

**M13MP18 İSKELE İPLİĞİNDEN DNA ORİGAMI  
NANODEMETLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İLAÇ TAŞIYICI  
OLARAK KULLANIMININ İNCELENMESİ**

**DEVELOPMENT OF DNA ORIGAMI NANOBUNDLES  
FROM M13MP18 SCAFFOLD STRAND AND  
INVESTIGATION OF THEIR USE AS DRUG CARRIER**

**AYKUT BİLİR**

**PROF. DR NECDET SAĞLAM**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

*Canım aileme...*

## ÖZET

# M13MP18 İSKELE İPLİĞİNDEN DNA ORİGAMİ NANODEMETLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İLAÇ TAŞIYICI OLARAK KULLANIMININ İNCELENMESİ

**Aykut BİLİR**

**Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM**

**Eş Danışman: Prof. Dr. Celal ÜLGER**

**Şubat 2022, 90 sayfa**

Günümüzde nanoteknoloji ve biyomedikal alanlarında DNA nanoteknolojisinin konvansiyonel yöntemlerin yerini almakta olduğu ve bu konuda önemli çalışmaların yapıldığı görülmektedir. DNA'nın yapısı gereği komplementerlik arz eden baz çiftlerinde görülen etkileşim özgülüğü, genomik çalışmalarda DNA'yı bir üst seviyeye taşımıştır. DNA origami multidisipliner bir alandır ve bu alanda üstün nanomalzemeler geliştirilmektedir. DNA nanoyapılar, polimer ve lipid bazlı ilaç taşıyıcı ajanlara kıyasla modülerlik, immün cevabı tetiklememek, biyouyumluluk, biyobozunurluk gibi avantajlar bulundurmaktadırlar. Yaygın olarak kullanılan DNA origami yöntemiyle uzun tek zincirli iskele DNA, yüzden

fazla eşlenik kısa 'zimba' zincirle termal tavlama ile katlanarak 2 ve 3 boyutlu DNA nanoyapılar oluşturulmaktadır.

Nanotıp ve biyomedikal alanında DNA origami nanoyapılardan antimikrobiyal dirence karşı çözüm üretmede yararlanılmaktadır. Bilindiği gibi enfeksiyon hastalıklarına ve cerrahi müdahale sonrası enfeksiyona neden olan patojen ajanlara karşı çeşitli antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak patojen ajanların antibiyotiklere karşı direnç geliştirmeleri, tedavide ve cerrahi müdahale sonrası enfeksiyonların sağıtımında zorluklar yaratmasının yanında ekonomik yönden de sağlık sistemini sıkıntıya sokmaktadır. Kanseri hastalıkları tedavisinde kullanılan ilaç, ameliyat, kemo, radyo ve foto terapiler gibi konvansiyonel yöntemler sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir. Ayrıca kanser hastalıkları başta olmak üzere bir çok hastalıkta çeşitli tedavi yöntemleri sonrası hastanın immün sistemi zayıflamakta ve hastanın mikrobiyal enfeksiyonlara karşı direnci düşmektedir. Bu tür hastalarda enfeksiyonları engellemek için etkin antibiyotiğin kullanılması uygulanan kemoterapinin de başarısını arttırmaktadır.

Antibiyotik grubundan olan Lantibiyotikler, translasyon sonrası modifiye edilmiş polisiklik peptid antibiyotiklerdir. Lantibiyotiklerden özellikle nisinin FDA onayına sahip olması, etkinliğinin yüksek fakat düşük sitotoksisite göstermesi ve bakteriyel direnç oluşturma olasılığının düşük olması antimikrobiyal direnç kazanmış hastane kaynaklı ve epidemik özellikteki patojenlere karşı diğer antibiyotiklere kıyasla avantajlar sağlamaktadır. Çünkü nisinin çift etki mekanizması göstererek hem mikrorganizmaların hücre duvarı sentezinde lipid-II'ye bağlanarak sentezini inhibe etmekte, hem de hücre zarında porlar oluşturarak hücreyi lizise uğratmaktadır.

Bu veriler ışığında yapılan tez çalışmasının ilk aşamasında,

a) sadece nisin,

b) m13mp18 iskele ipliği kullanılarak üretilen DNA Nano-Yapılara elektrostatik olarak nisin yüklenmiş,

c) sadece m13mp18 iskele ipliği kullanılarak DNA Nanoyapılar sentezlenmiş ve bu üç farklı örneğin belli başlı patojen ajan olan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA ATCC 43300) ve vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* (VRE ATCC 51299)'e karşı antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Bu bağlamda, a)

Sadece nisin lantibiyotiğinin farklı konsantrasyonlarındaki denemeleri sonucunda, 2500 nM nisin derişiminde, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA ATCC 43300) suşunda inhibisyonun % 97, b) Nisin yüklü DNA nanoyapıda % 95 olduğu; vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* (VRE ATCC 51299) suşunda ise a) sadece nisinli örnekte inhisyon oranının % 96, b) nisin yüklü DNA nanoyapıda %91 olduğu, c) her iki patojenin sadece DNA nanoyapı bulunan örneklerinde herhangi bir inhibisyon olmadığı saptanmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında bu patojenlerin IC<sub>50</sub> değerleri, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'ya karşı sadece nisin için 1051 nM, nisin yüklü DNA nanoyapı için de 1567 nM olarak bulunmuştur. Vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* (VRE)'ye karşı ise IC<sub>50</sub> değerleri incelendiğinde de yine sadece nisin için 1303 nM, nisin yüklü DNA-NY için de 1387 nM olarak bulunmuştur. Nisin kullanılarak MRSA ve VRE'ye karşı elde edilen en yüksek inhibisyon oranları sırasıyla %97 ve %96, literatürdeki %100'ünü inhibe eden minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri ile karşılaştırılmış ve yakın değerler bulunmuştur.

Çalışmamızın son aşamasında da in-vitro çalışmalar bağlamında, elde edilen nano yapıların hücre kültüründe etkinliğinin araştırılması için iki farklı hücre hattı; insan meme kanseri hücreleri (MCF-7) ve fare fibroblast hücreleri (L929)'ne karşı sitotoksik etkileri incelenmiştir. 2.5 µM konsantrasyonundaki sadece nisin ile MCF-7 hücrelerinin ölüm oranı %45, nisin yüklü DNA-NY ile ise %43'dür. L929 hücrelerine karşı ise 2.5 µM konsantrasyonda nisin hücrelerinin ölüm oranı %8, nisin yüklü DNA-NY'ların ise %17 dir.

Çalışmalar sonucunda, geliştirilen nisin yüklü DNA-nanoyapılar antimikrobiyal etkileri ile gerek hastane kaynaklı ve epidemik boyutlarda çoklu ilaca direnç kazanmış patojenlerle mücadelede, gerekse de kanser hücrelerine karşı seçici olarak antikanser özellikleri ile kanser tedavisinde kullanım alanına sahip olacağı saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** DNA Origami, patojen ajanlar, antibiyotik, lantibiyotik, nisin, ilaç taşınması, antikanser

## **ABSTRACT**

# **DEVELOPMENT OF DNA ORIGAMI NANOBUNDLES FROM M13MP18 SCAFFOLD STRAND AND INVESTIGATION OF THEIR USE AS DRUG CARRIER**

**Aykut BİLİR**

**Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology and Nanomedicine**

**Supervisor: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM**

**Co-Supervisor: Prof. Dr. Celal ÜLGER**

**February 2022, 90 pages**

Currently, in nanotechnology and biomedical field DNA nanotechnology is more and more used instead of conventional methods and important studies are carried out. Complementary base pairing of DNA has taken it to the next level in genomic studies. DNA origami is a multidisciplinary field and advanced nanomaterials are developed. DNA nanostructures have many advantages such as being modular, biocompatible, biodegradable and giving low immune response over polymer and lipid based drug delivery agents. In the common technique DNA origami, long single stranded DNA is folded by over hundreds of 'staple' strands via thermal annealing and 2D and 3D DNA nanostructures are created.

In nanomedicine and biomedical field, utilized from DNA origami nanostructures in generating solutions for antimicrobial resistance. Various antibiotics are used

against infectious diseases and the pathogens cause infections after surgeries. However pathogen agents develop resistance to antibiotics, it cause many challenges in therapy, after surgery and leads to financial burden in healthcare system. In cancer therapy conventional methods such as drug, surgery, chemotherapy, radiotherapy and phototherapy can kill normal cells as well. Moreover, particularly in cancer therapy many therapy methods weakens the patients' immune system and patient's resistance to infections. In this type of patients, effective antibiotic use improve the success of chemotherapy too.

Lantibiotics are post translational modified polycyclic peptite antibiotics. A member of lantibiotics class, nisin is FDA approved, shows high activity, low cytotoxicity, low possibility to develop bacterial resistance and has many advantages over other antibiotics against antimicrobial resisted epidemic nosocomial pathogens. Because nisin shows double mode of action, by binding one of cell wall initiators lipid II, it disrupts cell wall formation and it forms pores in cell membrane and leads cell to lysis.

In the first part of the thesis,

a) bare nisin,

b) DNA nanostructures were built by m13mp18 scaffold strand and electrostatically loaded with nisin,

c) bare DNA nanostructures were built by m13mp18 scaffold strand.

Antimicrobial activities of these 3 samples against pathogen agents methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA ATCC 43300) and vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* (VRE ATCC 51299) were investigated. In the concentration of 2500 nM, a) by bare nisin 97% of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA ATCC 43300) bacteria was inhibited and by loading onto DNA nanoparticles (DNA-NP) 95% of inhibition achieved. In 2500 nM concentration a) bare nisin inhibited up to 96% and b) by loading nisin onto DNA nanoparticles up to 91% of vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* (VRE ATCC 51299), c) for both pathogens bare DNA nanoparticles (DNA-NP) has not exhibited any inhibition.

In the second part of the study, IC<sub>50</sub> values calculated against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) for nisin as 1051 nM and for nisin loaded DNA-

NP as 1567 nM. And against vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* (VRE), IC<sub>50</sub> values found for nisin and nisin loaded DNA NP are 1303 nM and 1387 nM, respectively. By using nisin against MRSA and VRE, highest inhibition values obtained as 97% and 96% compared with minimum inhibition concentration (MIC) values in the literature and found compatible.

In the last part of the thesis, in vitro cytotoxic activity of nisin loaded DNA based drug delivery system investigated against human breast cancer cells (MCF-7) and mouse fibroblast cells (L929). Bare nisin in 2.5 µM concentration and nisin loaded DNA nanostructures showed cytotoxic effect in 45% and 43% of MCF-7 cells, respectively. And against L929 cells in 2.5 µM concentration, bare nisin and nisin loaded DNA nanostructures showed cytotoxic effect in only 8% and 17% of the cells, respectively.

Furthermore as a result of the study, it is believed that the developed nisin loaded DNA nanostructures will be used in both against nosocomial multi resistant pathogens thanks to their antimicrobial effects and in cancer therapy with their selective anticancer activity.

**Keywords:** DNA origami, pathogen agents, antibiotic, lantibiotic, nisin, drug delivery, anticancer



## TEŞEKKÜR

Tanıőtıđımız günden beri her türlü bana destek olan tez danışmanım Prof. Dr. Necdet Sağlam'a, eş danışmanım Prof. Dr. Celal Ülger'e, Prof. Dr. Mustafa Türk'e, fikir ve önerileriyle bu tezin gerçekleşmesini mümkün kılan Doç. Dr. Eylem Güven Öz'e, Dr. Öğr. Üyesi Mesut Őam'a ve Dr. Aytuna Çerçi'ye,

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Sağlamış oldukları Doktora Bursu için Yüksek Öğretim Kurulu (YÖK)'e,

Aalto University Biohybrid Materials Grubu üyeleri, Salla Valimaki, Heini Ijas ve Prof. Dr. Mauri A. Kostianen'e,

Canım annem Songül Bilir, babam Cengiz Bilir, kardeşlerim Dt. Nazmiye Bilir ve Büőra Bilir'e,

Her zaman yanımda olan Merve Kebapçioğlu, Ezgi Emül, Onur Ekmekçi, Havva İldeő Ekmekçi, Semih Tokkuzun'a,

Sonsuz teşekkürler...

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Deoksiribonükleik Asit.....	3
2.2. DNA Nanoteknolojisi .....	5
2.3. DNA Origami Nanoyapıların Oluşturulması .....	6
2.4. Akıllı İlaç Taşıyıcılar Olarak DNA Nanoyapılar .....	8
2.5. Bakteriler .....	18
2.5.1. Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) .....	20
2.5.2. Vankomisine Dirençli <i>Enterococcus faecalis</i> (VRE).....	21
2.6. Antimikrobiyal taşıyıcı olarak DNA nanoyapılar .....	22
2.7. Antimikrobiyaller.....	24
2.7.1. Hücre duvarını etkileyen antimikrobiyaller.....	25
2.7.2. Protein sentezini etkileyen antimikrobiyaller .....	25
2.7.3. Nükleik asit sentezini etkileyen antimikrobiyaller .....	26
2.7.4. Metabolit sentezini inhibe eden antimikrobiyaller (antimetabolitler) .	27
2.7.5. Hücre membranına zarar veren antimikrobiyaller .....	29
2.8. Antimikrobiyal Direnç .....	30
2.9. Bakteriyosinler.....	32
2.10. Lantibiyotikler .....	34
2.11. Nisin.....	37

2.12. Kanser .....	44
2.12.1. Meme kanseri .....	47
2.13. Kanser Tedavisinde Nisin .....	48
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	50
3.1. Deneyde Kullanılan Kimyasallar ve Mikroorganizmalar.....	50
3.1.1. DNA Primerleri ve İskele .....	51
3.2. Yöntem .....	54
3.2.1. DNA Origami Nanodemetlerinin Oluşturulması .....	54
3.2.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntülenmesi .....	55
3.2.3. Antimikrobiyal Aktivitelerin Belirlenmesi .....	55
3.2.4. Sitotoksik Aktivitelerin Belirlenmesi.....	57
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	60
4.1. DNA Nanoyapının Karakterizasyonu.....	60
4.2. Antimikrobiyal aktivitenin incelenmesi .....	62
4.3. Bazı Doku Hücrelerinde Sitotoksik Aktivitenin İncelenmesi - İn Vitro Çalışmalar .....	67
5. YORUM .....	71
KAYNAKLAR.....	74

