir. 1994'ten beri terapötiklerin enkapsüle edilerek taşınmasında PLGA nanopartiküllerinden yararlanılmaktadır [13]. PLGA nanopartikül sentezinde mevcut yöntemler, yukarıdan aşağı (top-down) ve aşağıdan yukarı (buttom-up)

olarak ikiye ayrılabilir[14], [15]. Antibiyotik, terapötik ajan, protein, peptit, siRNA, miRNA gibi moleküllerin uygun metot seçilerek PLGA polimeri içine hapsedilmesi ile sentezlenen nanopartiküller, yüzeylerinin de protein, peptit, aptamer, ligand, antikor gibi hedefleyici bir ajan ile konjuge edilebilmesi ile tedavi yaklaşımlarında avantaj sağlamaktadır [15]–[17]. RNA polimeraz inhibitörü olan rifampisin, MRSA tedavisinde kullanılan etkin lipofilik bir antibiyotiktir [18]. Enfeksiyon bölgesine antibiyotik yüklü PLGA nanopartikülünün hedeflenmesinde faj ve/veya faj alt birimi kullanılarak yapılan bir tasarım bölgedeki ilaç etkinliğinini artmasını, gerekli ilaç dozunun düşürülmesini, enfeksiyon bölgesi dışında ilaç maruziyetinin azalmasını sağlamaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Stafilokokal enfeksiyonlardan kaçınmak zordur, çünkü *S. aureus* üst solunum yolları veya deride flora bakterisi olarak yer alan fırsatçı patojen bir bakteridir. Hastalığa sebep olan *S. aureus* suşları, salgıladığı çeşitli virulans faktörleri ile immün sistem hücrelerinden kaçabilmektedir. Dünyada ve ülkemizde giderek artan hastane kaynaklı enfeksiyonlarda, antibiyotiğe direçli *S. aureus* suşları (MRSA, VRSA) önemli patojenler olarak yer almaktadır. Bu nedenle *S. aureus* kaynaklı nozokomiyal enfeksiyonlarla mücadelede antibiyotiklere alternatif ya da onlarla kombinasyonlu olarak daha etkin bir terapötik ürün geliştirilmesi elzemdir.

Sunulan bu çalışmada, insan ve hayvanlarda birçok hastalığa neden olan ve var olan antibiyotik tedavilerine karşı çoklu direnç geliştiren patojen *S. aureus*'u enfekte eden litik virülan bir bakteriyofaj olan Bakteriyofaj K'nın reseptör bağlayıcı protein geni olan Gp144'ün rekombinant DNA teknolojisi prensiplerinden yararlanılarak klonlanan vektörünün transformasyonu gerçekleştirilmesi, *E. coli* BL21 (DE3) bakterilerinden rekombinant Gp144'ün (rGp144) eksprese edilmesi, saflaştırılması, elde edilen rGp144'ün in vitro koşullarda *S. aureus* hücreleri ile olan etkileşiminin tespit edilmesi, antibiyotik (rifampisin) yüklü PLGA nanopartiküllerinin sentezi ve karakterizasyonu, üretilen rGp144 proteininin sentezlenen rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin yüzeyine konjugasyonu ve

karakterizasyonu, nanopartikülün ve konjuge nanopartikülün salım profilinin incelenmesi ve antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Elde edilen rGp144 konjuge rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin terapötik amaçlı olarak antimikrobiyal ilaç hedeflenmesinde kullanımı, dirençli *S. aureus* suşlarının neden olduğu enfeksiyonlarla mücadelede yenilikçi bir yaklaşım olacaktır. Ek olarak bakteriyofaj K'nın RBP geninin klonlanması, eksprese edilmesi ve konakçısına adsorbsiyonunun belirlenmesi ile mevcut faj kaynaklı RBP kütüphanesine katkı sağlanarak biyoteknoloji alanında yapılacak ileri çalışmalar için yeni bir perspektif sunulacak ve elde edilen bilgiler literatüre kazandırılmış olacaktır. Gp144 proteininin floresan boya ile boyanması, bu boyanmanın ardından çeşitli görüntüleme yöntemleri ile *S. aureus* bakteri duvarına entegrasyonu literatürde ilk kez gerçekleştirilecektir. Bu çalışmalar ile bakteriyel enfeksiyon hedefli tedavi yaklaşımlarına yeni bir bakış açısının kazandırılması, faj-konakçı etkileşiminin aydınlatılmasında devam çalışmalarına temel oluşturulması, bakteriyofajların biyoteknolojik değerinin daha iyi anlaşılması, günümüzde var olan tedavi yaklaşımlarına cevap vermeyen dirençli suşların elimine edilmesinde yenilikçi bir stratejinin oluşturulması, bakterilerin sebep oldukları hastalıkların tedavisinde umut ışığı olması, nanopartikül temelli ilaç taşıma sistemlerinde rGp144'ün terapötik amaçlı ve ilaç hedeflemede kullanımının önünün açılmış olması amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Ülkemizde ve dünyada hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli sebeplerinden birisi olan ve konvansiyonel tedaviler ile yanıt alınması antibiyotik direnci geliştirmesi sebebiyle zor olan *S. aureus* suşunun elimine edilmesinde yenilikçi bir yaklaşım olarak, *S. aureus*'u spesifik bir şekilde tanıyarak enfekte eden Bakteriyofaj K'nın bu özgül tanımayı gerçekleştirdiği reseptör bağlayıcı proteini ile konjuge edilerek hedeflendirilmiş rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü tasarımının ilacın tek başına kullanımına göre daha etkin ve inovatif bir tedavi yöntemi olacağı öngörülmektedir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Bakteriler

Yaşamın en temel birimi olan hücre, yapısal olarak prokaryot ve ökaryot olmak üzere iki temel gruba ayrılır. Her tip hücrenin ortak 3 temel bileşeni vardır: hücre zarı, sitoplazma ve genetik materyal [19]. Ökaryotlarda hücreyi kompartmanlara ayıran, özelleşmiş biçim ve görevleri olan çok sayıda zarlı organel bulunmasına karşın prokaryotik hücreler zarlı organellere sahip değillerdir [20]. Neredeyse tüm prokaryotlarda hücreyi koruyan ve şekil veren hücre duvarı yapısı ve bu hücre duvarını saran, kapsül adı verilen protein ve polisakkarit tabaka bulunmaktadır. Bazı prokaryotlarda birbirlerine ve/veya substratlarına tutunmalarını sağlayan ipliksi yapılar, fimbria bulunur. Hareket kabiliyeti sağlayan kamçılar, prokaryot hücrenin bir ucuna veya her iki ucuna birden toplanmış şekilde bulunabilir [20].

Nükleus yapısına sahip olmadıklarından genetik materyalleri nükleoid adı verilen, sitozolde bir bölgede bulunur [20]. Bakterilerde kalıtsal madde, bakterinin yaşamsal tüm genlerini içeren, halka biçiminde ve çift sarmal bir DNA molekülüdür. Çoğunda DNA molekülü halkasal olmakla beraber bazı bakterilerde, örneğin; *Borrelia burgdorferi*, doğrusal biçimli DNA moleküllerine de rastlanmaktadır. Ayrıca *Rhodococcus fascians* gibi bazı bakterilerde iki adet DNA molekülüne rastlanmıştır. *Agrobacterium tumefaciens*, iki adet DNA molekülü içerir ve bu moleküllerden biri halkasal diğeri doğrusaldır. Bakterilerde genomu oluşturan esas DNA molekülü dışında, bazı türlerin sayıları bir veya daha fazla olan küçük, halkasal (nadiren doğrusal) çift iplikli DNA molekülleri de bulunabilmektedir. Plazmit denilen bu moleküller, bakterilerin yaşamsal genlerini taşımazlar ancak onlara avantaj kazandıracak genler taşırlar. Az sayıda plazmidin yaşam için zorunlu genler içerdiği bilinmektedir [20], [21].

Bakteriyel hücre döngüsü genom replikasyonunu, replike olan kopyaların yavru hücrelere dağılımını ve ardından hücre bölünmesini içerir. Genetik materyalin bu şekilde aktarımı dikeydir. Ek olarak genetik bilgi transformasyon, konjugasyon ve

transdüksiyon ile yatay olarak da aktarılabilir ve bu üç durumda genetik bilgi farklı hücreler veya türler arasında kalıtılmış olur. Optimal koşullar altında bazı türler, hücre döngülerini her 20 dakikada bir tamamlayabilir ve bu durum tek bir hücreden yalnızca 10 saatte bir milyardan fazla hücre oluşabileceği anlamına gelmektedir [19].

2.1.1 Bakterilerin Keşfi ve Mikrobiyolojinin Gelişimi

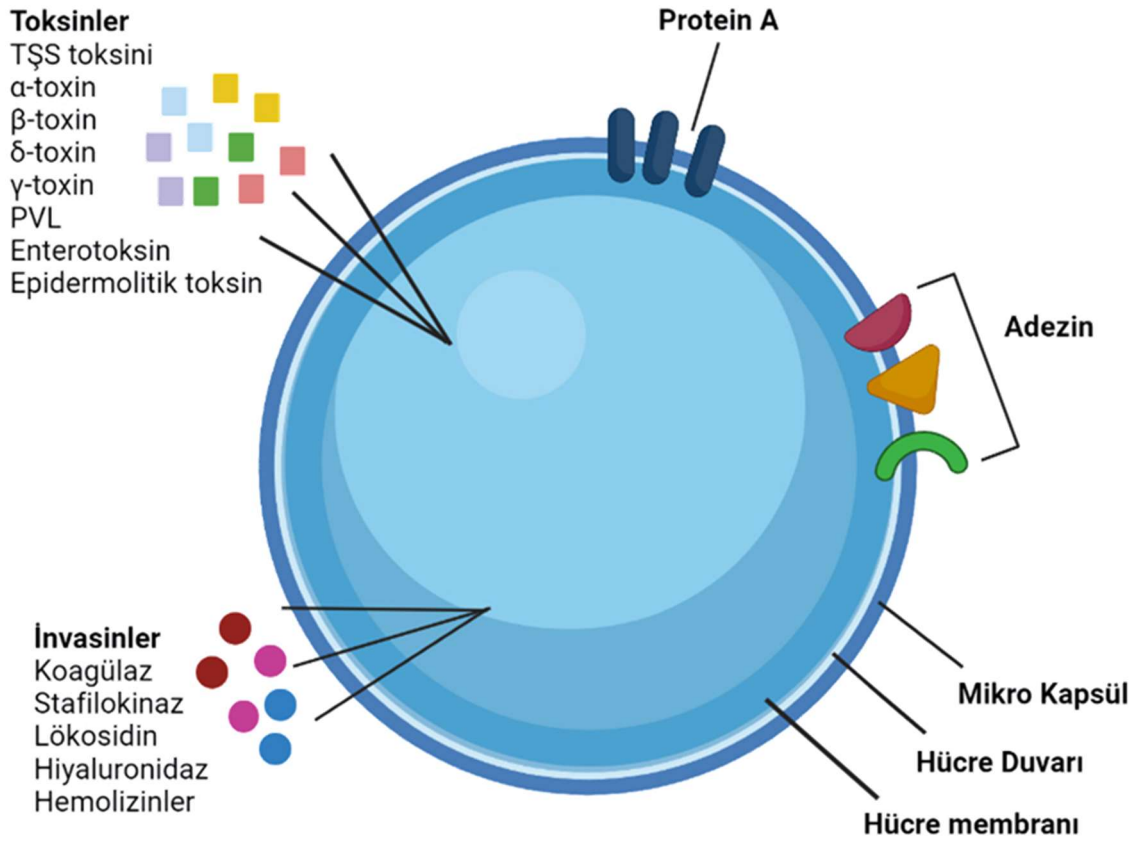
Küçük, çıplak göz ile görülemeyen canlıların varlığından, mikroskobun Robert Hook (1635-1703) tarafından icat edilmesinden önce de şüphelenilmekteydi. Robert Hook'un yazdığı Micrographia adlı kitabında çeşitli mikroorganizmaların yapısından bahsedilse de en küçük mikrobiyal hücreler olan bakterileri ilk kez Antony van Leeuwenhoek (1632-1723) gözlemlemiş ve bakterileri "küçük hayvancıklar" olarak tanımlamıştır. 19. yüzyılın ortalarında Ferdinand Cohn (1828-1898), bakterilerin ısıya direnç profilleri ile ilgilenmiş, endospor yapısının oluşumunu keşfetmiş ve çalışmaları bakterilerin sınıflandırılmasına yönelik ilk adımların atılmasını sağlamıştır [22]. Mikrobiyolojinin en önemli iki isminin çalışmalarıyla bu alandaki ilerlemeler ivmelenmiştir: Louis Pasteur (1822-1895) ve Robert Koch (1843-1910). Eğitimli bir kimyacı ve spontan generasyonun güçlü bir karşıtı olan Louis Pasteur, sterilizasyon yöntemlerinin gelişmesini sağlamış; alkolik fermantasyonun mekanizmasını keşfetmiş; şarbon, tavuk kolerası, kuduz hastalıklarına karşı aşı geliştirmiş, büyük buluşları ve sayısız çalışmaları ile prensipleri Robert Koch tarafından geliştirilmiş olan hastalığın germ teorisi kavramına katkı sağlamıştır [23]. Enfeksiyon hastalıkları kavramını geliştirmiş olan Robert Koch, bakterilerin hastalıklarla ilişkisi üzerine çalışmış ve özellikle *Bacillus anthracis*'in etmeni olduğu inek şarbonu üzerine araştırmalarını sürdürmüştür. Bakterileri saf kültür olarak elde etmek için metotlar geliştirmiş, mikrobiyal taksonomiye katkı sağlamış ve tüberküloza neden olan *Mycobacterium tuberculosis* bakterisini keşfederek başarılarını taçlandırmıştır [22].

Mikrobiyolojinin başlangıcında oluşturulan teknikler, keşfedilen organizmalar, geliştirilen temel prensipler ve tıbbi bakış açıları, yirminci yüzyıla girildiğinde çalışmaların daha fazla genişlemesine olanak sağlamıştır. Kültürleme teknikleri, çeşitli bakterilerin izolasyonu ve metabolizmalarının anlaşılması, metabolik

süreçlerle ilgili çalışmalar ve dahası, modern mikrobiyolojinin gelişimine katkı sağlamış, günümüzdeki çalışmalar bu temellerin üzerine oturtulmuştur [22].

2.2 *Staphylococcus aureus*

Stafilokok cinsi bakteriler; Eubacteria âlemi, Firmicutes şubesi, Bacilli sınıfı, Bacillales takımı, Staphylococcaceae ailesi içerisinde yer alırlar [24]. Kuruluğa dirençlidirler, havadaki ve yüzeylerdeki toz partikülleri içinde kolayca yayılabilirler. İnsanlar için önemli iki türü vardır; pigmentsiz, genellikle deri ve müköz zarlarda bulunan *Staphylococcus epidermidis* ve sarı pigmentli olan *Staphylococcus aureus* [22].



Şekil 2.1 *Staphylococcus aureus* temel bileşenleri ve yapısı [25]–[27]

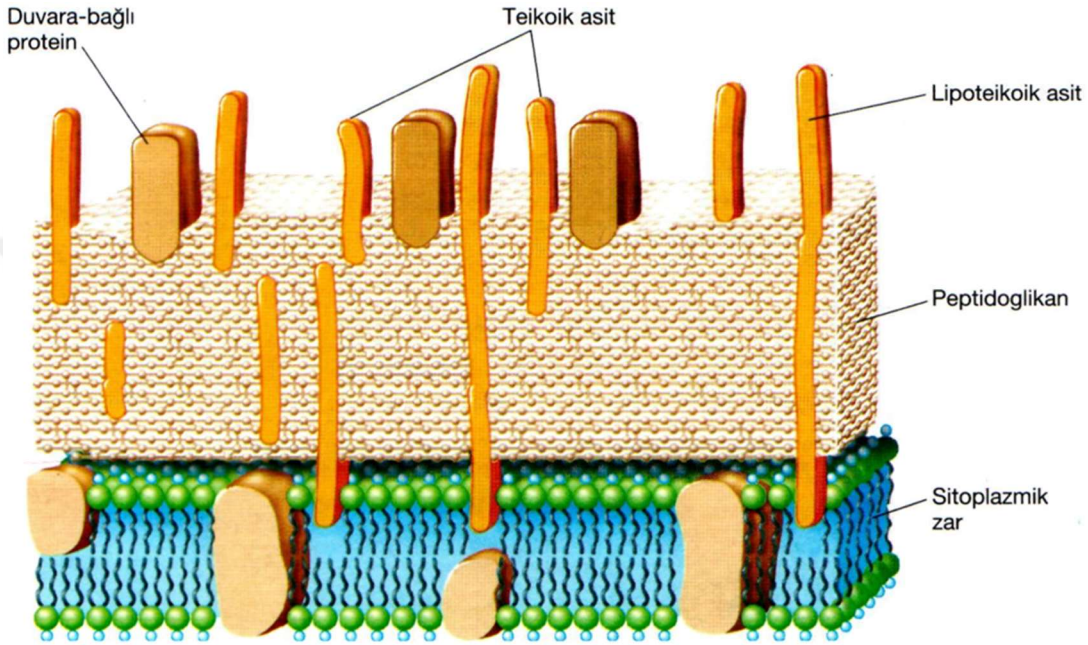
S. aureus, 0.8-1.0 μm çapında, fakültatif anaerobik, kok yapılı ve üzüm salkımı olarak tanımlanan kümeler halinde üreme eğiliminde olan Gram pozitif bakteridir (Şekil 2.1). Kolonileri genellikle altın veya sarı renklidir (aureus kelimesi Latince'de altın anlamına gelir) [22], [28]. 37 °C'de ve pH 7.4'te optimal olarak büyür. İlk olarak 1880 yılında İskoçya'nın Aberdeen kentinde cerrah Alexander

Ogston tarafından ülserli yaraları olan hastalarda keşfedilmiştir [29]. *S. aureus*, insan ve hayvanların normal florasında özellikle üst solunum yolları ve deride yaygın olarak bulunur ancak duyarlı kişilere taşınması durumunda hayatı tehdit eden patojenlere dönüşebilirler. Deride, yumuşak dokularda, endovasküler bölgelerde, iç organlarda ve yara bölgelerinde çeşitli enfeksiyonlara sebep olabilirler [30], [31]. Yüzeysel cilt enfeksiyonları, impedigo, endokardit, osteomiyelit, akne, çıban, septik artrit, bakteriyemi ve toksik şok sendromu gibi ciddi hastalıklara neden olabilen *S. aureus*, nozokomiyal enfeksiyonların en önde gelen ajanıdır [22], [32].

S. aureus, konakçı savunmasından korunmasını sağlayan Protein A, kapsüler polisakkarit, lökosidinler; konakçıya zarar vermesine sebep olan α-toxin, β-toxin, δ-toxin, γ-toxin, enterotoksin, toksik şok sendromu toksini, epidermolitik toksin; ekstrasellüler proteinler olan koagülaz, stafilokinaz ve enzimler olan proteaz, lipaz, DNaz, hemolizin, lökosidin ve yağ asidi modifiye edici enzimi salgılar [33], [34]. Salgıladığı virülans faktörleri, konakçı hücrelere bağlanmaya, konakçının bağışıklık kalkanını parçalamaya, doku istilasına ve toksin aracılı sendromlara yol açmaya yardımcı olur [35]. Ürettiği enzimlerden birisi olan koagülaz, fibrin pıhtılaşma enzimidir ve fibrinin *S. aureus* hücrelerininin yüzeyinde birikmesini sağlar. Bu sayede bakteri, konakçı hücrenin immün sistem elemanlarından kaçabilir. Ortaya çıkan fibrin ağı, koagülaz pozitif *S. aureus* sebepli enfeksiyonların doğasını oluşturur ve biyokimyasal tanımlamalarda kullanılabilir. Koagülaz pozitif *S. aureus*, koagülaz negatif stafilokokal suşlar ile karşılaştırılınca daha az virülanttır [22], [34], [28]. *S. aureus* suşlarının ürettiği hemolizinler, konakçı hücrenin zarına zarar verir ve hücre lizizine sebebiyet verir. Bazı *S. aureus* türleri iki polipeptit zincirinden oluşan, insan lökositlerine zarar veren Panton-Valentine lökosidinini (PVL) salgılarlar [31]. Gıda zehirlenmeleriyle ilişkili enterotoksinler, *S. aureus* kaynaklı bir diğer virülans faktörüdür. H_2O_2'yi H_2O ve O_2'ye dönüştürebilen katalaz enzimi, virülans faktörü olarak değerlendirilmez ancak bütün stafilokoklar tarafından üretilir [22].

2.2.1 *S. aureus* Hücre Duvarı Yapısı

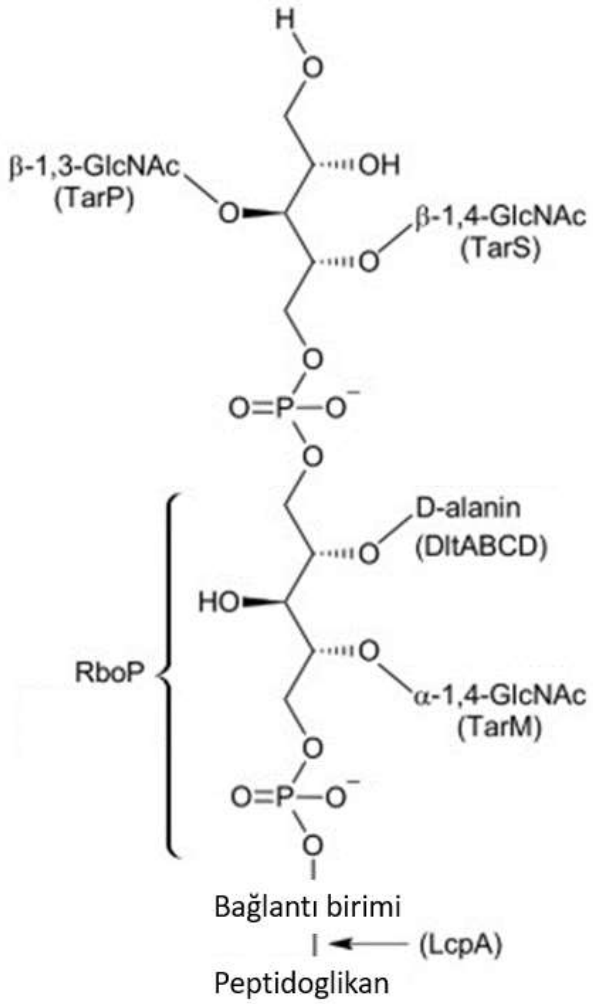
Hücre duvarı, *S. aureus* ve insan konakçı arasındaki arayüzü oluşturur ve sadece bakterinin yaşayabilirliği için gerekliliği bakımından değil konakçı bağışıklık sistemi ile etkileşime girmesi sebebiyle de önem arz eder [36]. *S. aureus* hücre duvarı mürein, teikoik asit ve duvar ilişkili yüzey proteinlerinden oluşur (Şekil 2.2). Mürein, peptidoglikan tabakadan meydana gelir [37].



Şekil 2.2 Gram pozitif bakteri hücre duvarının yapısı [22]

Peptidoglikan, hücre duvarının %90'ı olan ana bileşenidir ve çift tabaka fosfolipitten oluşan sitoplazmik zarı çevreleyen makromoleküldür [36]. N-asetilglukozamin (NAG), N-asetilmuramik asit (NAM) olmak üzere iki tip şekerden ve D-alanin, D-glutamik asit veya L-lizin ya da yapısal olarak benzer bir molekül olan diaminopimelik asit (DAP) aminoasitlerinden oluşur [22]. β-1,4-glikosidik bağı ile bağlanan NAM ve NAG, çapraz bağlar yapan kısa peptid ara köprüleri ile glikan tetrapeptid yapısını oluştururlar ve bu yapı tekrarlanarak peptidoglikan yapısını meydana getirir. Çapraz bağlar hücre duvarına üç boyutlu bir yapı kazandırmanın yanı sıra, duvarın güçlü ve sert olmasını sağlarlar. *S. aureus*'ta peptid çapraz köprüsü beş adet glisin aminoasidinden meydana gelir [22], [36].

Duvar teikoik asitleri (DTA), peptidoglikan tabakadaki muramik asitlere kovalent olarak bağlıdır. Çoğu *S. aureus* suşunun teikoik asit birimleri, bir poli-alkol olan ribitol molekülünün D-alanin ve N-asetil-D-glukozamin (GlcNAc) ile bağlanmasıyla oluşan ribitol fosfat birimlerinin tekrarlanmasıyla meydana gelen poliribitol fosfat (Rbo-P) yapısındadır (Şekil 2.3) [22], [38], [39].



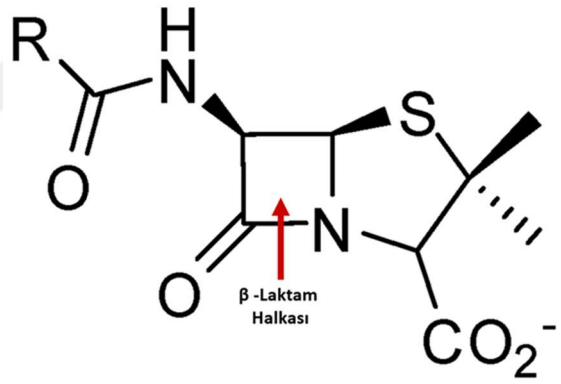
Şekil 2.3 *S. aureus* duvar teikoik asiti [40]

Fosfatın negatif yüklü oluşu sebebiyle teikoik asitler, hücre yüzeyinin negatif yük ile yüklenmesinden kısmen sorumludurlar. Lipoteikoik asit olarak adlandırılan bazıları, zar lipidlerine kovalent olarak bağlıdırlar. Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi iki değerli katyonun hücreye taşınımları sırasında bağlanmasında rol oynarlar [22]. DTA'ların bakteri fizyolojisi, antimikrobiyal moleküllere direnç, konak etkileşimi, virülans ve biyofilm oluşumunda önemli rolleri bulunmaktadır [39].

2.2.2 Antibiyotik Direnci

Penisilin, 1929'da Alexander Fleming tarafından *Penicillium chrysogenum* fungusundan izole edilen, stafilokokal ve pnömokokkal enfeksiyonlara karşı etkili bir silah olduğu bulunan ilk β-laktam antibiyotiktir [22], [35]. Gram pozitif bakterilere karşı esas olarak Penisilin G etkilidir [22]. Tüm β-laktam antibiyotikler, bu bileşiklerin biyolojik aktivitesi için gerekli olan dört üyeli β-laktam halkasına sahiptir (Şekil 2.4) [41].

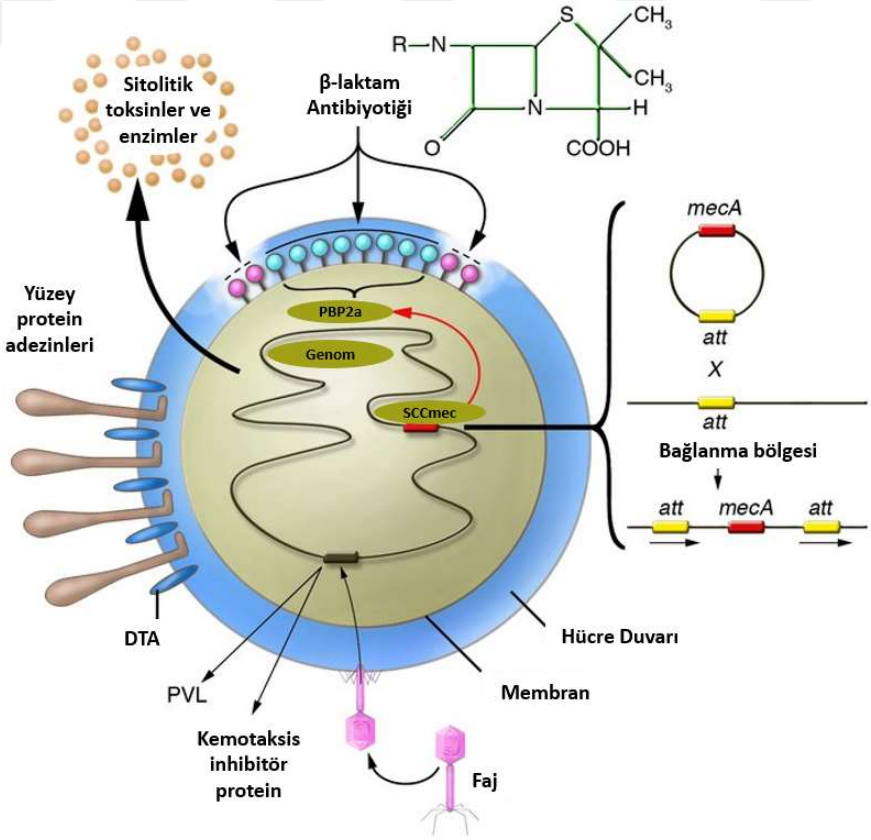
Penisilinin etki mekanizması üzerine yapılan çalışmalar, penisilinin bakteri hücre duvarlarının merkezi bileşeni olan peptidoglikanın çapraz bağ yapmasını sağlayan transpeptidasyon reaksiyonunu engellediği keşfedilmiştir [42]. Penisilin hedefi olan peptidoglikan ipliklerinin transpeptidasyonuna aracılık eden enzimler bu nedenle penisilin bağlayıcı proteinler (PBP'ler) olarak adlandırılmıştır. β-laktamların PBP'lere bağlanması, uzun süreli açil-enzim komplekslerinin oluşumuna yol açar, bu sayede enzimlerin aktivitesini bloke eder [41].



Şekil 2.4 Penisilinin kimyasal yapısı [42]

Hastanelerde penisilin 1943'te yaygın olarak kullanılmaya başlanmış, penisilin ve penisilin türevli antibiyotikler birçok hayat kurtarmıştır. Ancak, 1945 yılına gelindiğinde hastanelerde görülen *S. aureus* suşlarının %20'sinden fazlası penisiline karşı direnç geliştirmiştir [20]. Bu suşlar, penisilinin β-laktam halkasını enzimatik olarak parçalayarak antibiyotiği etkisiz hale getiren, gen bölgesi plazmitte taşınan β-laktamaz enzimi olan penisilinazı üretmektedirler. 1950'lerde penisilin direnci *S. aureus*'un yalnızca hastane izolatlarında görülürken 1960'ların sonunda hastane kökenli olup olmadığına bakılmaksızın *S. aureus* izolatının %80'inden fazlasının penisilinaz geninin (blaZ) plazmit transferi ve dirençli

suşların klonal yayılımı nedeniyle penisiline direnç geliştirdiği belirtilmektedir [35], [43]. Bu direnç gelişimine karşı hastalıkla mücadelede yeni bir antibiyotik, penisilinazın enzimatik indirgenmesiyle oluşturulan ve β-laktamaza dirençli yarı sentetik bir penisilin olan metisilin keşfedilmiştir [22], [35]. 1961 yılında kliniklerde kullanılmaya başlanan metisilin, bir yıldan kısa bir süre içerisinde *S. aureus*'un direnç geliştirdiği bir antibiyotik haline gelmiştir. Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları, hastane kaynaklı bir patojen olarak ortaya çıkmıştır. Metisiline direnç mekanizması 1981 yılında ortaya çıkarılmıştır [35], [43], [44]. *S. aureus*'taki metisilin antibiyotiğine karşı direnç, penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) ile ilişkilendirilir [45]. β-laktam antibiyotikleri, doğal olarak oluşturulan dört PBP'yi inaktive eder ve proteinlerin bakteri hücre duvarını oluşturan peptidoglikan zincirlerinin sentezi için yönlendirdiği reaksiyonlar bloke edilmiş olur [46]. Metisiline direnç geliştiren *S. aureus* suşlarında ise penisilin bağlayıcı protein 2a (PBP2a) ve PBP2c enzimleri kodlanır ve bu proteinlerin kodlanmasına sırasıyla mecA ve mecC genleri aracılık etmektedir. mecA ve mecC, hemen hemen tüm β-laktam antibiyotiklere direnç sağlayabilmektedir (Şekil 2.5) [43].



Şekil 2.5 *S. aureus*'un metisilin direnç mekanizması [27], [47]

MecA geni, stafilokokal kaset kromozom mec (SCCmec) üzerinde yer alır ve mecC geni mecA'nın homoloğu olarak 2007'de keşfedilmiştir [48]. PBP2a ve PBP2c, β-laktam antibiyotiklerine karşı düşük afinite gösterir, dolayısıyla β-laktam antibiyotiklerinin varlığında inhibe edilmezler ve peptidoglikan biyosentezi devam edebilir [45], [46].