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1</b> DNA'nın yapısı .....	3
<b>Şekil 2.2</b> DNA Heliks yapısında eşlenik baz çiftleri.....	4
<b>Şekil 2.3</b> DNA'nın rekombinasyonel birleşmeleri .....	5
<b>Şekil 2.4</b> Yıllara göre DNA Origami anahtar kelime yaygın ve atıf sayıları.....	7
<b>Şekil 2.5</b> İskele, DNA-NY ve saflaştırılmış DNA-NY için agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	8
<b>Şekil 2.6</b> Akıllı ilaç taşıyıcı olarak geliştirilen DNA nanoyapılar.....	12
<b>Şekil 2.7</b> Bakterilerin hücre duvarları.....	19
<b>Şekil 2.8</b> Antimikrobiyal taşıyıcı araçlar olarak DNA nanoyapılar.....	23
<b>Şekil 2.9</b> Antibakteriyel bileşikler ve yapıları .....	29
<b>Şekil 2.10</b> Lantibiyotiklere özel aminoasitler .....	35
<b>Şekil 2.11</b> Nisin gelişiminin zaman çizelgesi .....	38
<b>Şekil 2.12</b> Nisin A'nın yapısı. ....	39
<b>Şekil 2.13</b> Dünyada 2020 yılındaki tahmin edilen yeni vaka sayıları.....	46
<b>Şekil 2.14</b> ABD'de hastalığın evrelerine göre kadın meme kanseri tedavi paternleri, (%), 2016 yılı. ....	48
<b>Şekil 3.1</b> MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı bulunan mikroplaka .....	58
<b>Şekil 3.2</b> L929 sağlıklı fare fibroblast hücre hattı bulunan mikroplaka .....	59
<b>Şekil 4.1</b> A,B) DNA Nanoyapıların ve C,D) Nisin yüklü DNA nanoyapıların Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) görüntüleri.....	61
<b>Şekil 4.2</b> Sadece DNA-NY ile inkübe edilen metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) bakterilerinin değişen DNA-NY konsantrasyonlarına karşılık gelen % canlılık değerleri .....	62
<b>Şekil 4.3</b> Nisin konsantrasyonuna karşılık gelen sadece nisin ve nisin yüklü DNA-NY'lar ile inkübe edilen metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) % canlılıkları.....	63
<b>Şekil 4.4</b> Sadece DNA-NY ile inkübe edilen vankomisine dirençli <i>Enterococcus faecalis</i> 'in değişen DNA-NY konsantrasyonlarına karşılık gelen % canlılık değerleri.....	65

<b>Şekil 4.5</b> Nisin konsantrasyonuna karşılık gelen sadece nisin ve nisin yüklü DNA-NY'lar ile inkübe edilen vankomisine dirençli <i>Enterococcus faecalis</i> 'in % canlılık değişimleri .....	65
<b>Şekil 4.6</b> Değişen nisin konsantrasyonlarında A) sadece nisin, B) DNA-NY ve C) nisin yüklü DNA-NY ile etkileştirilen meme kanseri hücrelerinin (MCF-7) % hücre canlılık değişimleri .....	68
<b>Şekil 4.7</b> Değişen nisin konsantrasyonlarında A) sadece nisin, B) DNA-NY ve C) nisin yüklü DNA-NY ile etkileştirilen sağlıklı fare fibroblast hücrelerinin (L929) % hücre canlılık değişimleri .....	69

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1</b> DNA origami kararlılığını arttırmaya yönelik koruma yöntemleri....	13
<b>Çizelge 2.2</b> Organik ve inorganik nanopartiküller kullanılarak hazırlanan hibrit nükleik asit nanoyapıları ve uygulamaları.....	17
<b>Çizelge 2.3</b> Etki mekanizmalarına göre antibakteriyel bileşikler.....	26
<b>Çizelge 2.4</b> 2050 yılı için tahmin edilen koşullarına göre ölüm oranları. ....	31
<b>Çizelge 2.5</b> 2050 yılı için bölgeler göre tahmin edilen antimikrobiyal direnç kaynaklı ölüm oranları .....	31
<b>Çizelge 2.6</b> Bakteriyosin ve antibiyotiklerin karşılaştırılması. ....	33
<b>Çizelge 2.7</b> Bakteriyosinlerin sınıflandırılması .....	34
<b>Çizelge 2.8.</b> Bazı lantibiyotikler ve potansiyel tedavi uygulamaları. ....	36
<b>Çizelge 2.9</b> Nisin'in biyomedikal uygulamaları. ....	39
<b>Çizelge 2.10</b> Ülkelere göre 2020 yılı yeni kanserli vaka sayıları .....	45
<b>Çizelge 2.11</b> Türkiye'deki 2020 yılı için tahmin edilen yeni vaka sayıları, ölüm sayıları ve son beş yıldaki yaygınlık .....	46
<b>Çizelge 3.1</b> 60 helis demeti oluşturmak için kullanılan 141 zımba DNA'nın sekansları .....	51
<b>Çizelge 3.2</b> DNA-NY, nisin ve nisin yüklü DNA-NY çözeltilerinin antimikrobiyal etki değerlendirmesinde kullanılan konsantrasyonları .....	56
<b>Çizelge 3.3</b> Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar, inkübasyon sıcaklığı, süresi ve geliştiği besi ortamı.....	57
<b>Çizelge 3.4</b> Çalışmada kullanılan hücre hatları ve fizyolojik koşulları .....	57

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

°C Santigrat derece

μ Mikro

M Molar

### Kısaltmalar

MTT 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür

DNA Deoksiribonükleik asit

DNA-NY DNA nanoyapı

FDA Food and Drug Administration

CDC Centers for Disease Control and Prevention

IARC International Agency for Research On Cancer

ATCC American Type Culture Collection

FCS Fetal Buzağı Serumu

RPMI Roswell Park Memorial Institute

DMEM Dulbecco's Modified Eagles Medium

MRSA Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*

VRE Vankomisine Dirençli *Enterococcus faecalis*

BSA Sığır serum albümin

OD Optik Yoğunluk

TEM Geçirimli Elektron Mikroskobu

MKA Meme Koruyucu Ameliyat

# 1. GİRİŞ

İlaç taşıma, terapötik bir bileşenin insan veya hayvanlarda tedavi edici etkisine ulaşmak için gerçekleştirilen yöntem ve proseslere denir. Yeni ilaç molekülü geliştirmek pahalı ve zaman alan bir süreçtir, bu nedenle ilacı kontrollü bir şekilde, yavaş teslim etmek tedavi edici etkisini arttırmak için önemlidir. Bu nedenle ilaç taşıyıcı ajanlar kullanılmaktadır ve günümüzde nanopartiküller, dendrimerler ve lipozomlar yaygın olarak tercih edilmektedirler. Ancak biyouyumluluk ve istenilen özelliklerin kazandırılması konuları hala geliştirilmeye ihtiyaç duymaktadır.

Antimikrobiyal direnç sadece gelişmiş ülkelerde değil tüm dünyada halk sağlığı sistemleri için büyük bir tehdit olarak görülmektedirler. Son yıllarda tüm dünyada antibiyotik kullanımı ciddi oranda artış göstermiştir. Antibiyotiklerin tedavide yetersiz kaldığı bulaşıcı hastalıklar sağlık sisteminin geleceğini belirsizleştirmektedirler bu yüzden antimikrobiyallere dirençli bakteriler ile mücadelede yakın zamanda inovatif ve etkili çözümlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu konuda en dikkat çekici adaylardan birisi lantibiyotiklerdir. Lantibiyotikler Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen ve yapılarında lantiyonin (Lan),  $\beta$ -metillantiyonin (MeLan), dehidroalanin ve dehidrobütirin gibi alışılmadık aminoasitleri bulunduran antimikrobiyal peptitlerdir. *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin ise FDA tarafından onay almış dikkat çeken bir üyesidir. Nisinin hem birçok antibiyotik direnci kazanmış bakteriye karşı antimikrobiyal özellik gösterdiği hem de antikanser özellik gösterdiği bilinmektedir.

Yaygın olarak görülen ve aşılmayı bekleyen bir diğer sağlık sorunu da kanserdir. Bu amaçla FDA tarafından onaylanan birçok tedavi yöntemi bulunmaktadır. Bunlardan birisi biyouyumluluk konusunda büyük dezavantajlar bulunduran nanopartikül temelli kemoterapötiklerdir. Ve meme kanseri gibi örneklerde ise memenin tamamen alınmasına (mastektomi) kadar giden tedaviler bulunmaktadır. Ancak tüm bu ameliyat, kemo- ve radyoterapiler normal hücre ve dokulara da zarar vererek hastanın ölümüne neden olabilmektedir.



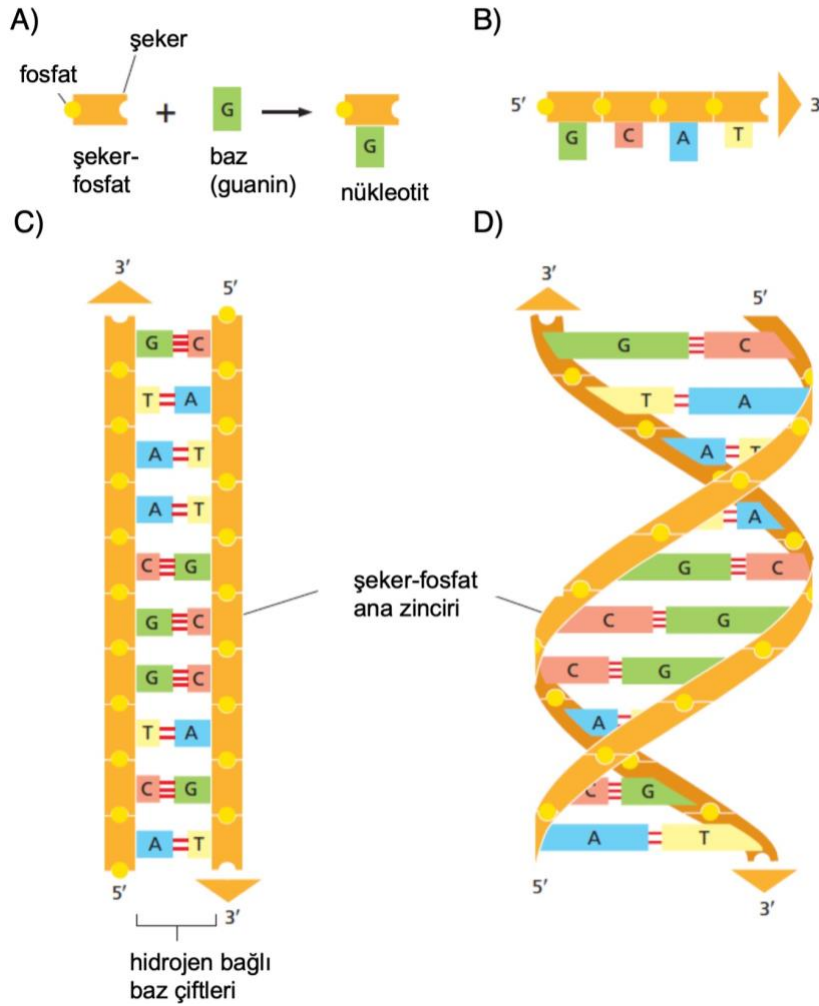
DNA bazlı nanoyapılar tedavi alanında diğer nanoteknolojik sistemlere kıyasla biyouyumluluk ve biyobozunurluk gibi birçok avantaja sahiptir. Bunun dışında en dikkat çekici özelliği ise modülerlikleridir, bu yapıların boyutu ve modifikasyon pozisyonları (ligand ve diğer moleküller) nanometre seviyesinde tam olarak kontrol edilebilmektedir, şekil ve esneklikleri de hassasça ayarlanabilmektedir.

Bu tez çalışmasında da kolay ve yaygın olarak kullanılabilir DNA origami yöntemi ile DNA bazlı nanoyapılar oluşturulmuştur. Buna göre m13mp18 tek zincirli viral uzun iskele DNA, yüzden fazla 'zımba' DNA ile katlama solüsyonu içerisinde termal tavlama tabii tutulmuştur. Sonrasında PEG bazlı saflaştırma ile fazla olan zımba DNA'lar uzaklaştırılarak nihai yapı oluşturulmuştur. Ardından negatif yüklü DNA nanoyapıya antimikrobiyal ve antikanser özellikleri bilinen katyonik nisin lantibiyotiği elektrostatik bağlanma ile yüklenerek ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Hastane kaynaklı patojenlerin başında gelen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* (VRE)'e karşı antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Son olarak da sitotoksikite testleri ise insan meme kanseri hücreleri (MCF-7) ve fare fibroblast hücreleri (L929) üzerinde yapılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Deoksiribonükleik Asit

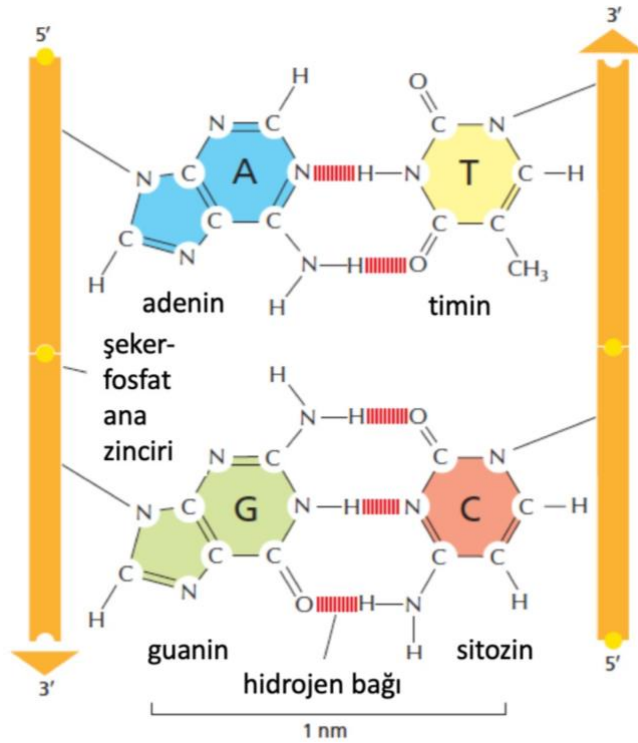
Deoksiribonükleik asit (DNA) organizmaların gelişme, bakım ve çoğalma gibi yaşamsal faaliyetler için gerekli olan genetik bilginin saklandığı bir biyomakromoleküldür. İlk defa tıp doktoru Friedrich Miescher tarafından 1868 yılında keşfedilmiştir, akyuvar hücrelerinin çekirdeğinden izole edilmiştir. Organizmadaki her hücre bu bilgiye sahiptir ve yavru hücreye aktarır. Bu bilgi DNA'nın yapısında bulunan nükleotitlerin oluşturduğu dizide saklanmaktadır. Her bir nükleotit; beş karbonlu şeker, bir azotlu organik baz ve fosfat grubundan oluşur (Şekil 2.1A).