Dünyada hastane kaynaklı enfeksiyonların artmasının en önemli nedenlerinden biri olan *S. aureus* ve dirençli suşlarının ülkemizdeki mevcut durumunu değerlendirdiğimizde, metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokoklar hastane enfeksiyonlarında ikinci (%85,99) ve metisilin dirençli stafilokoklar yedinci (%48,19) sırada yer almaktadırlar [3]. MRSA suşları zamanla vankomisine karşı düşük miktarda duyarlılık geliştirmişlerdir ve bu suşlara vankomisin orta dirençli *S. aureus* (VISA) denilmektedir [22]. Çoklu ilaç direnci (MDR), bakterilerin tür içerisinde ve başka türlerle de gen alışverişi yapmasıyla olmaktadır. Böylece günümüzde çoklu ilaç direncine sahip suşlar mevcuttur [20].

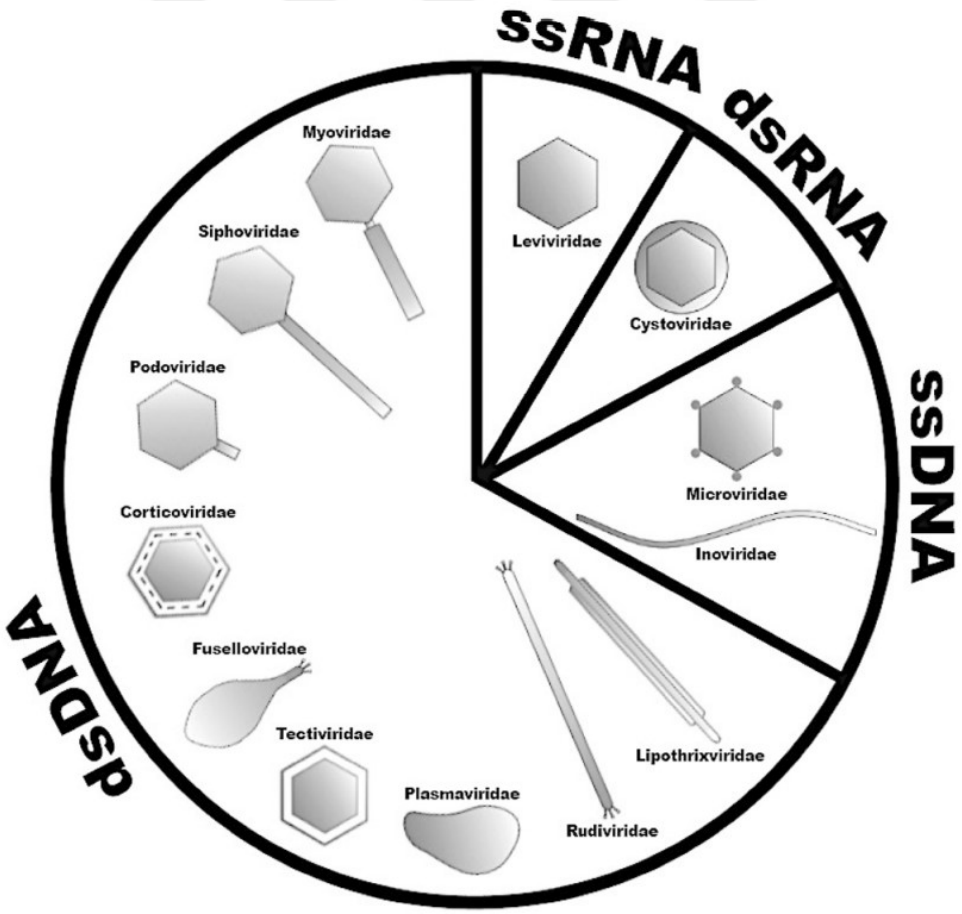
2.3 Bakteriyofajlar

Canlı veya cansız olarak tanımlanması tartışılan bir konu olan virüs, Latince'de "zehir" anlamına gelmektedir. Virüsler, kalıtsal materyal bulundurduklarından ve biyosferdeki en bol biyolojik kopyalayıcılar olduklarından önemli bir yere sahiptirler [19]. Virüsler, konak hücreleri arasında yayılmayı virion adı verilen ekstraselüler formları ile gerçekleştirirler. Kendilerini çoğaltabilmeleri için konaklarına ihtiyaç duyarlar ve konağın içerisine girerek kopyalarının üretilmesi işlemine enfeksiyon denilir [22], [49]. Kalıtsal madde olarak tek çeşit nükleik asit molekülüyle onu çevreleyen, kapsit adı verilen protein yapısında bir kılıftan ibaret olan virüsleri farklı özelliklerine (biçim, konak organizma grubu, serolojik özellik, içerdikleri nükleik asit çeşidi vb.) göre sınıflandırmak mümkündür. Genetik açıdan yapılacak sınıflandırmaya göre virüsler, içerdikleri kalıtsal molekülün çeşidine göre tek veya çift sarmallı, DNA virüsleri ve RNA virüsleri olarak gruplandırılırken enfekte ettikleri konaklarına göre de bitki virüsleri, arke virüsleri, hayvan virüsleri, protozan virüsleri, bakteri virüsleri (faj) gibi tanımlanabilirler [21] [22].

Bakteriyofajlar, gezegenimizde en bol bulunan biyolojik varlıklardır, bilinen her ortamda bakteri konaklarını tüm virüsler gibi spesifik bir şekilde enfekte eder ve

bakteriyel adaptif evriminde, patojenitesinin gelişiminde itici güçleridir [50], [51]. İnsan gastrointestinal sisteminden küresel okyanusa kadar keşfedilen her biyomda, aynı zamanda okyanus tabanı ve Orta Çağ fosilleşmiş dışkı örneği gibi dikkat çekici yerlerde bulunurlar. Boyut, morfoloji ve genomik organizasyon açısından son derece çeşitlidirler [8], [7].

Morfolojik açıdan bakteriyofajların çoğunluğu, genetik materyalini saran bir ikosahedral protein kapsitten, bir kuyruktan ve bakteri yüzeyindeki spesifik reseptörleri tanımayı sağlayan reseptör bağlama proteinlerinin yer aldığı, taban plakasında bulunan kuyruk liflerinden oluşmaktadır. Genetik materyalin türüne göre bakteriyofajlar Şekil 2.6'te gösterildiği gibi, dört gruba ayrılabilir: tek sarmallı DNA fajları (ssDNA), çift zincirli DNA fajları (dsDNA), tek sarmallı RNA fajları (ssRNA) ve çift sarmallı RNA fajları (dsRNA) [50]. Faj taksonlarının taksonomik sınıflandırması, Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) tarafından gerçekleştirilir [8].



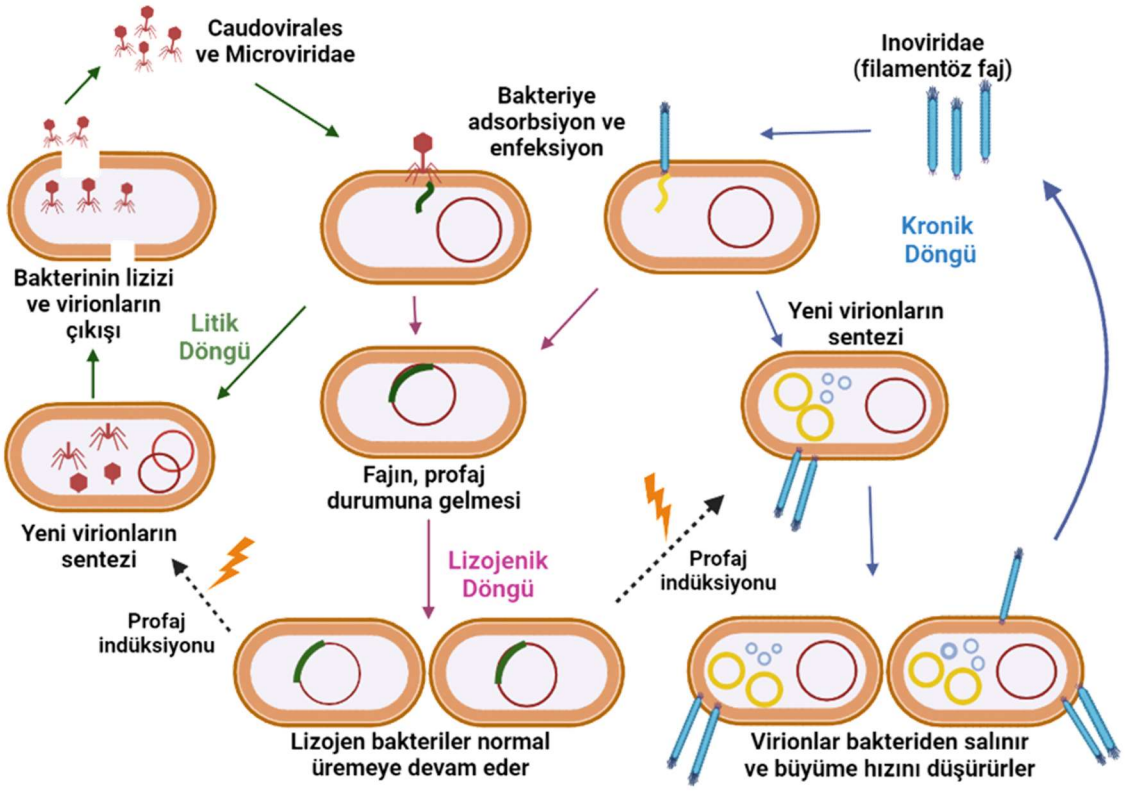
Şekil 2.6 İçerdikleri genetik materyalin türüne göre bakteriyofajların sınıflandırılması [50]

2.3.1 Yaşam Döngüleri

Bakteriyofajların temelde iyi anlaşılmış litik ve lizojenik olarak iki yaşam döngüsü bulunmasının yanı sıra kronik ve psödo-lizojenik olarak isimlendirilen yaşam döngüleri daha bilinmektedir (Şekil 2.7). Litik döngüyü izleyen faj virülent bir fajdır, konak hücresine tutunmasının ardından fajın nükleik asidi hücreye girer, yüzlerce faj kopyası bakteride üretilir ve faj partikülleri hücreyi lizize uğratarak ortama salınırlar [52]. Holin ve lizin gibi peptidoglikan tabaka yapısını bozabilen proteinlerin ekspresyonu ile karakterizedir. Bakteri konakçısı, faj partiküllerini sentezleyen fabrika gibi işlev görür [53]. Lizojenik döngüyü takip eden fajlar, ılımlı fajlardır. Ilımlı fajların DNA'sı bakteri kromozomuna entegre olur ve entegre DNA (profaj), artık bakteri genomunun bir parçası olarak dikey bir şekilde nesillere aktarılır. Ilımlı fajlar, genetik materyallerinin, transpozisyon ile rastgele bölgelere veya rekombinasyon ile bağlanma bölgeleri denilen belirli yerlere girişini sağlayabilir. Lizojenik döngüde, litik döngüden sorumlu olan protein genlerinin liziz baskılayıcılar (CI, CII, CIII represörleri) tarafından baskılandığı görülmektedir [52], [53]. Çeşitli stres durumlarında profaj bakteri genomunda entegre olduğu bölgeden çıkabilir ve litik döngüye devam edebilir [30]. Psödo-lizojeni, düşük beslenme düzeyinin hakim olduğu büyüme koşullarında gerçekleşen faj-bakteri etkileşim şekillerinden biridir [53], [54]. Böyle bir stres altında, psödo-lizojenik fajlar ne litik döngüde olduğu gibi hücreleri parçalayarak çoğalırlar, ne de lizojenik döngüde olduğu genomlarını konakçı ile bütünleştirirler. Bunun yerine, bakterinin enerji eksikliği nedeniyle, konakçının replikasyon sürecini engellerler. Psödo-lizojenide duraklama dönemi yaşandıktan sonra koşullar düzelir ise, fajlar daha yaygın replikasyon döngülerinden birine geri dönebilirler [53].

Filamentli fajların bazılarında meydana gelen kronik yaşam döngüsü bakterinin ölümü ile sonuçlanmadan, yeni oluşan faj partiküllerinin bakteriden sürekli olarak salınması ile gerçekleşir. Filamentli fajlar, biyofilm oluşturmada yardımcı olduklarından, toksinleri ve diğer virülent faktörleri bakteri konağına aktarabileceklerinden dolayı bakterileri desteklerler. Kronik yaşam döngüsünü takip eden faj tarafından enfekte olmuş konakçı bakteriler, yavaş bir oranda büyüme yeteneğine sahiptirler [55]. Litik, lizojenik ve psödo-lizojenik fajlar,

replikasyon döngüsünün bir noktasında öldürücü hale gelirken kronik fajlarda durum böyle değildir. Kronik fajlar, lizize neden olmadan bakteri zarından tomurcuklanır. [53], [56].



Şekil 2.7 Bakteriyofajların litik, lizojenik ve kronik yaşam döngüleri [27], [55]

2.3.2 Bakteri-Bakteriyofaj Etkileşimi/Tutunma

Her bakteriyofajın yaşam döngüsünün ilk basamağı, takip ettiği yaşam döngüsü çeşidi farketmeksizin bakteri konakçısına tutunmaktır. Bu tutunma işlemi, fajın konakçısının yüzeyindeki spesifik reseptörler (lipopolisakkaritler, teikoik asitler, proteinler ve flagella gibi) aracılığı ile gerçekleşir. Bakteri hücre yüzeyinde bulunan reseptörün özgüllüğü nedeniyle, fajlar yalnızca belirli konakçıları enfekte edebilir [22], [57]. Fajın kuyruğun uç kısmında bulunan reseptör bağlayıcı proteini ile konak hücrenin yüzeyinde bulunan bir reseptör arasındaki tanımanın özgüllüğü bakterideki reseptörlerin yapısı ile ilişkili olarak meydana gelen adsorpsiyon özgüllüğü ile ilişkilidir. Bu reseptörlerin lokalizasyonu, hacmi ve yoğunluğu, tanıma sürecinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Faj tarafından

tanınan hücre yüzeyi reseptörleri, protein reseptörleri (OmpA ve OmpC), lipopolisakarit (LPS) reseptörleri, kapsüler polisakaritlerde (Vi-antijen), pili ve flagella'da bulunan reseptörleri içerebilir [52].

Bakterinin Gram negatif veya Gram pozitif oluşu, büyüme koşulları ve virülansı fajın konağın yüzeyine bağlanmasını etkiler. Gram negatif bakterileri dış zarı, besinlerin taşınması ve difüzyonu için dış lipopolisakarit (LPS) tabakasına ve gömülü dış zar proteinlerine (OMP'ler) sahiptir. Genellikle bu yapılar faj reseptörleri olarak işlev görürken Gram pozitif bakteri hücre duvarında bulunan teikoik asitler genellikle fajlar için reseptör görevi görür [57].

Bakteri yüzeyinde reseptörün bulunmaması veya mutasyon sonucunda değişikliğe uğraması, fajın bağlanmasını bloke eder. Bu sayede herhangi bir fajın konakçı spektrumu, öncelikli olarak bakteride faja ait uygun bir reseptörün varlığı ile ilişkilidir [22]. Bakterilerde var olan ve fajların etkileşimine aracılık eden reseptörler, enzimler, taşıma proteinleri, yapısal proteinler, porinler, flagella gibi hücrede fonksiyonel olarak kullanılan moleküllerdir. Örneğin *E. coli*'yi enfekte eden T1 fajı hücrede demir alımından sorumlu bir proteini reseptör olarak kullanırken aynı bakteriyi enfekte eden bakteriyofaj lambdanın kullandığı reseptör hücrede maltoz alımında görev almaktadır. Bakteri-bakteriyofaj etkileşimine aracılık eden reseptör fark etmeksizin, tutunma bir kez gerçekleştiğinde, enfeksiyon başlamış olur [22], [52].

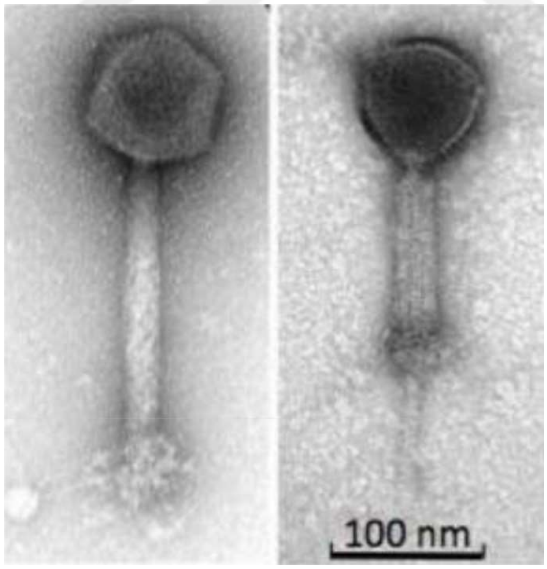
Bakteriyofaj adsorpsiyonu; ilk temas, geri dönüşümlü bağlanma ve geri dönüşümsüz bağlanma olmak üzere genellikle üç adımdan oluşur. İlk temas, ortam koşulları sebebiyle oluşan difüzyon ve akışın neden olduğu faj ve konak arasındaki rastgele çarpışmalardır. Geri dönüşümlü bağlanma adımında, bakteri reseptörlerine bağlanma kesin değildir ve faj konakçıdan ayrılabilir. Bu süreç, fajın spesifik olduğu reseptörü ararken yaptığı bağlanmaları içermektedir. Son olarak bakteriyofaj, spesifik olduğu reseptörü bulduğu zaman, konağa geri dönüşümsüz bağlanmayı gerçekleştirir [58]

Konak reseptörüne başarılı bir şekilde tutunmanın ardından, ATP harcanmasıyla fajın bazal plakasında konformasyonel değişiklik meydana gelir ve faj kılıfı kasılır, faj nükleik asidini konakçıya aktarır ve dışarıda boş kapsit kalır [20], [52].

Tutunmanın ardından meydana gelen penetrasyon süreci, farklı faj türleri arasında değişkenlik gösterir. Fajın genetik materyali, hücre içi sistemleri kullanarak viral ve konakçı enzimleri aracılığıyla kopyalanır ve faj proteinlerinin sentezi gerçekleştirilir. Fajın baş, kuyruk ve kuyruk lifleri yapıları oluşturulduktan sonra faj genomu içine paketlenir [20].

2.3.3 Bakteriyofaj K

Bakteriyofaj K, çeşitli stafilokoklara karşı aktif olan, litik yaşam döngüsünü takip eden Myoviridae ailesinin polivalan bir fajıdır. Fajın genomu 148.317 baz çifti içerir ve lineer DNA yapısındadır (NCBI Ref Sekans: NC_005880.2). Genomu; yapısal proteinler, liziz, DNA replikasyonu ve transkripsiyon için gerekli proteinleri kodlayan modüler bir biçimde organize olmaktadır. Faj K; DNA ligaz, primaz, helikaz, polimeraz, RNaz H ve DNA bağlanan proteinler dahil olmak üzere kendi replizomu için gerekli proteinleri kodlama potansiyeline sahiptir [10]. Listeria faj A511 genomu ile yapısal olarak yüksek homoloji gösterir. Yapısal olarak uzun kontraktil kuyruğa, ikozahedral bir başa ve bazal plaka kısmından çıkan kuyruk fibrillerine sahiptir [59].



Şekil 2.8 Bakteriyofaj K TEM mikroskop görüntüsü [59]

Elektron mikroskobu ile karakterize edilen bakteriyofaj K; yaklaşık 70 nm ikozahedral bir baş, 210 nm uzun ve 15 nm kısa kontraktil kuyruktan oluşur (Şekil 2.8) [60]. Hem koagülaz negatif hem de koagülaz pozitif stafilokoklara karşı aktiviteye sahiptir ve adsorbsiyon için RBP'si Gp144, duvar teikoik asitlerinin

GlcNAc birimlerini hedefler [10]. DTA'lar, birincil stafilokokal faj reseptörüdür. Çoğu *S. aureus* suşu, D-alanin ve N-asetilglukozamin (GlcNAc) taşıyan, poliribitol fosfat (Rbo-P) tipi DTA'ya sahiptir. Genelde poli- 1,3 gliserol fosfat (GroP) veya poli- 1,5 ribitol fosfat (RhoP) olmak üzere iki çeşit olan ve D-alanin, α-O-GlcNAc veya β-O-GlcNAc olmak üzere üç kısımdan oluşan DTA'lar birincil stafilokokal faj reseptörleridir [38], [61], [62]. Gram pozitif *S. aureus* fajlarından ϕ11, iyi bilinen Syphoviridae ailesindendir. ϕ11 fajının RBP'si olan Gp45 ile *S. aureus* bakterilerinin DTA'sının GlcNAc bakiyeleri arasındaki etkileşimin, fajın bakterilere adsorpsiyonunda anahtar bir role sahip olduğu kanıtlanmıştır [61]. Bakteriyofaj phi812'nin RBP'si olan Gp127'nin, *S. aureus*'un hücre duvarına girişi için gerekli olduğu kriyo-elektron mikroskopisi ve tomografi kullanılarak tanımlanmıştır. Phi812 ve bakteriyofaj K'nın protein sekans analiz sonuçları karşılaştırıldığı zaman; phi812 RBP'si Gp127 ile bakteriyofaj K RBP'si Gp144'ün sekans diziliminin %100 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir [63]. Faj K ile yapılan bir çalışmada, WTA'daki GlcNAc birimlerine bağlanarak *S. aureus* enfeksiyonunu gerçekleştirdiği gösterilmiştir [64].

2.4. Bakteriyofaj Temelli Biyoteknolojik Yaklaşımlar

Bakteriyofajlar, gezegenimizde en bol bulunan biyolojik varlıklardır, bilinen her ortamda belirli bakteri konaklarını enfekte ederler. Faj çalışmaları, potansiyel olarak yeni biyoteknolojik ürünlerin geliştirilmesine ışık tutmaktadır [50]. Bakteriyofajlar teşhis, iyileştirme ve hedeflenen mikrobiyom manipülasyonu için geniş kullanım alanı oluştururlar [65].

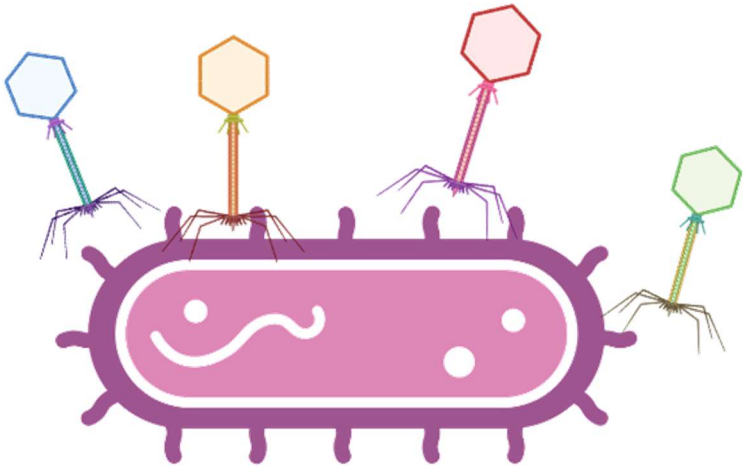
İlaç endüstrisinde antibiyotiklerin ortaya çıkmasıyla geliştirilmekte olan faj tedavileri terk edilmiştir. Bununla birlikte, ilaca dirençli bakterilerin yayılması ve yeni antibiyotiklerin keşfinin bakterilerin direnç kazanma hızlarına yetişememesi ve bu sebeple eksiklikleri ile bakterilere karşı faj kullanımı yeniden önem kazanmıştır. Bakteriyofajlar, bakterisidal etkileri, düşük toksisiteleri, yüksek özgüllükleri, yüksek replikasyon oranları, kolay depolanmaları ve antibiyotikler ile çapraz direnç göstermemeleri nedeniyle bu amaca hizmet edebilmektedirler. Fajlar, konaklarına son derece spesifik oldukları için kişinin yararlı yani onunla

yaşayan, gerekli olan bakterileri bu tedavi sırasında olumsuz etkilenmez ve insan hücreleri de bakteriyofajlardan doğrudan etkilenmez [66].

Biyoteknolojide bakteriyofajlardan; faj terapisinde, gen aktarımı çalışmalarında, ilaç hedeflemede, gıda koruma ve güvenliği alanlarında, bitki patojenlerinin biyolojik kontrolünde, faj display yönteminde, bakteriyel biyosensörler olarak, antibiyotikler ile uygulanmasıyla sinerjik etki oluşturmada, aşılar ve aşı taşıyıcıları, biyofilm ve bakteri üreme kontrolünde, yüzey dezenfeksiyonunda faydalanılmaktadır [50].

2.4.1 Faj Terapi

Bakteriyofajların enfeksiyon hastalıkları tedavisinde kullanılması fikri ve bu konudaki ilk çalışmalar Fransız bir mikrobiyolog olan Felix d'Herelle'e aittir. Bakteri-bakteriyofaj antagonistic simbiyozunu gözlemlemiş olan d'Herelle, enfeksiyon etkeninin hastaya verilen zenginleştirilmiş faj solüsyonlarıyla yok edilebileceğini göstermiş ve fajların tedavide kullanılmasını sağlamıştır [67]. 1900'lerin başından beri tıbbi amaçlarla kullanılmaktaydılar. Bakterilere karşı inflamatuar yanıtın gelişimini destekleyebilme yetenekleri sayesinde, bakterilerle enfekte olmuş hastalara faj kokteyllerinin uygulanması (Şekil 2.9), bakteri hücrelerinin doğrudan ortadan kaldırılmasının yanı sıra, enfeksiyona karşı savaşmak için ayrıca insan bağışıklık sistemini de harekete geçirebilmektedir. Fajların hedef bakterileri öldürme yeteneği, gıda endüstrisinde ve tarımda yani biyokontrol uygulamalarında süt ürünlerini, meyveleri, sebzeleri, etleri ve balıkları korumak için kullanılabilmektedir Application of Bacteriophages in Nanotechnology. Dünyada giderek artan bir şekilde çoklu dirençli patojenlerinin ortaya çıkması, antibiyotik öncesi çağa dönüleceğinin sinyallerini vermeye başlamakta ve bu sebeple alternatif tedavi yaklaşımlarından olan faj terapisi, enfeksiyon hastalıkların tedavisinde önemli hale gelmektedir [67].

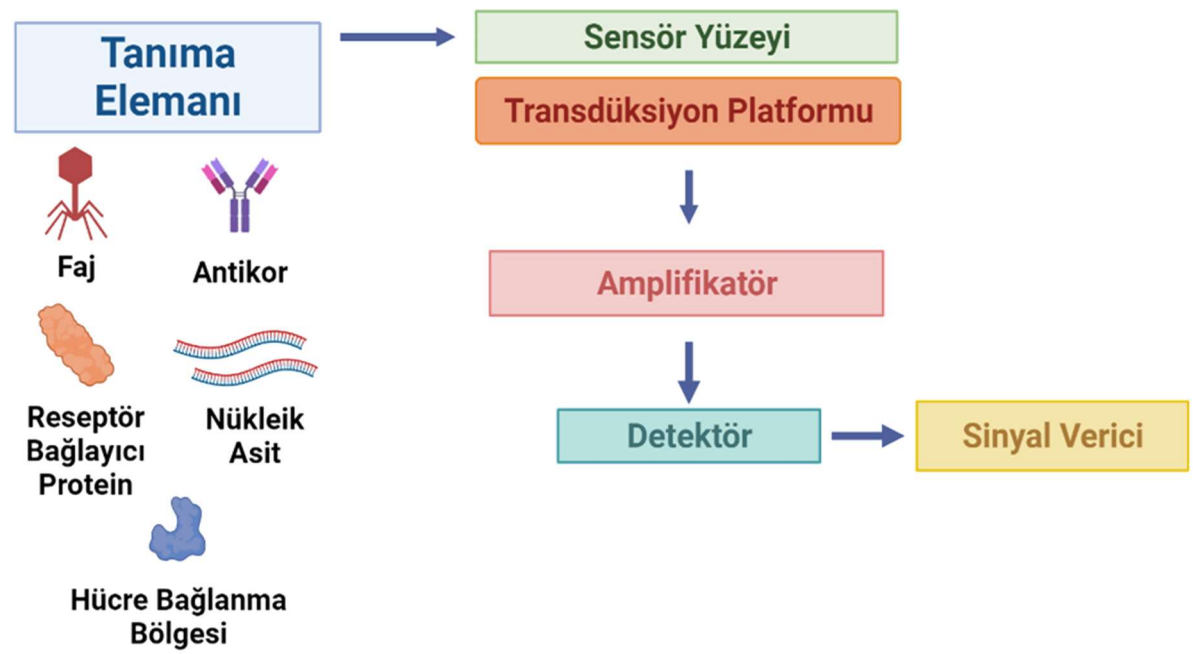


Şekil 2.9 Faj kokteyli [27]

Faj terapide en sık hedeflenen patojenlerden birisi *S. aureus*'dur. Enfeksiyonların kolayca yayılabildiği hastane ortamlarında yaygın olarak bulunan bir patojen olan *S. aureus*, artan antibiyotik direnci nedeniyle birçok tedaviye karşı duyarsız hale gelmiştir. Ortaya çıktığından beri halk sağlığı için bir tehdit olmaya devam eden metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) için durum özellikle zordur. *S. aureus* enfeksiyonu faj terapide en çok çalışılan durumlardandır. Yapılan bir çalışmada [68], *S. aureus* ile enfekte diyabetik ayak ülserinden şikayetçi altı hastaya faj terapisi uygulanmıştır. Terapi, *S. aureus* hücrelerini yok etmek için yeterli gelmiştir. Özellikle bunun gibi topikal uygulamalarda faj terapinin başarısının çok daha yüksek olduğu görülmektedir [69].

2.4.2 Biyosensör Çalışmalarında Kullanımı

Biyosensörlerde biyo-tanıma elemanları olarak fajların kullanılması, söz konusu bakterilerin hızlı, spesifik ve oldukça hassas tespitini sağlayan bir yöntemdir. Biyosensör sistemleri, bir tanıma elemanı, bir sensör yüzeyi, bir transdüksiyon platformu, bir amplifikatör, bir detektör ve bir sinyal vericiden oluşur (Şekil 2.10). Fajları tanıma öğeleri olarak kullanan sistemlerde, Salmonella'nın tespiti için altın bir yüzey üzerinde immobilize edilmiş faj M13, *E. coli* tespiti için T4 fajı, metisiline dirençli *S. aureus*'un saptanması için BP14 bakteriyofajı gibi bütün haldeki fajlardan oluşabileceği gibi bakterinin bağlanmasını sağlayacak reseptör bağlayıcı proteini gibi bir yapı da kullanılabilmektedir [52].



Şekil 2.10 Biyosensör tasarımı [27], [52]

2.4.3 Biyokontrol Çalışmalarında Kullanımı

Salmonella, Campylobacter, Listeria ve *E. coli*, gıda kaynaklı enfeksiyonlarda yaygın bakteriyel kontaminantlardır. Ekinlerdeki bakteriyel enfeksiyon, verimi azaltan ciddi bir problemdir. Tarım alanında birçok araştırmacı tarafından çoklu antibiyotiğe karşı yüksek direnç bildirilmiştir [70]–[73]. Enfeksiyondan kaçınmak için çeşitli ürünlerde (domates, narenciye ve soğan gibi) fajların uygulamasına ilişkin çalışmalar yapılmaktadır [74], [75]. *E. coli* ve Listeria monocytogenes kontaminasyonuna yönelik antimikrobiyal ambalajların üretiminde bakteriyofajlardan yararlanılmaktadır [76]. Gıda ürünlerindeki patojenlerin biyokontrolünde bakteriyofaj bazlı çalışmalar ekonomik olarak da uygun yöntemlerdir.

2.4.4 Faj Temelli Taşıyıcı Sistemler

Bakteriyofajlar ve faj alt birimleri, hem terapötik ajanların hem de tanıda kullanılabilecek moleküllerin belirli bölgelere hedeflendirilmesinde nanotaşıyıcılar olarak kullanılabilirler. Bakteriyofajların genetik mühendisliği teknikleri ile kolay manipüle edilebilir olması, reseptör bağlayıcı proteini gibi alt

birimleri ile konakçı bakteriye spesifik bir şekilde yönlendirilebilmesi onları özellikle ilaç taşımada ve gen aktarımında çok faydalı kılmaktadır [50].

Faj görüntüleme yönteminin geliştirilmesi, bu alandaki ilerlemeleri hızlandırmıştır. Ligand-reseptör etkileşimlerini araştırma ve tanımlama olasılığı, bulaşıcı hastalıklar ve kanser çalışmalarında ilerleme sağlamış, ilaç keşfinde, aşı tasarımında gelişmeler meydana getirmiştir. Lauster ve ark., bir faj kapsidinin doğal olmayan amino asitle (L-homopropargilglisin) modifikasyonunu gerçekleştirerek influenza A virüsünün spike proteinine bağlanan ligandlarının üzerinde kontrol sağlamayı amaçlalamışlardır. Bu kapsidlerin, influenza A virüs zarfına bağlanarak ökaryotik hücrelerin enfeksiyonunu inhibe ettiği kanıtlanmıştır [77].

Metalik nanopartiküller, antibakteriyel etkiyi desteklemek için fajlar ile işlevselleştirilebilir. Bakteriyofajlar uygulamada özgüllüğü, hedeflemeyi sağlarken, altın partiküller bakteri üzerinde öldürücü etken olarak işlev görür. Böyle bir faj-nanopartikül kombinasyonunun mühendisliği kolaydır ve bileşenlerin özellikleri, dirençli bakteriyel enfeksiyonların ortadan kaldırılmasında birbirini tamamlar. Bakteriyofajlar ayrıca altın nanorodlara konjuge edilebilir. Bu sistemler, fototermal erime, yani kızılötesi ışıkla uyarılarak lokal ısı oluşumu gerçekleştirilebilir ve bu sayede spesifik bakteri hücrelerini öldürmek için kullanılabilir [66].

Faj enfeksiyonunun son aşamasında litik fajlar, bakteri hücrelerini parçalamak ve oluşan yeni fajları serbest bırakmak için endolizinler üretir. Endolizinler, periplazmaya eriştikten sonra peptidoglikanı bozarak hücre lizizine yol açan enzimlerdir. Endolizinler kullanılarak patojenlerin hedefli bir şekilde öldürülmesini sağlamak için bir dizi mühendislik stratejisi geliştirilmiştir. Fajların reseptör bağlayıcı proteinlerinin, bakteriyel reseptörlere bağlanma özgüllüğünden ve endolizinlerin antibakteriyel özellik sergilemesinden yararlanılarak tasarlanan füzyon proteinlerin işlevsel ve yenilikçi bir yaklaşım olduğu çok açıktır. Bu tasarımlara RBP-endolisin hibritleri (Innolysin) denilmektedir. Örneğin, yapılan bir çalışmada *E. coli*yi hedeflemek için faj T5'in endolizini ve RBP'si (Pb5)

birleştirilerek sefalosporinler gibi kritik öneme sahip antimikrobiyallere dirençli *E. coli*'ye karşı bakterisidal aktiviteye sahip bir Innolysin tasarlanmıştır [78].

Viral kapsidler için kovalent modifikasyon süreçlerinin ortaya çıkışı; viral kapsidleri, ilaçlar ve görüntüleme ajanları için modüler taşıyıcı sistemlere dönüştürmek için zemin hazırlamıştır. Örneğin Kovacs ve ark. genom içermeyen MS2 kapsidlerinin yüzeyini polietilen glikol (PEG) zincirleri ile kaplamışlar ve aynı zamanda tasarladıkları bu kapside 50-70 adet floresan ilaç kopyası içeren bir kargo dahil etmeyi başarmışlardır [79]. Kapsidin, yüksek seviyelerde modifikasyona rağmen kargonun bağlı durumda kaldığı ve böylece kapsidin ilaçlar veya görüntüleme ajanları için uygun bir taşıyıcı haline getirdiği gösterilmiştir. Tong ve ark. tarafından geliştirilen benzer bir sistemde, MS2 faj kapsidleri ilaç ile yüklenmiş ve yüzey, hedefleme için DNA ile kaplamışlardır [80]. Antisens oligonükleotidler, small interfering RNA (siRNA), aptamerler ve ribozimler gibi nükleik asitler, protein ekspresyonunu inhibe etme yetenekleri nedeniyle tıpta kullanım alanlarına sahiptirler. Bununla birlikte, nükleik asit terapötiklerinin kullanımı, fizyolojik koşullar altında kararsızlıkları ve faaliyet göstereceği alana geçme yeteneklerinin olmaması nedeniyle sınırlıdır. Bu sebeple örneğin, siRNA'nın iletilmesi için molekülün paketlenmesi önemli bir yaklaşımdır. siRNA, taşıyıcı partikülün merkezine yerleştirilir ve lipid çift tabakası gibi biyo-uyumlu bir materyal ile çevrilir. Hedefleme peptidi, hücrelerle etkileşime izin vermesi için dışarıya yerleştirilir. Faj peptitleri teorik olarak herhangi bir organ veya hücre tipinin hedeflenmesine izin verir ve bu sayede siRNA içeren parçacığın hedeflenmesi gerçekleştirilir. Bu siRNA içeren parçacıkların birçok uygulamada potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Örneğin, Bedi ve ark. pVIII kaplı siRNA içeren lipozomların göğüs kanseri hücrelerini hedeflemek için bir taşıyıcı görevi görebileceğini göstermişlerdir. İpliksi fajların genetik mühendisliği ile hazırlanmış pVIII proteini, MCF-7 hücrelerini hedeflemek için kullanılmıştır. Tümör hedefleyen peptitler, bir faj görüntüleme kütüphanesinden göğüs kanseri hücrelerine karşı afinite gösterenler olarak seçilmiş ve fajın pVIII proteini ile kaynaştırılmıştır. siRNA, ipliksi fajlardan seçilen pVIII ile kaplanarak MCF-7 hücrelerinde GAPDH genini susturduğu kanıtlanmıştır. GAPDH, çeşitli kanser

hücrelerinde düzensiz ekspresyonu ile tümör gelişimine katılmakla birlikte terapötik hedef olarak da kullanılmaktadır [80].

2.5 Nanopartiküller

Yunanca “nannos”tan türemiş olan nano terimi, cüce anlamına gelir ve 10^{-9}”u yani metrenin milyarda birini temsil etmektedir [81], [82], [83]. Nanomalzemeler, birbiriyle ilişki içindeki atomların ve/veya moleküllerin nano boyutlu kompleksleri olarak tanımlanabilen, nanoyapılı malzemeleri ve nanopartikülleri kapsamaktadır. Nanoteknoloji, 1nm-100 nm ölçeğindeki nanomalzemelerin üretim ve geliştirilme süreçlerinin bilgisi, yönetimi ve uygulanması ile ilgilenmektedir. Nanoteknoloji teriminin tanımı ilk kez 1974 yılında Tokyo Üniversitesi'nde profesör olan Norio Taniguchi tarafından “Nanoteknolojinin Temel Kavramları” adlı makalesinde verilmiştir. Norio Taniguchi, “Nanoteknoloji temel olarak malzemelerin bir atom veya bir molekül tarafından ayrılması, sağlamlaştırılması ve deformasyonu aşamalarından oluşur.” diye belirtmiştir [83]. Nanoteknoloji; tıp-sağlık sektörü, karbon nanotüp yapımı, bilişim teknolojisi, nanorobot üretimi, enerji, havacılık ve uzay araştırmaları, elektronik ve bilgisayar sektörü, malzeme ve imalat sektörü, biyoteknoloji başta olmak üzere çeşitli alanlarda yükselen bir ivme ile yer edinmektedir [83].

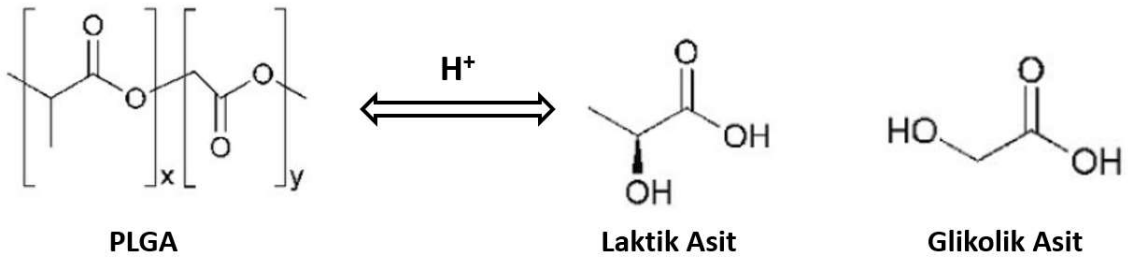
Nanomalzemeler; fullerenler, karbon nanotüpler, nanopartiküller (metalik nanopartiküller, manyetik nanopartiküller, nanoteller, nanoçubuklar), kuantum noktaları ve polimerik nanopartiküller olarak sınıflandırılabilir [83]. Nanopartiküllerin boyutları sebebiyle sahip oldukları özellikleri, beklenmedik ve benzeri olmayan davranışları, yenilikçi teknolojik uygulamalar için büyük potansiyel taşımaktadır [84].

İlaç taşınımı [85], görüntüleme ve tanıda kullanılan etiket molekülleri [86], aşı formülasyonları [87], gen transferi, ortopedik uygulamalar, biyosensör, dental uygulamalar [83], kanser tanısı ve terapisi [88], siRNA ve miRNA hedefli terapiler [89] nanopartiküllerden yararlanılan biyoteknolojik yaklaşımlardır.

2.5.1 PLGA Nanopartikülleri

Polimerik nanopartiküller, boyutları yaklaşık 100 nm civarında olan, doğal veya sentetik polimerlerden hazırlanmış katı ve küresel yapılardır. Hidrofilik küçük ilaçlar, hidrofobik küçük ilaçlar, aşılar ve biyolojik makromolekül gibi maddeler, nanopartiküller tasarlanarak belirli organlara veya hücrelere hedeflendirilebilir ve/veya kontrollü salımları gerçekleştirilebilir. Tıp alanında nanopartiküller, doku mühendisliği yapı iskeleleri ve cihazları, bölgeye özgü ilaç taşıma sistemleri, kanser tedavisi, klinik biyoanalitik teşhis ve terapötik geliştirilmesi gibi çeşitli alanlarda önemli bir değere sahiptir. İlaç taşınmasında kullanılan nanopatiküllerin, biyouyumluluk, ilaç uyumluluğu, uygun biyobozunma kinetiği ve mekanik özellikler gibi bazı gereksinimleri karşılaması gerekmektedir [90].

PLA, Poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA), poli(Ɛ-kaprolakton), kitosan, PACA, poli(lizin) ve poli(aspartik asit) gibi biyobozunur polimerler genellikle kontrollü ilaç salımını gerçekleştirmeyi sağlayabilen matris elemanları olarak nanopartikül sentezinde kullanılmaktadırlar [82]. PLGA, iki farklı monomer olan glikolik asit ve laktik asidin siklik dimerleri (1,4-dioksan-2,5-dionlar)'ın rastgele halka açma kopolimerizasyonu yoluyla sentezlenen PLGA, bir kopolimerdir. PLGA , hidrolizi ile laktik asit ve glikolik asit monomerlerine ayrılır (Şekil 2.11) [90], [91].



Şekil 2.11 PLGA molekülünün hidrolizi [92]

Polimerizasyon sırasında, ardışık monomerik birimler (glikolik veya laktik asit), PLGA'da ester bağlarıyla birbirine bağlanır, böylece doğrusal, amorf alifatik polyester ürünleri verir [90]. Bu iki monomer endojen olduğundan ve vücut tarafından Krebs döngüsü yoluyla kolayca metabolize edilerek karbondioksit ve

suyu oluşturduğundan, ilaç dağıtımı veya biyomateryal uygulamaları için PLGA kullanımı, minimal bir toksisite ile ilişkilidir. PLGA'nın, biyouyumlu oluşu, biyomedikal uygulamalar ve geleneksel ilaç mekanizmalarına kıyasla sürekli ilaç salınımının günler, haftalar veya aylara kadar devam edebileceğini gösteren çalışmaların varlığı ve enjeksiyon yoluyla parenteral uygulama kolaylığı nedeniyle bu alanda yaygın bir kullanıma sahiptir [91]. PLGA nanopartikülleri, hücrelere kısmen pinositoz ve ayrıca klatrin aracılı endositoz yoluyla alınırlar. Endo-lizozomlardan hızla kaçar ve inkübasyonun 10 dakikası içinde sitoplazmaya girer. Vücut hidrofobik parçacıkları yabancı olarak tanır. Retikülo-endotelyal sistem (RES) bunları kan dolaşımından uzaklaştırıp karaciğer veya dalağa almayı sağlar. Bu süreç, nanopartiküllere dayalı kontrollü ilaç dağıtımının önündeki en önemli biyolojik engellerden biridir [90], [91].

PLGA formları genellikle kullanılan monomer oranı ile tanımlanır. Örneğin, PLGA 50:50, bileşimi %50 laktik asit ve %50 glikolik asit olan kopolimer anlamına gelmektedir. Bozunma süresi, moleküler ağırlık ve kopolimer oranına bağlı olarak birkaç aydan birkaç yıla kadar değişebilmektedir [90], [91]. Antibiyotik yüklü PLGA nanopartiküllerin, bakteriler üzerine terapötik uygulamaları ile bu bakterilerin sebep olduğu enfeksiyon ve hastalıkların iyileştirilebileceği çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır. Bakterilerde yapısal hasar oluşturmak için fotoaktif formülasyonların [93], dental uygulamalarda spreyle uygulanan ajanların [93], *S. aureus* sebepli hastalıklara karşı vankomisinin [94], biyofilmlerin bozulması için meropenemin [95] PLGA nanopartikülü halinde sentezlenebileceği birçok çalışma bulunmaktadır.

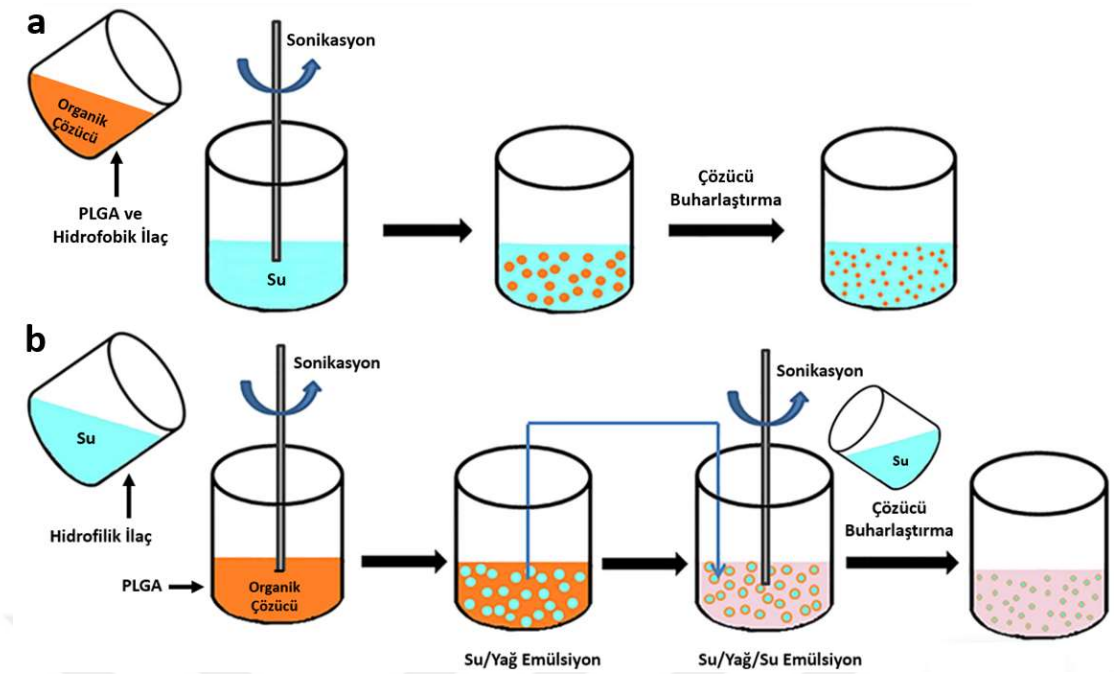
2.5.2 PLGA Nanopartiküllerin İlaç Taşıma Sistemleri İçin Tasarımı

Biyobozunur polimerler, ilaçların kontrollü ve hedefli bir şekilde verilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. PLGA, uygun özelliklerinden dolayı kapsamlı bir şekilde araştırılan sentetik biyobozunur polimerlerden biridir. Uyaranlara duyarlı davranışından dolayı 'Akıllı Polimer' olarak da bilinir. Çeşitli hastalıklıkların tedavisinde veya teşhisinde kullanılabilen PLGA yapılı ilaç taşıma sistemi çalışmaları bulunmaktadır [96]. Nanopartikülleri sentezlemek için literatürde birkaç yöntem bulunmaktadır. Sentezin hazırlık işlemine bağlı olarak,

nanopartikülün yapısı farklı olabilir. İlaç ya nanopartikülün çekirdeğinin içinde hapsolur ya da matris yüzeyine adsorbe edilir [91], [90]. PLGA kullanılarak biyobozunur nanopartikül sentezlerken kullanılan tüm teknikler için ilk adım emülsifiye edilmiş bir sistem hazırlamaktır. Nanopartiküller, tercih edilen yönteme göre ilerleyen ikinci aşamada oluşurlar ve ikinci aşama yönteme ismini verir [90].

2.5.3 Tekli veya İkili Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

PLGA nanopartikül sentezinde en genel olarak kullanılan yöntemler, tekli veya ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemleridir. Tekli emülsiyon prosesi, su içinde yağ (oil-in-water: o/w) emülsifikasyonunu içerirken; ikili emülsiyon prosesi, su içinde yağ içinde su (water-in-oil-in-water: w/o/w) tekniğidir. İkili emülsiyon yöntemi; peptit, protein ve aşılar gibi suda çözünür molekülleri, ilaçları enkapsüle etmek için uygundur (Şekil 2.12 b). Tekli emülsiyon yöntemi ise, steroidler gibi suda çözünmeyen, hidrofobik ilaçlar için uygundur (Şekil 2.12 a). Tekli emülsiyon yönteminde polimer, diklorometan, kloroform, aseton veya etil asetat gibi organik bir çözücü içinde çözülür. İlaç, organik çözücülerden birisinde veya belli oranlarda karışımında çözünmüş olan polimer çözeltisinin içerisine eklenir, çözündürülür ve bu karışım, su (w) içinde yağ (o) yani o/w emülsiyonu yapmak için yüzey aktif madde/emülsiyonlaştırıcı madde kullanılarak hazırlanmış sulu bir çözelti içerisine emülsifiye edilir. Poli vinil alkol (PVA), jelatin, polisorbat-80, poloksamer-188, yüzey aktif madde olarak kullanılabilir. Stabil bir emülsiyon oluşumunun ardından, organik çözücü ya sıcaklık/basınç altında ya da belli bir süre karıştırılarak buharlaştırılır. İki yöntemde de, fazlar birbirine eklenirken homojenizasyon veya sonikasyon kullanır. Boyut; karıştırma hızı, kullanılan fazların türü ve miktarı, organik ve sulu fazların viskozitesi ve sıcaklık değiştirilerek düzenlenebilir [90], [97].



Şekil 2.12 (a) Tekli emülsiyon (b) Çiftli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemleri [98]

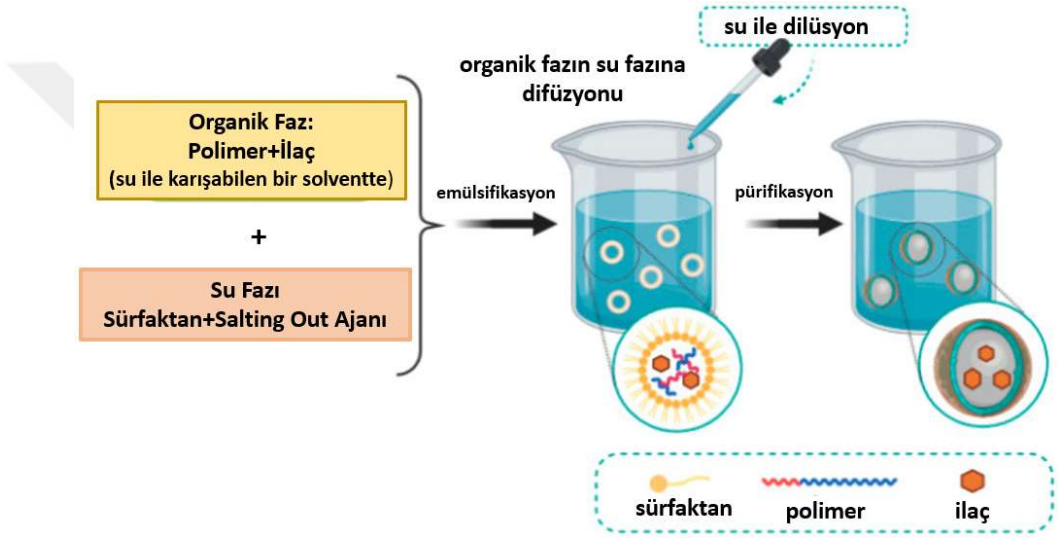
2.5.4 Emülsifikasyon Çözücü Difüzyon Yöntemi

Emülsifikasyon çözücü difüzyonu, yaygın olarak kullanılan küresel kristalizasyon tekniğidir. Teknikte iyi çözücü (ilaç maddesini çözen çözücü), zayıf çözücü (ilacın içinde çözünmediği çözücü) ve köprü çözücü (ilacın kısmen çözünmesini sağlayan ve zayıf çözücü ile karışmayan çözücü) olmak üzere üç farklı çözücü kullanılır. Küresel kristalizasyon, kısmen karışabilir üç çözücünün, yani iyi çözücü-köprü çözücü-zayıf çözücünün kullanıldığı bir sistem ile gerçekleştirilir [99].

Çözünmüş polimeri ve ilacı içeren organik çözücü sonikasyon altında yüzey aktif madde içeren su fazına eklenerek emülsiyon haline getirilir. Ardından bu sistem karıştırılmaya başlanır ve bu aşamada su eklenmeye başlanır. Bu durum çözücünün iç fazdan dışarıya difüzyonuna sebep olur ve polimerin nanoçökelmesi ile kolloidal nanopartiküllerin oluşumuna yol açar. Organik çözücünün buharlaşması için belirli bir süre karıştırılmaya devam edilir veya basınç altında buharlaşması sağlanır. Ölçek büyütme kolaylığı, basit oluşu, homojen boyut dağılımı, yüksek enkapsülasyon oranı gibi avantajlar sunmaktadır [90], [97].

2.5.5 Emülsifikasyon Salting-Out Yöntemi

Emülsifikasyon salting-out yöntemi, polimer ve ilacı içeren aseton gibi suyla karışabilen bir çözeltinin magnezyum klorür, kalsiyum klorür gibi tuz ve bir yüzey aktif madde içeren sulu çözeltiye, mekanik karıştırıcı altında eklenmesini içerir. Yöntemde yağ-su emülsiyonu, fazla miktarda sulu faz ile seyreltilerek hazırlandığından asetonun sulu faza difüzyonu hızlı bir şekilde gerçekleşir ve bu da nanopartikül oluşumunu indükler. Seyreltme esnasında, emülsiyonun sürekli fazındaki tuz konsantrasyonunda ani bir düşüşe neden olarak polimer çözücünün emülsiyon damlacıkları halinde oluşmasına neden olur (Şekil 2.13), [97] [100].

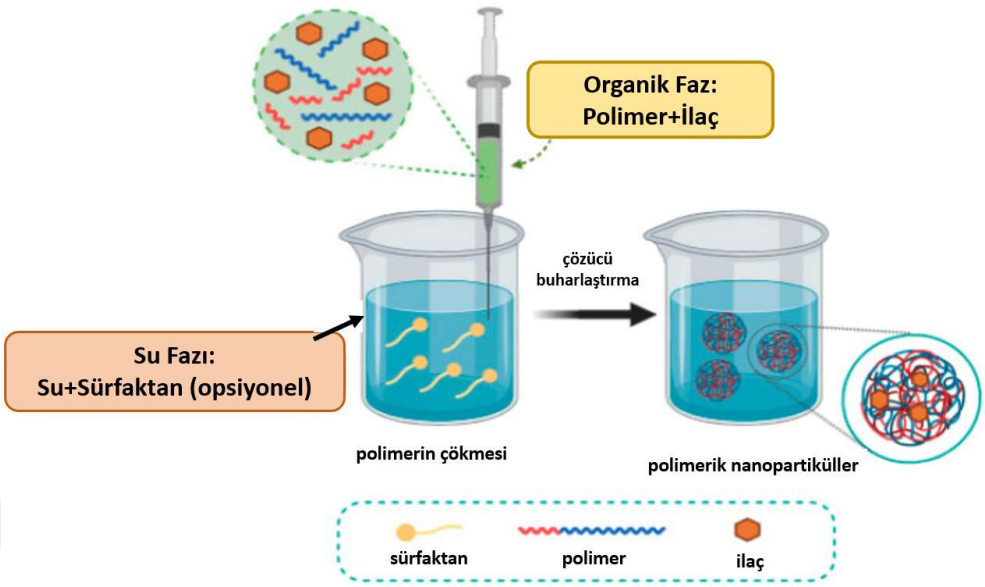


Şekil 2.13 Emülsifikasyon Salting-Out yöntemi [97]

2.5.6 Nanoçöktürme

Tek adımlı bir işlem olan nanoçöktürme [101], [102] polimer, polimerin çözücüsü ve polimerin çözünmediği çözücü olmak üzere üç temel bileşen içeren bir sistem kullanılarak gerçekleştirilir. Genellikle, bu yöntem hidrofobik ilaç enkapsülasyonunda kullanılır, ancak hidrofilik ilaçlar için de uygundur. Polimer ve ilaç; aseton, asetonitril, etanol veya metanol gibi polar, suyla karışabilen organik çözücü içinde çözülür. Çözelti, sulu bir çözeltiye kontrollü bir şekilde damla damla eklenir. Suda çözünebilen, polar organik çözücünün sulu faza geçişi ile polimer arayüzeyde birikir. Polimer çözeltisinin sulu faza hızla difüzyonu sayesinde, polimer ve ilaç su moleküllerinden uzaklaşarak nanopartikülleri anında

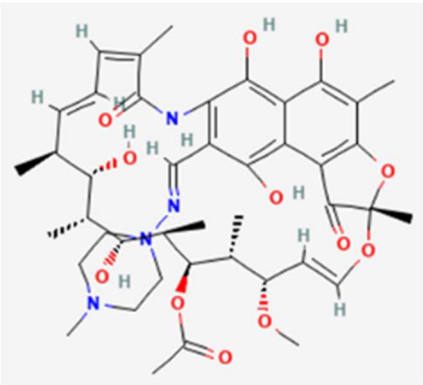
oluşur. Son olarak çözücü, belirli bir süre karıştırılarak veya basınç altında buharlaştırılır (Şekil 2.14), [90], [97].



Şekil 2.14 Nanoçöktürme metodu [97]

2.6 Rifampisin

Moleküler formülü $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ olan rifampisin, Gram pozitif bir bakteri olan *Amycolatopsis rifamycinica*'dan türetilen yarı sentetik antibiyotiktir (Şekil 2.15). RNA polimeraz inhibitörü, DNA sentez inhibitörü, antitüberküler ajan, leprostatik ilaç, protein sentezi inhibitörü, nöroprotektif ajan, anjiyogenez inhibitörü, antineoplastik madde olarak rol oynayan makrosiklik bir ajandır (CHEBI:28077-rifampicin), [103].



Şekil 2.15 Rifampisin antibiyotiğinin iki boyutlu yapısı [79]

Geniş spektrumlu makrosiklik bir antibiyotik olan rifampisin; mikobakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların, tüberkülozun, cüzzamın, stafilokok ve özellikle metisiline dirençli *S. aureus* suşlarının sebep olduğu hastalıkların, *Neisseria meningitidis, Borrelia burgdorferi* ve *Anaplasma phagocytophilum* kaynaklı hastalıkların, ciltte meydana gelen enfeksiyonların, kronik yaraların ve birçok yaygın hastalığın tedavisinde kullanım alanına sahiptir. Kimyasal yapısı sayesinde, dokulara zayıf bir şekilde nüfuz eden diğer ajanların yanı sıra güçlü bir şekilde doku ve apselere nüfuz edebilir, başka ajanlarla sinerjik olarak kullanılarak etkisi arttırılabilir [104], [105].

2.6.1 Etki Mekanizması

DNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RNAP), tüm organizmalarda transkripsiyon ve gen ekspresyonu süreçlerindeki anahtar enzimdir. RNAP, hedef DNA dizisini okur ve komplementer RNA zincirinin ribonükleotid trifosfat monomerleri ile polimerizasyonunu katalize eder. Bakterilerde ortalama 400 kDa olan RNAP; α (α1 ve α2), β, β', ω (omega) ve σ (sigma) olmak üzere beş farklı alt birimden oluşur [106], [107]. Alt birimler bir araya gelerek birbirleri ile etkileşirler ve holoenzim olarak isimlendirilen enzimin aktif formunu oluştururlar. Sigma faktörü, DNA üzerinde uygun bölgelerin tanınmasında rol oynar ve yapıya sıkı bir şekilde bağlanmaz. α2ββ'ω, RNA polimerazın kor enzim kısmıdır ve bu şekilde RNA zincirinin oluşumunu sağlayabilir [30]. Kor enzim kısmı, kıskaç benzeri bir yapıya sahiptir. Kıskaç, katalitik olarak aktif Mg+2 iyonu içeren ve transkripsiyon sırasında nükleik asitleri bulunduran pozitif yüklü bir boşluktan oluşur ve bu kısma aktif bölge veya ana kanal denilir. En büyük iki alt birimi olan β ve β', yaklaşık 27 Å genişliğinde derin bir boşluk ile ayrılan kıskacı oluşturur.

Rifampisin, RNAP'ın β alt birimine bağlanır ve bakteriyel RNAP'ın β alt birimini inhibe eder, böylece birkaç nükleotid eklendikten sonra RNA zincirinin uzama aşamasını fiziksel olarak bloke etmiş olur. Hücrenin temel rollerinden birisi olan transkripsiyon sürecinin bastırılması, nihai olarak hücre ölümüne yol açan rifampisin aracılı transkripsiyonel etkileşimin mekanizması ile gerçekleştirilmiş olur [106].

3
MATERYAL/METOT

3.1 Materyal

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal, reaktif, malzeme, cihaz, ekipman ve mikroorganizma suşları sunulacaktır.