**Şekil 2.1** DNA'nın yapısı A) DNA molekülünün bileşenleri, B) DNA zinciri, C) Çift zincirli DNA D) Çift heliks. [1] nolu referanstan izin alınarak kullanılmıştır. Telif

hakkı © 2015 Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts ve Peter Walter

Adenin (A), Timin (T), Guanin (G) ve Sitozin (C) olmak üzere dört farklı azotlu organik baz farklı şekillerde sıralanarak genetik kod denilen bu bilgiyi oluştururlar. Nükleotitlerde bulunan şeker ve fosfatlar fosfodiester bağları ile bağlanarak DNA zincirini oluştururlar (Şekil 2.1B). Fosfat ana zinciri DNA'nın negatif yüklü olmasına neden olur. DNA'nın molekül şekli ilk defa 1953 yılında Francis Crick ve James Watson tarafından keşfedilmiştir [2]. Buna göre iki tarafta bulunan DNA zincirleri bazlar arasındaki hidrojen bağları yardımıyla birbirine bağlanmakta (Şekil 2.1C) ve heliks yapısını oluşturmaktadır (Şekil 2.1D). DNA çoğunlukla B-formunda bulunur ve buna göre 2nm çapında ve her bir helikal dönüşünü 3.4 nm'de (10.4 baz çifti) yapar. Bazlar bağlanırken her zaman Adenin, Timin ile 2 hidrojen bağı, Guanin ise Sitozin ile 3 hidrojen bağı yaparak eşleşir (Şekil 2.2). Bu bağlanmaya Watson-Crick baz eşleşmesi denir.

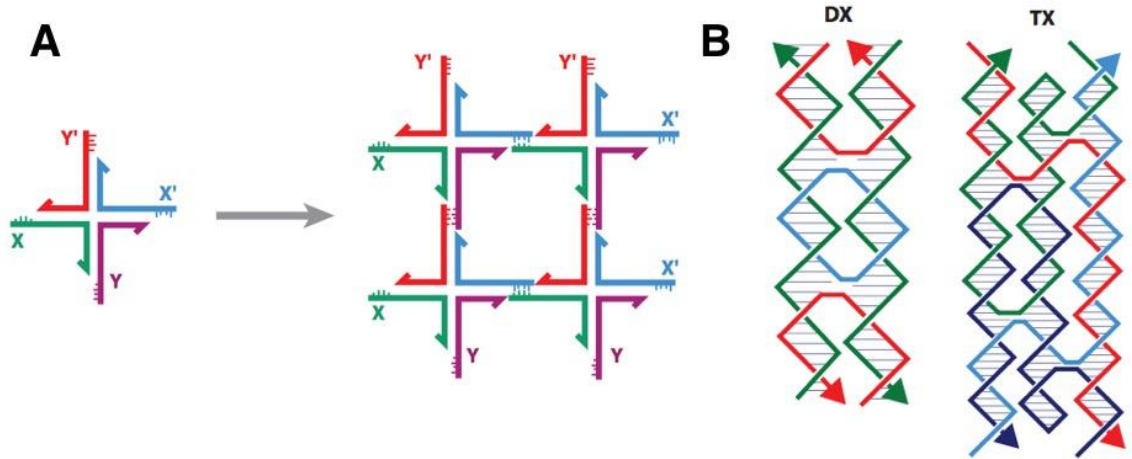


**Şekil 2.2** DNA Heliks yapısında eşlenik baz çiftleri. [1] nolu referanstan izin alınarak kullanılmıştır. Telif hakkı © 2015 Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts ve Peter Walter

Watson-Crick baz eşleşmesi sentetik DNA nanoyapıların üretilmesini sağlamıştır ve böylelikle DNA nanoteknolojisi alanının doğmasına vesile olmuştur. [1]

## 2.2. DNA Nanoteknolojisi

Yapısal DNA nanoteknolojisi Seeman'ın 1982 yılında DNA'yı aşağıdan yukarıya kendiliğinden kurulmada yapı malzemesi olarak önermesinden bu yana kayda değer bir gelişme göstermiştir [3]. Watson-Crick baz eşleşmesine dayanan sayısız nanoyapı tasarlanmış ve geliştirilmiştir [2]. Seçici sekansa dayalı baz eşleşmesi sayesinde hedeflenen nanoyapılar ikiz helis geometrisinde oluşturulmuştur. Bu alandaki dönüm noktası DNA'nın yüksek dereceli yapılar oluşturmak amacıyla sabit birleşme noktaları elde edilebileceğinin keşfedilmesi ile yaşanmıştır. Oysa ki yaşayan sistemlerde dizilim simetrisinden kaynaklı olarak Holliday junction (kavşağı) hareketlidir. Seeman dizilimin tasarlanarak ve asimetric hale getirilerek bu yapıların kararlı bir forma getirilebileceğini ve 2 boyutlu latise öz birleşebileceğini göstermiştir (Şekil 2.3A) [4]. Ardından kol sayıları artırılarak 5-, 6-, 8- ve 12-kollu son derece dallanmış bağlantılar oluşturulmuştur [5, 6].



**Şekil 2.3** DNA'nın rekombinasyonel birleşmeleri **A)** 4 kollu bağlanmadan oluşan 2B latis. İzin alınarak uyarlanmıştır [3]. Telif hakkı © 1982 Elsevier. **B)** çift

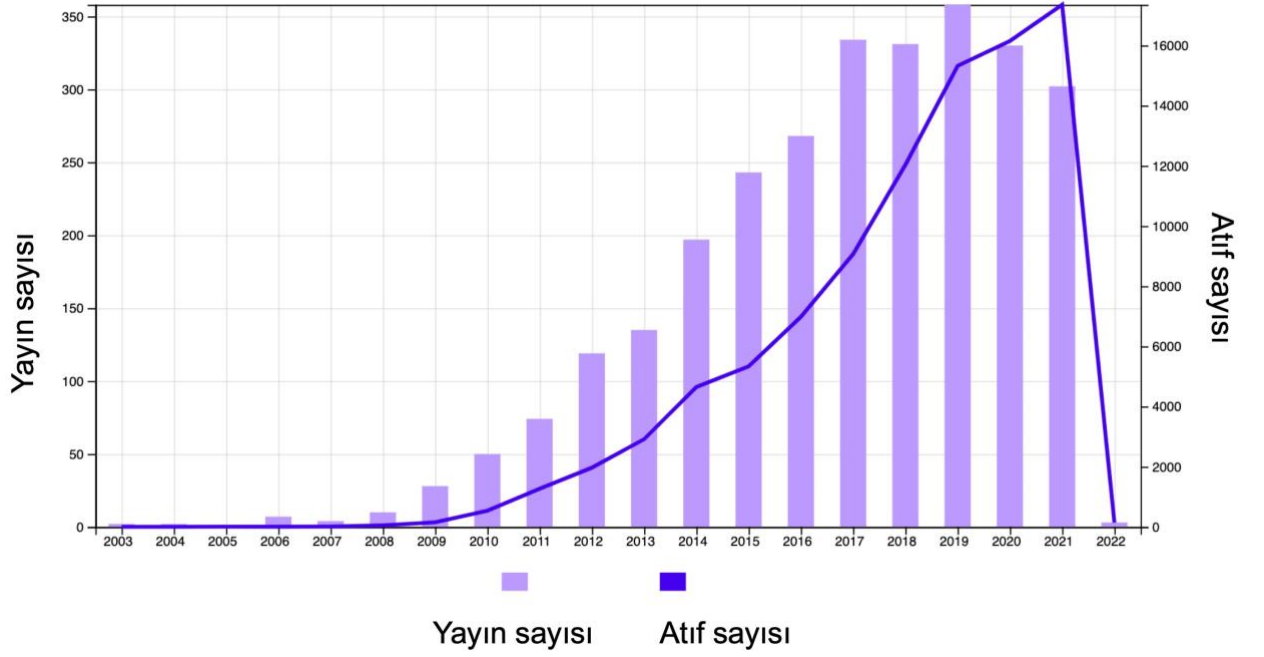
krossover (DX) ve üçlü krossover (TX). İzin alınarak kullanılmıştır [7, 8]. Telif hakkı © 1993 ve 2000 American Chemical Society.

6-kollu bağlantılar 3 boyutlu latis için yapıtaşı olarak kullanılmış ve böylelikle makromoleküller elde edilmiştir. Bu yapının sağlamlığını arttırmak amacıyla Seeman ve arkadaşları çifte krossover [7], üçlü krossover [8], paranemik krossover ve yanyana sıralanmış paranemik krossover geliştirmişlerdir (Şekil 2.3B) [9].

### **2.3. DNA Origami Nanoyapıların Oluşturulması**

Seeman'ın karo-bazlı yaklaşımı oldukça sağlamdır ve 20 yıl boyunca nanoyapıların oluşturulmasında yaygın olarak kullanılmıştır. Ancak bazı dezavantajları bulunmaktadır: zincirler için tam stokiyometriye ihtiyaç duymaktadır ve karoların küçük boyutundan dolayı sofistike yapıların oluşturulması zordur.

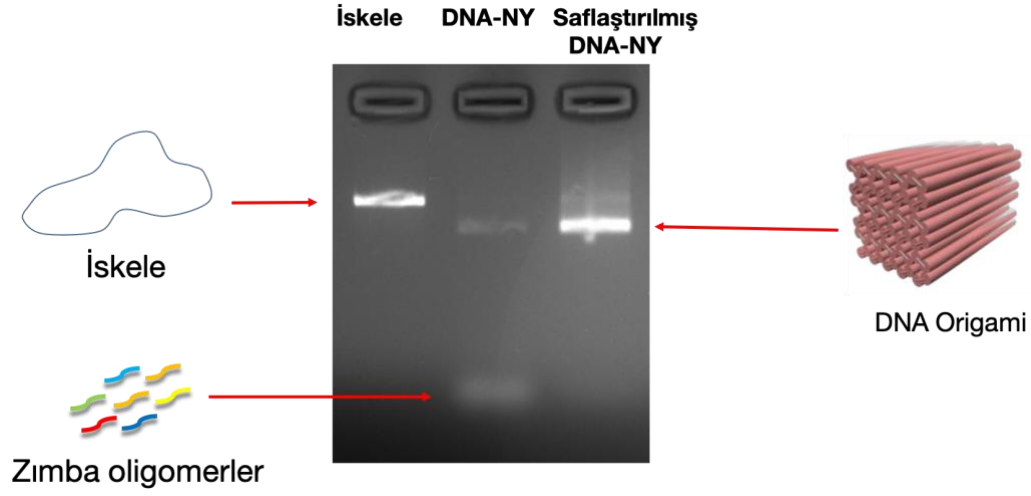
2006 yılında Rothemund uzun tek zincirli DNA'dan iki boyutlu şekiller oluşturmak için daha basit bir yöntem önermiştir [10]. Bu çalışmada 7 kilobaz uzunluğundaki M13mp18 dairesel genomik DNA iskele olarak kullanılarak 200'den fazla ayrı kısa "zımba" zincirler yardımıyla katlanmıştır. Termal tavlama ile iskele zımbalar ile özbirleşerek kare, üçgen, 5-noktalı yıldız ve gülen yüz elde edilmiştir.



**Şekil 2.4** Yıllara göre DNA Origami anahtar kelimeli yayın ve atıf sayıları (Kaynak: ISI Web of Science, Erişim tarihi: Aralık 2021)

Daha sonra DNA origami olarak adlandırılacak olan bu teknik 2 ve 3 boyutlu nanoyapıların olağanüstü karmaşıklıkta oluşturulmasını sağlamaktadır. Bu da daha fazla araştırma grubunun dikkatini çekerek bu alandaki yayın ve atıf sayısının 2003-2022 yılları arasında artmasını sağlamıştır (Şekil 2.4). Bu trendin de artarak devam edeceği tahmin edilmektedir.

Bu teknik uzun tek zincirli 'iskele' DNA'nın yüzlerce bütünleyici kısa 'zımba' zincir yardımı ile beraber termal tavlama ile katlanmasına dayanmaktadır [10-13]. DNA origami DNA nanoteknolojisinde bir dönüm noktası olmuştur ve karo-bazlı yaklaşıma kıyasla çok daha karmaşık ve büyük yapıların yapılabileceği gösterilmiştir. Bunun yanında M13mp18 iskele olarak yaygın olarak kullanılmaktadır ve kimyasal olarak sentezlenmediği için bu yaklaşımı çok daha ucuz hale getirmiştir. Ayrıca stokiometrik orana ihtiyaç duymamaktadır ve saflaştırma ile oldukça yüksek saflıkta yapılar elde edilebilmektedir (Şekil 2.5) [14]. Agaroz jel yardımı ile iskele, DNA-Nanoyapı (DNA-NY) ve saflaştırılmış DNA-NY yapılarındaki farklılıklardan ötürü jeldeki aldıkları mesafeler farklılık göstermekte ve bu şekilde karakterize edilebilmektedirler.



**Şekil 2.5** İskele, DNA-NY ve saflaştırılmış DNA-NY için agaroz jel elektroforez görüntüsü [15]

Tüm bu avantajları sayesinde DNA origami yönteminden sayısız uygulamada faydalanılmıştır; biyosensörler [16, 17], gelişmiş ilaç taşınımı [18], sentetik iyon kanalları [19], moleküler boyuttaki elektronik devreler [20] ve plazmonik nano yapılar [21] örnek verilebilir. Bunlardan yaygın olarak kullanılanlardan birisi de DNA nano yapılarının biyobozunurluluk ve biyouyumluluk gibi üstün özelliklerinden faydalanılarak akıllı ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesidir.

#### 2.4. Akıllı İlaç Taşıyıcılar Olarak DNA Nano yapılar

Hem kimyasal hem de biyomoleküler ilaçlar (iRNA, antibody vs.) sağlık alanında ilaç verimliliğini artırma konusunda engeller bulundurmaktadır. Kimyasal ilaçlar düşük çözünürlük ve istenmeyen etkiler gösterirken, biyomoleküler ilaçlar ise enzimatik degradasyona yatkındırlar ve hücre membranından girişleri zordur.

Şimdiye kadar molekülleri taşımak amacıyla sayısız akıllı ilaç taşıyıcı geliştirilmiştir [22, 23]; nanopartiküller [24], virüsler [25, 26], polimerler [27], kırmızı kan hücrelerini taklit eden biyomimetik sistemler [28], lipozomlar gibi sentetik organik sistemler [29] [30], katyonik dentrik polimerler [31], altın nanopartiküller gibi sentetik inorganik sistemler [32] ve karbon nanomalzemeler

[33]. Bu doğal biyoesinlenilmiş ve sentetik platformlar; ilaç moleküllerinin fizyokimyasal sınırlarının aşılması ve ilaç yükleme verimliliğini artırma, vücut içinde dolanım süresini artırma ve bazılarının da klinik tedavide kullanılması için Food and Drug Administration (FDA) tarafından onay almıştır. Ancak tüm bu avantajlarına rağmen halihazırdaki ilaç taşıyıcılarının birçok kısıtlaması bulunmaktadır. Örneğin virüsler sadece kısa DNA'ları hücre içerisine ulaştırabilmekte, mutasyona ve sitopatik etkilere neden olma ihtimali bulunmaktadır [34]. Dentrik polimerler katyonik yüzey yüklerinden kaynaklı olarak sitotoksiktirler [35] ve heterojen boyut dağılımları ilaç yükleme kapasitesini düşürmekte ve immün toksisitesini arttırmaktadır [36]. İnorganik nanomalzemeler ise toksik elementler içermekte [37] ve bozulmaları zordur [38].