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Cihaz/Ekipman	Kullanım Amacı
Otoklav/ HİRAYAMA HV50/L	Besiyerlerinin ve hücre çalışmalarında kullanılacak malzemelerin sterilizasyonu
Soğutmalı Santrifüj/ Hettich UNIVERSAL 320 R	Protein saflaştırma, hücre ve nanopartikül çöktürülmesi
Biyogüvenlik Kabini/ NordicSafe ESCO Class II A2	Hücre çalışmalarında steril ortamın sağlanması
Çalkalamalı İnkübatör/ DATHAN Scientific	Hücre kültürünün hazırlanması ve salım çalışmalarında
-80 Derin Dondurucu/ Arçelik	Hücre stoklarının saklanması
Buzdolabı/ Arçelik	Hazırlanan çözeltilerin, besiyerlerinin muhafazası
Isıtıcı Blok/ Hot&Stirrer- MS300HS	Sabit sıcaklıkta inkübasyon sağlanması
Hassas Terazi/ SHIMADZU (AB-0060-K)	Kimyasalların, sentezlenen nanopartiküllerin tartılması
İnkübatör/ Memmert	Hücrelerin inkübasyonu
Güç Kaynağı/ BIORAD Power Pac Basic	Elektroforez sistemlerine güç sağlanması
Dikey Jel Elektroforez Sistemi/ SDS BIORAD Tetra System	SDS-PAGE çalışmasının yapılması

Tablo 3.1 Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları (devamı)

Western Blot Transfer Sistemi/ BIORAD Transblot Turbo Transfer System	Western Blot çalışmasının yapılması
Çalkalayıcı/ Sun Flower Mini Shaker Biosan	SDS-PAGE ve Western Blot protokollernde, ELISA inkübasyonlarında ve protein saflaştırılmasında
Manyetik Karıştırıcı/ IKA RH Basic 2	Çözeltilerin karıştırılması
Vorteks/ IKA Vortex V1S000	Örneklerin çözülmesi ve karıştırılması
Spektrofotometre/ Spectrum UV-VIS Spectrophotometer	Hücre yoğunluğunun ölçülmesinde
Nanodrop / Thermo Scientific One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers	DNA ve protein miktar tayininde
Su Banyosu/ Bandalin Sonorex	Hazırlanan örneklerin çözülmesi
pH Metre/ Mettler Toledo Seven Compact Ion S220	Çözelti pH'larının ayarlanmasında
Sonikatör- Bandelin SONOPULS	Nanopartikül sentezi ve hücre kültürlerinin lize edilmesinde
Çalkalayıcılı Soğutmalı Etüv/ JSR büyük hacimli etüv	Hücre kültürü inkübasyonunda
Ultra Saf Su Cihazı/ Milipore-Q	Saf suyun eldesinde
Çoklu Manyetik Karıştırıcı/ IKA	Nanopartikül sentezi ve konjugasyonunda
Zetasizer/ NanoZS	Nanopartiküllerin karakterizasyonu
Liyofilizatör/ Heto Drywinner	Nanopartikül ve proteinlerin kurutulması
UV-Vis Spektrofotometresi/ Shimadzu UV-1700	Nanopartiküllerin karakterizasyonunda
ATR Aparatlı FT-IR Spektrofotometresi/ Shimadzu Prestige 2100	Nanopartiküllerin karakterizasyonunda

Tablo 3.1 Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları (devamı)

ELİSA Okuyucu/ BioTek PowerWave XS2	Bradford ölçümleri ve ELİSA protokolünde
Konfokal Mikroskobu/Leica SP8	Mikroskobik görüntülemede
Yüksek Verimli Görüntüleme Cihazı/ Cytation 5	Mikroskobik görüntülemede

3.1.2 Kullanılan Mikroorganizma Suşları

Klonlama ve ekspresyon çalışmalarında kullanılan *E. coli* BL21 (DE3), antimikrobiyal testlerde kullanılan *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922), metisilin dirençli klinik izolat *S. aureus* (MRSA), oksasilin duyarlı *S. aureus* (ATCC 29213), metisilin-oksasilin dirençli *S. aureus* (ATCC 43300) ve metisilin duyarlı klinik izolat *S. aureus* (MSSA) suşları Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.3 Kullanılan Kimyasal, Reaktif ve Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar, reaktifler ve malzemelerin isimleri ve kullanım amaçları Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2 Kullanılan kimyasallar/reaktifler/malzemeler ve kullanım amaçları

Kimyasal/Reaktif/Malzemeler	**Kullanım Amacı**
IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)/ BiolineBIO37036	Protein Ekspresyonu
Tripton/ Multicell	Protein Ekspresyonu
Maya Özütü/ Multicell	Protein Ekspresyonu
NaCl/ Sigma	Protein Ekspresyonu
Gliserol/ Multicell	Protein Ekspresyonu
KH_2PO_4/ Multicell	Protein Ekspresyonu
K_2HPO_4/Multicell	Protein Ekspresyonu
Ampisilin/ Multicell	Protein Ekspresyonu

Tablo 3.2 Kullanılan kimyasallar/reaktifler/malzemeler ve kullanım amaçları (devamı)

HisPure Kobalt Resin / Thermo Scientific	Protein Saflaştırma
İmidazol/ Sigma-Aldrich	Protein Saflaştırma
Lizozim/Thermo Scientific	Protein saflaştırma
Tris-base/ Biomatik	Protein Saflaştırma
SDS/ Multicell	Protein saflaştırma, SDS-PAGE
DTT (Dithiothreitol)/ GoldBIO	SDS-PAGE
Glisin/ Multicell	SDS-PAGE
%30 Akrilamid/ BIORAD	SDS-PAGE
TEMED/ Sigma	SDS-PAGE
Amonyum Per Sülfat/ Biorad	SDS-PAGE
Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining/ GoldBIO	SDS-PAGE
DAB/ Thermo Scientific	Western Blot
Nitroselüloz Membran/ Thermo Scientific	Western Blot
His-probe Antibody (H-3): sc-8036 primer antikor / Santa Cruz Biotechnology	Western Blot, ELISA
Goat anti-Mouse IgG (H+L) sekonder antikor/ invitrogen	Western Blot, ELISA
Diyaliz Membranı/Merck	Diyaliz
96 well plate/ Nest	ELISA
Bovine Serum Albumin/ CAPRICORN SCIENTIFIC	Western Blot, ELISA
Tween 20/ Sigma Aldrich	Western
NaH_2PO_4/ Sigma-Aldrich	ELISA
Na_2HPO_4/ Sigma-Aldrich	ELISA
TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin)	ELISA

Tablo 3.2 Kullanılan kimyasallar/reaktifler/malzemeler ve kullanım amaçları (devamı)

FluoReporter® FITC Protein Etiketleme Kiti/ invitrogen	Mikroskobik görüntüleme
PLGA/Sigma Resomer RG502 Asit uçlu, 50:50, M_A 7 – 17 kDa	Nanopartikül Sentezi
Rifampisin ($C_{43}H_{58}N_4O_{12}$)/ Sigma Aldrich	Nanopartikül Sentezi
EDC/abcr	Protein Konjugasyonu
DCM (Diklorometan)	Nanopartikül Karakterizasyonu
Aseton/Sigma Aldrich	Nanopartikül Sentezi
Mueller-Hinton Agar/Merck	Antimikrobiyal çalışmalarda
Mueller-Hinton Broth/Biolife	Antimikrobiyal çalışmalarda

3.2 Metot

Tez kapsamında yürütülen çalışmaların metadolojisi detaylı olarak başlıklar halinde açıklanmıştır.

3.2.1 Protein Ekspresyonu, Saflaştırılması, SDS-PAGE, Bradford ve Western Blot Analizi

Bakteriyofaj K (ATCC® 19685-B1™)'dan izole edilen ve özgün primerler ile amplifiye edilen RBP geni bölgesi (Gp144), aLICator LIC Cloning & Expression System klonlama kiti [108] kullanılarak kompetant *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transforme edildi, Sentebiolab Biyoteknoloji Şirketine Yeni Nesil Dizilemeye gönderilerek klonlama doğrulandı. Bu aşama, Doç. Dr. Tülin ÖZBEK'in lisans öğrencisi Semra Taşdurmazlı'nın bitirme tezi olup Gp144 geni içeren klon ilgili çalışmada üretilmiştir (2021). Sunulan tez çalışmasında, rekombinant Gp144 (rGp144) genini içeren hücrelerden tek koloni alınıp ampisilin içeren petriye çizgi ekim yapıldı ve bir gece 37 °C etüvde büyütüldü. Süre sonunda, tek koloni seçilerek ampisilin içeren LB sıvı besiyerine inoküle edildi ve bir gece boyunca 200 rpm, 37 °C'de çalkalayıcılı inkübatör kullanılarak büyütüldü. İnkübasyon sonrası, sıvı kültüründen son hacimde %15 gliserol olacak şekilde hazırlanarak -80 °C'de

stoklandı. Protein ekspresyonu gerçekleştirmek için gecelik kültür veya starter kültür kullanıldı.

3.2.1.1 Starter Kültürün Hazırlanması

Petriden seçilen tek koloni, ampisilin içeren (10 μl) 10 mL LB sıvı besiyerine inokule edildi. 37 °C ve 200 rpm'de çalkalayıcılı inkübatöre konulan kültür OD_{600}: 0.5-0.6 yani $1.5x10^8$ kob/mL hücreye denk gelen aralıkta inkübatörden alındı. 1 mL olarak alikotlandı ve son hacimde %15 gliserol içerek şekilde hazırlanarak -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.1.2 Ekspresyon Koşullarının Optimize Edilmesi

Starter kültür veya gecelik kültürden 1 mL alındı ve 100 μL ampisilin (100 mg/mL) içeren 100 mL Terrific Broth besiyerine eklendi ve 37 °C'de, 200 rpm'de çalkalayıcı inkübatöre konuldu. OD_{600}: 1-1.5 aralığına geldiğinde her bir kültüre farklı konsantrasyonlarda (0.1 mM, 0.2 mM, 0.5 mM) IPTG eklenerek, bir kültüre IPTG eklenmeden ve bir kültür de negatif kontrol amaçlı transforme olmayan *E. coli* BL21 hücreleri olarak hazırlandı, 18 °C 200rpm'de çalkalamalı inkübatöre yerleştirildi. 0., 2., 4., 6., 8. ve 24. saatlerde 3'el mL örnek alındı. Alınan örnekler, 15 mL'lik falkona konuldu ve 9000 rpm'de, 10 dakika, 4 °C'de santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı ve hücre pelleti liziz aşamaları için -80 °C'de saklandı. Hücre pelletleri -80 °C'den alınarak lize edildiler ve saflaştırılmaya geçilmeden önce SDS-PAGE elektroforezi ile protein üretiminin olup olmadığı tayin edildi.

3.2.1.3 Eksprese Edilen rGp144'ün Saflaştırılması

Farklı koşullarda ekspresyon gerçekleştirildikten sonra, rGp144 üretimi için en optimum şartların seçilmesi amacıyla protein üretimine devam edildi. Eksprese edilen rGp144'ün saflaştırılması, proteinin 6x Histidin etiketinden faydalanılarak Thermo Fisher HisPure Kobalt Resin ile yapıldı. 1 mL resin kolona konuldu, 700 x g'de 2 dakika, 4 °C'de santrifüj edildi. Kolonun altında kalan sıvı atıldı ve 2 mL dengeleyici tampon [10 mM imidazollü PBS (20 mM sodyum fosfat tamponu 300 mM NaCl)], kolona eklendi. Tamponun tüm resine nüfuz etmesi sağlandı ve 700 x g'de 2 dakika, 4 °C'de santrifüj edildi. 100 mL ekspresyon kültürü 50 mL'lik falkona konuldu ve 9000 rpm'de, 10 dakika, 4 °C'de santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı, hücre pelleti üzerine 5 mL liziz tamponu (50 mM sodyum fosfat tamponu, 400

mM NaCl, 100 mM KCl, %10 gliserol, %0,5 Triton X-100, 10 mM imidazol, pH 7.8) ve 5 mg lizozim eklendi. İyice vortekslenerek yeniden süspanse hale getirilen pellet, 30 dakika 4 ºC'de bekletildi. Sonikatör altında %50 güç ile 10 saniye sonikasyon 10 saniye bekleme ile 3 dakika boyunca hücre pelleti sonike edildi. Ardından örnekler maksimum rpm'de, 25 dakika, 4 ºC'de çöktürüldü. Elde edilen süpernatant ayrı tüpe alındı. Protein örneğinin hacmi kadar dengeleyici tampon üzerine eklendi. Tampon ile yıkama yapılan resinin üzerine örnek-dengeleyici tampon karışımı konuldu. Proteinlerin 6x Histidin kuyruklarından kobalt resine afinitesinin sağlanması için 1 saat boyunca 4 °C'de çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyonun ardındani, kolon 700 x g'de 2 dakika 4 °C'de santrifüj edildi, alt kısımda kalan sıvı flowthrough bir tüpte toplandı. Kolona 2 mL yıkama tamponu (25 mM imidazollü PBS) eklenecek, 700 x g'de 2 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı. Ardından kolona 1 mL elüsyon tampon (400 mM imidazollü PBS) eklendi ve 700 x g'de 2 dakika 4 °C santrifüj edildi. Altta kalan sıvı elüsyon olarak yeni bir tüpte toplandı. Elüsyon alma işlemi 5 kez tekrarlandı. Pürifikasyon prosesinden sonra tüm fraksiyonlar %12 SDS-PAGE jel ile yürütüldü ve boyama çözeltisi ile jeller boyandı. Elüentlerin miktar tayini Bradford analizi ile yapıldı ve kalan kısmı, son hacimde %15 gliserol olacak şekilde hazırlanarak -20 °C'de saklandı [109].

3.2.1.4 Örneklerin Hazırlanması ve SDS-PAGE Analizi

Saflaştırma sonrası hazırlanan örneklerden 45 µL alınarak üzerlerine 6X örnek boyasından (0.375 M Tris Base pH 6.8, %12 SDS, %60 gliserol, 0.6 M DTT, 0.4 mM Bromofenol Blue) eklendi ve ardından 95 ºC'de 5 dakika denatürasyon için bekletildi. SDS-PAGE elektroforezi için %12'lik yürütme jeli ve % 5'lik yükleme jeli hazırlandı.

SDS-PAGE elekroforezinde camlar, jelin arasında hazırlanabilmesi için doğru bir şekilde yerleştirildikten sonra önce yürütme jeli eklendi. Polimerleşmeden önce distile su kullanılarak üst kısmı kapatıldı ve polimerleşmesi beklenildi. Ardından distile su uzaklaştırılarak yükleme jeli, yürütme jelinin üzerine eklendi. Polimerleşmeden önce kuyucukların oluşumu için kullanılan tarak yerleştirildi ve yürütme jelinin de polimerleşmesi beklendi. Jel, içerisinde yürütme tamponu (1X

yürütme tamponu: 25 mM Tris Base, 192 mM Glisin, 3.4 mM SDS) bulunan tankın içerisine yerleştirildi ve camların arasında, jelin üzerinde bulunan tarak dikkatli bir şekilde yukarıya doğru çekilerek çıkarıldı.

Yürütme Jeli (%12)	Yükleme Jeli (%5)
Distile Su- 1,6 ml	Distile Su- 1,8 ml
1,5 M Tris Base- 1,3 ml	0,5 M Tris Base- 0,3125 ml
%10 SDS- 50 µl	%10 SDS- 25 µl
%30 Akrilamid/Bis Solüsyonu- 2 ml	%30 Akrilamid/Bis Solüsyonu- 335 µl
%10 APS- 50 µl	%10 APS- 25 µl
TEMED- 5 µl	TEMED- 2,5 µl

SDS-PAGE için hazırlanan jelin kuyucuklarına örnekler 25 µL, protein marker ise 2 µL eklendi. Elektrotlar ile güç kaynağına bağlanan tank, 120 V'ta işleme tabi tutuldu. Örneklerin yürütülmesi tamamlandıktan sonra jeller sistemden çıkarılarak protein bantlarının görüntülenmesi için %0,6 g coomassie brillant blue, %40 metanol, %0,7 asetik asit içeriğinden oluşan boyama çözeltisine alındılar. Oda sıcaklığında bir gece çalkalandıktan sonra jeller, %0,5 metanol, %0,7 asetik asit içeriğinden oluşan boyayı uzaklaştırma çözeltisinin içerisinde oda sıcaklığında bir saat çalkalandılar. Ardından suya alınan jellerdeki protein bant profilleri incelendi [109].

3.2.1.5 Western Blot Analizi

Western blot analizi, Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Membrana aktarılmadan önce proteinler, %12 yürütme ve %5 yükleme jelinde SDS-PAGE ile yürütüldü. Nitroselüloz membran ve whatman filtre kağıtları 30 dakika, jel 15 dakika 1x Western blot transfer tamponunda (Biorad) bekletildi. Whatman filtre kağıtlarındaki fazla transfer tamponu, üzerinden silindir spiral geçirilerek uzaklaştırıldı. İki whatman filtre kağıdının arasında akımın geçtiği yöne doğru sırasıyla jel ve membran olacak şekilde sandviç sistemi hazırlandı, arada boşluk kalmamasına dikkat edilerek cihaza yerleştirildi. 25 V, 30 dakika, 1 A koşullarında blotlama işlemi gerçekleştirildi. Ardından blotlamanın etkin bir şekilde gerçekleştiğinin tespit edilmesi için sandviç sistem içerisinden alınan jel, boyama çözeltisi ile boyandı. Nitroselüloz membran, PBS-Tween 20 (2

ml Tween 20: 1 L PBS) ile 5 dakika oda sıcaklığında çalkalanarak yıkandı. %5 BSA çözeltisi ile 1,5 saat oda sıcaklığında çalkalanarak bloklama yapıldı ardından membran PBS-Tween 20 ile 5 dakika yıkandı. 1: 500 oranında His-probe Antibody (H-3): sc-8036 primer antikoru ile 4 °C'de gece boyu çalkalanarak inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün membran 3 kez PBS-Tween 20 ile 5 dakika oda sıcaklığında çalkalanarak yıkandı. 1: 5000 oranında Goat anti-Mouse IgG (H+L) sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalanarak inkübasyona bırakıldı. Sırasıyla 2 kez PBS-Tween 20, 1 kez PBS ve 1 kez distile su ile 5 dakika çalkalanarak yıkanan membran sonrası deteksiyon tamponu içerisine (30 mg DAB, 50 µL H_2O_2, 50 mL PBS) alındı. Bant oluşuncaya kadar, yaklaşık 5 dakika bekletildi [110].

3.2.1.6 Diyaliz

Saflaştırılan proteinlerin liyofilize edilerek -20 °C'de saklanması amacıyla, saflaştırma elüsyon tamponunda bulunan imidazolden ve -20 °C stoğuna alınırken içerisine son hacimde %15 olacak miktarda eklene gliserolden uzaklaştırılması istenmektedir. 14 kDa diyaliz membranı kullanılarak 1/10 dilüe edilmiş 1x PBS'e (0.137 M NaCl, 0.01 M Na_2HPO_4, 0.0027 M KCl ve 0.0018 M KH_2PO_4, pH 7.4) karşı 24 saat karıştırılmaya bırakılarak diyaliz gerçekleştirildi. Diyalizin ardından membranın içerisindeki protein çözeltisi, liyofilize edilmesi amacıyla 6 ml'lik hacimlerde 15 ml falkonlara ayrıldı ve liyofilizatöre yerleştirilerek kurutuldu.

3.2.2 rGp144'ün *S.aureus* Hücre Duvarına Adsorbsiyonunun Tespiti

S. aureus hücre duvarı ve rGp144 arasındaki etkileşimin ispatı için ELISA yönteminden faydalanıldı ve yüksek verimli görüntüleme cihazı ile bu etkileşimin mikroskobik analizi gerçekleştirildi.

3.2.2.1 Hücre ELISA Yöntemi

S. aureus (ATCC 25923) ve *E. coli* (ATCC 25922), 3 mL LB sıvı besiyerine petrilerinden tek koloni alınarak inoküle edildi ve 37 °C'de bir gece çalkalanarak inkübe edildi. Ertesi gün kültürler OD_{600}= 0.1-0.2 olacak şekilde dilüe edildi ve 5000 x g'de, 3 dakika, 4 °C'de çöktürüldü. Üst sıvı uzaklaştırıldı ve pelletlerin üzerine uzaklaştırılan besiyeri hacminde tutunma tamponu (0.137 M NaCl, 0.01 M Na_2HPO_4, 0.001 M, NaH_2PO_4) eklendi [111]. Yeniden süspanse edilen hücre pelletleri ve 0.1 µg/mL, 0.2 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.8 µg/mL konsantrasyonlarda

tutunma tamponunda hazırlanan rGp144 proteini her kuyuda 100 μL olacak şekilde 96-well plate kuyularına dağıtıldı. 4 ^{o}C'de bir gece inkübasyonun ardından, tüm kuyucuklar yıkama tamponu (tutunma tamponu içerisinde %0.05 Tween 20) ile 3 kez 5'er dakika çalkalanarak yıkandı. Blank olarak alınacak hücre kaplı kuyucuklar ile protein kaplı kuyucuklar dışındaki hücre kaplı kuyucuklara belirtilen miktarlarca rGp144 eklenerek oda sıcaklığında 2 saat çalkalandı. Kuyular 3 kez yıkama tamponu ile 5'er dakika çalkalanarak yıkandı. Yıkama sonrası, 200 μL durdurma tamponu (yıkama tamponu içerisinde %1 BSA) kuyucuklara eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat çalkalandı. Kuyucuklar 3 kez yıkama tamponu ile 5'er dakika çalkalanarak yıkandı ve 1: 5000 oranında 100 μL primer antikor (His-probe Antibody (H-3): sc-8036) solüsyonundan kuyucuklara eklendi. 4 °C'de bir gece çalkalanarak inkübe edildikten sonra kuyucuklar 3 kez yıkama tamponu ile 5'er dakika çalkalanarak yıkandı. 1: 10000 oranında sekonder antikor [Goat anti-Mouse IgG (H+L)] solüsyonundan 100 μL eklenerek oda sıcaklığında 1,5 saat çalkalandı. Kuyucuklar 3 kez yıkama tamponu ile 5'er dakika çalkalanarak yıkandı. TMB substrattan 100 μL kuyucuklara eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında çalkalandı. Süre sonunda son durdurma tamponu (0.9 M HCl) eklenerek ELISA plate reader cihazında 450 nm'de okuma gerçekleştirildi [112]–[114].

3.2.2.2 rGp144'ün Floresan Boyanması ve Mikroskobik Analizi

rGp144, FluoReporter® FITC Protein Etiketleme Kiti (Thermo Scientific-F6434) kullanılarak floresan olarak yeşile boyandı. Kit protokolüne göre gerçekleştirilen protein boyama işleminde rGp144, 1x PBS (0.137 M NaCl, 0.01 M Na_2HPO_4, 0.0027 M KCl ve 0.0018 M KH_2PO_4, pH 7.4) içerisinde 4 mg/mL olacak şekilde hazırlandı, hazırlanan FITC reaktif boya stok solüsyonundan 21 μL alınarak 200 μL protein solüsyonuna eklendi, 800 rpm'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası spin kolonda santrifüj edilerek bağlanmayan boya uzaklaştırıldı ve 2 mM sodyum azidli PBS içerisinde 200 μL FITC ile işaretlenmiş protein elde edilmiş oldu. Boyama işleminin sonunda 1 μL boyanmış rGp144 ve 500 μL PBS içerisinde OD_{600}= 0.1-0.2 *S. aureus* (ATCC 25923) ve negatif kontrol olarak *E. coli* (ATCC 25922) hücreleri, 24-well plate içerisinde oda sıcaklığında 1 saat çalkalanarak inkübe edildi, 1 μL lam üzerine damlatıldı ve görüntüleme işlemleri

gerçekleştirildi [115]–[117]. rGp144'ün, *S. aureus* ve *E. coli* ile etkileşimi konfokal mikroskobu (Leica SP8) ve yüksek verimli görüntüleme cihazı (Cytation 5 cell imaging multi-mode reader) ile görüntülendi.

3.2.3 Rifampisin Yüklü PLGA Nanopartikül Sentezi

Rifampisin yüklü PLGA nanopartikül sentezi tekli emülsiyon ve nanoçöktürme yöntemleri ile gerçekleştirildi. Sentez sonrası nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

3.2.3.1 Tekli Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma metodunda [118], suda çözünürlüğü düşük olan lipofilik rifampisin antibiyotiği yüklü PLGA nanopartiküllerinin sentezi amaçlandı. Organik çözücü olarak polimer ve ilaç için çözünürlüklerinin yüksek olduğu diklorometan (DCM) seçildi. Sulu faz, sonikasyon ve manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılma aşamalarında farklı oranlarda stabilizör (PVA) içeren distile su olarak belirlendi.

Optimize edilen yöntemde, 80 mg PLGA (50:50, M_W= 7-17 kDa) ve 20 mg rifampisin tartılarak 2 mL DCM içerisinde vorteks yardımıyla çözüldü. Karışım enjektöre alındı ve soğuk bir ortam sağlanarak %80 güç ile 90 saniye içerisinde sonikatör altında 50 mL falkonda bulunan 4 mL %3 PVA içerisine damlatıldı. Ardından bu karışım tekrar enjektöre alındı ve manyetik karıştırıcı üzerinde behere eklenen 35 ml %0.1 PVA içerisine damlatıldı. Organik fazın evaporasyonu, çözeltinin 4 saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında karıştırılmasıyla gerçekleştirildi. Evaporasyonun ardından boyut ve zeta potansiyeli ölçümleri için örnek ayrıldı. Çözelti 50 mL falkona alındı ve oluşan nanopartiküllerin, 10.000 x g'de 4 °C'de 60, 40, 40 ve 15 dakikalık santrifüjler ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Her santrifüj işleminin ardından üst sıvı toplandı ve pellet 20 mL distile su ile yeniden süspanse hale getirildi. Son santrifüjün ardından pellet 3 mL distile su ile yeniden süspanse hale getirildi ve nanopartiküllerin liyofilizatör cihazında kurutulması için dondurulmak üzere -20 ºC'ye kaldırıldı.

3.2.3.2 Nanoçöktürme Yöntemi

Nanoçöktürme yöntemi [119], [120] rifampisin molekülünün lipofilik yapısı sebebiyle daha iyi bir ilaç yüklemesinin sağlanabilmesi amacıyla tercih edildi. Yöntemde hem polimer ve etkin maddeyi çözebilen hem de su ile karışabilen organik çözücü gerekmektedir. PLGA ve rifampisini çözebilen, su ile karışabilen ve sentez ortamından uzaklaştırılması kolay olan aseton organik faz olarak seçilmiştir. PLGA ve rifampisinin asetonda çözünmesinin ardından çözeltinin su üzerine damlatılması ile suya karışacak olan aseton, PLGA ve rifampisinin çökmesini ve rifampisinin PLGA içerisine enkapsüle olmasını sağlamıştır. Stabilizör kullanılmamış, sulu faz yalnızca distile sudan oluşmuştur.

20 mg PLGA ve 3,4 mg rifampisin tartıldı ve 2 mL aseton içerisinde vorteks yardımıyla çözüldü. Enjektöre alınan karışım, manyetik karıştırıcı üzerinde 28 mL distile suya damlatıldı. Organik fazın evaporasyonu, çözeltinin 4 saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında karıştırılmasıyla gerçekleştirildi. Evaporasyonun ardından boyut ve zeta potansiyeli ölçümleri için örnek ayrıldı. Çözelti, agregatların ve enkapsüle olmayan moleküllerin uzaklaştırılması amacıyla 0.45 μm selüloz asetat (CA) enjektör uclu filtreden geçirildi. Nanopartiküller liyofilizatör cihazında kurutulmak için dondurulmak üzere -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.4 Rifampisin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Yüzeyine rGp144 Protein Konjugasyonu

S. aureus hücrelerini doğrudan hedeflemek üzere rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin yüzeyine rGp144 konjuge edilmiştir. Konjugasyon aşamasında EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino) propyl carbodiimide) kullanılmıştır. EDC, karboksil ve amin grupları arasında amid bağları oluşturan suda çözünür bir çapraz bağlayıcı ajandır. PLGA'nın karboksil uçlarından rGp144'ün amino uçlarına bağlanması amaçlanmıştır.

5 mg rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü 5 mL PBS (pH 5) içerisinde ve 3 mg EDC 1 mL distile su içerisinde çözüldükten sonra bir araya getirildi. 4 °C'de 30 dakika 500 rpm'de karıştırılarak PLGA'nın karboksil grubu aktive edildi. Ardından nanopartiküller 9000 rpm'de 10 dakika çöktürüldü. Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra pellet 4.5 mL PBS ile yeniden süspanse hale getirildi. PBS kullanılarak

hazırlanan 1 mg/mL rGp144 çözeltisinden 500 μL alınarak, nanopartikül çözeltisine eklendi ve 4 °C'de 30 dakika karıştırıldı. Ardından rGp144 konjugasyonu gerçekleşen nanopartiküller 9000 rpm'de 10 dakika çöktürüldü ve reaksiyona girmeyen proteinler uzaklaştırıldı. Pellet 5 mL distile suda çözüldü ve ölçümler için örnek ayrıldı. Kalan örnek, liyofilizatör cihazında kurutulması için dondurulmak üzere -20 °C'ye kaldırıldı [121], [122].

3.2.5 Nanopartikül Karakterizasyon Çalışmaları

Rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin hem rGp144 ile konjuge edilmiş hem de konjugasyon gerçekleştirilmemiş durumundaki boyutu, zeta potansiyeli, polidispersite indeksi (PDI), Zetasizer cihazıyla tespit edildi. Enkapsülasyon etkinliği, etkin madde yüklenme etkinliği ve rekasiyon verimi konjuge edilmemiş nanopartiküller için hesaplandı. FT-IR spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu incelemeleri gerçekleştirilerek in-vitro salım çalışması yapıldı.

3.2.5.1 Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi (PDI)

Nanopartiküllerin boyut ve PDI değerleri, dinamik ışık saçılımı metodu (DLS) ile çalışan Zetasizer (Zetasizer Nano ZS90, Malvern, UK) cihazıyla saptanmıştır. Evaporasyonun ardından ayrılan sentez örneğinden ve konjugasyonun ardından ayrılan örnekten 50 μL alındı ve üzerine 1450 μL distile su eklenerek 1:30 oranında seyretme yapıldı. Örnekler sırayla altın elektrodlu kapiler küvete konuldu ve 3 tekrarlı ölçüm gerçekleştirildi. Sonuçların ortalaması alınarak boyut (nm) ve PDI değerleri standart sapmalarıyla belirlendi.

3.2.5.2 Yüzey Yükü ve Zeta Potansiyeli

Nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri, elektroforetik ışık saçılması metodu (ELS) ile çalışan Zetasizer (Zetasizer Nano ZS90, Malvern, UK) cihazıyla saptanmıştır. Evaporasyonun ardından ayrılan sentez örneğinden ve konjugasyonun ardından ayrılan örnekten 50 μL alındı ve üzerine 1450 μL distile su eklenerek 1:30 oranında seyretme yapıldı. Örnekler sırayla altın elektrodlu kapiler küvete konuldu ve 3 tekrarlı ölçüm gerçekleştirildi. Sonuçların ortalaması alınarak zeta potansiyel (mV) değerleri standart sapmalarıyla belirlendi.

3.2.5.3 Enkapsülasyon Etkinliği

Rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği (%EE), direkt yöntem ile hesaplanmıştır. Liyofilizasyon sonrası kuru nanopartiküllerden 1 mg tartıldı. 1 mL DCM ile çözülerek PLGA kaplı rifampisin molekülleri açığa çıkarılmış oldu. Rifampisin moleküllerinin miktarı UV-Vis spektrometre ile 476 nm'de absorbansı ölçüldü. Belirlenen konsantrasyonlarda rifampisinin DCM'de çözülmesiyle hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak enkapsüle edilen etkin madde miktarı mg cinsinden tayin edildi. Eşitlik 3.1 kullanılarak % EE hesaplandı [123], [124].

$$\%EE = \frac{\text{Enkapsüle olan etkin madde miktarı (mg)}}{\text{Başlangıçta eklenen etkin madde miktarı (mg)}} x100 \qquad (3.1)$$

3.2.5.4 Etkin Madde Yüklenme Kapasitesi

Enkapsülasyon etkinliği hesaplamasında kullanılmak üzere hesaplanan nanopartiküllerde enkapsüle edilen rifampisin miktarı ile liyofilizasyon sonrası kurutulan tüm nanopartiküllerin miktarı kullanılarak etkin maddenin yüklenme kapasitesi (%YK) Eşitlik 3.2 ile belirlendi [123], [124].

$$\%YK = \frac{\text{Enkapsüle olan etkin madde miktarı (mg)}}{\text{Üretilen nanopartikül miktarı (mg)}} x100 \qquad (3.2)$$

3.2.5.5 Reaksiyon Verimi

Liyofilizasyon sonrası kurutulmuş nanopartikül miktarı ile sentezin başlangıcında kullanılan rifampisin ve PLGA Miktarları dikkate alınarak Eşitlik 3.3 kullanılarak reaksiyon verimi (%RV) hesaplanmıştır [123], [124].

$$\%RV = \frac{\text{Üretilen nanopartikül miktarı (mg)}}{\text{Başlangıçta eklenen polimer miktarı (mg)} + \text{Başlangıçta eklenen etkin madde miktarı (mg)}} x100 \qquad (3.3)$$

3.2.5.6 FT-IR Spektroskopisi

Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FT-IR), etkin madde ve polimer arasında meydana gelen etkileşimleri belirlenmesi için kullanıldı. FT-IR, katı, sıvı ve gaz haldeki maddelerin kızılötesi absorbsiyon, emisyon ve fotoiletkenlik

spektrumunu belirlemek için kullanılan bir tekniktir [125]. FT-IR, moleküllerin elektromanyetik spektrumun kızılötesi aralığında bulunan ışığı absorblayarak, molekül yapısındaki bağlara ait dalga boylarında absorpsiyon bantları oluşturması ile bağların durumu, bağlanma yerleri hakkında bilgi edinilmesini sağlamaktadır. Etkin madde ve polimer arasındaki etkileşim genellikle fonksiyonel grupların sebep olduğu bant kaymaları ve IR spektrumlarında meydana gelen değişimler ile tespit edilmektedir [126]. Polimer ve etkin madde arasında etkileşimin belirlenmesi ve enkapsülasyonun doğrulanması için liyofilizasyon sonrası kurutulmuş rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin FT-IR spekturumları ATR modunda Shimadzu Prestige 2100 spektofotometre cihazı ile 600-2500 cm^{-1} dalga sayısı aralığında alınmıştır.

3.2.5.7 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

SEM maddelerin yüzeyini odaklanmış elektron demeti ile tarayarak boyut, şekil, topografya, kristalografi ve yüzey kompozisyonu gibi morfolojik özelliklerin analizinde kullanılabilen, çok kez büyütülmüş yüksek çözünürlüğe sahip görüntülerin elde edilmesini sağlayan elektron mikroskobu tekniğidir [127][128]. Rifampisin yüklü rGp144 konjuge edilmiş ve konjuge edilmemiş PLGA nanopartiküllerinin yüzey morfolojisi, boyutları ve şekilleri taramalı elektron mikroskopu ile incelenmiştir. Kurutulan nanopartiküller vakum kullanılarak altın-paladyum üzerine kaplanmış ve ölçüm gerçekleştirilmiştir. Ölçümde PHILIPS XL30S FEG cihazı kullanılmıştır.

3.2.5.8 In-vitro Salım Çalışması

Rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin ve rGp144 konjuge nanopartiküllerin salım çalışması dissolüsyon metodu ile gerçekleştirilmiştir [129]. Rifampisinin, nanopartiküllerden ve konjuge nanopartüküllerden salımının incelenmesi için 2 mg liyofilize nanopartikül, 4 mg ve 2 mg liyofilize konjuge nanopartikül tartılarak 1'er mL pH 7.4 1X PBS tamponda 15 mL'lik falkonda süspanse edilmiştir. 37 °C'de çalkalamalı inkübatöre yerleştirilmiş ve salımın başladığı ilk gün 6 saat boyunca her saatte bir, 1 hafta boyunca 24 saatte bir ve 1 ay boyunca haftada bir olmak üzere örnekler alınarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Örnekler alınırken 15 mL falkonda süspanse haldeki nanopartiküller ve konjuge nanopartiküller, 9000

rpm'de 15 dakika 4 °C'de santrifüjde edilerek çöktürülmüştür. Santrifüjün ardından rifampisinin salındığı üst faz ölçüm için ayrılmış, nanopartikül ve konjuge nanopartikül pelletleri 1 mL 1X PBS ile yeniden süspanse edilerek salım ortamlarına tekrar yerleştirilmişlerdir. Alınan üst faz, UV-Vis spektrometrede 476 nm dalga boyunda ölçülmüş ve salınan rifampisin miktarları oluşturulan kalibrasyon eğrisi ile tayin edilmiştir.

3.2.6 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerin, rGp144 konjuge rifampisin yüklü nanopartiküllerin ve rifampisinin, *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922), metisilin dirençli klinik izolat *S. aureus* (MRSA), oksasilin duyarlı *S. aureus* (OSSA-ATCC 29213), metisilin-oksasilin dirençli *S. aureus* (MORSA-ATCC 43300) ve metisilin duyarlı klinik izolat *S. aureus* (MSSA) suşları üzerine antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için agar kuyucuk difüzyon ve broth mikrodilüsyon yöntemleri uygulandı. Antibakteriyal etkinlik tayininde kullanılacak yöntemler EUCAST/2022 ve CLSI 2022 standartları esas alınarak belirlenmiştir. Bakteriler, 3 ml Mueller-Hinton sıvı besiyerinde (MHB) bir gece boyunca 37 °C'de çalkalayıcılı inkübatörde kültüre edildiler. Ardından hücreler MHB besiyeri kullanılarak, agar kuyucuk difüzyon yöntemi için 10^8 kob/mL (OD_{600nm}=0,1-0,2 aralığı), broth mikrodilüsyon yöntemi için 10^6 kob/mL olacak şekilde dilüe edilerek hazırlandılar. Rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü ve rGp144 konjuge rifampisin yüklü PLGA nanopartikülün hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak (Şekil 4.9) ilaç yükleme kapasiteleri belirlendi ve 24. saatin sonunda saldıkları rifampisin miktarı 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.031 ve 0.015 μg/mL olacak şekilde tartılarak steril su içerisinde çözüldü. Rifampisin antibiyotiği de pozitif kontrol olarak değerlendirildi [130], [131].

3.2.6.1 Agar Kuyucuk Difüzyon

Mueller-Hinton agar besiyeri içeren petri kaplarına 100 μL 10^8 kob/mL konsantrasyonda hazırlanan bakteri suşları swap ile yayılarak ekildi. Petri kaplarında üzerine bakteri kültürü yayılmış MHA besiyerinde, uygulanacak örnek sayısınca 6 mm çapında kuyular açıldı. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyonun ardından hazırlanan rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü, rGp144 konjuge

rifampisin yüklü nanopartikül ve rifampisin için hazırlanan altı farklı konsantrasyondan (32-0.015 μg/mL) 100 μL alınarak kuyulara eklendi. 37 ºC'de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı [132].

3.2.6.2 Broth Mikrodilüsyon

Broth mikrodilüsyon yöntemi, CLSI 2022 standardına uygun olarak gerçekleştirilmiştir [133]. 96-well plate kullanılarak her kuyucuğa 10^6 kob/mL konsantrasyonda hazırlanan bakteri suşlarından 100 μL eklendi. Rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü, rGp144 konjuge rifampisin yüklü PLGA nanopartikül ve rifampisin için hazırlanan altı farklı konsantrasyondan (32-0.0012 μg/mL) 100 μL alınarak bakteri içeren kuyuların üzerine eklendi. Kontaminasyon kontrolü amacıyla MHB besiyerinden 200 μL ve bakterilerin üreme durumlarının izlenmesi ve örnek içeren kuyular ile karşılaştırılması amacıyla 100 μL bakteri üzerine 100 μL besiyeri eklenerek kontrol kuyuları hazırlandı. Çalışılan 96-well plate 37 ºC'de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından MİK değerinin belirlenmesi ve antibakteriyel etkilerin karşılaştırılması amacıyla standart petri sayma metodu uygulanmıştır. Standart petri sayma yönteminde, kuyucuklardan 100 μL alınarak MHA içeren petri üzerine eklenmiş ve drigalski kullanılarak yayma yöntemi ile bakteri ekimleri gerçekleştirilmiştir. Petriler, 37 °C etüvde bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün sonuçlar elde edilmiş, petrilerdeki bakteri üreme durumu değerlendirilmiştir.

4
SONUÇ VE ÖNERİLER

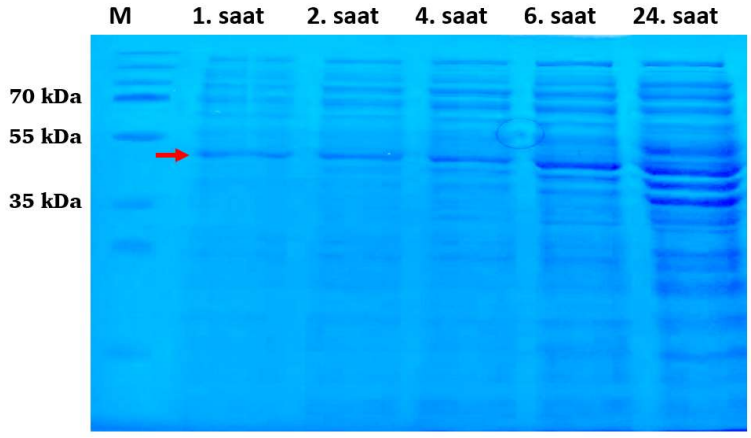
Tez çalışmasının sonuçları protein ekspresyonu, doğrulanması, *S. aureus* ile etkileşiminin analizi ve nanopartikül sentezi, karakterizasyonu olarak iki gruba ayrılarak sunulmuştur. Son olarak tezin bulgularına ve önerilere yer verilmiştir.

4.1 rGp144 Ekspresyonu, Doğrulanması ve *S.aureus* ile Etkileşiminin Analizi

Transforme *E. coli* Bl21 (DE3) suşundan rGp144 ekspresyonu koşullarının optimize edilmesi, SDS-PAGE analizi, saflaştırılması ve western blot yöntemi ile doğrulanmasının ardında ELISA ve mikroskobik yöntemler ile *S. aureus* etkileşiminin analizi sonuçları sunulmuştur.

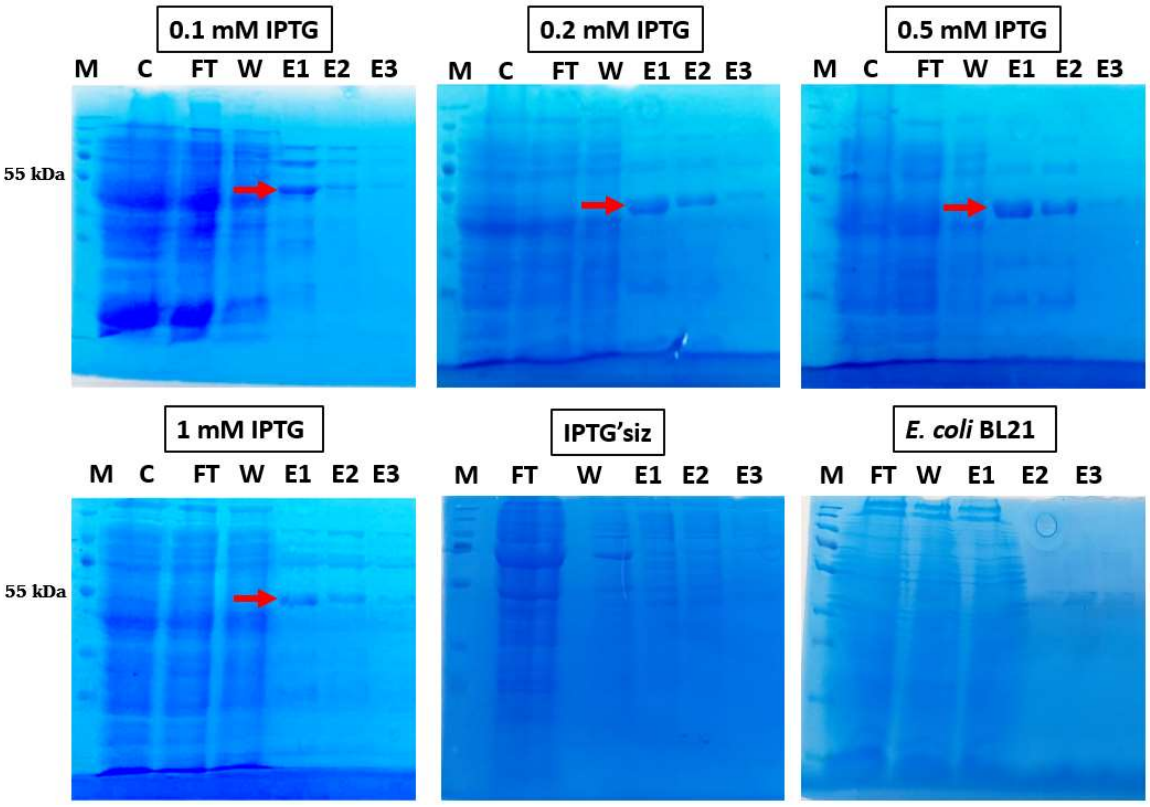
4.1.1 rGp144 Protein Ekspresyonu ve SDS-PAGE Analizi

rGp144 proteininin optimum eksprese edilme koşullarının belirlenmesi için transforme hücreler 100 μL ampisilin (100 mg/mL) içeren 100 ml Terrific Broth besiyerinde ve negatif kontrol amaçlı *E. coli* BL21 hücreleri ampisilin içermeyen besiyerinde 37 °C'de 200 rpm'de OD: 0.1-0.2 düzeyine erişene kadar inkübe edildi. İnkübasyon süresince 0.1 mM IPTG eklendi ardından 1, 2, 4, 6 ve 24. Saatlerde örnekler alınarak saatlik ekspresyon düzeylerinin incelenmesi için SDS-PAGE analizi gerçekleştirildi (Şekil 4.1).



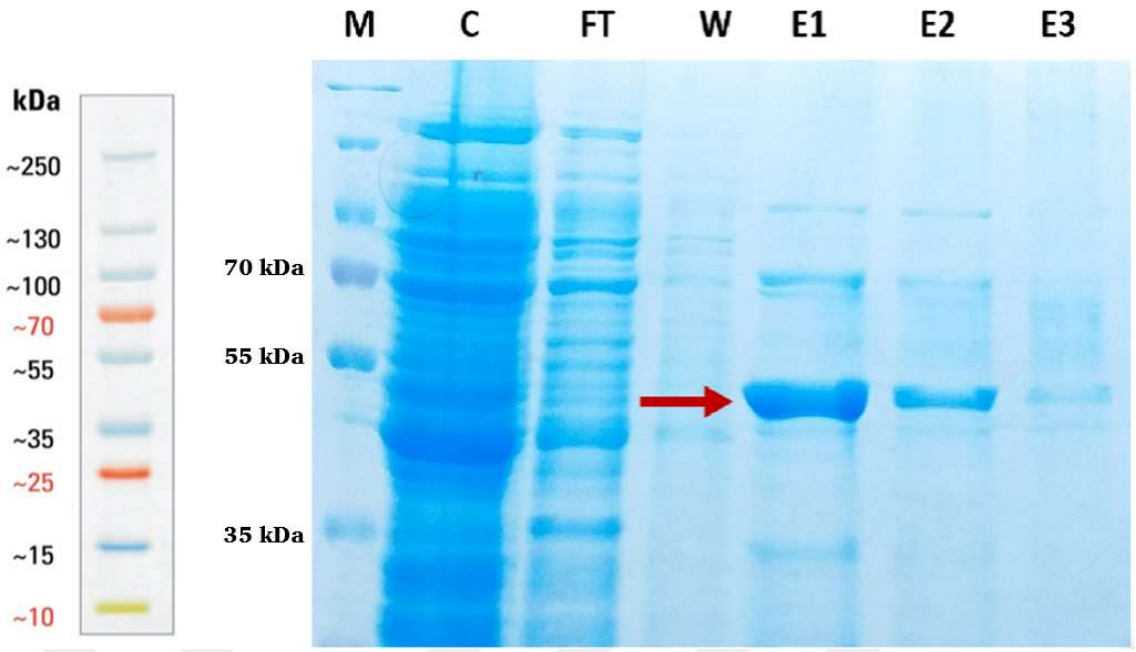
Şekil 4.1 rGp144 hücre kültüründen farklı saatlerde alınan örneklerin saflaştırma öncesi SDS-PAGE analizi (M: Marker)

Ardından IPTG konsantrasyonu için optimizasyon gerçekleştirildi. 0.1 mM, 0.2 mM, 0.5 mM, 1 mM konsantrasyonlarda IPTG eklenen kültürler, IPTG eklenmeyen ve negatif kontrol amaçlı *E. coli* BL21 kültürü 18 °C'de 200 rpm'de 6 saat inkübasyonu, lizizi ve sonrasında Thermo Fisher HisPure Kobalt Resin ile pürüfikasyonuyla elde edilen fraksiyonlarla yapılan SDS-PAGE analizi Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlarda IPTG eklenen, IPTG eklenmeyen ve E. coli BL21 hücre kültürlerinin saflaştırma sonrası SDS-PAGE analizi (M: Marker, C: Crude, FT: Flowthrough, W: Wash, E1: Elüsyon 1, E2: Elüsyon 2, E3: Elüsyon 3)

SDS-PAGE analizi ile rGp144'ün ekspresyonunun; 0.5 mM IPTG konsantrasyonu ve 6 saat 18 °C'de 200 rpm'de 100 mL Terrific Broth besiyeri ile optimum düzey olduğunu beklenen boyutta (yaklaşık 53 kDa) yüksek düzeyde ekspresyon varlığı ile tespit edilmiştir. Optimize koşullarda eksprese edilen kültür lizatından gerçekleştirilen protein saflaştırma işleminin sonuçları Şekil 4.3'de gösterilmekte olup %75 ve üzerinde saflıkta rGp144 proteini eldesi sağlanmıştır.

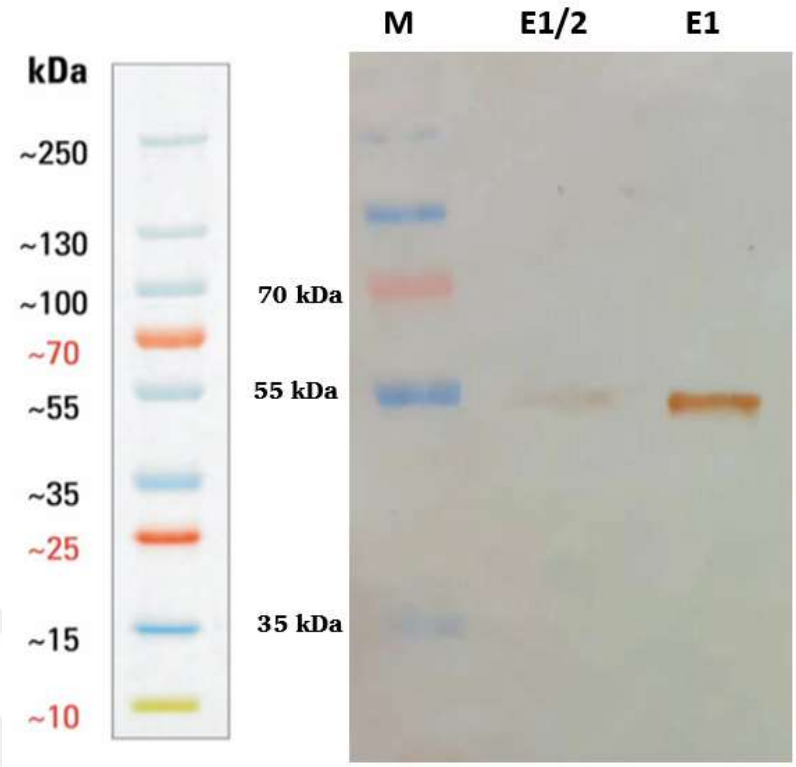


Şekil 4.3 rGp144'ün 6 saat 18°C'de 200 rpm'de 0.5 mM IPTG ile ekspresyonu ve saflaştırmasının ardından SDS-PAGE görüntüsü (M: Marker, C: Crude, FT: Flowthrough, W: Wash, E1: Elüsyon 1, E2: Elüsyon 2, E3: Elüsyon 3)

Saflaştırma sonrası gerçekleştirilen Bradford analizi ile eksprese edilen proteinin miktar tayini gerçekleştirildi. Buna göre Elüsyon 1: 1.4 mg/mL, Elüsyon 2: 0.6 mg/mL, Elüsyon 3: 0.08 mg/mL protein içermektedir. Belirlenen optimum ekspresyon koşulları ile seri ekspresyona geçilmiştir.

4.1.2 Western Blot Analizi ile rGp144 Ekspresyonunun Doğrulanması

Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi kullanılarak gerçekleştirilen Western Blot analizi ile jelden nitroselüloz membrana transferi gerçekleştirilen rGp144, 6x Histidin kuyruğundan (His-tag) bağlanacak olan His-probe Antibody (H-3): sc-8036 primer antikoru ile muamele edildi. Ardından membran Goat anti-Mouse IgG (H+L) sekonder antikorda bekletildi ve HRP ile konjuge sekonder antikorlar, primer antikorlara bağlandılar. Membranda bulunan proteinin His-tag kuyruğuna bağlanan primer antikora bağlanan sekonder antikorların HRP kısımlarının kataliz ettiği reaksiyon ile deteksiyon solüsyonunda bulunan DAB, hidrojen peroksit tarafından oksitlenmiş ve okside olan DAB kahverengi olduğundan membran üzerinde His-tag kuyruğuna sahip olan rGp144'ün varlığı Şekil 4.4'te gösterildiği gibi kanıtlanmış oldu.

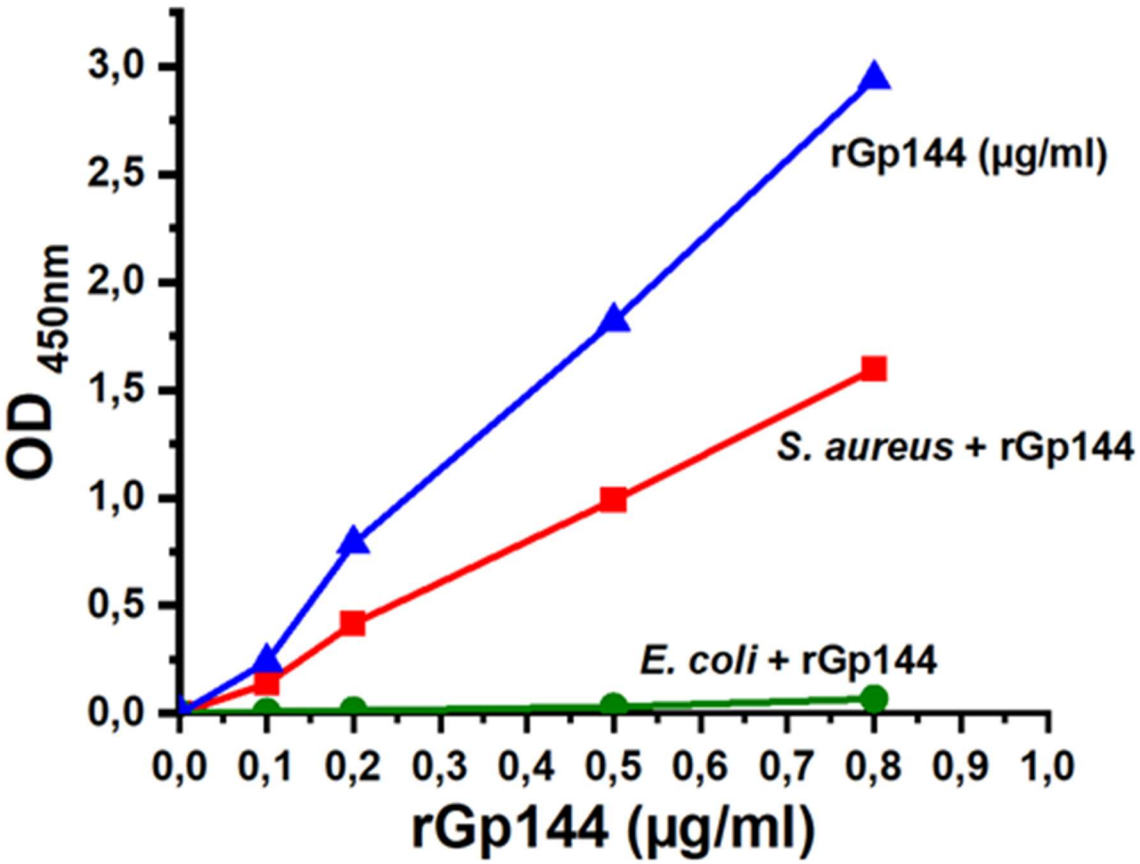


Şekil 4.4 rGp144 proteininin Western Blot görüntüsü (M: Marker, E1/2: Elüsyon 1'in ½ oranda seyreltilmiş hali, E1: Elüsyon 1)

4.1.3 Hücre ELISA Yöntemi ile *S. aureus*-rGp144 Etkileşiminin Doğrulanması

Hücre duvarı ELISA yöntemi ile 96 well plate kuyuları *S. aureus* ve *E. coli* ile kaplandı. Ardından rGP144 ile inkübasyonu gerçekleştirildi ve yıkamalardan sonra rGp144'ün His-tag kuyruğuna bağlanacak olan olan His-probe Antibody (H-3): sc-8036 primer antikoru ile muamele edildi. Ardından hücreye bağlanan rGp144'e bağlanan primer antikorlara bağlanacak olan Goat anti-Mouse IgG (H+L) sekonder antikoru kuyulara eklendi. Sekonder antikora konjuge edilmiş olan HRP'nin subsratı olan TMB kuyulara eklendi ve ardından son durdurma tamponu ile reaksiyon durduruldu. 450 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

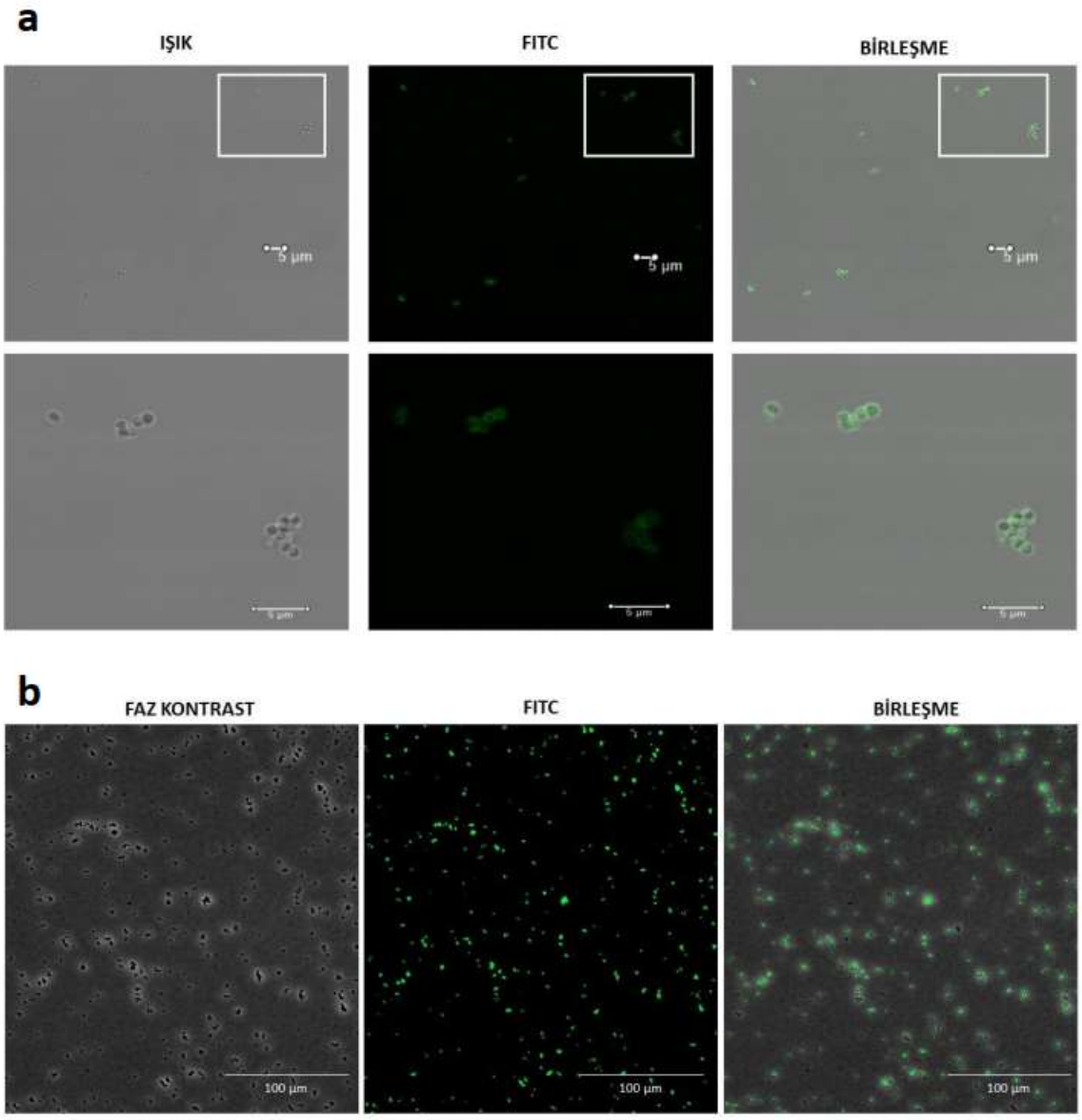
Hücre ELISA sonuçlarına göre *S. aureus* hücreleri ile interaksiyonu gerçekleştirilen rGp144'ün konsantrasyonu arttıkça, ölçülen absorbansta da anlamlı bir artış var iken *E. coli* ile interaksiyonu gerçekleştirilen rGp144 kuyularında absorbansta bir artış olmamıştır. Bu durum Şekil 4.5'te görüldüğü gibi rGp144'ün *S. aureus* hücre duvarına bağlandığını ve *E. coli* hücre duvarına bağlanmadığı ispatlamaktadır.



Şekil 4.5 Hücre ELISA yönteminin sonuç grafiği

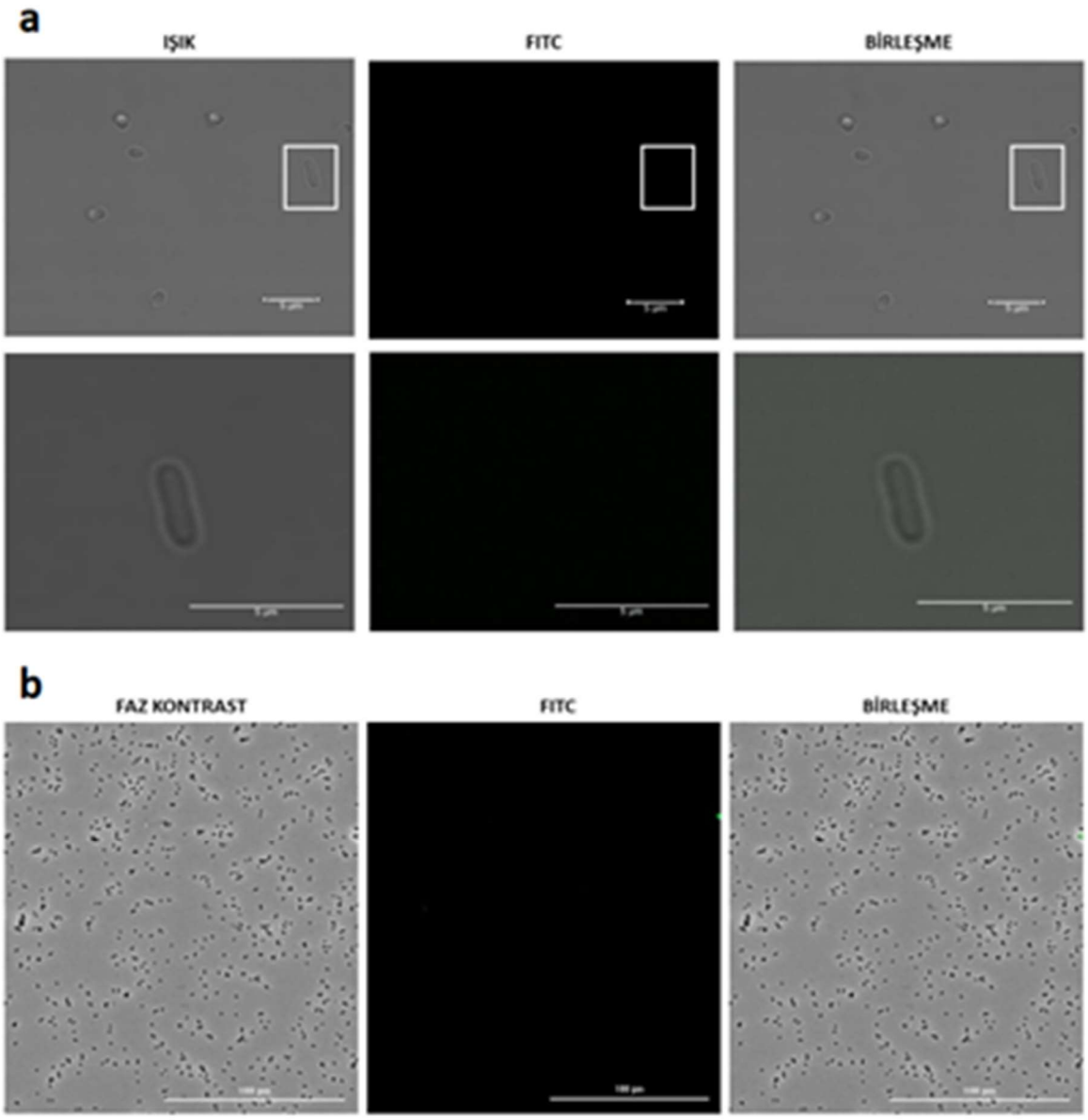
4.1.4 Konfokal Mikroskobu ve Yüksek Verimli Görüntüleme Cihazı ile *S. aureus*-rGp144 Etkileşiminin Gösterilmesi

S. aureus ve rGp144 etkileşiminin mikroskobik analizinde konfokal mikroskobu ve yüksek verimli görüntüleme cihazından yararlanılmıştır. Floresan boyanmış rGp144 PBS içerisinde, 10^8 kob/mL *S. aureus* ve negatif kontrol olarak kullanılan *E. coli* ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilmiş ve ardından incelemeler gerçekleştirilmiştir. Konfokal mikroskobu ile yapılan incelemede ışık ve FITC merceği kullanılarak alınan görüntülerin yanı sıra bu iki görüntünün üst üste çakışmasıyla meydana gelen birleşme görüntüsü de alınmıştır. Yüksek verimli görüntüleme cihazında ise faz kontrast ve FITC merceği ile incelenmiş ve bu iki görüntünün üst üste çakışmasıyla meydana gelen birleşme görüntüsü de alınmıştır.



Şekil 4.6 *S. aureus* ve FITC etiketli rGp144'ün interaksiyonu (a) konfokal mikroskobu ve (b) yüksek verimli görüntüleme cihazı ile incelenmesi

Mikroskobik analizler sonucunda Şekil 4.6'da görüldüğü üzere, rGp144'ün *S. aureus* hücreleri ile etkileşime girdiği ancak Şekil 4.7'de görüldüğü gibi *E. coli* hücreleri ile etkileşime girmediği kanıtlanmıştır. FITC etiketli rGp144'ün *S. aureus* hücre yüzeyinde lokalize olduğu, *E. coli* hücre yüzeyinde lokalize olmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.7 *E. coli* ve FITC etiketli rGp144'ün interaksiyonu (a) konfokal mikroskobu ve (b) yüksek verimli görüntüleme cihazı ile incelenmesi

4.2 Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyonu

Rifampisin yüklü PLGA sentezi, tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma ve nanoçöktürme yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Nanopartikül ve rGp144 konjuge nanopartiküllerin boyut, PDI, zeta potansiyel sonuçları, %EE, %YK, %RV değerleri belirlenmiş ve sonuçlar karşılaştırılarak analiz edilmiştir.