DNA origamiler ise boyutları itibariyle (10-100nm) nanotıp uygulamaları için oldukça uygundurlar. Yapılan çalışmalar DNA origamilerin toksik olmadığını, mükemmel biyouyumluluğa sahip olduğunu, biyobozunur olduğunu, immün cevabı tetiklemediğini, transfeksiyon ajanlarına ihtiyaç duymadan hücrelere girebildiğini ve 12 saate kadar in vivo kararlılığı olduğunu göstermiştir [39-45]. Bunun dışında dikkat edilmesi gereken birkaç konu vardır bunlar: sadece kaynama noktasının altında kararlıdırlar (yapıya bağlı olmak koşuluyla genellikle 50 °C), kararlılıkları için iyonik şiddete ihtiyaç duyarlar ve nükleazların degradasyonuna karşı bir noktaya kadar dayanıklıdırlar [46, 47].

Mg<sup>2+</sup> iyonunun mM mertebesinde ihtiyaç duyması DNA origami nanoyapıların uygulamalarını kısıtlayan bir konu olmuştur. Çünkü bu iyonlar DNA nanoyapıların birbirlerini elektrostatik itmelerinin önüne geçerek kararlılıklarını korumak için önemlidir. Ancak DNA origami nanoyapılarının kararlılıkları üzerine yapılan son çalışmalarda genel bir gereklilik olmadığı ve yapıya bağlı olduğu gösterilmiştir. Yüksek Mg<sup>2+</sup> ortamında oluşturulan DNA origamilerin tamamen spin-filtering ile µM gibi düşük seviyede Mg<sup>2+</sup> 'un yapısal bütünlüklerini korudukları görülmüştür [47]. Ancak bu koşullar tampon kompozisyonuna bağlıdır. Özellikle EDTA fosfat gruplarına bağlanan Mg<sup>2+</sup> iyonlarını kendine çekerek DNA origamilerinin denature olmasına neden olmuştur. Ayrıca DNA origaminin yapısına da bağlıdır, örneğin 6-heliks yapısı tüm tamponlarda kararlılık gösterirken, 24-heliks demeti



sadece 10mM Tris'te kararlı kalmıştır. Sonuç olarak DNA origamilerin kararlılığı yapıda kullanılan latis çeşidine, kompaktlığına, yük yoğunluğuna ve yapısal esneklik gibi birçok parametreye bağlıdır ve tahmin etmesi genel olarak güçtür.

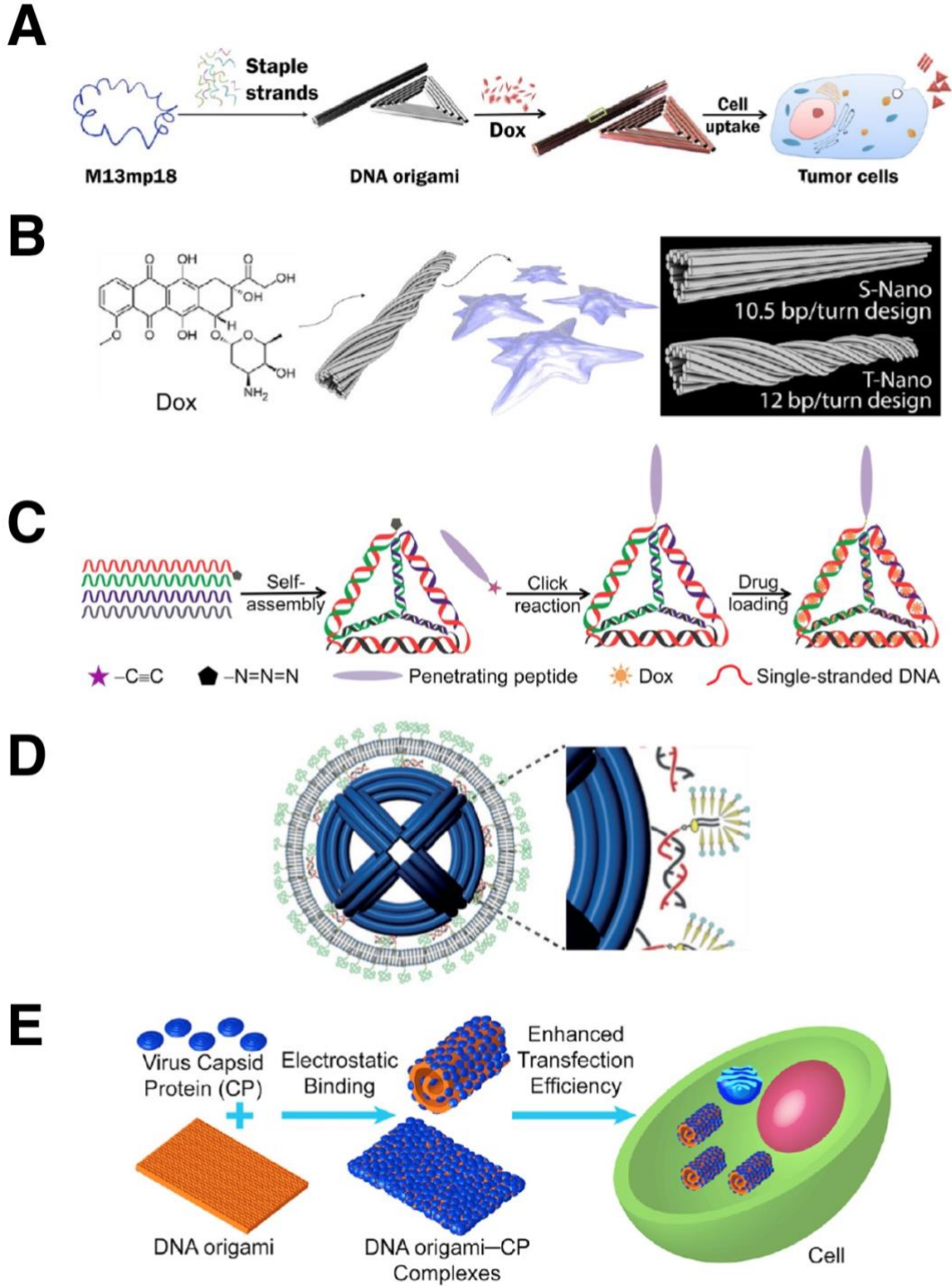
Castro ve ark. 18-,24- ve 32-heliks demeti için DNase I, T7 endonuclease I, T7 exonuclease, Escherichia coli exonuclease I, lambda exonuclease ve Msel restriksiyon endonükleazını çalışmışlardır [48]. Ve bu nükleazlardan sadece DNase I ve T7 endonükleaz l'in degradesyona uğratabildiğini diğerlerinin ise etki etmediğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışma DNA nanoyapıların kan ve plazmada en çok bulunan nükleaz enzimi DNase l'e karşı dirençli olduğunu göstermesi açısından önemlidir. Ayrıca DNA origamilerin çift zincirli DNA'ya kıyasla degradesyona daha dayanıklı olduğu ve yapı sıkıca paketlenmiş ve kompakt olunca degradesyon hızının azaldığı gösterilmiştir [48, 49].

Şimdiye kadar birçok molekülü taşımak için DNA nanoyapıların kullanıldığı akıllı ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir bunlara örnek olarak floresan boyalar [50], antikanser ilaçları [51, 52], metillenmemiş CpG (sitozin-fosfat-guanin) oligonükleotitleri [41], siRNA [53], enzimler [54] verilebilir.

Zhang ve ark. düz çubuk ve üç DNA origami ile doksorubisinin tümör hücrelerine taşınmasını gerçekleştirmişlerdir (Şekil **2.6A**). İkili yapısı sayesinde yüksek ilaç yükleme kapasitesine ulaşılmış ve bu kompleks doksorubisine dirençli kanser hücreleri de dahil olmak üzere normal insan meme adenokarsinoma kanser hücrelerine (MCF-7) karşı sitotoksitate göstermiştir. Jiang ve ark. sonrasında origami-Dox kompleksini fare tümör modelinde çalışmışlar ve hiç sistematik toksisite olmadan antitümör etkinliği göstermiştir [51].

Zhao ve ark. değişen derecede bükümlü nanoyapılar geliştirerek doksorubisini insan meme kanseri hücrelerine ulaştırmışlardır (Şekil **2.6B**) [52]. Tasarımı değiştirerek kapsülleme verimliliği ve ilacın salım oranını ayarlamışlar böylelikle sitotoksitate arttırılmış ve doksorubisinin hücre içi eliminasyon oranı düşürülmüştür.

Bu yapılar doğaları gereği biyouyumludurlar ve hücelere girmek için transfeksiyon ajanlarına ihtiyaç duymazlar, hücesel alım verimliliği ve kararlılıkları bazı koruma teknikleriyle ciddi ölçüde geliştirilebilmektedir [15, 55, 56]. Protein nueoripilin-1 (NRP) gliyoblastom hücelerinde ve anjiyojenik kan damarlarının endotel hücelerinde aşırı üretilmektedir [57-59]. Özel kısa tümöre nüfuz eden peptitler (TPP) NRP'nin ligandlarıdır. Xia ve ark. DNA tetrahedronların (TDN) bu peptitler ile fonksiyonelleştirilerek hücesel alımının normal TDN'ye ve çift zincirli DNA'ya kıyasla ciddi anlamda geliştirilebildiğini göstermişlerdir (Şekil **2.6C**) [60]. Perrault ve ark. ise polietilen glikol (PEG)'lenmiş lipid tabakası kullanarak immün aktivasyonunu 100 kat düşürmüş ve farmokokinetik biyoyararlanımlarını 17 kat arttırmışlardır (Şekil **2.6D**) [61]. Mikkila ve ark. ise DNA origamiye virüs kapsit proteinlerini elektrostatik olarak bağlamışlar ve normal DNA origamilere kıyasla HEK293 hücelerine taşınımı 10 kat arttırmışlardır (Şekil **2.6E**) [62].



**Şekil 2.6** Akıllı ilaç taşıyıcı olarak geliştirilen DNA nanoyapılar **A)** Doksorubisin yüklü tübüler ve üçgen DNA origami. [51] nolu referenstan izin alınarak uyarlanmıştır. Telif hakkı © 2012 American Chemical Society. **B)** Düz ve burkulmuş doksorubisin yüklü DNA origami. [52] nolu referanstan izin alınarak uyarlanmıştır. Telif hakkı © 2012 American Chemical Society. **C)** DNA tetrahedronların tümöre nüfuz eden peptitler ile özbirleşmesi. [60] nolu

referanstan izin alınarak uyarlanmıştır. Telif hakkı © 2016 American Chemical Society **D)** Çift tabakalı lipid ile kaplanmış DNA origami. [61] nolu referanstan izin alınarak uyarlanmıştır. Telif hakkı © 2014 American Chemical Society. **E)** Virüs ile kapsüllenmiş DNA origami. [62] nolu referanstan izin alınarak kullanılmıştır. Telif hakkı © 2014 American Chemical Society.

DNA origamilerin hücre alımı ve kararlılıklarını arttırmaya yönelik korumacı yöntemler aşağıda listelenmiştir.

**Çizelge 2.1** DNA origami kararlılığını arttırmaya yönelik koruma yöntemleri. Artan tuz ve nükleaz kararlılığı (---,-,+,+++). 1: 3 Boyutlu yoğun; 2: 3 Boyutlu aralıklı, 3: 2 Boyutlu, 4: tel kafes, 5: Karo temelli. B.D. : Belirli Değil. [56] nolu referanstan izin alınarak uyarlanmıştır. Telif hakkı © 2019, Royal Society of Chemistry.

Yöntem	Tuz kararlılığı	Nükleaz kararlılığı	Origami yapıları	Ulaşılabilirliği	Toksik olmayışı	Fonksiyonelliğin korunması	Ref.
<b>Katyon kaplamaları</b>							
Kitosan ve lineer PEI	+++	+	1,4	Ticari	B.D.	Evet	[49]
K <sub>10</sub> -PEG <sub>5k</sub>	+++	+++	1,2,4	Ticari	+++	Evet	[63]
PEG <sub>12k</sub> Lys <sub>18</sub>	+++	+++	1,2,3,4	Kurum içi	B.D.	Evet	[64]
Spermidine	+	+++	5	Ticari	+++	B.D.	[65]
<b>Protein kaplama</b>							
CCMV kapsit protein	B.D.	B.D.	3	Kurum içi	+	B.D.	[62]
BSA dendrimer konjüatları	B.D.	+	1	Kurum içi	B.D.	B.D.	[66]

Sso7 DNA'ya bağlanan protein	B.D.	+	3	Kurum içi	B.D.	B.D.	[67]	
C12 dendron üzerinde HSA bağlama	B.D.	+++	5	Kurum içi	B.D.	Evet	[68]	
<b>Çapraz-bağlanma</b>								
T-T çapraz-bağlama	UV	+++	+	1	Ticari	B.D.	B.D.	[69]
Çentiklerin T4 DNA bağlanması		+	B.D.	5	Ticari	B.D.	B.D.	[70]
8-MOP çapraz-bağlama	foto	B.D.	B.D.	3	Ticari	B.D.	B.D.	[71]
CuAAC birbirine kenetlenmiş halka		+++	-	5	Ticari	B.D.	B.D.	[72]
Tiyol-disülfid birleşmesi		B.D.	B.D.	5	Ticari	B.D.	B.D.	[73]
<b>Yapı kapsüllemesi</b>								
Çift katmanlı membran	lipit	B.D.	+++	4	Kurum içi	B.D.	B.D.	[61]
<b>Omurga modifikasyonu ve doğal olmayan bazlar</b>								
5-Me-isoC/isoG A/2-thioT		B.D.	-	5	Kurum içi	B.D.	B.D.	[74]
Zincir ucuna HEG ve C6		B.D.	+	5	Kurum içi	B.D.	Evet	[75]

---

HEG/C <sub>12</sub> dentronları	B.D.	+++	5	Kurum içi	B.D.	Evet	[76]
------------------------------------	------	-----	---	--------------	------	------	------

---

Koruyucu kaplamalar origamilerin kararlılıklarını arttırmaya yönelik temel yöntemlerden olmuştur. Bu amaçla negatif yüklü fosfat ana zinciri ile elektrostatik olarak etkileşecek dendrimer, polimer, şeker ve protein gibi katyonik moleküller tercih edilmiştir. Bu yaklaşım iki ana grupta toplanabilir : lineer katyonik polimerler ve proteinlerin doğal ve sentetik olarak eklendiği katyonik arayüzler (Çizelge 2.1). Ahmadi ve ark. yaygın olarak kullanılan biyouyumlu polimer lineer polietilenimin (PEI) ve doğal katyonik polisakkarit kitosanı düşük maliyetli bir kaplama malzemesi olarak kullanmışlardır [49]. Oligolisin-PEG bazlı polimer kaplamalar da koruyucu olarak kullanılmıştır. Bu yapıda L-lizin pozitif yük sağlarken PEG nükleaz ataklarına karşı koruma sağlamaktadır. PEG<sub>12k</sub>-Kys<sub>18</sub> ile kaplı DNA nanoyapılar DNase bulunduran hücre ortamında 16 saate kadar dayanırken, K<sub>10</sub>-PEG<sub>5k</sub> ile kaplanarak yapıların kararlılığı 1000 kata kadar arttırılmıştır [63, 64].