4.2.1 Boyut, Polidispersite İndeksi (PDI) ve Zeta Potansiyel Analizi

Sentezde uygulanan iki farklı yöntem ve yöntemlerde kullanılan parametreler değiştirilerek elde edilen nanopartiküllerin boyut, PDI ve zeta potansiyeli değerleri Zetasizer cihazı ile belirlenmiştir.

4.2.1.1 Tekli Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

80 mg PLGA, üç farklı rifampisin miktarı belirlenerek tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile sentezlenmiştir. Organik çözücü olarak 2 ml DCM, sulu faz olarak 35 ml % 0,1 PVA kullanılmış, %80 güç ile prob sonikatör altında 90 saniyede sentez gerçekleştirilmiş ve evaporasyon için 4 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Tablo 4.1'de, kullanılan farklı konsantrasyon oranları sonucu oluşan nanopartiküllerin boyut, PDI ve zeta potansiyeli değerleri verilmiştir.

Tablo 4.1 PLGA/Rifampisin oranına göre boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri

PLGA/Rifampisin (mg)	Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
80/20	235,8 ± 3,751	0,175 ± 0,024	-26,5 ± 2,43
80/25	246 ± 7,80	0,135 ± 0,019	-26,6 ± 2,12
80/30	256,8±3,150	0,103 ± 0,02	-22,7 ± 1

Çalışılan üç farklı konsantrasyonda da 250 nm'nin altında, PDI değeri 0,2'den düşük, zeta potansiyeli -30 değerine yakın rifampisin yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlenmiştir. Rifampisin miktarı arttıkça boyutun arttığı ve PDI değerinin düştüğü görülmektedir. Ölçümler 3 tekrarlı olarak alınmış olup standart sapmaları da oldukça düşük çıkmıştır. Bu durum stabil nanopartiküllerin sentezlendiğini göstermektedir.

4.2.1.2 Nanoçöktürme Yöntemi

Sentez çalışmaları kullanılan PLGA, rifampisin miktarları ve sulu fazın, organik çözücünün hacmi değiştirilerek nanoçöktürme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. PLGA ve rifampisin, organik çözücüde çözüldükten sonra sulu faza damlatılmış ve oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılarak 4 saat evaporasyona

bırakılmıştır. Tablo 4.2'de, kullanılan farklı konsantrasyon oranları ve fazların hacimleri sonucu oluşan nanopartiküllerin boyut, PDI ve zeta potansiyeli değerleri verilmiştir.

Tablo 4.2 PLGA/Rifampisin oranları ve fazların hacimlerinde göre boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri

PLGA/Rifampisin (mg)	Organik Çözücü Hacmi (mL)	Sulu Faz Hacmi (mL)	Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
5/0,85	0,5	5	143,7 ± 1,383	0,084 ± 0,110	-31,3 ± 2,3
5/0,85	0,5	7	224,3 ± 1,1	0,221 ± 0,092	-27,7 ± 2,32
20/3,4	2	28	131,3 ± 2,076	0,143 ± 0,12	-36,0 ± 1,07
20/3,4	2	24	128,8 ± 1,02	0,141 ± 0,107	-31,2 ± 1,4

Nanoçöktürme yöntemi ile yapılan çalışmalarda boyut 250 nm'nin altında, PDI değeri 0,3'ten düşük, zeta potansiyeli -30 değerine yakın rifampisin yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlenmiştir. Miktarların sabit ancak sulu faz hacminin düşük (5 mL ve 24 mL) kullanıldığı iki çalışmada evaporasyon esnasında agregatların oluştuğu tespit edilmiştir. Ölçümler 3 tekrarlı olarak alınmış olup standart sapmaları da oldukça düşük çıkmıştır. Bu durum stabil nanopartiküllerin sentezlendiği göstermektedir.

Deneyde optimize edilen 20 mg PLGA, 3.4 mg rifampisin, 2 mL organik çözücü (aseton) ve 24 mL distile su koşullarında meydana gelen nanopartiküllerin boyut dağılımı grafiği Şekil 4.8 (a)'da, zeta potansiyeli dağılım grafikleri Şekil 4.9'da verilmiştir.

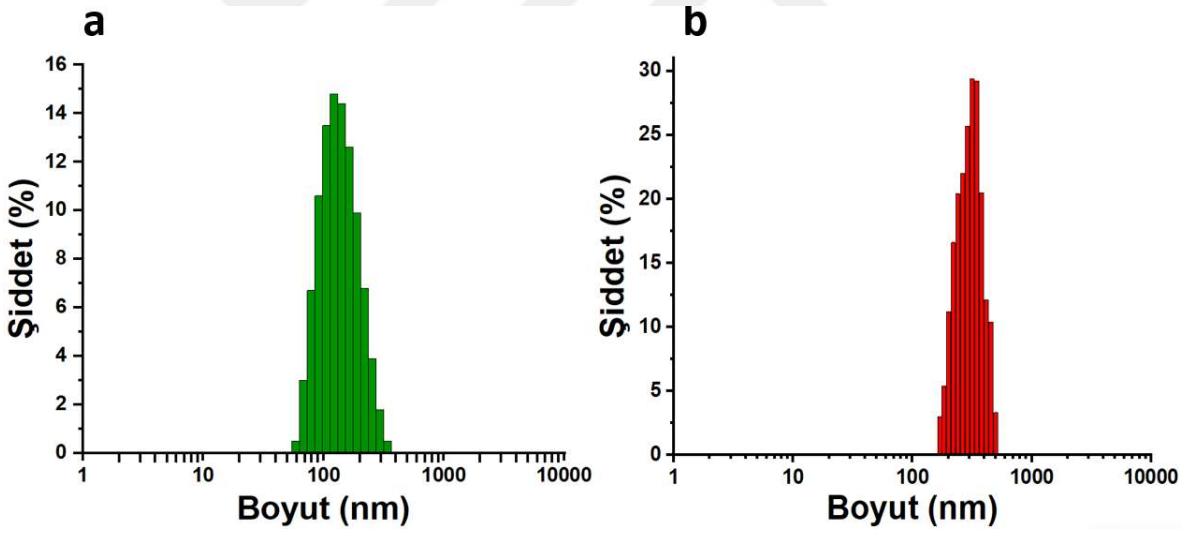
4.2.1.3 rGp144 Konjuge Nanopartiküller

Rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin rGp144 ile konjugasyonunda belirlenen parametreler sonucu boyut, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 Nanopartikül/rGp144 oranları ve EDC miktarına göre boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri

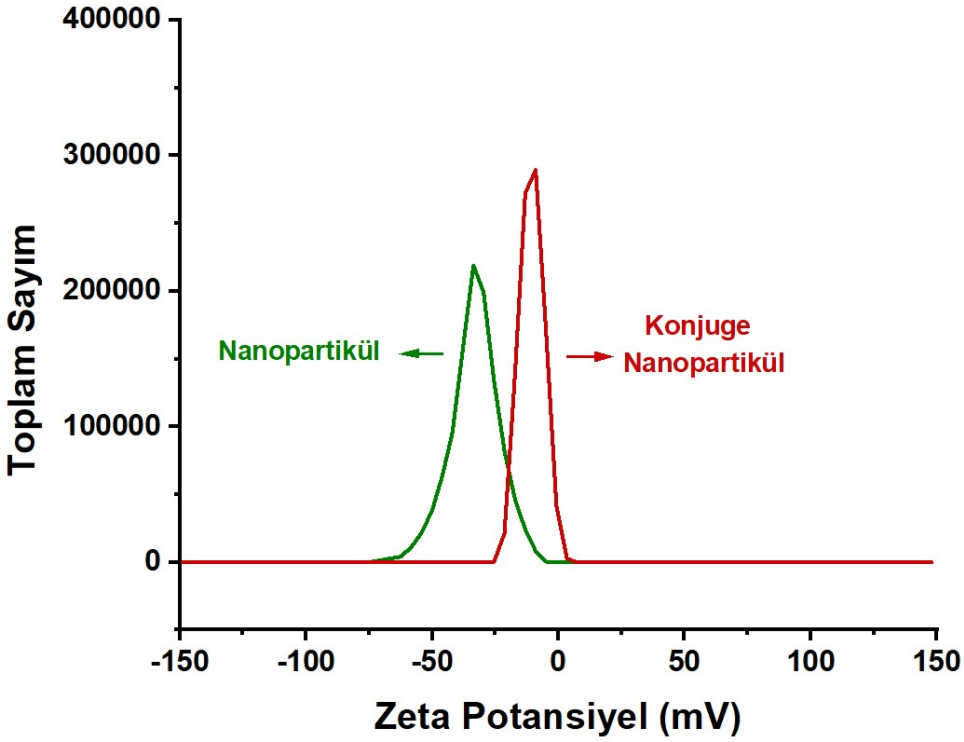
Konjugasyon	Nanopartikül/ rGp144 (mg)	EDC (mg)	Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
rGp144-NP 1	5/0.5	3	250,9 ± 131,2	0,794 ± 0,291	-11,7 ± 1,27
rGp144-NP 2	5/0.5	5	322,7 ± 148,3	0,583 ± 0,295	-10,7 ± 2,47
rGp144-NP 3	5/0.5	-	250,6 ± 68,38	0,689 ± 0,380	-10,9 ± 1,720

Deneyde 5 mg nanopartikül ve 0.5 mg rGp144 ile 5 mg/mL EDC kullanılarak gerçekleştirilen konjugasyon sonucu meydana gelen nanopartiküllerin boyut dağılımı grafiği Şekil 4.8 (b)'de, zeta potansiyeli dağılım grafikleri Şekil 4.8'de verilmiştir. Nanopartiküllerin boyutu dinamik ışık saçılması yöntemi, zeta-potansiyeli ise elektroforetik ışık saçılması yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.



Şekil 4.8 Rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin (a) ve rGp144 ile konjuge edilen rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin (b) boyut dağılımı grafikleri

rGp144 ile konjuge edilen nanopartiküllerin, konjuge edilmemiş olanlar kıyasla daha büyük boyutlu olmaları, konjugasyonun gerçekleştiğini doğrulamaktadır. Nanopartikülün boyutu 120-220 nm civarı iken konjugasyon sonrası boyut 250-330 nm'ye kadar yükselmiştir.

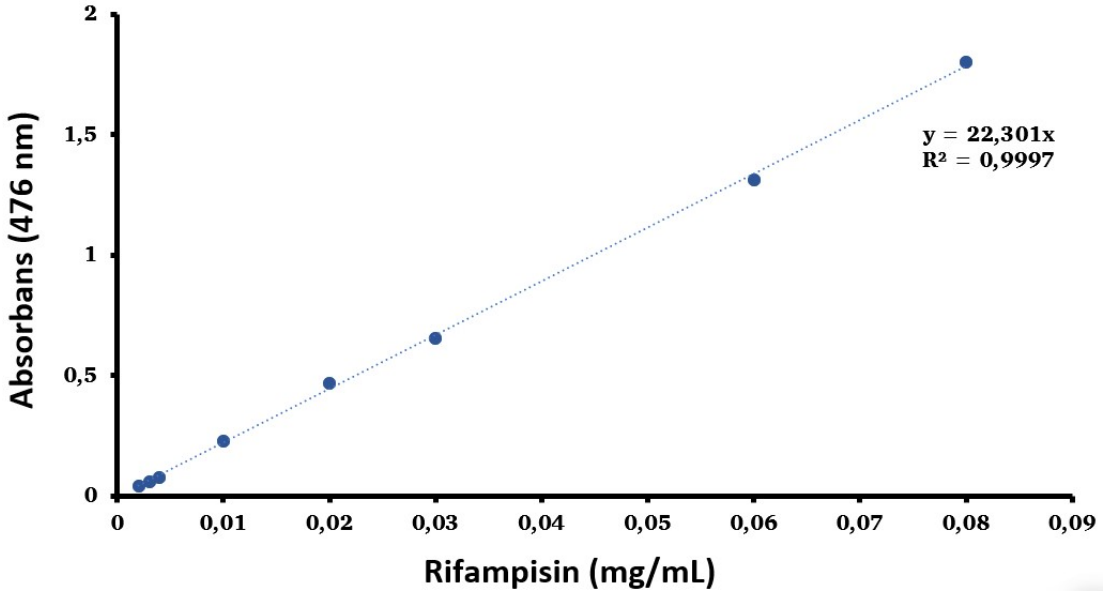


Şekil 4.9 Ortalama zeta potansiyel dağılım grafiği

Zeta potansiyel değerlerinin ölçümü, konjugasyonun doğrulanması için oldukça önemlidir. Rifampisin yüklü PLGA nanopartikülün zeta potansiyeli -35 ila -25 arasında değişkenlik gösteririrken rGp144 ile konjuge edilen nanopartikülün zeta potansiyeli -10 civarındadır (Şekil 4.9). Konjugasyon sonrası zeta potansiyel grafiğinin pozitif değerlere doğru kayması konjugasyonun başarılı olduğunu işaret etmektedir. Bu pozitif artış, partiküllerin yüzeyindeki negative yüklü karboksilik gruplara rGp144 bağlanmasından (nanopartiküllerin karboksilik asit gruplarının peptidin amin gruplarına bağlanmasıyla nötral amid bağlarının oluşması sonucunda) kaynaklanmaktadır .

4.2.2 Enkapsülasyon Etkinliği, İlaç Yükleme Kapasitesi ve Reaksiyon Verimi

Sentezde uygulanan iki farklı yöntem ve yöntemlerde kullanılan parametreler değiştirilerek elde edilen nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği, ilaç yükleme kapasitesi ve reaksiyon verimi 3.1, 3.2 ve 3.3 eşitlikleri kullanılarak belirlenmiştir. Enkapsülasyon etkinliği, liyofilize olmuş nanopartiküllerin DCM içerisinde çözülerek PLGA içine yüklenmiş rifampisin moleküllerinin açığa çıkarılması ve UV-Vis spektrofotometrede 476 nm'de analiz edilmesiyle hesaplanmıştır.



Şekil 4.10 Rifampisin kalibrasyon eğrisi

Enkapsülasyon etkinliğinin hesaplanmasında konsantrasyonu 1 ile 0,001 mg/mL arasında değişen rifampisinin DCM içerisinde çözülmesiyle ve 476 nm'de ölçümleri gerçekleştirerek hazırlanan Şekil 4.10'da verilen kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır.

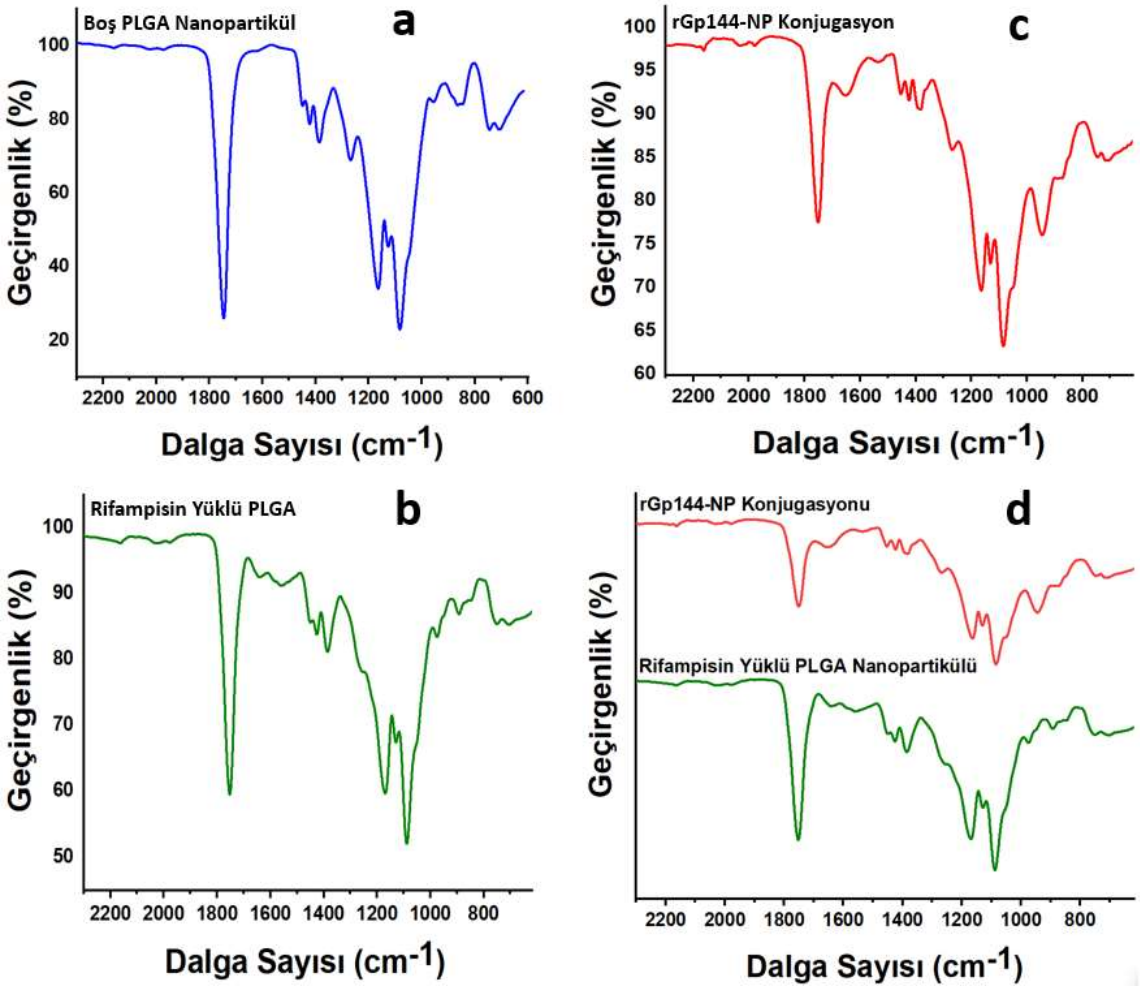
Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma ve nanoçöktürme yöntemleri ile gerçekleştirilen çalışmaların, kalibrasyon eğrisi (Şekil 4.10) ve Eşitlik 3.1 kullanılarak enkapsülasyon etkinlikleri hesaplanmış, ardından Eşitlik 3.2 kullanılarak yüklenme kapasiteleri bulunmuş ve liyofilize olan nanopartiküllerin toplam ağırlığı belirlenerek Eşitlik 3.3 kullanılmış ve reaksiyon verimleri bulunmuştur (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 Enkapsülasyon etkinliği (% EE), ilaç yükleme kapasitesi (% YK) ve reaksiyon verimi (% RV)

Yöntem	% EE	% YK	% RV
Tekli Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma	7,33	3,25	48,29
Nanoçöktürme	35,26	26,64	53,71

4.2.3 FT-IR Spektroskopisi Analizi

Rifampisin yüklü PLGA nanopartikülleri, rGp144 konjuge edilen nanopartiküller ve boş PLGA nanopartiküllerinin FT-IR analizi yapılmıştır ve spektrumlar Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11 Sentezlenen nanopartiküllerin FT-IR grafiği (a) boş PLGA nanopartikülü, (b) rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü (c) rGp144 konjuge edilmiş rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü (d) Rifampisin yüklü nanopartiküllerin ve rGp144 konjugasyonunun karşılaştırılmalı FT-IR spektrum grafiği

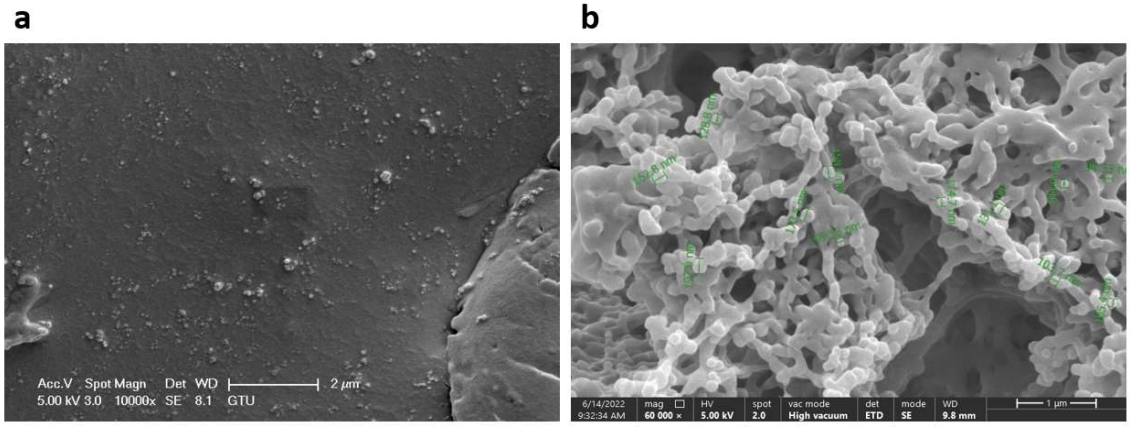
Rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin ve rGp144 ile konjuge rifampisin yüklü nanopartiküllerin FT-IR spektrumları Şekil 4.11 (d)'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Kızılötesi spektroskopi, polimerik malzemelerde yapı kimyasal bileşimini ve bileşenlerin bağlanma düzeninin anlaşılmasında gerekli ve etkin bir karakterizasyon tekniğidir. PLGA'nın majör karakteristik piki olan 1770 ve 1750 cm^{-1} arasında olan tek bant ester bağının C = O gerilmesine ve 1169 – 1088 cm^{-1}

'deki bantlar ise C – O gerilmesine aittir. 1450-850 cm^{-1} arasında olan bantlar da C-H bükülmelerine bağlıdır [134].

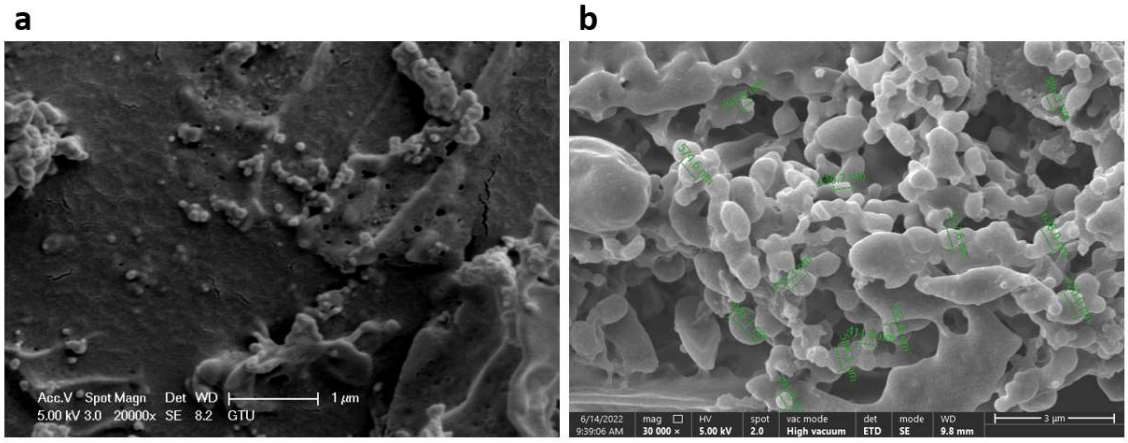
Proteinlerin karakteristiği için incelenen 1650 ve 1550 cm^{-1} bölgelerinde var olan bantlar ana amid bantlarıdır ve sırasıyla amid I ve amid II olarak adlandırılırlar. Amid grubunun C=O gerilmesi ve N-H bağının faz içi bükülmesi ve C-N bağının gerilmesinden kaynaklanan bant amid I'dir. Amid II, esas olarak N-H bükülmesi ve C-N gerilmesiyle meydana gelir [126]. FT-IR spektrumları incelendiğinde, PLGA'nın karakteristik bantlarından rifampisin yüklü nanopartikül sentezinin gerçekleştirildiği anlaşılmaktadır. Aynı zamanda konjuge edilmemiş nanopartikül ile karşılaştırıldığında rGp144 ile konjugasyonu gerçekleştirilmiş nanopartiküllerin protein varlığı sebebiyle verdiği amid bağı bantlarından ötürü konjugasyonun da başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği görülmektedir.

4.2.4 SEM Analizi

Sentezlenen rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü (Şekil 4.12 a ve b) ve rGp144 konjuge rifampisin yüklü PLGA nanopartikülünün (Şekil 4.13 a ve b) SEM görüntüleri incelendiğinde partiküllerin küresel yapıda oldukları ve boyutlarının beklenen değerlerde olduğu gözlemlenmiştir.



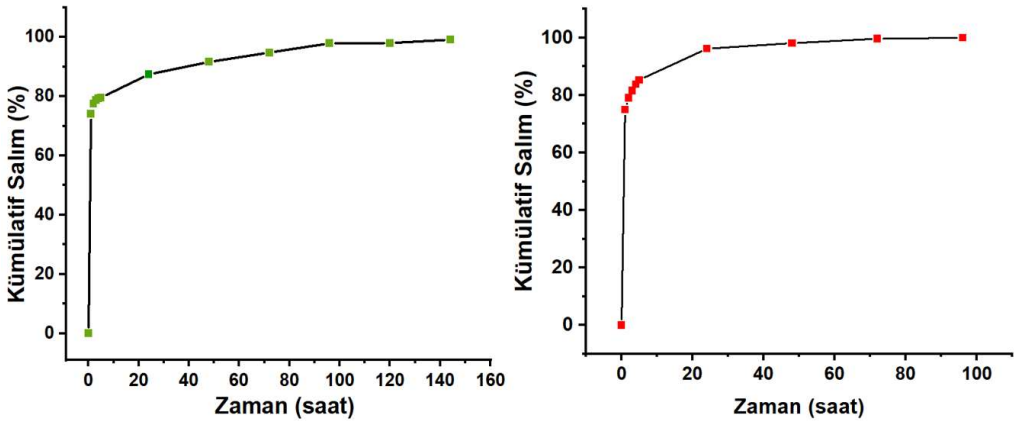
Şekil 4.12 Rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü SEM görüntüsü



Şekil 4.13 rGp144 konjuge rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü SEM görüntüsü

4.2.5 *In-vitro* Salım Çalışması

Rifampisin yüklü PLGA nanopartikülleri ve rGp144 konjuge nanopartiküllerin salım çalışması için belirtilen zamanlarda alınan salım örneklerinin UV-Vis spektrometrede 476 nm'de içerdikleri rifampisin miktarı, kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak tayin edilmiş ve sonuçlar kümülatif olarak toplanarak Şekil 4.14'te verilen grafik oluşturulmuştur. Yapılan salım profili çalışması ile hızlı bir şekilde salımın başladığı ve ilk 24 saatte nanopartiküllerin ve konjuge nanopartiküllerin içerdikleri antibiyotiği hızlıca saldıkları, patlama salımının (burst release) gerçekleştiği ve konjuge nanopartikül ve konjuge olmayan nanopartikül için sırasıyla %96 ve %87'ye ulaştıkları görülmüştür. Salım yavaşlamış ve daha sabit bir hızda devam etmiştir Kkonjuge nanopartikül 96. saatte, konjuge olmayan nanopartikül 144. saatte %100'e ulaşarak salımı tamamlanmıştır.



Şekil 4.14 Salım profili grafikleri (a) rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü (b) rGp144 konjuge rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü

4.2.6 Antibakteriyel Aktivitenin Değerlendirilmesi

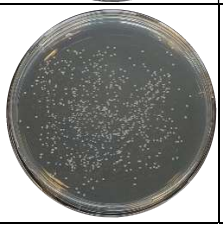
Rifampisin, rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü ve rGp144 konjuge rifampisin yüklü PLGA nanopartikülünün antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde, broth mikrodilüsyon ve agar kuyucuk difüzyon yöntemlerinden yararlanılmıştır. Örnekler için çalışılacak konsantrasyonlar belirlenirken, nanopartiküllerin 24. saatin sonunda saldıkları rifampisin miktarı göz önüne alınmıştır. *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922), metisilin dirençli klinik izolat *S. aureus* (MRSA), oksasilin duyarlı *S. aureus* (OSSA-ATCC 29213), metisilin-oksasilin dirençli *S. aureus* (MORSA-ATCC 43300) ve metisilin duyarlı klinik izolat *S. aureus* (MSSA) suşları kullanılarak yapılan değerlendirmelerin sonuçları Tablo 4.5, Tablo 4.6, Tablo 4.7 ve 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.5 MİK değerleri

Bakteri / Örnek	*E. coli*	*S. aureus*	MRSA	OSSA	MORSA	MSSA
	MİK (µg/mL)					
Rifampisin	>32	0.01	0.0025	0.0025	0.0025	0.005
Rifampisin Yüklü PLGA Nanopartikülü	>32	0.005	0.0012	0.0012	0.0012	0.0025
rGp144 Konjuge Rifampisin Yüklü PLGA Nanopartikülü	>32	0.005	0.0012	0.0012	0.0012	0.0025

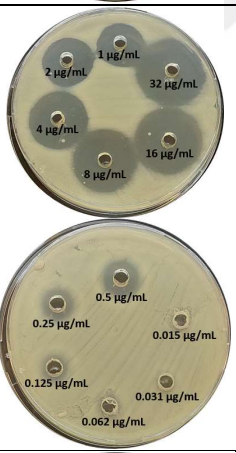
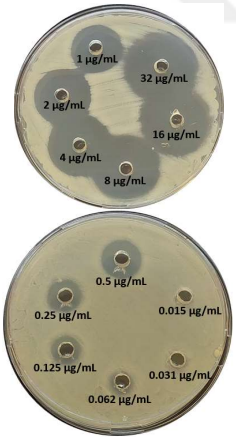
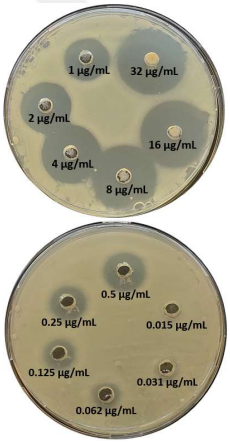
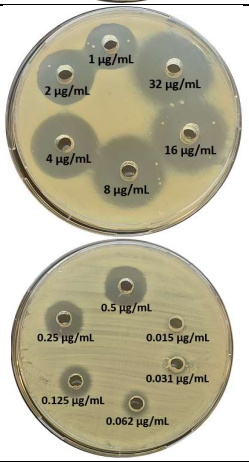
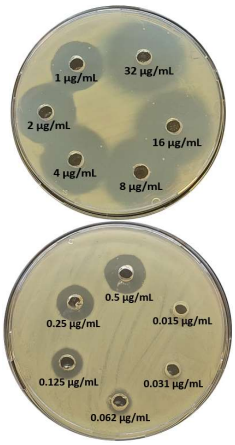
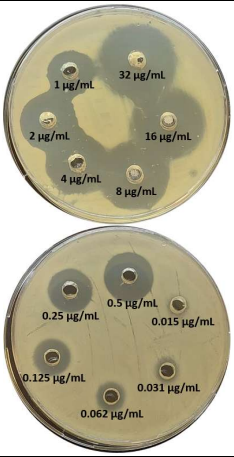
Broth mikrodilüsyon yönteminde, rifampisin ve nanopartiküllerin eklendiği *E. coli* ile çalışılan her kuyuda kontrol kuyuları kadar üreme görülürken diğer suşlar ile çalışılan kuyuların hiçbirinde üreme görülmemiştir. 32-0.0012 μg/mL uygulanan üç örnek için de *E. coli*'de MİK değerleri >32 μg/mL, diğer suşlarda MİK değeri <0.005 μg/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.6 MİK değerindeki standart petri görüntüleri

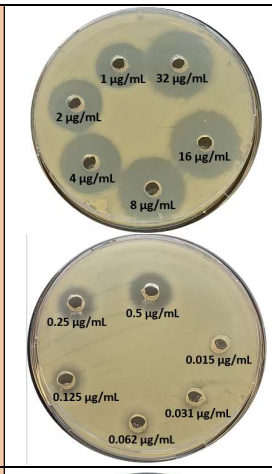
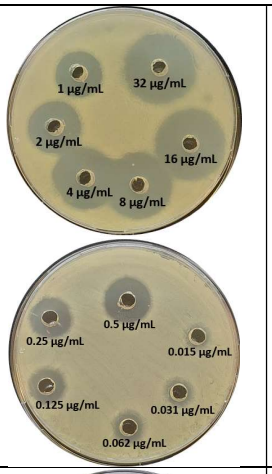
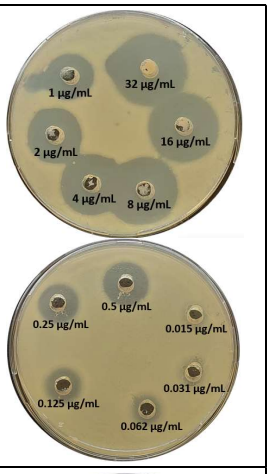
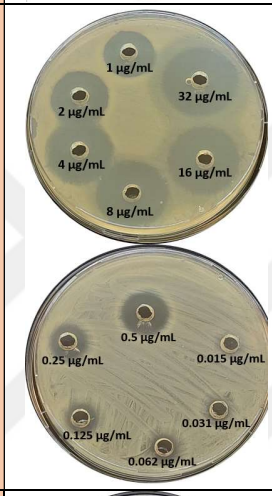
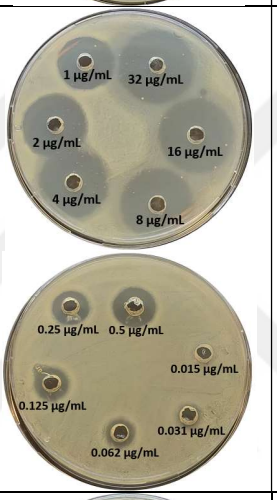
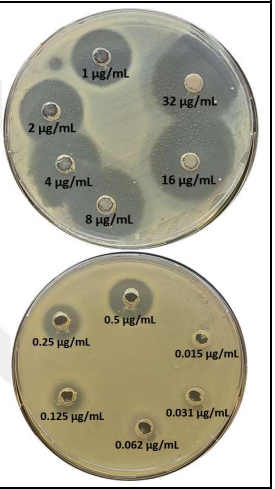
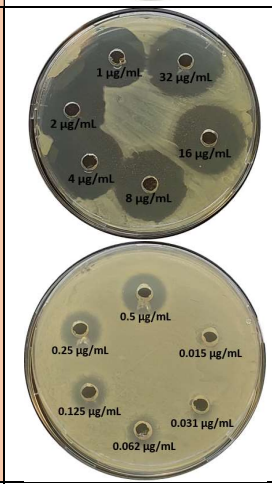
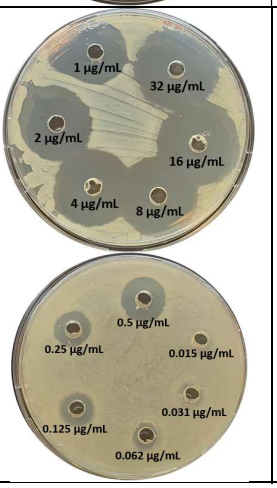
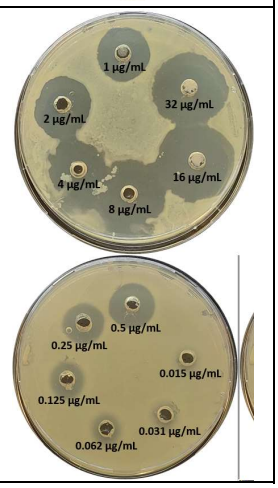
Örnek / Bakteri	Kontrol	Rifampisin	Rifampisin Yüklü PLGA Naopartikülü	rGp144 Konjuge Rifampisin Yüklü PLGA Naopartikülü
E. coli				
S. aureus				
MRSA				
OSSA				
MORSA				
MSSA				

Belirlenen MİK değerlerinin alındığı kuyulardan dilüsyon yapılmadan direkt ekim yapılarak standart petri sayma yöntemi ile sonuçlar doğrulanmıştır (Tablo 4.6). Agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile rifampisin ve nanopartiküller *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922), metisilin dirençli klinik izolat *S. aureus* (MRSA), oksasilin duyarlı *S. aureus* (OSSA-ATCC 29213), metisilin-oksasilin dirençli *S. aureus* (MORSA-ATCC 43300) ve metisilin duyarlı klinik izolat *S. aureus* (MSSA) suşları ile çalışılmıştır. 32-0.015 μg/mL olarak kuyulara uygulanan örneklerin petri görüntüleri (Tablo 4.7) alınmış ve oluşan zon çapları (Tablo 4.8) ölçülmüştür.

Tablo 4.7 Agar kuyucuk difüzyon petri sonuçları

Örnek / Bakteri	Rifampisin	Rifampisin Yüklü PLGA Nanopartikülü	rGp144 Konjuge Rifampisin Yüklü PLGA Nanopartikülü
E. coli			
S. aureus			
MRSA			

Tablo 4.7 Agar kuyucuk difüzyon petri sonuçları (devamı)

OSSA			
MORSA			
MSSA			

Tablo 4.7'de verilen agar kuyucuk yöntemi sonuçlarında görüldüğü üzere, *E. coli* suşunda düşük konsantrasyonda üç örnek için de zon oluşmadığından 0.5-0.015 μg/mL konsantrasyon aralığı çalışılmamıştır. Tablo 4.8'de gri renk ile vurgulanan hücrelerde, hem rifampisin hem de rifampisin yüklü nanopartikülden daha geniş çaplı zon oluşturan konjuge nanopartikül konsantrasyonları verilmektedir.

Tablo 4.8 Agar kuyucuk difüzyon zon çapları

Örnek \ Bakteri		*E. coli*	*S. aureus*	MRSA	OSSA	MORSA	MSSA
		Zone Çapları (mm)					
Rifampisin (µg/mL)	32	12	33	33	30	31	31
	16	-	31	32	29	27	30
	8	-	28	30	28	26	29
	4	-	26	26	25	25	28
	2	-	22	23	21	21	27
	1	-	20	20	19	20	24
	0.5	-	16	17	17	18	18
	0.25	-	14	15	13	15	15
	0.125	-	10	12	10	11	12
	0.062	-	9	10	9	10	10
	0.031	-	-	9	7	8	-
	0.015	-	-	-	-	-	-
Rifampisin Yüklü PLGA Nanopartikülü (µg/mL)	32	13	34	34	32	32	33
	16	-	32	32	31	31	32
	8	-	30	30	29	30	31
	4	-	27	28	27	27-28	30
	2	-	24	25	24	25	29
	1	-	22	21	19	21-22	26
	0.5	-	16	17	18	17	18
	0.25	-	15	15	16	15	14
	0.125	-	13	12	14	12	12
	0.062	-	9	10	12	11	10
	0.031	-	7	-	11	9	8
	0.015	-	-	-	10	-	-
rGp144 Konjuge Rifampisin Yüklü PLGA Nanopartikülü (µg/mL)	32	-	33	34	34	34	33
	16	-	32	32	32	32	32
	8	-	30	30	31	30	31
	4	-	26	27	29	28	27-28
	2	-	22	25	24	26	25
	1	-	20	20	19	23	21
	0.5	-	18	19	18	19	19
	0.25	-	16	17	17	15	16
	0.125	-	13	14	15	13	13
	0.062	-	10	11	13	11	12
	0.031	-	9	10	11	9	11
	0.015	-	-	9	10	-	10

Zon çapları değerlendirildiğinde *E. coli* petrilerinde, rifampisin ve rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü ile muamele sonucunda sırasıyla 12 ve 13 mm çapında zon oluşmuştur. Diğer suşlar incelendiğine hem rifampisin yüklü PLGA nanopartikülü hem de rGp144 ile konjuge edilmiş hali, yalnızca rifampisin eklenmiş kuyular ile

karşılaştırıldığında daha geniş zon oluşturdukları görüldüğünden nanosistemin, yüklenen antibiyotiğin etkinliğini artırmıştır. Nanopartikül ve rGp144 konjuge nanopartikül değerlendirildiğinde, zon çaplarının bazı suşlarda ve konsantrasyonlarda eşit, bazılarında ise birbirlerine yakın oldukları görülmektedir. Ancak rGp144 konjuge rifampisin yüklü PLGA nanopartikülünün birçok konsantrasyon ve bakteri suşunda zon çapı açısından etkinliğinin görece üstün olduğu tespit edilmiştir. En yüksek konsantrasyonda oluşan en büyük zon çapları nanopartikül için *S. aureus* ve MRSA'da 34 mm; konjuge nanopartikül için MRSA, oksasilin duyarlı *S. aureus* ve metisilin-oksasilin dirençli *S. aureus*'da 34 mm olarak belirlenmiştir. Rifampisin ise *S. aureus* ve MRSA'da 33 mm ile en yüksek konsantrasyonda en büyük zon çapını oluşturmuştur. En düşük konsantrasyonda rifampisin ile muamelede; hiçbir suş için zon oluşmamış, 0.031 μg uygulandığında MRSA'da 9 mm ile en büyük zon çapını oluşmuştur. Nanopartikülün en düşük konsantrasyonda oksasilin duyarlı *S. aureus* suşunda 10 mm zon oluşturduğu, konjuge nanopartikülün ise hem oksasilin duyarlı *S. aureus* hem de MSSA suşlarında 10 mm zon çapı oluşturduğu görülmektedir.

4.3 Bulgular

Gram pozitif, fakültatif aerob, kok şekilli, üzüm salkımı olarak tanımlanan kümeler halinde üreme eğiliminde ve 0.8-10 μm çapında olan *S. aureus*, insan ve hayvanlarda normal florada varlığını gösterirken duyarlı kişilere teması halinde kişide enfeksiyon, septik artrit, osteomiyolit, bakteriyemi, toksik şok sendromu gibi çeşitli hastalıklara ve sonunda ölüme kadar gidebilen sorunlara yol açabilecek fırsatçı bir patojendir. Antibiyotikler, keşiflerinden bu yana bakteriyel hastalıkların tedavisinde kullanılmışlardır ancak patojenlerin antibiyotiklerin birçoğuna direnç geliştirmesi ve yeni antibiyotik keşfinin veya sentetik olarak yapımının patojenlerin direnç geliştirme hızına yetişememesi enfeksiyon hastalıklar ile tedavide en önemli sorun haline gelmiştir. Alternatif tedavi arayışları, bakterileri spesifik bir şekilde enfekte eden virüsler olan bakteriyofajları günyüzüne çıkarmıştır. Yenilikçi bir yaklaşım olan bakteriyo(faj)ların ve faj alt birimlerinin patojenler ile mücadelede kullanımı, biyoteknoloji tekniklerinin gelişmesi ile ivmelenen ve ilgi görmeye başlayan bir alan olmaktadır. Fajlar, sahip oldukları

RBP sayesinde konakçı bakterisini özgül bir şekilde tanıyarak bakteriye adsorbsiyonunu gerçekleştirir, genomik materyalini konakçısının içerisine verir ve yaşam döngülerine devam ederler. Antibiyotiklere dirençli *S. aureus* suşları (MRSA, VRSA gibi), ülkemizde özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan patojenler arasında ön sıralarda yer almaktadır. Konakçısı *S. aureus* olan Bakteriyofaj K'nın reseptör bağlayıcı proteini Gp144'ün terapötik ilaç hedefleme çalışmalarında kullanımı, *S. aureus* sebepli enfeksiyonlarla mücadelede oldukça yenilikçi bir yaklaşım olacaktır.

Sunulan tez çalışmasında, *S. aureus* suşunu enfekte eden faj olan Bakteriyofaj K'nın genomunda, konakçısını hücre duvarının teikoik asit brimlerinden tanıyarak bağlanmasını sağlayan reseptör bağlayıcı proteini olan Gp144'ün amplifiye edilerek eldesi, plate 51 [108] vektörüne ligasyonu ve *E. coli* Bl21 suşuna transformasyonu ardından yapılan çalışmalara yer verilmiştir. Seçilen plate 51 vektörü, ampsisilin direnç gen bölgesine sahip ve N terminal bölgesinde 6 adet Histidin amino asitini (6x-Histag) ihtiva eden verimli bir ekspresyon vektörüdür. T7 RNA Polimeraz tarafından tanınan T7 promotörü içerir. IPTG indüksiyonu ile T7 RNA polimeraz eksprese edilir ve T7 promotörünün kontrolündeki genlerin transkripsiyonu ve ardından ekspresyonu başlatılmış olur.

Rekombinant Gp144 (rGp144) gen bölgesinin ekspresyonunda, öncelikle ekspresyonun en verimli gerçekleştiği zaman aralığı, IPTG konsatrasyonu ve sıcaklık belirlendi. 0.1 mM, 0.2 mM, 0.5 mM IPTG konsantrasyonları ile 18°C'de ampisilin içeren Terrific broth besiyerinde başlatılan kültürden 0., 2., 4., 6., 8. ve 24. saatlerde örnek alınarak SDS-PAGE analizi yapıldı. Negatif kontrole kıyasla istenen bölgede 6. saatte, 0.5 mM IPTG eklenerek gerçekleştirilen ekspresyonda daha kalın bir bant varlığı optimizasyonun başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Belirlenen koşullarda yapılan ekspresyon kültürünün, HisPure Kobalt resin kullanılarak yapılan saflaştırılmasının SDS-PAGE analizi ve Bradford tayini yüksek oranda ve yaklaşık %75 saflıkta protein üretimini doğrulamaktadır. rGp144 olduğu düşünülen protein bandının Western Blot analizinde, yaklaşık 53 kDa büyüklüğünde bandın gözlenmesi membranda His-tag kuyruğu içern rGp144 proteinin varlığını doğrulamıştır.

S. aureus hücre duvarındaki teikoik asit birimlerini kullanarak konakçısına tutunduğu literatürde yer alan Bakteriyofaj K'nın, bu geri dönüşümsüz ve spesifik bağlanmasını sağlayan Gp144 geni ürünü proteinin, *S. aureus* ile etkileşiminin anlaşılmasında ELISA metodu ve mikroskobik görüntüleme yöntemleri kullanıldı. Hücre ELISA yönteminde 96-well plate kuyularına, tutunma tamponunda 10^8 kob/mL *S. aureus* ve negatif kontrol amacıyla *E. coli* suşları eklendi. Bakteriler, rGp144 ile etkileşime sokuldu ve proteinin His-tag kuyruğundan faydalanılarak bakterilere tutunan rGp144 miktarı belirlendi. Literatürü destekler bir şekilde *S. aureus* kaplı kuyularda, rGp144 miktarı arttırıldıkça ELISA reader cihazında okunan absorbans değerinin de lineer bir şekilde arttığı tespit edilirken *E. coli* ile rGp144 arasında etkileşimin olmadığı belirlenmiştir. Yin ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptıkları çalışmada, bakteriyofaj lizin proteininin bakteri duvarını hedefleyen bölgesi rekombinant olarak elde edilmiş ve ardından *S. aureus'un* tanısında faydalanmak üzere ELISA metodu geliştirilmiştir. Çalışmada, bakteriyofaj temelli proteinin çalışılan diğer bakteri suşlarına bağlanmayıp *S. aureus*'a yüksek afinite ile bağlandığından özgül, hızlı ve kolay bir tanıma aracı olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir [135]. Konfokal mikroskobu ve yüksek verimli görüntüleme cihazı kullanılarak FITC ile işaretlenen rGp144'ün *S. aureus* hücre yüzeyine bağlandığı ancak *E. coli* yüzeyi ile etkileşimde olmadığı gözlenmiştir. Hedefleme amacıyla kullanılması planlanan rGp144'ün literatürde belirtildiği şeklide *S. aureus* hücrelerine bağlandığı tespit edildi [64] [136], [137].

Terapötik antimikrobiyal ajanların faj RBP'leri kullanılarak bölge hedefli tasarımlarının yapılabilmesi yaklaşımıyla ilerletilen tez çalışmamızda, konakçısı *S. aureus* olan Bakteriyofaj K'nın rekombinant olarak üretilen reseptör bağlayıcı proteini Gp144'ün yüzey konjugasyonu gerçekleştirilecek olan rifampisin antibiyotiği yüklü PLGA nanopartiküllerinin sentezi ve karakterizasyonu, çalışmanın ikinci kısmını oluşturmaktadır. Rifampisin, yarı sentetik antibiyotik olan rifamisin sınıfının bir üyesidir ve temelde RNA polimeraz inhibitörüdür. PLGA, biyobozunur bir polimerdir ve kontrollü ilaç salımını gerçekleştirmeyi sağlayabilen matris elemanı olarak nanopartikül sentezinde kullanılmaktadır. Düşük toksisiteye sahip, biyouyumlu, nihai bozunma ürünlerinin (laktik asit ve glikolik asit) su ve karbondioksit olması ile güvenilir bir polimer olan PLGA,

rifampisinin kapsüle edilmesinde tercih edilmiştir [138]. Lipofilik bir yapısa sahip olan rifampisin, tekli emülsüyon çözücü buharlaştırma ve nanoçöktürme yöntemleri ile sentezlenmiştir. Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminde polimer ve ilaç miktarları değiştirilerek en verimli sentez koşulu araştırılmıştır. Yüzey stabilizatörü olarak PVA, organik faz olarak hem polimer hem de ilaç için DCM tercih edilmiştir. Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile sentezlenen rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin boyutu 250 nm'nin altında, PDI değeri 0,2'den düşük ve zeta potansiyeli -30 mV yakın ölçülmüştür ancak enkapsülasyon etkinliği %7 ve ilaç yükleme kapasitesi %3 değerlerinde kalmıştır. Bu sonucun rifampisinin lipofilik bir yapıya sahip olması sebebiyle olabileceği düşünülerek nanoçöktürme yöntemi ile sentez yapılmıştır. Nanoçöktürme yönteminde hem su ile karışabilen hem de polimer ve ilacın içinde çözünebildiği aseton, organik faz olarak tercih edilmiş ve yüzey stabilizörü kullanılmadan nanopartikül sentezi yapılmıştır. Sentez sonucunda boyut 250 nm'nin altında, PDI değeri 0,3'ten düşük ve zeta potansiyeli -30 mV'ye yakın olan nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği %35 ve ilaç yükleme kapasiteleri %26 değerlerinde bulunmuştur. Reaksiyon verimleri karşılaştırıldığında tekli emülsiyon yönteminde %48 olan reaksiyon verimi nanoçöktürme yönteminde %53'e yükselmiştir. Literatürde nanoçöktürme yönteminin bazı durumlarda çözücü buharlaştırma yöntemlerinden daha iyi sonuçlar verdiğine rastlanmaktadır [139]. Nanoçöktürme yöntemi ile rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin sentezinin daha verimli olduğu görülmüş ve belirlenen koşullar ile senteze devam edilmiştir.

Liyofilize rGp144'ün, üretilen rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerine konjugasyonunda PLGA'nın karboksil ve rGp144'ün amin grupları arasında amid bağlarının oluşmasını sağlayacak olan çapraz bağlayıcı EDC'den yararlanılmıştır. Liyofilize rGp144'ün PBS içerisinde düşük çözünürlüğü agregat oluşumuna sebep olduğundan konjugasyon sonrası homojen boyut ölçümü gerçekleştirilememiştir. Bu sebeple diyaliz sonrası liyofilize edilmemiş rGp144, konsantrasyonu ölçülerek konjugasyon reaksiyonuna eklenmiştir. Konjugasyon sonrası nanopartikül boyutu 300 nm, PDI değeri 0,5 ve zeta potansiyeli -10 mV civarında ölçülmüştür. Boyuttaki ve zeta potansiyeli değerindeki artış proteinin nanopartiküle konjuge

olduğunu göstermektedir. Yapılan FT-IR analizi ile nanopartikül ve konjuge nanopartiküllerin PLGA'nın majör karakteristik piki olan 1770 ve 1750 cm^{-1} arasındaki tek bant ester bağının C = O gerilmesine ve 1169–1088 cm^{-1}'deki C – O gerilmesine, 1450-850 cm^{-1} arasında olan C-H bükülmelerine sahip olması ile PLGA nanopartiküllerinini sentezlendiği; konjuge nanopartikülün proteinlerin karakteristiği için incelenen 1650 ve 1550 cm^{-1} bölgelerinde var olan ana amid bantlarını göstermesi ancak konjuge olmayan nanopartiküllerin bu bantları göstermemesi ile konjugasyonun gerçekleştiği doğrulanmıştır [140].

SEM analizi ile morfolojik yapıları görüntülenen nanopartüküllerin, küresel yapıda oldukları tespit edilmiştir. Partiküllerin boyut dağılımları sentez sonrası zeta sizer cihazı ile yapılan ölçümü doğrular nitelikte, konjuge olmayan nanopartiküllerde konjuge olan nanopartiküllere kıyasla daha homojen bir boyut dağılımı gösterdiği görülmektedir.

Rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerin ve rGp144 konjuge nanopartiküllerin salım profillerinin belirlenmesi için yapılan çalışmada salım örnekleri, UV-Vis spektrometrede 476 nm'de ölçülmüş ve sonuçlar kümülatif olarak hesaplanmıştır. Konjuge olan ve olmayan nanopartiküllerde ilk 24 saatte salım sırasıyla % 96 ve % 87'ye ulaşarak burst release (patlama salımı) gerçekleşmiştir. 24 saatten sonra daha sabit bir salım profili gözlenmekle birlikte 4. günün sonunda konjuge nanopartikülde % 100, konjuge olmayan nanopartikül de ise % 94 salım verisine ulaşılmış, konjuge olmayan nanopartikül 6. günde %100 salımını gerçekleştirmiştir. İlgili sonuçlar, literatürde yer alan rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerin salım profiline benzerdir [120], [141]. Salımın hızlı olmasının sebebi; rifampisinin molekül boyutunun küçük olması ve nanopartikül sentezi sırasında yüzeye bağlanan veya yüzeyin hemen altına yerleşen kısmının bir anda salınımıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir [97]. Da Costa ve arkadaşlarının çalışmasında (2021), rifampisin yüklü nanopartiküllerin salım grafikleri incelendiğinde 48 saatte kümülatif salımın % 100'e ulaştığı görülmektedir [120]. Yayında da tartışıldığı üzere rifampisinin iki hidrofobik ve bir hidrofilik gruptan oluşması sebebiyle, partikül sentezi esnasında hidrofobik grubun partikülün iç kısmında kalırken hidrofilik grubunun yüzeye yakın konumlandığı salım profilini desteklemektedir. Rifampisin yüklü nanopartiküllerin ilk saatte gerçekleşen

patlama salımı, MİK değeri üzerindeki konsantrasyona erken ulaşılması ile enfekte bölgede tedavinin hızlı bir şekilde başlamasını sağlarken [120] sonrasındaki 4 güne kadar süren salım ise *S. aureus* (dirençli veya duyarlı) suşlarının düşük MİK değeri düşünüldüğünde etkinliğin devamını sağlamaktadır. Tez çalışmamızda alınan sonuçlar, nanosistemlerle sağlanmaya çalışılan tek doz antibiyotik uygulması ile etkili tedavi stratejisini doğrular niteliktedir.

Sentezlenen rifampisin yüklü nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesinde *S. aureus*, *E. coli*, MRSA, OSSA, MORSA ve MSSA suşları kullanılmıştır. Broth mikrodilüsyon ve agar kuyucuk difüzyon yöntemleri ile alınan sonuçlar, rifampisinin *S. aureus* üzerine oldukça etkili olduğunu ancak kullanılan konsantrasyonlarda hem rifampisinin hem de nanosistemlerin *E. coli* üzerine bir etkisinin olmadığını göstermektedir. DNA transkripsiyonundan sorumlu enzim bakteriyal RNA polimerazı inhibe eden rifampisin [142], özellikle Gram-pozitif bakterilere karşı aktif iken dış zarlarına kolayca nüfuz edemediğinden Gram-negatif basillere karşı daha az aktiftir [143]. Gram-negatif bakteriler, dış zarları tarafından sağlanan ek koruma nedeniyle, antimikrobiyal maddelere Gram-pozitif bakterilerden daha dirençli olma eğilimindedir [144]. Bu sebeple *E. coli* ile yapılan çalışmaların sonuçları literatürü doğrular niteliktedir. *S. aureus* suşları ile yapılan çalışmaların sonuçları incelendiğinde, rifampisinin MİK değerinin *S. aureus*'ta 0.01 μg/mL, MSSA'da 0.005 μg/mL iken MRSA, OSSA ve MORSA suşlarında 0.0025 μg/mL olarak belirlenmiştir. Eucast duyarlılık kırılma noktaları rifampisin antibiyotiği için incelendiğinde, *S. aureus*'ta belirlenen değer 0.06 μg/mL iken çalışmamızda 0.01 μg/mL olarak belirlenmiştir. Hem rGp144 konjuge hem de konjuge olmayan rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinde MİK değerleri *S. aureus*'ta 0.005 μg/mL, MSSA'da 0.0025 μg/mL iken MRSA, OSSA ve MORSA suşlarında 0.0012 μg/mL olarak tespit edilmiştir. Literatürde nanosistemlerin antimikrobiyal etkinliği arttırdığını gösteren birçok çalışmayı destekler nitelikte, rifampisin nanosisteminin yanlızca antibiyotik uygulamasından daha iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir [145]–[147]. Jelinkova ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada görüldüğü gibi; nanosistemlerin ilaç etkinliğini arttırmasının yanı sıra bakteri spesifik ajanlar ile yüzeyi dekore edilmiş nanosistemlerin mikrobiyotada özgül bir şekilde tanıdığı bakterinin/bakterilerin

çevresinde yoğunlaşması ile yapılan seçilim sayesinde, enfeksiyon bölgesinde hedeflenen bakteriye karşı güçlü, hızlı ve belli bir süre devam eden salım ile daha etkin tedavi süreci olanağını kazandırmaktadır [148]. Periodontal bir patojen olan *Porphyromonas gingivalis'*in (Pg) tedavisinde, bakteriyi hedeflediği tanımlanan bir peptit dizisi ile PLGA nanopartiküllerinin yüzeyi modifiye edilmiştir. Mahmoud ve ekibi, Pg'nin biyofilm oluşumuna serbest peptidin inhibe edici etki gösterdiğini ancak yerleşik veya önceden oluşturulmuş biyofilm üzerinde etkinlik göstermediğini ve sentezledikleri peptit modifiye PLGA nanopartikülle yerleşik biyofilm üzerinde daha düşük konsantrasyonlar etkinlik tespit etmişlerdir [149]. Başka bir çalışmada, vankomisin yüklü polimerik nanopartikül sentezlenmiş, MRSA ve VISA suşları ile antimikrobiyal çalışması gerçekleştirilmiştir. Serbest vankomisinin kontrol grubu olarak kullanıldığı çalışmada, vankomisin nanopartikülünün MİK değerini MRSA suşunda 1 μg/mL'den 0.25 μg/mL'ye, VRSA için 4 μg/mL'den 2 μg/mL'ye düşürdüğü tespit edilmiştir. Scolari ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, rifampisin yüklü aljinat/kitosan nanopartiküllerinin yalnızca rifampisin uygulanan örneklere kıyasla daha düşük MİK değerleri verdiği, *S. aureus* ve MSSA'da <1 μg/mL, MRSA'da >1 μg/mL olduğu görülmektedir [150]. Qiao ve arkadaşları [151] rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin, sadece moksifloksasin yüklü partiküllere kıyasla *S. aureus* suşlarında oluşturdukları zon çaplarının çok daha büyük olduğunu tespit etmişlerdir. Makrofajlara yerleşebilen tüberküloza neden olan *Mycobacterium tuberculosis*, 1,3-β-glukan ve rodamin ile yüzeyi konjuge edilmiş rifampisin yüklü PLGA nanopartikülleri ile hedeflenerek hastalığın tedavi edilmesini amaçlayan Tukulula ve arkadaşları sentezledikleri yüzey modifiye nanosistem ile ilaç alımını 62 kat arttırmışlardır [152]. Sunulan tezde tasarladığımız nanosistemlerin antimikrobiyal etkinliğinin anlaşılmasında agar kuyucuk difüzyon yönteminden de yararlanılmıştır. 24. saatin sonunda gerçekleşen salım miktarı baz alınarak yapılan çalışmada, eşit miktarda antibiyotiği salmış olmasına rağmen rGp144 konjuge rifampisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin birçok suş ve konsantrasyon için konjuge olmayan nanopartiküle kıyasla görece daha etkin olduğu tespit edilmiştir. Bu etkinlik artışının sebebinin; konjuge nanopartiküllerin zeta potansiyellerinin (-10 mV), konjuge olmayan nanopartiküllerin zeta

potansiyelinden (-30 mV) daha pozitif olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Konjuge olmayan nanosistem, konjuge nanosistem ile kıyaslandığında daha yüksek bir negatif yüke sahip olması sebebiyle, agar ortamında bulunan negatif yüklü moleküller (agaropectin gibi) ile karşılaştığında daha zor bir ilerleme sağlayacaktır. Bu etkileşim, difüzyonu etkileyebileceğinden oluşacak zon çapını da etkileyecektir [153], [154].

Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde, özellikle bakterilerin terapötiklere karşı direnç profili geliştirmesi sebebiyle yetersizlik mevcuttur ve yeni stratejilerin geliştirilmesi tıbbi bir ihtiyaçtır. Enfekte dokularda antibakteriyel aktivitenin arttırılması, biyofilmlerde etkili antibiyotik konsantrasyonlarına ulaşılması ve ihtiyaç duyulan dozda azalmanın sağlanması amacıyla hedeflendirilmiş nanopartiküllerin tasarımı ve tedavide kullanımı mevcut tedavilerin eksikliğini ve verimsizliğini giderebilecek yenilikçi bir yöntemdir. İlaç dağıtım sistemleri, bölgesel tedaviyi sağlayarak yüklenen ilacın doğru yere, yeterli miktarda ulaşmasını sağlayarak enfekte olmayan bölgelere ilaç maruziyetini büyük ölçüde azaltmaktadır. Sunulan bu tezde, konakçısı *S. aureus* olan Bakteriyofaj K'nın konakçısını özgül bir şekilde hedeflemesini ve tutunmasını sağlayan RBP'si Gp144, rekombinant DNA teknolojisi prensiplerinden yararlanılarak üretilmiştir (rGp144). Esasen RNA polimeraz inhibitörü olan rifampisin antibiyotiği yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlenerek rGp144 ile konjugasyonu gerçekleştirilmiş, ilaç dağıtım sistemi oluşturulması ve hedefli bir şekilde *S. aureus* sebepli enfeksiyon bölgesine içerdiği antibiyotiği spesifik bir şekilde ulaştırması sağlanmıştır.

KAYNAKÇA

[1] D. M. Livermore and N. Woodford, "The β-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter," *Trends in Microbiology*, vol. 14, no. 9. 2006. doi: 10.1016/j.tim.2006.07.008.

[2] H. W. Boucher, "BAD BUGS, NO DRUGS 2002-2020: PROGRESS, CHALLENGES, AND CALL TO ACTION.," *Trans Am Clin Climatol Assoc*, vol. 131, 2020.

[3] "UHESA, Özet Raporu," *T.C. Sağlık Bakanlığı*, 2021.

[4] W. Gao, S. Thamphiwatana, P. Angsantikul, and L. Zhang, "Nanoparticle approaches against bacterial infections," *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 6, no. 6. 2014. doi: 10.1002/wnan.1282.

[5] R. A. Petros and J. M. Desimone, "Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 9, no. 8. 2010. doi: 10.1038/nrd2591.

[6] O. C. Farokhzad and R. Langer, "Impact of nanotechnology on drug delivery," *ACS Nano*, vol. 3, no. 1, 2009, doi: 10.1021/nn900002m.

[7] Laura M. Kasman; La Donna Porter, "Bacteriophages," *StatPearls*, 2021.

[8] M. B. Dion, F. Oechslin, and S. Moineau, "Phage diversity, genomics and phylogeny," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 18, no. 3. 2020. doi: 10.1038/s41579-019-0311-5.

[9] A. S. A. Dowah and M. R. J. Clokie, "Review of the nature, diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target Gram-positive bacteria," *Biophysical Reviews*, vol. 10, no. 2. 2018. doi: 10.1007/s12551-017-0382-3.

[10] S. O'Flaherty, A. Coffey, R. Edwards, W. Meaney, G. F. Fitzgerald, and R. P. Ross, "Genome of Staphylococcal Phage K: A New Lineage of Myoviridae Infecting Gram-Positive Bacteria with a Low G+C Content," *J Bacteriol*, vol. 186, no. 9, 2004, doi: 10.1128/JB.186.9.2862-2871.2004.

[11] S. M. DePorter and B. R. McNaughton, "Engineered M13 Bacteriophage Nanocarriers for Intracellular Delivery of Exogenous Proteins to Human Prostate Cancer Cells," *Bioconjug Chem*, vol. 25, no. 9, 2014, doi: 10.1021/bc500339k.

[12] H. Peng, R. E. Borg, L. P. Dow, B. L. Pruitt, and I. A. Chen, "Controlled phage therapy by photothermal ablation of specific bacterial species using gold nanorods targeted by chimeric phages," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 117, no. 4, 2020, doi: 10.1073/pnas.1913234117.

[13] A. Loureiro, N. G. Azoia, A. C. Gomes, and A. Cavaco-Paulo, "Albumin-Based Nanodevices as Drug Carriers," *Curr Pharm Des*, vol. 22, no. 10, 2016, doi: 10.2174/1381612822666160125114900.

[14] C. E. Astete and C. M. Sabliov, “Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles,” *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 17, no. 3. 2006. doi: 10.1163/156856206775997322.

[15] J. Xu *et al.*, “Controllable Microfluidic Production of Drug-Loaded PLGA Nanoparticles Using Partially Water-Miscible Mixed Solvent Microdroplets as a Precursor,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-05184-5.