Mikkila ve ark. b6r6lce klorotik benekli vir6s kapsit proteinlerini DNA origami nanoyapısına elektrostatik olarak bağlayarak h6cresel transfeksiyonunu 13 kat arttırmışlardır [62]. Auvinen ve ark. sığır serum alb6min (BSA) proteinini kovalent olarak dendrona bağlamış ve bu yapıyla da DNA origamiyi kaplamış, nükleaz kararlılığı DNase l'e karşı tam direnç sağlamıştır, kaplanmamış olanlar ise %75 oranında degradasyona uğramıştır [66]. Qian ve ark. ise spermidin korumasını kullanarak DNA-origamilerin dayanıklılığını 12 saate kadar arttırmış ve h6cresel alımını iki katına çıkarmıştır [65]. *Sulfolobus solfataricus*'un DNA bağlayıcı doğal proteini Sso7d'i kullanarak 2 boyutlu DNA dikd6rtgenini kaplanmış ve DNase l'e karşı orta seviyede kararlılık sağlamıştır [67]. Hidrofobik 4 kollu dodekan DNA modifikasyonu ile HSA proteinine bağlanmış ve bağlanma sonucu yarı-6mr6nde 22 saate varan artış sağlanmıştir [68].

DNA nanoyapıların kararlılıklarını arttırmaya yönelik yöntemlerden bir diğeri ise bu yapıların b6nyesinde bulunan zimba zincirleri çapraz bağlayarak kovalent bağlar oluşturmaadır. Dietz ve ark. 310 nm UV ışığı kullanarak T-T k6pr6leri oluşturmuş ve bu yapıların 90 6C'ye kadar dayanabildiklerini g6stermiştir [69]. Bir

diğer çalışmada T4 DNA ligaz enzimi kullanarak DNA zincirindeki 5' fosfat ile diğer zincirdeki 3' hidrosil arasında kovalent fosfodiester bağ oluşumu gerçekleştirilmiş, 74 °C'ye kadar dayanabildiği ve saf suda bir aya kadar kararlı kalabildiği gösterilmiştir [70]. Çarpaz bağlanmanın kullanıldığı ilk çalışma ise birçok sebze doğal olarak bulunan foto çarpaz bağlayıcı 8-metoksi-psoralen (8-MOP)'in kullanılması ile gerçekleşmiştir. Buz içerisinde 8-MOP ve origami karşımının bir saatlik irradyasyonu sonucu 90 °C'ye bir saat dayanabilen çarpaz bağlı yapıların oluşturulduğu gösterilmiştir [71].

Yine tek zincirli karo metodu kullanılarak 24-oligonükleotit 6-helis tüp yapısı oluşturulmuş ve her bir oligo 3' ucundan alkin, 5' ucundan ise azit ile fonksiyonelleştirilmiş ve bu uçlar birbirlerine click reaksiyonu ile kenetlendirilerek DNA katenanları oluşturulmuştur ve bu yapıların saf suda 95 °C'ye kadar kararlılık sergilediği gösterilmiştir [72]. Bir diğer çalışmada DNA oligoların dinamik çarpaz bağlayıcı disülfid uçlu oligonükleotitler ile stabilizasyonu sağlanmıştır. Bu çarpaz bağlı yapıların 60 °C'ye kadar jel elektroforez ortamında kararlı oldukları gösterilmiştir [73].

Bir diğer yöntem ise virüs lipid bilayer membran enkapsülasyonu ile koruma sağlama üzerinedir [61]. Her ne kadar zaman isteyen bir hazırlama istese de origami popülasyonunun yüksek bir yüzdesi enkapsüle edilebilmekte ve DNase l'e karşı 37 °C'de 24 saate kadar etkin aktivite göstermektedir.

5-Me-isoC/isoG ile A/2-thioT'un 6 kollu bağlantılı DNA yapısında baz çiftleşmesi T7 ekzonükleaza karşı iki kata kadar fazla direnç sağlayarak 12 saate kadar direnç göstermiştir [74]. Bir diğer modifikasyon yöntemi ise zincir uçlarında gerçekleştirilmiştir. Hekzaetilen glikol zinciri (HEG), oligoların 5' ve 3' uçlarına eklenerek serum kararlılığı benzer karo yapılara kıyasla 3 kat arttırılmıştır [75]. Ardından benzer bir strateji ile HEG 4 kollu dentritik konformasyon oluşturulmuş ve 8 saate varan serum yarılanma ömrüne ulaşılmıştır [76].

DNA nanoyapıların kararlılığı ve özgünlüğünün arttırılmasına yönelik ayrıca organik ve inorganik nanopartiküller de kullanılmaktadır. Bunlar Çizelge 2.2'de

listelenmiştir. Zhang ve ark. kendiliğinden oluşma şeklinde kolesterol-DNA küresel miseller ve tek boyutlu nanoçubuklar oluşturmuşlardır [77]. Willem de Vries ve ark. ise optalmik ilaç taşımada kullanılmak üzere lipid modifiye DNA nanopartiküllerinden uniform miseller geliştirmişlerdir böylelikle kullanılan ilaç miktarının azaltılması ve etkinliğinin artırılması hedeflenmiştir [78]. Choi ve ark. ise hedeflendirilmiş kanser tedavisinde kullanılmak üzere lipozom benzeri nanopartiküller geliştirerek doksorubisin taşınmasında kullanmışlardır [79].

**Çizelge 2.2** Organik ve inorganik nanopartiküller kullanılarak hazırlanan hibrit nükleik asit nano yapıları ve uygulamaları [80] nolu referanstan izin alınarak kullanılmıştır. Telif hakkı © 2020 Sybil Obuobi ve Natasa Skalko-Basnet.

Grup	Fonksiyonel	Hibrit nano yapı	Biyolojik uygulama testi	Referans	
Organik	Hidrofobik	miseller ve nanoçubuklar	Mevcut değil	[77]	
		miseller	kornea enfeksiyonu	[78]	
		lipozom benzeri nanoparçacıklar	hedeflendirilmiş kanser tedavisi	[79]	
		tetrahedron & origami	kanser tedavisi	[81]	
	Protein/peptitler	nanojeller	kanser tedavisi	[82]	
		hidrojel	antidot (alkol giderme)	[83]	
		hidrojel	protein taşınması	[84]	
		tetrahedral kafes	mevcut değil	[85]	
		Altın	origami	mevcut değil	[86]



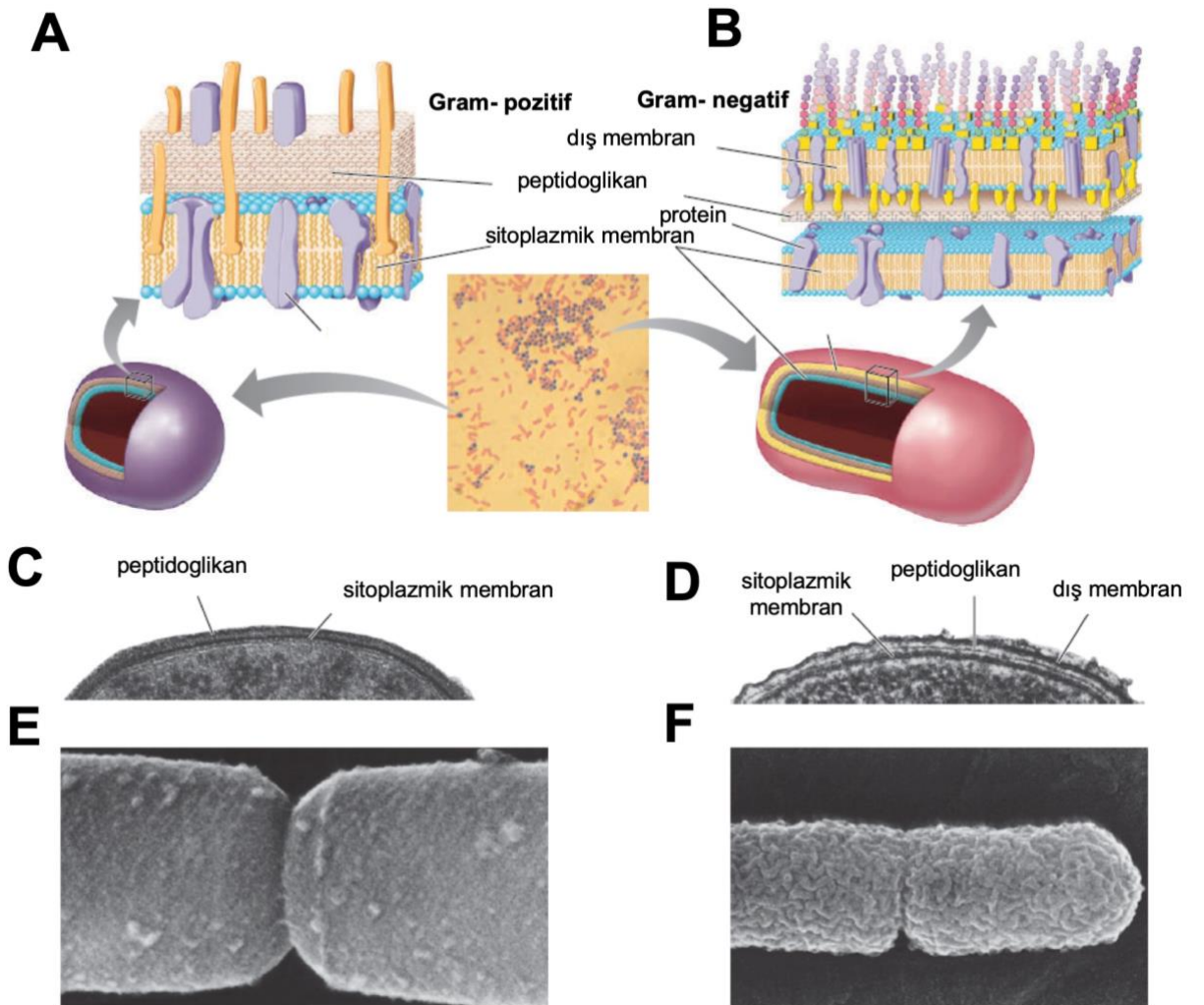
İnorganik		dendrimer	mevcut değil	[87]
		tetrahedronlar	enzim / hücre taşınması & biyogörüntüleme	[88]
		nanogünebakan	gen tedavisi	[89]
		origami	mevcut değil	[90]
		origami	mevcut değil	[91]
	Gümüş	origami	mevcut değil	[92]
		nanoparçacıklar	kanser ve antibakteriyel tedavi	[93]
	Kuantum noktası	origami	mevcut değil	[94]
		hidrojel	kanser tedavisi	[95]

Mevcut değil, biyolojik aktivitesinin test edilmediği anlamına gelmektedir.

## 2.5. Bakteriler

Bakteriler görece basit yapılı, prokaryot organizmalardır ve çekirdek zarı, mitokondri, golgi cisimciği ve endoplazmik retikulumu sahip değildirler. Boyut (1 ile 20 µm aralığında), şekil (küre, çubuk ve spiral) ve uzaysal aranjman (tek hücre, zincir, küme) kullanılarak ilk sınıflandırması yapılır, fenotip ve genotip özellikleri kullanılarak ise tam sınırlandırması gerçekleştirilir. İnsan vücudunda binlerce farklı bakteri türü yaşar kimisi geçici olarak, kimisi ise parazit ilişki içerisinde kalıcı olarak bulunurlar. Ayrıca çevremizde soluduğumuz havadan, içtiğimiz suya ve aldığımız gıdaların birçoğu bakteriler ile iskân edilmiştir. Bunların bir kısmı zararsız iken bir kısmı ise yaşamı tehdit eden hastalıklara neden olabilmektedir. Bu hastalıklar toksinler gibi bakteriyel ürünlerden ya da bakterinin akın ettiği normal steril vücut doku ve sıvılarından kaynaklanabilmektedir [96]. Bakteriler arasında 30 ana filogenetik köken (fila) tanımlanmıştır. Bakteri yetiştiriciliğinde kullanılan bakterilerin %90'ı şu dört temel filaya aittir : *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* ve *Bacteroidetes* [97]. Bakteriyel filadaki birçok tür özgün fenotipik

özelliklerine göre sınıflandırılrsa da birçok bakteriyel fila çok çeşitli türler içerebilmekte ve büyük bir fizyolojik çeşitlilik göstermektedir. Prokaryot hücrelerin sitoplazması yüksek konsantrasyonda çözünmüş madde içerir ve bu da ozmotik basınca neden olur. Bu basıncı kontrol altında tutmak ve patlamasını -hücre lizisini- engellemek için bakteri hücre duvarına sahiptir ve iki temel formdan birinde bulunur: Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı kalın peptidoglikan katmanlıdır, Gram-negatif hücrelerin duvarı ise üzerini örten dış bir membran ile beraber ince peptidoglikan katmandan oluşur (Şekil 2.7).



**Şekil 2.7** Bakterilerin hücre duvarları A), B) Gram pozitif ve Gram negatif hücre duvarlarının şematik gösterimi, C) gram boyama ile *Staphylococcus aureus*'un hücre duvarı yapısı (gram pozitif, mor renkli kalın peptidoglikan tabakaya sahiptir), D) *Escherichia coli*'nin gram boyama ile hücre duvarı çok ince

peptidoglikan, lipopolisakkarit ve lipoprotein bulunur, gram boyama ile son boyanın rengini alır; gram negatif pembe E) sırasıyla Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin hücre duvarlarının geçirimli elektron mikroskobu görüntüleri, F) Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri, her bir hücre 1 µm genişliğindedir [97].

Peptidoglikan, bakteri hücre duvarında bulunan rijit bir polisakkarittir ve hücreye yapısal gücünü verir. Yapısı iki modifiye glikoz kalıntısı *N-asetilglukozamin* ve *N-asetilmuramik asitin* yanında diaminopimelik asit (DAP), L-alanin, D-alanin, D-glutamik asit, ve L-lizin'in değişen tekrarlarla birleşmesinden oluşur. Böylece uzun peptidoglikan zincirinin yapıtaşı olan glikan tetrapeptiti meydana getirirler. Penisilin ve cephalosporin gibi bazı antibiyotikler hücre duvarı sentezini hedefleyerek hücreyi ozmotik lizise karşı hassas hale getirir. İnsan hücresinde hücre duvarı bulunmadığı için ise antibiyotiklerin hedefi olmamaktadır ve bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

Bu çalışmada her ikisi de firmicute bakteri şubesine ait Gram-pozitif bakteriler metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* (VRE)'e karşı kullanılmak üzere antimikrobiklerin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

### **2.5.1. Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

*Staphylococcus aureus* Gram-pozitif, kok formunda, fakültatif aerobik ve kümeler şeklinde büyüyen, hem hayvanlar hem de insanlar için oportunist bir patojendir. En önemli enfeksiyonları gıda zehirlenmeleri, cilt, yumuşak doku ve solunum sistemi enfeksiyonlarıdır [98]. *Staphylococcus aureus* Infectious Diseases Society of America (IDSA) tarafından ABD hastanelerindeki enfeksiyonların büyük bir kısmından sorumlu tutulan ve antibakteriyel ilaçların yetersiz kaldığı ESKAPE (*E. faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter spp.*) arasında yer almaktadır [99]. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ise antibiyotik

direncinin artık son formuna ulaştığı ve işlevini yitirdiği bir örnektir. Metisilin bir  $\beta$ -laktam antibiyotığıdır ve diğer penisilinler gibi penisilin-bağlayıcı proteinleri hedef alır. Ancak, diğer penisilin türevlerinin aksine metisilin,  $\beta$ -laktamaz yarılmamasına karşı dirençlidir. *S. aureus*'un birçok suşu metisilin tarafından yok edilebilirse de, MRSA suşu alternatif bir penisilin bağlayıcı protein olan MecA üretir bu metisilin ve diğer  $\beta$ -laktamlar tarafından tanınmamaktadır ve hemen hemen bütün  $\beta$ -laktam sınıfı antibiyotiklere karşı direnç kazanmıştır [97] [100].

ABD hastanelerindeki hastaların yaklaşık %5'i burunlarında ve cildinde MRSA taşımaktadır [101]. 2018 yılında Nilay Çöplü ve arkadaşlarının elli beş hastaneden temin edilmiş kan ve beyin omurilik sıvılarından izole ederek yaptıkları çalışmada, *Staphylococcus aureus*'un metisiline direnci ülkemizde %31.5 olarak bulunmuştur [102]. Bu veri CLSI standartları tarafından önerilen birinci basamak ilaçlar beta-laktam antimikrobiklerini kullanmayı imkansızlaştırmıştır [103]. Bu enstitü öncelikle birincil antimikrobiyal ilaçların kullanımını önermekte ve ikincil ilaçların kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu direnç yüzdesinin yakın coğrafyadaki ülkelere kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Dünya Sağlık Örgütü tarafından antimikrobiyal direncin 2050 yılına kadar dünyada yıllık ek 1.2 trilyon dolarlık bir gider oluşturacağı öngörülmektedir. Tüm bunlar mikroorganizmalara karşı mücadelede alternatif çözümlerin üretilmesinin gerekliliğine işaret etmektedir.

### **2.5.2. Vankomisine Dirençli *Enterococcus faecalis* (VRE)**

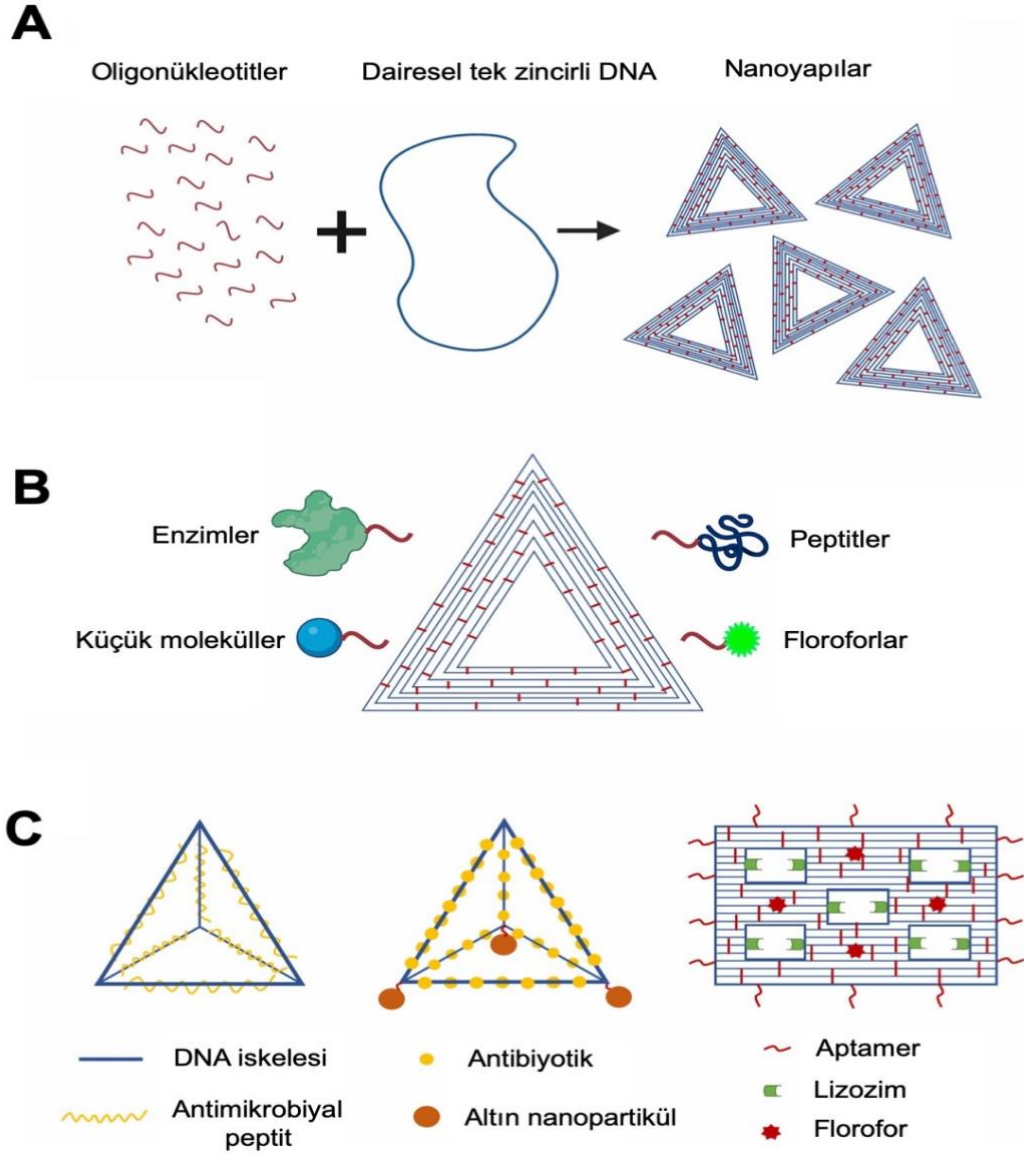
Enterokoklar Gram-pozitif, fakültatif, anaerobik bakterilerdir, insan ve hayvanların bağırsak yolundaki doğal floranın bir parçası olarak yaşarlar. Enterokoklar arasında şimdiye kadar insanda enfeksiyona neden olan en önemli türleri *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* olmuştur. Oportunist patojenlerdir ve nozokomiyal enfeksiyonların başlıca nedenleri arasında sayılmaktadırlar. Son birkaç on yıldır çoklu antibiyotik direnci, idrar yolu ve cerrahi yara enfeksiyonlarında başı çekmektedirler [104]. Vankomisin, penisilin direnci kazanmış enterokoklar ve diğer Gram-pozitif bakterilere karşı önemli bir terapötik alternatiftir [105]. Ancak son 20 yıldır vankomisine direncin gelişmesi yüksek

ölüm oranlarından dolayı alarm vermektedir. 2018 yılında yapılan bir çalışmada ülkemizdeki *Enterococcus faecalis*'in vankomisin direncinin %1'in altında olduğu belirlenmiştir [102]. Bir başka çalışmada ise birçok Avrupa ülkesinden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir [106]. Amfisilin, gentamisin, teikoplanin ve streptomisin gibi antibiyotiklerin de yer aldığı bir çalışmada vankomisin haricindekilerin yüzde dirençlerinin NAMRSS'den biraz daha yüksek olduğu belirlenmiştir [107]. Bu veriler ele alındığında antimikrobiyal direnç ile mücadelede yeni önlemlerin alınması oldukça önemlidir.

## 2.6. Antimikrobiyal taşıyıcı olarak DNA nanoyapılar

DNA nanoyapılarının ilaç taşıyıcı olarak kullanılması şimdiye kadar büyük oranda ökaryotik kanser hücrelerini hedef alarak onları yok etmek üzerine ve kanser tedavisi başlığı altında yoğunlaşmıştır [18, 108-110]. Fakat antimikrobiyal taşıyıcı olarak kullanılması da gelişen bir kategori olmaktadır. Yüzlerce farklı oligonükleotit ile bu nanoyapılar bir arada tutulabilmekte (Şekil 2.8A) ve fonksiyonelleştirilerek enzim, küçük moleküller, peptitler ve floroforlar gibi çok çeşitli aktif molekülleri taşıyabilmektedirler (Şekil 2.8B). DNA nanoyapılarının antimikrobiyal taşıyıcı olarak kullanılma potansiyelini gösteren birkaç çalışma olmuştur. 2014 yılında Setyawati ve arkadaşları tetrahedral DNA nanoyapıları altın nanosalkımları deteksiyon işareti olarak ve aktinomisinini ise *E. coli* and *S. aureus*'e karşı aktif antimikrobiyal olarak kullanmıştır (Şekil 2.8C) [111]. Antibiyotik yüklü nanoyapılar ile muamele edilen bakteri popülasyonu %65 düşerken, serbest antibiyotik ile %42 düşmüştür. Benzer bir şekilde aktinomisin yüklü nanoyapılar kullanıldığında *E. coli* hücrelerine karşı serbest antibiyotik hücrelerin %14'ünü öldürürken, nanopartikül üzerine yüklendiğinde ise %48'ini öldürmüştür. Aktivitedeki bu artış bakteride bulunan Deoksiribonükleaz (DNAaz)'ların DNA'yı parçalayarak bağlı ilaçların DNA araçlarından lokalize salımına dayandırılmıştır. Ayrıca ilaç taşınımında nanopartikül için 25 nm çapında yüksek hücre alımının gerçekleştiği ve bu yüzden de ~0.12 nm boyutundaki serbest antibiyotiğe kıyasla etkinliğinin daha yüksek olduğu önerilmiştir. Daha yakın zamanda ise, tetrahedral DNA nanoyapıları kullanılarak antimikrobiyal peptit GL13K ulaştırılmıştır, nanoyapılar peptitlerin bakteriler tarafından alımını arttırmış ve extraselüler ortamda proteazlara karşı koruyarak peptitlerin stabiliteğini arttırmışlardır [112].

DNA origami ayrıca yakın zamanda antimikrobiyal enzim olan lizozim taşınması için kullanılmıştır. Bu çalışmada, Mela ve ark. lizozim yüklü DNA origamiyi *E. Coli* ve *Bacillus subtilis*'e karşı kullanmışlar ve serbest lizozime kıyasla daha etkili olduğunu göstermişlerdir [113].



**Şekil 2.8** Antimikrobiyal taşıyıcı araçlar olarak DNA nanoyapılar **A)** Yüzlerce oligonükleotit uzun, dairesel tek zincirli DNA'nın önceden tasarlanmış bölgelerine bağlanarak katlanmasını ve bir nanoyapı oluşmasını sağlamaktadır. **B)** Her bir oligonükleotit fonksiyonelleştirilerek enzim, küçük moleküller, peptitler ve floroforlar gibi aktif moleküller taşıyabilmektedirler. **C)** Günümüze kadar antimikrobiyal taşıyıcı olarak kullanılmış olan DNA nanoyapıları. Antimikrobiyal

peptitler (solda) ya da aktinomisin antibiyotiği ve altın nanopartikülleri (ortada) ile birleştirilmiş DNA piramitleri, antimikrobiyal enzim olan lizozim ve aptamer ile donatılmış beş kuyulu nanoyapı (sağda) [114].

Gün geçtikçe daha fazla çalışma grubu DNA nanoyapıları antimikrobiyal taşıyıcı olarak kullanma konusunda çalışmalar sürdürmektedir ve potansiyelini gözler önüne sermektedir. Burada dikkat edilmesi gereken memeli hücrelerinin aksine bakteriler tarafından endositoz ile alınmazlar bu yüzden bakterileri hedefleyen DNA nanoyapıların yüzeye erişimi elzemdir ve de Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı lipid membran ile korunduğu için Gram-pozitiflere kıyasla antimikrobiyaller daha az etkili olmaktadır [113] [115].

## **2.7. Antimikrobiyaller**

Antimikrobiyaller, mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyonlara karşı ilkin kullanılan ilaçlardır. Antibiyotikler ise bakteriler ve mantarlar gibi belirli mikroorganizmalar tarafından doğal olarak üretilen ve bakterilerin çoğalmasını inhibe eden (bakteriyostatik) veya onları öldüren (bakterisidal) antimikrobiyal ajanlardır. Bu doğal antibiyotiklere ek olarak, birçok ilaç sentetik olarak da üretilmektedir. Patojenleri yok ederken konak hücreyi etkilememesi önemli bir kriterdir, binlerce antibiyotik bilinmesine rağmen, %1'inden daha azı klinik olarak kullanılmaktadır.

Her bir mikrobun antimikrobiyallere karşı olan duyarlılığı büyük farklılıklar göstermektedir. Örneğin, Gram-pozitif bakteriler doğal penisiline duyarlıyken, Gram-negatif bakteriler genel olarak dirençlidir böylelikle doğal penisilin görece dar bir spektruma sahiptir. Buna karşın tetrasiklin gibi antibiyotikler daha geniş bir spektruma sahiptir ve genel olarak her iki gruba karşı da etkindirler. Geniş spektrumlu antibiyotikler daha geniş bir medikal kullanım sunsa da bazı patojenlere karşı dar spektrumlu antibiyotikler oldukça etkili olabilmektedirler. Örnek olarak vankomisin, dar spektrumlu bir antibiyotiktir ve enterococci, staphylococci ve clostridia gibi penisilin dirençli gram-pozitif bakterilere karşı

etkindir. Antimikrobiyaller etki mekanizmalarına göre beş başlıkta toplanırlar (Çizelge 2.3):

### **2.7.1. Hücre duvarını etkileyen antimikrobiyaller**

Dünyada yıllık 100,000 metrik ton antibakteriyel ilaç üretildiği ve kullanıldığı düşünülmektedir ve bunların büyük bir çoğunluğu bakteri hücre duvarını hedeflemektedir. Penisilinler ve sefalosporinler gibi  $\beta$ -laktamlar bu kategoriye girer ve dünya genelinde üretilen ve kullanılan antibiyotiklerin üçte ikisini oluştururlar. İlk  $\beta$ -laktam antibiyotiği 1929 yılında Alexander Fleming tarafından *Penicillium chrysogenum*'dan elde edilmiştir ve penisilin G olarak adlandırılmıştır [116]. Penisilin ve diğer  $\beta$ -laktam antibiyotikleri bakteri hücre duvarı sentezindeki transpeptidasyon reaksiyonuna müdahale ederek iki glikan bağlı peptit zincirinin çapraz bağlanmasına neden olur ve hücre duvarının sentezini durdururlar. Peptidoglikan sentez mekanizmaları bakteriye özgü olduğu için,  $\beta$ -laktam antibiyotikleri oldukça seçicidir ve konak hücreye karşı toksik değildir.