[16] Q. Meng *et al.*, “Intranasal delivery of Huperzine A to the brain using lactoferrin-conjugated N-trimethylated chitosan surface-modified PLGA nanoparticles for treatment of Alzheimer’s disease,” *Int J Nanomedicine*, vol. 13, 2018, doi: 10.2147/IJN.S151474.

[17] Z. H. Wang, Z. Y. Wang, C. S. Sun, C. Y. Wang, T. Y. Jiang, and S. L. Wang, “Trimethylated chitosan-conjugated PLGA nanoparticles for the delivery of drugs to the brain,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 5, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.104.

[18] S. E. Gilchrist, D. Lange, K. Letchford, H. Bach, L. Fazli, and H. M. Burt, “Fusidic acid and rifampicin co-loaded PLGA nanofibers for the prevention of orthopedic implant associated infections,” *Journal of Controlled Release*, vol. 170, no. 1, 2013, doi: 10.1016/j.jconrel.2013.04.012.

[19] N. Youssef, A. Budd, and J. P. Bielawski, “Introduction to genome biology and diversity,” in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1910, 2019. doi: 10.1007/978-1-4939-9074-0_1.

[20] J. B. Reece, L. A. Urry, M. L. Cain, S. A. Wasserman, P. v. Minorsky, and R. B. Jackson, *Campbell Biology*. 2010. doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2.

[21] Güler Temizkan, *Moleküler Genetik*, 2nd ed. 2014.

[22] “Book Review: Brock Biology of Microorganisms – 14th edition,” *Sci Prog*, vol. 99, no. 3, 2016, doi: 10.3184/003685016x14721564318450c.

[23] L. E. Robbins, *Louis Pasteur and The Hidden World of Microbes*. 2001.

[24] Z. N. YUKSEKDAG and N. BALTACİ, “Staphylococcus aureus Türlerinde Biyofilm ve Biyofilm Oluşumundan Sorumlu Genler,” *Turk Mikrobiyol Cemiy Derg*, vol. 43, no. 3, 2015, doi: 10.5222/tmcd.2013.077.

[25] F. S. Y. Yoshikawa, J. F. de Lima, M. N. Sato, Y. Á. L. Ramos, V. Aoki, and R. L. Orfali, “Exploring the role of staphylococcus aureus toxins in atopic dermatitis,” *Toxins*, vol. 11, no. 6. 2019. doi: 10.3390/toxins11060321.

[26] R. S. Daum and B. Spellberg, “Progress toward a staphylococcus aureus vaccine,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 54, no. 4, 2012, doi: 10.1093/cid/cir828.

[27] Biorender, https://biorender.com, (01, 02, 2023).

[28] Taylor. Tracey A and C. G. Unakal, “Staphylococcus Aureus - StatPearls - NCBI Bookshelf,” *StatPerals*. 2020.

[29] Y. Guo, G. Song, M. Sun, J. Wang, and Y. Wang, “Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in Staphylococcus aureus,” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 10. 2020. doi: 10.3389/fcimb.2020.00107.

[30] M. T. MADIGAN JOHN M MARTINKO Çeviri Editörü ProfDr CUMHUR ÇÖKMÜŞ PALME YAYINCILIK, “BROCK MIKROORGANIZMALARıN BIYOLOJISI.” [Online]. Available: http://rdp.cme.msu.edu.

[31] T. J. Foster, J. A. Geoghegan, V. K. Ganesh, and M. Höök, “Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 12, no. 1. 2014. doi: 10.1038/nrmicro3161.

[32] G. Y. C. Cheung, J. S. Bae, and M. Otto, “Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus,” *Virulence*, vol. 12, no. 1. 2021. doi: 10.1080/21505594.2021.1878688.

[33] Y. Oogai, M. Matsuo, M. Hashimoto, F. Kato, M. Sugai, and H. Komatsuzawa, “Expression of virulence factors by Staphylococcus aureus grown in Serum,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 77, no. 22, 2011, doi: 10.1128/AEM.05316-11.

[34] T. J. Foster, “Chapter 12 Staphylococcus - Medical Microbiology 4th Edition,” in *Medical Microbiology*, 1996.

[35] A. Gnanamani, P. Hariharan, and M. Paul-Satyaseela, “Staphylococcus aureus: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach,” in *Frontiers in Staphylococcus aureus*, 2017. doi: 10.5772/67338.

[36] J. A. F. Sutton *et al.*, “Staphylococcus aureus cell wall structure and dynamics during host-pathogen interaction,” *PLoS Pathog*, vol. 17, no. 3, 2021, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1009468.

[37] B. A. Dmitriev, F. v. Toukach, O. Holst, E. T. Rietschel, and S. Ehlers, “Tertiary structure of Staphylococcus aureus cell wall murein,” *J Bacteriol*, vol. 186, no. 21, 2004, doi: 10.1128/JB.186.21.7141-7148.2004.

[38] G. Xia *et al.*, “Glycosylation of wall teichoic acid in Staphylococcus aureus by TarM,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 18, 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.096172.

[39] N. Mistretta, M. Brossaud, F. Telles, V. Sanchez, P. Talaga, and B. Rokbi, “Glycosylation of Staphylococcus aureus cell wall teichoic acid is influenced by environmental conditions,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-39929-1.

[40] R. van Dalen, A. Peschel, and N. M. van Sorge, “Wall Teichoic Acid in Staphylococcus aureus Host Interaction,” *Trends in Microbiology*, vol. 28, no. 12. Elsevier Ltd, pp. 985–998, Dec. 01, 2020. doi: 10.1016/j.tim.2020.05.017.

[41] M. Vestergaard, D. Frees, and H. Ingmer, “Antibiotic Resistance and the MRSA Problem,” *Microbiol Spectr*, vol. 7, no. 2, 2019, doi: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0057-2018.

[42] A. Zervosen, E. Sauvage, J. M. Frère, P. Charlier, and A. Luxen, “Development of new drugs for an old target - The penicillin binding proteins,” *Molecules*, vol. 17, no. 11. 2012. doi: 10.3390/molecules171112478.

[43] J. Larsen *et al.*, “Emergence of methicillin resistance predates the clinical use of antibiotics,” *Nature*, vol. 602, no. 7895, 2022, doi: 10.1038/s41586-021-04265-w.

[44] A. Hassoun, P. K. Linden, and B. Friedman, “Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment,” *Critical care (London, England)*, vol. 21, no. 1. 2017. doi: 10.1186/s13054-017-1801-3.

[45] B. DOĞAN, M. PALAZ, and M. İZGÜR, “Metisilin Dirençli Staphylococcus aureus ve Önemi,” *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, vol. 29, no. 2, 2018, doi: 10.35864/evmd.513551.

[46] A. Pantosti, A. Sanchini, and M. Monaco, “Mechanisms of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus,” *Future Microbiology*, vol. 2, no. 3. 2007. doi: 10.2217/17460913.2.3.323.

[47] T. J. Foster, “The Staphylococcus aureus ‘superbug,’” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 114, no. 12. 2004. doi: 10.1172/JCI200423825.

[48] E. Doğan, A. Kiliç, H. Türütoğlu, D. Öztürk, and S. Türkyilmaz, “Screening of Staphylococcus aureus isolates for mecA and mecC genes carriage,” *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, vol. 63, no. 4, 2016, doi: 10.1501/vetfak_0000002758.

[49] K. v. Chaitanya, “Structure and Organization of Virus Genomes,” in *Genome and Genomics*, 2019. doi: 10.1007/978-981-15-0702-1_1.

[50] L. K. Harada *et al.*, “Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art,” *Microbiological Research*, vol. 212–213. 2018. doi: 10.1016/j.micres.2018.04.007.

[51] S. Bérard, A. Chateau, N. Pompidor, P. Guertin, A. Bergeron, and K. M. Swenson, “Aligning the unalignable: Bacteriophage whole genome alignments,” *BMC Bioinformatics*, vol. 17, no. 1, 2016, doi: 10.1186/s12859-015-0869-5.

[52] E. Stone, K. Campbell, I. Grant, and O. McAuliffe, “Understanding and exploiting phage–host interactions,” *Viruses*, vol. 11, no. 6. 2019. doi: 10.3390/v11060567.

[53] S. Makky, A. Dawoud, A. Safwat, A. S. Abdelsattar, N. Rezk, and A. El-Shibiny, “The bacteriophage decides own tracks: When they are with or against the bacteria,” *Current Research in Microbial Sciences*, vol. 2. 2021. doi: 10.1016/j.crmicr.2021.100050.

[54] W. Cenens, A. Makumi, M. T. Mebrhatu, R. Lavigne, and A. Aertsen, “Phage–host interactions during pseudolysogeny,” *Bacteriophage*, vol. 3, no. 1, 2013, doi: 10.4161/bact.25029.

[55] R. Sausset, M. A. Petit, V. Gaboriau-Routhiau, and M. de Paepe, “New insights into intestinal phages,” *Mucosal Immunology*, vol. 13, no. 2. 2020. doi: 10.1038/s41385-019-0250-5.

[56] I. D. Hay and T. Lithgow, “Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy,” *EMBO Rep*, vol. 20, no. 6, 2019, doi: 10.15252/embr.201847427.

[57] S. Sharma *et al.*, “Bacteriophages and its applications: an overview,” *Folia Microbiologica*, vol. 62, no. 1. 2017. doi: 10.1007/s12223-016-0471-x.

[58] J. Bertozzi Silva, Z. Storms, and D. Sauvageau, “Host receptors for bacteriophage adsorption,” *FEMS Microbiology Letters*, vol. 363, no. 4. 2016. doi: 10.1093/femsle/fnw002.

[59] J. Ajuebor *et al.*, “Comparison of Staphylococcus phage K with close phage relatives commonly employed in phage therapeutics,” *Antibiotics*, vol. 7, no. 2, 2018, doi: 10.3390/antibiotics7020037.

[60] P. J. Rees and B. A. Fry, “The morphology of staphylococcal bacteriophage K and DNA metabolism in infected Staphylococcus aureus.,” *J Gen Virol*, vol. 53, no. Pt 2, 1981, doi: 10.1099/0022-1317-53-2-293.

[61] X. Li *et al.*, “An essential role for the baseplate protein Gp45 in phage adsorption to Staphylococcus aureus,” *Sci Rep*, vol. 6, May 2016, doi: 10.1038/srep26455.

[62] X. Li, “b-GlcNAc on Wall teichoic acids in Staphylococcus aureus triggers complement activation via lectin pathway,” *Mol Immunol*, vol. 56, no. 3, 2013, doi: 10.1016/j.molimm.2013.05.171.

[63] J. Nováček, M. Šiborová, M. Benešík, R. Pantůček, J. Doškař, and P. Plevka, “Structure and genome release of Twort-like Myoviridae phage with a double-layered baseplate,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 113, no. 33, 2016, doi: 10.1073/pnas.1605883113.

[64] A. N. Chatterjee, “Use of bacteriophage-resistant mutants to study the nature of the bacteriophage receptor site of Staphylococcus aureus.,” *J Bacteriol*, vol. 98, no. 2, 1969, doi: 10.1128/jb.98.2.519-527.1969.

[65] M. Dunne *et al.*, “Reprogramming Bacteriophage Host Range through Structure-Guided Design of Chimeric Receptor Binding Proteins,” *Cell Rep*, vol. 29, no. 5, 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.09.062.

[66] S. Raza, K. Matuła, S. Karoń, and J. Paczesny, “Resistance and adaptation of bacteria to non-antibiotic antibacterial agents: Physical stressors, nanoparticles, and bacteriophages,” *Antibiotics*, vol. 10, no. 4. 2021. doi: 10.3390/antibiotics10040435.

[67] A. , & U.-K. A. Gündoğdu, “Bakteriyofaj Terapisi: Unutulmuş Bir Şifa Kaynağı,” *KLIMIK Derg*, vol. 31, no. 2, pp. 78–87, 2018.

[68] R. Fish, E. Kutter, G. Wheat, B. Blasdel, M. Kutateladze, and S. Kuhl, “Bacteriophage treatment of intransigent Diabetic toe ulcers: A case series,” *J Wound Care*, vol. 25, 2016, doi: 10.12968/jowc.2016.25.7.S27.

[69] L. Walsh, C. N. Johnson, C. Hill, and R. P. Ross, “Efficacy of Phage- and Bacteriocin-Based Therapies in Combatting Nosocomial MRSA Infections,” *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 8. 2021. doi: 10.3389/fmolb.2021.654038.

[70] L. B. Price *et al.*, “Staphylococcus aureus CC398: Host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock,” *mBio*, vol. 3, no. 1, 2012, doi: 10.1128/mBio.00305-11.

[71] S. A. Micallef *et al.*, “Diversity, distribution and antibiotic resistance of Enterococcus spp. recovered from tomatoes, leaves, water and soil on U.S. Mid-Atlantic farms,” *Food Microbiol*, vol. 36, no. 2, 2013, doi: 10.1016/j.fm.2013.04.016.

[72] M. Popowska, M. Rzeczycka, A. Miernik, A. Krawczyk-Balska, F. Walsh, and B. Duffy, “Influence of soil use on prevalence of tetracycline,streptomycin, and erythromycin resistance and associated resistance genes,” *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 56, no. 3, 2012, doi: 10.1128/AAC.05766-11.

[73] Y. P. Yu, T. Gong, G. Jost, W. H. Liu, D. Z. Ye, and Z. H. Luo, “Isolation and characterization of five lytic bacteriophages infecting a Vibrio strain closely related to Vibrio owensii,” *FEMS Microbiol Lett*, vol. 348, no. 2, 2013, doi: 10.1111/1574-6968.12277.

[74] B. Balogh, B. I. Canteros, R. E. Stall, and J. B. Jones, “Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages,” *Plant Dis*, vol. 92, no. 7, 2008, doi: 10.1094/PDIS-92-7-1048.

[75] N. Y. D. Ankrah *et al.*, “Phage infection of an environmentally relevant marine bacterium alters host metabolism and lysate composition,” *ISME Journal*, vol. 8, no. 5, 2014, doi: 10.1038/ismej.2013.216.

[76] M. Ghavidel, T. Gholamhosseini-Moghadam, K. Nourian, and K. Ghazvini, “Virulence factors analysis and antibiotic resistance of uropathogenic escherichia coli isolated from patients in northeast of iran,” *Iran J Microbiol*, vol. 12, no. 3, 2020, doi: 10.18502/ijm.v12i3.3240.

[77] D. Lauster *et al.*, “Phage capsid nanoparticles with defined ligand arrangement block influenza virus entry,” *Nat Nanotechnol*, vol. 15, no. 5, 2020, doi: 10.1038/s41565-020-0660-2.

[78] A. Zampara *et al.*, “Exploiting phage receptor binding proteins to enable endolysins to kill Gram-negative bacteria,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-68983-3.

[79] E. W. Kovacs, J. M. Hooker, D. W. Romanini, P. G. Holder, K. E. Berry, and M. B. Francis, “Dual-surface-modified bacteriophage MS2 as an ideal scaffold for a viral capsid-based drug delivery system,” *Bioconjug Chem*, vol. 18, no. 4, 2007, doi: 10.1021/bc070006e.

[80] K. S. Sunderland, M. Yang, and C. Mao, “Phage-Enabled Nanomedicine: From Probes to Therapeutics in Precision Medicine,” *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 56, no. 8. 2017. doi: 10.1002/anie.201606181.

[81] M. Wang and T. J. Webster, “Nano-biomaterials and their applications,” in *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, vol. 1–3, 2019. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.99871-4.

[82] M. Naito, T. Yokoyama, K. Hosokawa, and K. Nogi, *Nanoparticle Technology Handbook*. 2018. doi: 10.1016/s1748-0132(07)70119-6.

[83] Zhypargul Abdullaeva, “Nano- and Biomaterials: Compounds, Properties, Characterization, and Applications,” 2017.

[84] F. J. Heiligtag and M. Niederberger, “The fascinating world of nanoparticle research,” *Materials Today*, vol. 16, no. 7–8. 2013. doi: 10.1016/j.mattod.2013.07.004.

[85] S. Scioli Montoto, G. Muraca, and M. E. Ruiz, “Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects,” *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 7. 2020. doi: 10.3389/fmolb.2020.587997.

[86] K. Shao, S. Singha, X. Clemente-Casares, S. Tsai, Y. Yang, and P. Santamaria, “Nanoparticle-Based Immunotherapy for Cancer,” *ACS Nano*, vol. 9, no. 1. 2015. doi: 10.1021/nn5062029.

[87] L. Zhao *et al.*, “Nanoparticle vaccines,” *Vaccine*, vol. 32, no. 3. 2014. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.11.069.

[88] S. C. Baetke, T. Lammers, and F. Kiessling, “Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer,” *British Journal of Radiology*, vol. 88, no. 1054. 2015. doi: 10.1259/bjr.20150207.

[89] F. Mainini and M. R. Eccles, “Lipid and polymer-based nanoparticle siRNA delivery systems for cancer therapy,” *Molecules*, vol. 25, no. 11. 2020. doi: 10.3390/molecules25112692.

[90] F. S. T. Mirakabad *et al.*, “PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems,” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 15, no. 2. 2014. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.2.517.

[91] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. le Breton, and V. Préat, “PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications,” *Journal of Controlled Release*, vol. 161, no. 2. 2012. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043.

[92] A. Gulzar, S. Gai, P. Yang, C. Li, M. B. Ansari, and J. Lin, “Stimuli responsive drug delivery application of polymer and silica in biomedicine,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 3, no. 44. 2015. doi: 10.1039/c5tb00757g.

[93] E. Preis *et al.*, “Spray dried curcumin loaded nanoparticles for antimicrobial photodynamic therapy,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 142, 2019, doi: 10.1016/j.ejpb.2019.07.023.

[94] E. Booysen, H. Sadie-Van Gijsen, S. M. Deane, W. Ferris, and L. M. T. Dicks, “The Effect of Vancomycin on the Viability and Osteogenic Potential of Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells,” *Probiotics Antimicrob Proteins*, vol. 11, no. 3, 2019, doi: 10.1007/s12602-018-9473-0.

[95] M. C. Gaspar, A. A. C. C. Pais, J. J. S. Sousa, J. Brillaut, and J. C. Olivier, "Development of levofloxacin-loaded PLGA microspheres of suitable properties for sustained pulmonary release," *Int J Pharm*, vol. 556, 2019, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.005.

[96] D. N. Kapoor, A. Bhatia, R. Kaur, R. Sharma, G. Kaur, and S. Dhawan, "PLGA: A unique polymer for drug delivery," *Therapeutic Delivery*, vol. 6, no. 1. 2015. doi: 10.4155/tde.14.91.

[97] A. Zielinska *et al.*, "Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology," *Molecules*, vol. 25, no. 16. 2020. doi: 10.3390/molecules25163731.

[98] Y. Su *et al.*, "PLGA-based biodegradable microspheres in drug delivery: recent advances in research and application," *Drug Deliv*, vol. 28, no. 1, 2021, doi: 10.1080/10717544.2021.1938756.

[99] V. B. Yadav and A. v. Yadav, "Recrystallized agglomerates of indomethacin by emulsion solvent diffusion (ESD) technique," *Int J Pharma Bio Sci*, vol. 1, no. 1, 2010.

[100] N. Mendoza-Munoz, D. Quintanar-Guerrero, and E. Allemann, "The Impact of the Salting-Out Technique on the Preparation of Colloidal Particulate Systems for Pharmaceutical Applications," *Recent Pat Drug Deliv Formul*, vol. 6, no. 3, 2012, doi: 10.2174/187221112802652688.

[101] M. Morales-Cruz *et al.*, "Two-step nanoprecipitation for the production of protein-loaded PLGA nanospheres," *Results Pharma Sci*, vol. 2, no. 1, 2012, doi: 10.1016/j.rinphs.2012.11.001.

[102] M. N. Koopaei *et al.*, "Docetaxel immunonanocarriers as targeted delivery systems for HER 2-positive tumor cells: preparation, characterization, and cytotoxicity studies.," *Int J Nanomedicine*, vol. 6, 2011, doi: 10.2147/ijn.s23211.

[103] "https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rifampicin," *Son erişim tarihi: 11.06.2022*.

[104] P. Müller *et al.*, "Synergism between Medihoney and Rifampicin against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)," *PLoS One*, vol. 8, no. 2, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0057679.

[105] Bethesda, *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]*, no. Md. 2017.

[106] S. Borukhov and E. Nudler, "RNA polymerase holoenzyme: Structure, function and biological implications," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 6, no. 2. 2003. doi: 10.1016/S1369-5274(03)00036-5.

[107] A. Nusrath Unissa and L. E. Hanna, "Molecular mechanisms of action, resistance, detection to the first-line anti tuberculosis drugs: Rifampicin and pyrazinamide in the post whole genome sequencing era," *Tuberculosis*, vol. 105. 2017. doi: 10.1016/j.tube.2017.04.008.

[108] Thermo Fisher, "aLICator LIC Cloning and Expression Kit 2 ".

[109] T. Atabey *et al.*, "In Vitro Evaluation of Immunogenicity of Recombinant OMP25 Protein Obtained from Endemic Brucella abortus Biovar 3 as Vaccine Candidate Molecule Against Animal Brucellosis," *Protein Pept Lett*, vol. 28, no. 10, 2021, doi: 10.2174/0929866528666210615104334.

[110] Kübra Trabzonlu, "FARKLI ŞAPERON PLAZMİTLERİ KULLANILARAK ESCHERICHIA COLI' DE REKOMBİNANT OMP25 PROTEİNİN EKSPRESYONUNUN OPTİMİZASYONU," Yüksek Lisans Tezi, Fen Fakültesi, İstanbul, 2020.

[111] M. Carstens, C. Bittner, M. Krokowski, M. Hadlak, A. C. Feller, and H. Merz, "Whole cell ELISA for measuring anti-tumour effects of immunotherapies in a mouse tumour model of ALCL," *In Vivo (Brooklyn)*, vol. 17, no. 4, 2003.

[112] Güler Temizkan ve Nazlı Arda, *Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri*. 2017.

[113] N. Sundararaj, N. K. Kalagatur, V. Mudili, K. Krishna, and M. Antonysamy, "Isolation and identification of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolates from Indian food samples: evaluation of in-house developed aptamer linked sandwich ELISA (ALISA) method," *J Food Sci Technol*, vol. 56, no. 2, 2019, doi: 10.1007/s13197-019-03568-1.

[114] B. L. Elder, D. K. Boraker, and P. M. Fives-Taylor, "Whole-bacterial cell enzyme-linked immunosorbent assay for Streptococcus sanguis fimbrial antigens," *J Clin Microbiol*, vol. 16, no. 1, 1982, doi: 10.1128/jcm.16.1.141-144.1982.

[115] A. C. DeDent, M. McAdow, and O. Schneewind, "Distribution of protein A on the surface of Staphylococcus aureus," *J Bacteriol*, vol. 189, no. 12, 2007, doi: 10.1128/JB.00227-07.

[116] X. Cao *et al.*, "Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of Staphylococcus aureus," *Nucleic Acids Res*, vol. 37, no. 14, 2009, doi: 10.1093/nar/gkp489.

[117] G. Koch *et al.*, "Attenuating Staphylococcus aureus Virulence by Targeting Flotillin Protein Scaffold Activity," *Cell Chem Biol*, vol. 24, no. 7, 2017, doi: 10.1016/j.chembiol.2017.05.027.

[118] K. Y. Hernández-Giottonini *et al.*, "PLGA nanoparticle preparations by emulsification and nanoprecipitation techniques: Effects of formulation parameters," *RSC Advances*, vol. 10, no. 8. 2020. doi: 10.1039/c9ra10857b.

[119] A. Minost, J. Delaveau, M.-A. Bolzinger, H. Fessi, and A. Elaissari, "Nanoparticles via Nanoprecipitation Process," *Recent Pat Drug Deliv Formul*, vol. 6, no. 3, 2012, doi: 10.2174/187221112802652615.

[120] D. da Costa *et al.*, "Surface charge modulation of rifampicin-loaded PLA nanoparticles to improve antibiotic delivery in Staphylococcus aureus biofilms," *J Nanobiotechnology*, vol. 19, no. 1, 2021, doi: 10.1186/s12951-020-00760-w.

[121] A. Tiwari, P. Kesharwani, V. Gajbhiye, and N. K. Jain, "Synthesis and characterization of dendro-PLGA nanoconjugate for protein stabilization,"

Colloids Surf B Biointerfaces, vol. 134, 2015, doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.06.064.

[122] P. A. McCarron, W. M. Marouf, R. F. Donnelly, and C. Scott, "Enhanced surface attachment of protein-type targeting ligands to poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles using variable expression of polymeric acid functionality," *J Biomed Mater Res A*, vol. 87, no. 4, 2008, doi: 10.1002/jbm.a.31835.

[123] S. Erisen, T. Arasoğlu, B. Mansuroglu, I. Kocacaliskan, and S. Derman, "Cytotoxic and mutagenic potential of juglone: a comparison of free and nano-encapsulated form," *Arh Hig Rada Toksikol*, vol. 71, no. 1, 2020, doi: 10.2478/aiht-2020-71-3344.

[124] A. Katmıs, S. Fide, S. Karaismailoglu, and S. Derman, "Synthesis and characterization methods of polymeric nanoparticles," *Characterization and Application of Nanomaterials*, vol. 2, no. 2, 2019, doi: 10.24294/can.v2i2.791.

[125] R. Wang and Y. Wang, "Fourier transform infrared spectroscopy in oral cancer diagnosis," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 3. 2021. doi: 10.3390/ijms22031206.

[126] H. Yang, S. Yang, J. Kong, A. Dong, and S. Yu, "Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy," *Nat Protoc*, vol. 10, no. 3, 2015, doi: 10.1038/nprot.2015.024.

[127] M. Rani, Keshu, and U. Shanker, "Green nanomaterials: An overview," in *Green Functionalized Nanomaterials for Environmental Applications*, 2021. doi: 10.1016/B978-0-12-823137-1.00026-9.

[128] N. Ural, "The significance of scanning electron microscopy (SEM) analysis on the microstructure of improved clay: An overview," *Open Geosciences*, vol. 13, no. 1. 2021. doi: 10.1515/geo-2020-0145.

[129] T. Arasoglu, S. Derman, and B. Mansuroglu, "Comparative evaluation of antibacterial activity of caffeic acid phenethyl ester and PLGA nanoparticle formulation by different methods," *Nanotechnology*, vol. 27, no. 2, 2016, doi: 10.1088/0957-4484/27/2/025103.

[130] T. Arasoğlu *et al.*, "Preparation, characterization, and enhanced antimicrobial activity: Quercetin-loaded PLGA nanoparticles against foodborne pathogens," *Turkish Journal of Biology*, vol. 41, no. 1, pp. 127–140, 2017, doi: 10.3906/biy-1604-80.

[131] D. Gokkaya, M. Topuzogullari, T. Arasoglu, K. Trabzonlu, M. M. Ozmen, and S. Abdurrahmanoğlu, "Antibacterial properties of cationic copolymers as a function of pendant alkyl chain length and degree of quaternization," *Polym Int*, vol. 70, no. 6, 2021, doi: 10.1002/pi.6170.

[132] S. Irshad, M. Mahmood, and F. Perveen, "In-Vitro Anti-Bacterial Activities of Three Medicinal Plants Using Agar Well Diffusion Method," *Research Journal of Biology*, vol. 02, no. 01, 2012.

[133] CLSI, “Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11th ed. CLSI standards M07.,” *Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2018.

[134] T. K. R. K. A. K. Gurpreet Singh, “Recent Biomedical Applications and Patents on Biodegradable Polymer PLGA ,” *International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences*, vol. 1, no. 2, pp. 30–42, 2014.

[135] W. Yin *et al.*, “Bio-Hybrid Nanoarchitectonics of Nanoflower-Based Elisa Method for the Detection of Staphylococcus Aureus,” *SSRN Electronic Journal*, 2022, doi: 10.2139/ssrn.4038101.

[136] B. Ma *et al.*, “Use of peptide-modified nanoparticles as a bacterial cell targeting agent for enhanced antibacterial activity and other biomedical applications,” *Food Research International*, vol. 161, 2022.

[137] M. J. Beha, J. S. Ryu, Y. S. Kim, and H. J. Chung, “Delivery of antisense oligonucleotides using multi-layer coated gold nanoparticles to methicillin-resistant S. aureus for combinatorial treatment,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 126, 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.112167.

[138] S. Derman, “Caffeic Acid Phenethyl Ester Loaded PLGA Nanoparticles: Effect of Various Process Parameters on Reaction Yield, Encapsulation Efficiency, and Particle Size,” *J Nanomater*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/341848.

[139] U. Bilati, E. Allémann, and E. Doelker, “Nanoprecipitation versus emulsion-based techniques or the encapsulation of proteins into biodegradable nanoparticles and process-related stability issues,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 6, no. 4, 2005, doi: 10.1208/pt060474.

[140] H. A. Alhazmi, “FT-IR spectroscopy for the identification of binding sites and measurements of the binding interactions of important metal ions with bovine serum albumin,” *Sci Pharm*, vol. 87, no. 1, 2019, doi: 10.3390/scipharm87010005.

[141] F. Esmaeili, M. Hosseini-Nasr, M. Rad-Malekshahi, N. Samadi, F. Atyabi, and R. Dinarvand, “Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-co-glycolide nanoparticles,” *Nanomedicine*, vol. 3, no. 2, 2007, doi: 10.1016/j.nano.2007.03.003.

[142] W. Wehrli, “Rifampin: Mechanisms of action and resistance,” *Rev Infect Dis*, vol. 5, 1983, doi: 10.1093/clinids/5.Supplement_3.S407.

[143] Winston. Lisa G., D. Deck, and A. F. Bolger, “ENDOCARDITIS,” in *Pharmacology and Therapeutics*, 2009, pp. 1121–1140.

[144] R. M. Epand, C. Walker, R. F. Epand, and N. A. Magarvey, “Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics,” *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1858, no. 5, 2016, doi: 10.1016/j.bbamem.2015.10.018.

[145] W. Gao, Y. Chen, Y. Zhang, Q. Zhang, and L. Zhang, “Nanoparticle-based local antimicrobial drug delivery,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 127. 2018. doi: 10.1016/j.addr.2017.09.015.

[146] L. Wang, C. Hu, and L. Shao, “The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future,” *International Journal of Nanomedicine*, vol. 12. 2017. doi: 10.2147/IJN.S121956.

[147] S. Hussain *et al.*, “Antibiotic-loaded nanoparticles targeted to the site of infection enhance antibacterial efficacy,” *Nat Biomed Eng*, vol. 2, no. 2, 2018, doi: 10.1038/s41551-017-0187-5.

[148] P. Jelinkova *et al.*, “Nanoparticle-drug conjugates treating bacterial infections,” *Journal of Controlled Release*, vol. 307. 2019. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.06.013.

[149] M. Y. Mahmoud, J. M. Steinbach-Rankins, and D. R. Demuth, “Functional assessment of peptide-modified PLGA nanoparticles against oral biofilms in a murine model of periodontitis,” *Journal of Controlled Release*, vol. 297, 2019, doi: 10.1016/j.jconrel.2019.01.036.

[150] I. R. Scolari, P. L. Páez, M. M. Musri, J. P. Petiti, A. Torres, and G. E. Granero, “Rifampicin loaded in alginate/chitosan nanoparticles as a promising pulmonary carrier against Staphylococcus aureus,” *Drug Deliv Transl Res*, vol. 10, no. 5, 2020, doi: 10.1007/s13346-019-00705-3.

[151] Z. W. Qiao, Z. Yuan, W. Zhang, D. Wei, and N. Hu, “Preparation, in vitro release and antibacterial activity evaluation of rifampicin and moxifloxacin-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres,” *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, vol. 47, no. 1, 2019, doi: 10.1080/21691401.2019.1581792.

[152] M. Tukulula, L. Gouveia, P. Paixao, R. Hayeshi, B. Naicker, and A. Dube, “Functionalization of PLGA Nanoparticles with 1,3-β-glucan Enhances the Intracellular Pharmacokinetics of Rifampicin in Macrophages,” *Pharm Res*, vol. 35, no. 6, 2018, doi: 10.1007/s11095-018-2391-8.

[153] J. Hansing, J. R. Duke, E. B. Fryman, J. E. Derouchey, and R. R. Netz, “Particle Diffusion in Polymeric Hydrogels with Mixed Attractive and Repulsive Interactions,” *Nano Lett*, vol. 18, no. 8, 2018, doi: 10.1021/acs.nanolett.8b02218.

[154] M. S. Kadayifci *et al.*, “Core-crosslinking as a pathway to develop inherently antibacterial polymeric micelles,” *J Appl Polym Sci*, vol. 137, no. 8, 2020, doi: 10.1002/app.48393.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Projeler

1. *S. aureus* Hedefli, Vankomisin Ve Oksasilin Içeren Nanoformülasyonların Eldesi Ve Antibakteriyal Etkinliginin In Vitro In Vivo Degerlendirilmesi, TÜBİTAK 1001 Projesi, Bursiyer