Glikopeptitler ise vankomisin ve teikoplaninin de yer aldığı bakteri hücre duvarını etkileyen bir diğer antimikrobiyal grubudur. Etki spektrumları hücre duvarından içeri nüfuz edemedikleri için streptokoklar, enterokoklar, metisiline dirençli olanlar dahil stafilokoklar, Gram pozitif bakterilerle sınırlıdır.

### **2.7.2. Protein sentezini etkileyen antimikrobiyaller**

Bazı antibiyotikler ise ribozomal RNA (rRNA) ile etkileşime geçerek bakteriyel patojenlerin protein sentezinin (translasyon) aksamasına yol açarak inhibe ederler. Bu ilaçların birçoğu yapıları farklı olan bakteriyel ribozomları hedeflediği için ökaryotik hücrelerdeki sitoplazmik ribozomlar üzerinde etkisi yoktur.

Aminoglikozitler ribozomun alt birimi olan 30S'i hedefleyerek translasyonu inhibe eder ve bakterisidal etki gösterirler. Mikobakteriler, stafilokoklar ve Gram negatif aerob basillere karşı etki gösterirken anaeroblara ve Gram pozitif basillerin çoğuna karşı etkisizdir [117, 118]. 30S ribozomal alt birimi hedefleyen bir diğer



antibiyotik grubu tetrasiklinler de geniş spektruma sahiptir, *Streptomyces* gibi birkaç tür tarafından sentezlenir ve Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterileri inhibe edebilir. Tetrasiklinler yapısında tetrasen halka sistemi içerir Şekil 2.9. Makrolit antibiyotikleri ise 50S ribozomal alt birimi inhibe eder. Temel yapısı şekere bağlanmış lakton halkası içermektedir. Makrolitler global antibiyotik üretiminin %12'sini oluşturmaktadır ve eritromisin, klaritromisin ve azitromisin gibi üyeleri bulunmaktadır. Penisilin ve  $\beta$ -laktam antibiyotiklerine alerjisi olan hastalar için yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

### 2.7.3. Nükleik asit sentezini etkileyen antimikrobiyaller

Kinolonlar sentetik antimikrobiyal bileşiklerdir, DNA giraz enzimini inhibe ederek DNA'nın süpersarımına ve paketlemesine müdahale ederek bakterinin replikasyonunu engellerler. DNA giraz tüm bakterilerde bulunduğu için tüm Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriyel enfeksiyonunda etkindir. Florokinolonlar ise kinolonların florlanmış türevleridir ve yüksek konsantrasyonlarına sahip olmaları sayesinde idrar yolu enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar ve bu sebeple direnç gelişmesine yol açmaktadırlar [118]. Ayrıca sığırcılık ve tavukçuluk endüstrisinde hayvanlardaki solunum yolu hastalıklarına karşı mücadelede kullanılmaktadır. Siprofloksasin ise *Bacillus anthracis*'in bazı suşlarının penisiline karşı direnç kazanmasından ötürü şarbon ile mücadelede tercih edilmektedir.

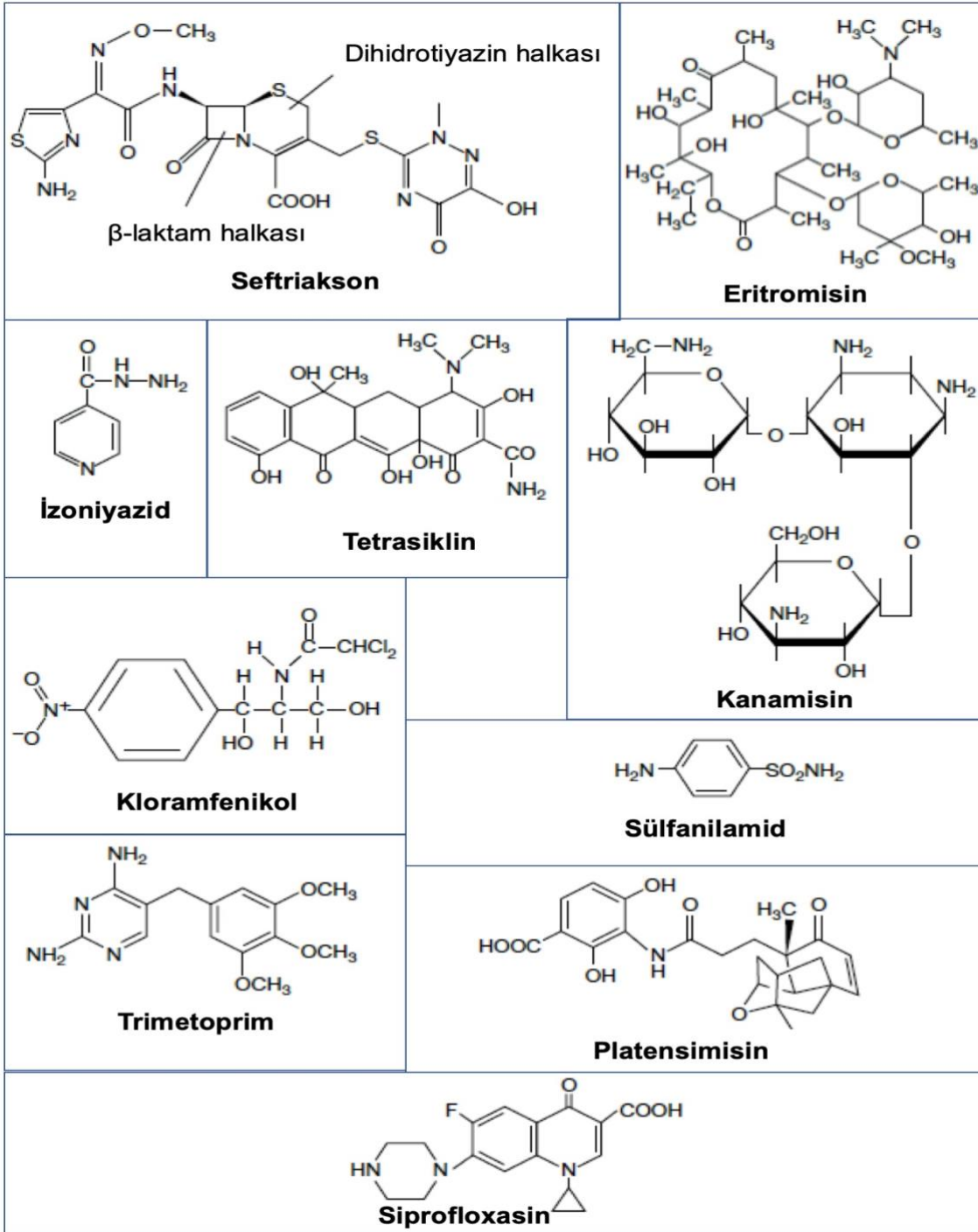
**Çizelge 2.3** Etki mekanizmalarına göre antibakteriyel bileşikler

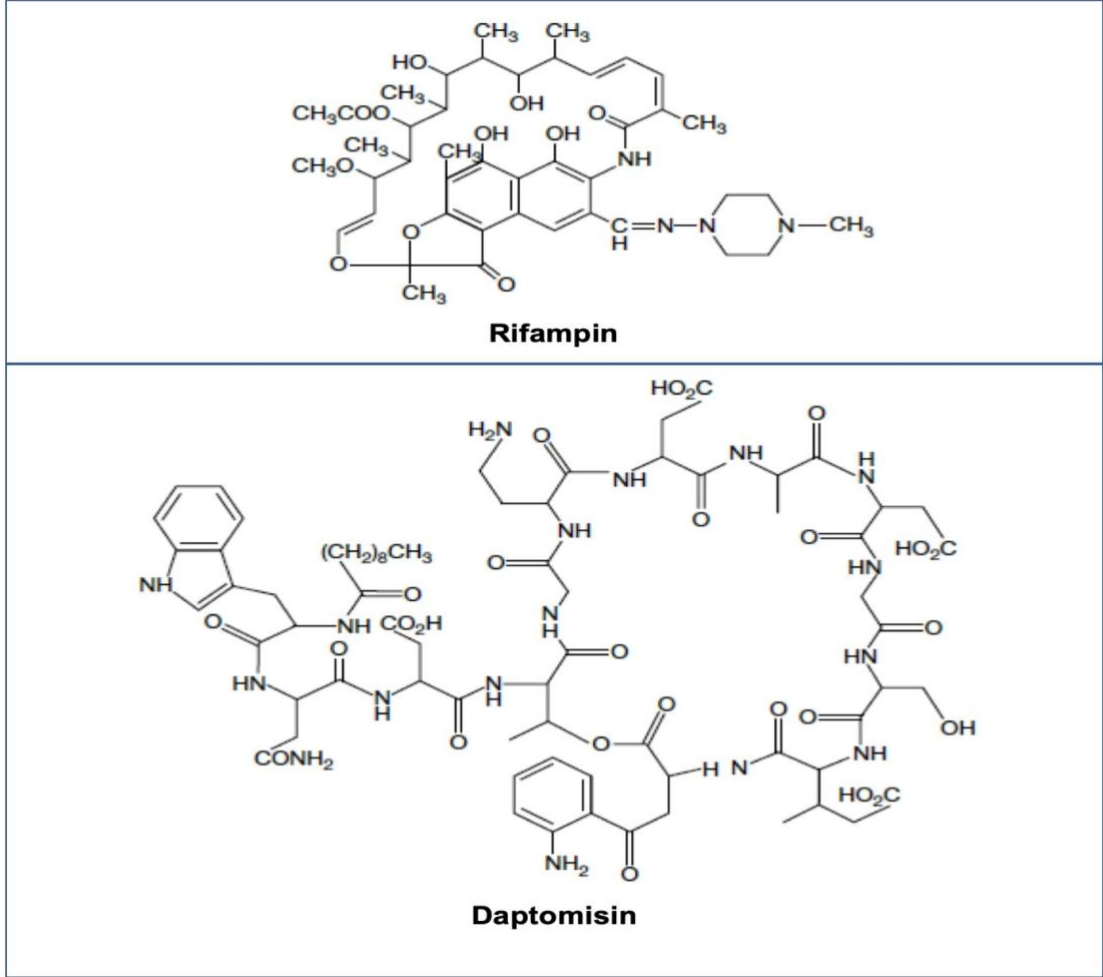
Etki mekanizması	Antibiyotik sınıfı	Örnekler
Hücre duvarı sentezini inhibe edenler	$\beta$ -laktamlar	Penisilinler, sefalosporinler, seftriakson,
	İzoniiazidler	İzoniiazid
	Polipeptit antibiyotikleri	Vankomisin, basitrasin
Protein sentezi inhibe edenler	Aminoglikozitler	Streptomisin, kanamisin, gentamisin
	Tetrasiklinler	Tetrasiklin, doksisisilin

	Makrolitler	Eritromisin, azitromisin
	Kloramfenikol	Kloramfenikol
Nükleik asit sentezini inhibe edenler	Kinolonlar ve florokinolonlar	Nalidiksik asit, siprofloksasin, moksifloksasin
	Rifamisinler	Rifampin
Metabolit sentezini inhibe edenler	Trimetoprim	Trimetoprim
	Sulfa ilaçları	Sulfanilamid, sulfametoksazol
Hücre membranına zarar verenler	Lipit biyosentezi bölücüler	Platensimisin
	Membran yapısını bölücüler	Daptomisin

#### 2.7.4. Metabolit sentezini inhibe eden antimikrobiyaller (antimetabolitler)

Bakteriler bir vitamin ve nükleik asit prekürsörü olan folik asiti insan ve hayvanlar gibi dışardan almaz kendileri sentezler. Sülfonamidler, izoniyazidler gibi sentetik büyüme faktörü analoglarıdır. Sülfanilamid, en basit sülfonamidlerden olup folik asitin bir bileşeni olan p-aminobenzoik asit (PABA)'in analogudur (Şekil 2.9). PABA'yı taklit ederek folik asit sentezini böylece nükleik asit sentezini de inhibe eder. Ayrıca bir folik asit rakibi trimetoprim ile beraber kullanılarak folik asit sentezindeki art arda iki basamak bloke edilerek oldukça efektif antimikrobiyal terapi elde edilmektedir. Ve bu ilaca direnç kazanmak aynı yolaktaki genlerdeki iki mutasyona ihtiyaç duysa da birçok hassas patojen folik asiti dışarıdan alma kabiliyetini geliştirmişlerdir ve bu da sülfonamidlere olan direncin artmasına sebebiyet vermektedir.





**Şekil 2.9** Antibakteriyel bileşikler ve yapıları

### 2.7.5. Hücre membranına zarar veren antimikrobiyaller

Daptomisin gibi bazı antibiyotikler ise bakteriyel sitoplazma membranına bağlanarak por oluşturur ve membran sentezini önleyerek bakterisidal etki gösterir (Şekil 2.9). Özellikle streptokokki ve stafilokokki gibi Gram-pozitif bakterilere karşı kullanılmaktadırlar. Platensimisin ise *Streptomisis platensis* tarafından üretilen ve yağ asitleri ile lipit biyosentezini inhibe eden bir antibiyotiktir. Platensimisin geniş bir spektrumda Gram-pozitif bakterilere karşı etkindir, toksisite göstermez ve patojenler tarafından bilinen bir direnç gelişimi bulunmamaktadır. Ayrıca konağa da toksisite göstermemektedir.

## 2.8. Antimikrobiyal Direnç

Antimikrobiyal direnç, bakteriler dahil olmak üzere virüs, mantar ve parazitler gibi mikroorganizmaların ilaca maruz kalmasının ardından ilaç varlığında adapte olabilmesi ve büyüebilmesine denir [119]. Antimikrobiyal direnç sadece gelişmiş ülkelerde değil tüm dünyada halk sağlığı sistemleri için büyük bir tehdit olarak görülmektedir. 2000-2015 yılı arasındaki dönemde antibiyotik kullanımının %65 oranında arttığı tespit edilmiştir [120]. Bu ciddi artış geliştirmekte olan ülkelerdeki artan gelirlerin neden olduğu artan antibiyotik kullanımının bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Düşük ve orta gelirli ülkelerde artan Gayri Safi Yurtiçi Hasıla (GSYİH) ile beraber artan hayat standartları ile antibiyotik kullanımı arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür. Gelişmekte olan ülkelerdeki artan gelirler ile hayvan proteini kullanımının arttığı ve bunun da daha fazla antibiyotiğin hayvanların besinine eklenmesine olan ihtiyacı arttırdığı görülmüştür.

Antibiyotiklerin tedavide yetersiz kaldığı bulaşıcı hastalıklar sağlık sisteminin geleceğini belirsizleştirmektedirler. Örneğin sadece Avrupa'da antimikrobiyal dirençten kaynaklı olarak yıllık ortalama 9 milyar dolardan fazla bir gider oluşmaktadır [121, 122]. Ayrıca Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'ye göre antimikrobiyal direnç Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) sağlık hizmetleri giderlerinde fazladan 20 milyar dolarlık bir masraf oluşturmakta bu da yıllık üretkenlikte 35 milyar dolarlık bir kayba neden olmaktadır. Yine CDC'ye göre ABD'de yıllık iki milyondan fazla insan antibiyotiğe dirençli hastalıklara yakalanmakta ve minimum 23,000 ölüme neden olmaktadır [123]. Avrupa Birliği'nde ise yıllık 25,000 kişinin antimikrobiyal ilaç kaynaklı nedenlerden ötürü hayatını kaybettiği bilinmektedir [124]. Şuanda dünya genelinde ilaca dirençli enfeksiyonlardan ötürü ise yıllık 700,000 kişi hayatını yitirmektedir [125]. 2050 yılı için antimikrobiyal direnç kaynaklı ölüm oranının listede 10 milyona ulaşması tahmin edilmektedir (Çizelge 2.4).

**Çizelge 2.4** 2050 yılı için tahmin edilen koşullarına göre ölüm oranları. [126] nolu referanstan uyarlanmıştır. Creative Commons Attribution 4.0 International Public License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>)

<b>Ölüm nedeni</b>	<b>Ölüm sayısı</b>
Antimikrobiyal Direnç	10 Milyon
Kanser	8.2 Milyon
Kolera	100,000 – 120,000
Diyabet	1.5 Milyon
İshalli hastalık	1.4 Milyon
Kızamık	130,000
Trafik Kazaları	1.2 Milyon
Tetanoz	60,000

Dünyanın farklı bölgelerindeki antimikrobiyal direnç kaynaklı ölüm oranları ise Çizelge 2.5'te verilmiştir. Buna göre en yüksek yıllık ölümün Asya ve ardından Afrika'da olacağı tahmin edilmektedir.

**Çizelge 2.5** 2050 yılı için bölgeler göre tahmin edilen antimikrobiyal direnç kaynaklı ölüm oranları. [126] nolu referanstan uyarlanmıştır. Creative Commons Attribution 4.0 International Public License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>)

<b>Bölge</b>	<b>Ölüm sayısı</b>
Asya	4,730,000
Afrika	4,150,000
Avrupa	390,000
Latin Amerika	392,000
Kuzey Amerika	317,000
Okyanusya	22,000

Antimikrobiyal direnç, mali etkilerinin yanında sağlık sistemine ekstra yükler de yüklemektedir. Bunlardan birisi de ameliyat sonrası enfeksiyon riskini düşürmek için kullanılan antibiyotiklerin, antimikrobiyal dirençten kaynaklı olarak başarıyla uygulanmasının zorluğudur. Buna ek olarak organ naklini de zorlaştırarak hastaları çeşitli enfeksiyonlara açık hale getirmektedir. Bir inceleme çalışmasında karaciğer nakli sonrasında çoklu-ilaca dirençli patojenlerin naklin başarısız olma ihtimalini ve ölüm oranlarını arttırdığını göstermiştir [127]. Ayrıca bir diğer etkisi de kemoterapinin kanserli hastalarda kullanılması konusunda görülmektedir. Kemoterapi kanser hastalarının bağışıklık sistemini zayıflatmakta ve hastaları enfeksiyonlara karşı daha hassas hale getirmektedir. Bu nedenle enfeksiyonu engelleyecek ya da tedavi edecek efektif antibiyotikler olmadan, kemoterapi daha da riskli bir hale gelmektedir [126]. Antimikrobiyal direnç ile ilgili konuların birçoğu karışık ve birbirleri ile ilişkilidir. İlaça dirençli bakteriler ile mücadelede yakın zamanda inovatif ve etkili çözümlere ihtiyaç duyulmaktadır.

## **2.9. Bakteriyosinler**

Bakteriyosinler çeşitli bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen ve hem bakteriyosin üreticisi türün suşlarına (dar aralıkta) hem de daha uzak türlere (geniş aralıkta) karşı antimikrobiyal etkiye sahip olan peptit ya da proteinlerdir. Bakteriyosinler ilk kez 1925 yılında Gratia tarafından *Eschericia coli*'nin suşlarının birbirlerini inhibe ettiğini farkettiğinde ortaya çıkmıştır [128]. Daha sonra protein olarak sınıflandırılarak kolisin adı verilmiştir. 1928 yılına gelindiğinde, Fleming penisilini bulduğu zamanlarda Rogers ve Whittier laktik streptokokkinin diğer laktik asit bakterilerini inhibe ettiğini bildirmişlerdir [129, 130]. Bundan beş yıl sonra ise Whitehead inhibitör molekülünü izole ederek protein yapısında olduğunu göstermiştir [131]. "1947 yılında ise N N inhibitory substance (nisin) adını almıştır, -in son eki ise antibiyotik özelliğini tanımlamaktadır [132].

Bakteriyosinler doğal maddelerdir ve proteinler gibi biyobozunurlardır. Ayrıca ribozomal olarak sentezlenen moleküllerdir ve genetik mühendisliği yardımıyla modifiye edilmesi mümkündür. Her bakteriyosin kendine özel ve dar bir

spektruma etki etmektedir bu sayede gıda mikrobiyal ekosistemlerini manipüle etmeyi sağlamaktadır. Antibiyotiklere kıyasla daha dar bir etki spektrumuna sahiptirler [133, 134]. Birçok özellik bakımından antibiyotiklerden ayrılmaktadırlar (Çizelge 2.6)

**Çizelge 2.6** Bakteriyosin ve antibiyotiklerin karşılaştırılması. [135] nolu referenstan izin alınarak uyarlanmıştır. Telif hakkı © 2001 Elsevier.

Özellik	Bakteriyosinler	Antibiyotikler
Sentez	Ribozomal	İkincil Metabolit
Aktivite	Dar spektrum	Değişken spektrum
Konak hücre bağışıklığı	Evet	Hayır
Hedef hücre direnci veya toleransı mekanizması	Genellikle hücre membran kompozisyonunu etkileyen adaptasyon	genellikle etki şekline bağlı olarak değişik bölgeleri etkileyen genetik olarak transfer edilebilir belirleyici faktör
Etkileşim gereklilikleri	bazen kenetlenen molekül	spesifik hedef
Etki şekli	çoğunlukla por oluşumu	hücre membranı ya da hücreler arası hedefler
Toksik/yan etkiler	Bilinmiyor	Evet

Bakteriyosinler kimyasal yapıları, molükül ağırlığı, enzim aktivitesine karşı olan hassasiyeti, modifiye aminoasit ve aktivite mekanizmasına göre 4 gruba ayrılmıştır [136]. Çizelge 2.7’de gösterilmiştir.



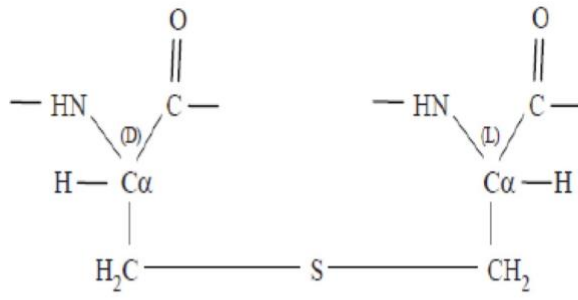
**Çizelge 2.7** Bakteriyosinlerin sınıflandırılması [136] nolu referenstan izin alınarak uyarlanmıştır. Telif hakkı © 2012 Bodaszewska-Lubas, M. Brzychczy-Wloch, M. Gosiewski, T. Heczko, P. B.

Bakteriyosin Grubu	Özellikleri
I. Grup (Lantibiyotikler)	IA: Katyonik özellikte nisin vb. lantibiyotiklerdir. IB: Düşük negatif yük içerirler, duramisin, marsasidin ve alametisin örnek verilebilir. Marsasidin, Alametisin, Duramisin vb.
II. Grup	Lantiyonin içermezler. Küçük ve Isı dirençli peptitlerdir. IIA: Antilisteriyal etki gösteren pediosin benzeri peptitlerdir. IIB: İki peptit içerirler, laktasin gibi. IIC: Siklik bakteriyosinlerdir. Carnobakteriyosun.
III. Grup	Büyük, ısıya hassas protein bakteriyosinleridir. Helvetisin J ve enterolizin A
IV. Grup	Lipit, karbonhidrat gibi yan grupları bulundurur ve karmaşıklardır. Leucocin S, mesenterocin vb.

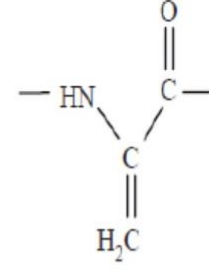
## 2.10. Lantibiyotikler

Lantibiyotikler Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen, ribozomal olarak sentezlenen ve yapılarında lantiyonin (Lan),  $\beta$ -metillantiyonin (MeLan), dehidroalanin ve dehidrobütirin gibi post translasyonel modifikasyonlar sonucu oluşan alışılmadık aminoasitleri bulunduran antimikrobiyal peptitlerdir (

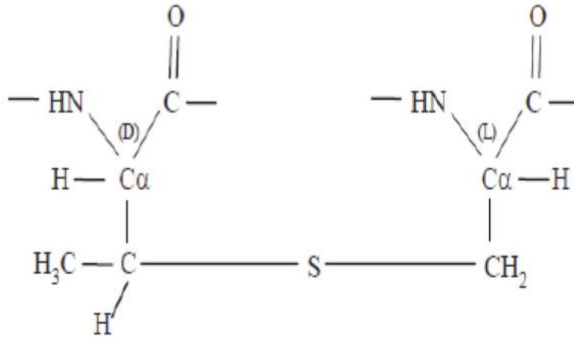
Şekil 2.10). Lantibiyotik ismi lantiyonin içeren antibiyotikten türetilmiştir. Molekül ağırlıkları 5 kDa'dan küçüktür. 1. grup bakteriyosinler için lantibiyotik ismi ilk olarak 1988 yılında lantiyonin içeren peptit antibiyotiğin kısaltması olarak ortaya atılmıştır [137]. IA grubundaki lantibiyotikler katyonik özelliktedirler ve hedeflenmiş olduğu hücrenin sitoplazma zarını depolarize ederek etkinlik gösterirler. 21-38 aminoasite sahiptirler. En yaygın üyesi nisindir. IB grubundaki lantibiyotikler ise IA grubuna kıyasla daha küçüktürler ve 19'dan az sayıda amino asit içerirler. Bu gruptaki lantibiyotikler ise konak hücre enzimlerini inhibe ederler [138-140].



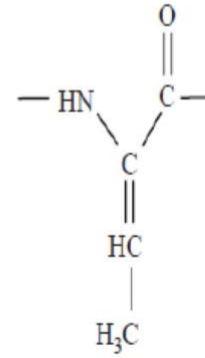
Lantionin



Dehidroalanin



$\beta$ -metillantionin



Dehidrobütirin

**Şekil 2.10** Lantiboyiklere özel aminoasitler [141]

Lantibiyotikler ve özellikle nisin on yıllardır güvenli ve doğal gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır [142]. Ancak çoklu ilaca dirençli bakteriyel enfeksiyonların artışıyla beraber ölümcül enfeksiyonlara karşı kullanımı ele alınmıştır. Birçok çalışma hastanede bulaşan (nozokomiyal) patojenlere karşı lantibiyotiklerin in vitro potansiyeline ışık tutmaktadır [143]. Bunlardan bir kısmı Çizelge 2.8'de listelenmiştir.

**Çizelge 2.8.** Bazı lantibiyotikler ve potansiyel tedavi uygulamaları. [144] nolu referanstan izin alınarak uyarlanmıştır. Telif hakkı © 2015 Field, Cotter, Hill ve Ross.

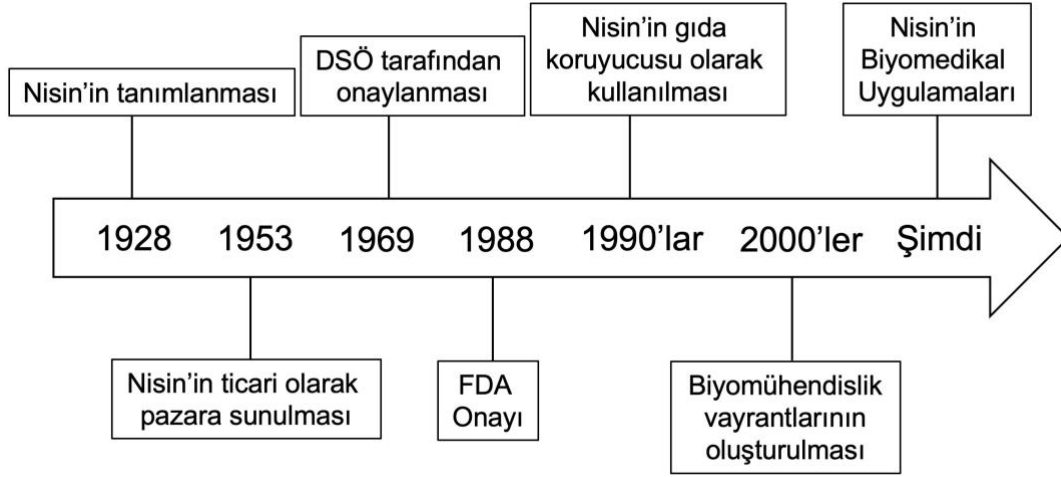
Lantibiyotik	Ticari ilgili hedefleri	In vivo testleri	Potansiyel uygulamaları	Referans
Nisin	Gram pozitif bakteri	+	Stafilokokkal tedavisi (MRSA dahil) ve enterokokkal enfeksiyonları. Bakteriyel göğüs iltihaplanması tedavisinde. Ağız hijyeni, deodorantlar ve anti kanser uygulamaları.	[145-150]
Mersacidin	MRSA VRE, <i>C. difficile</i>	+	Stafilokokkal tedavisi (MRSA dahil) ve enterokokkal enfeksiyonları. CDAD tedavisi	[151-153]
Actagardine	MRSA VRE, <i>C. difficile</i>	+	Stafilokokkal tedavisi (MRSA dahil) ve enterokokkal enfeksiyonları. CDAD tedavisi	[152]
Deoxyactagardine/NVB302	<i>C. difficile</i>	+	<i>C. difficile</i> enfeksiyonları tedavisi	[154]
Gallidermin/Epi dermin	<i>Propionibacteria</i> , Staphylococci, Streptococci,	+	Akne, ekzema, folikülit, impetigo	[155]
Pinensins	Maya/mantar	x	Mantar önleyici/maya	[156]
Planosporicin	MRSA, VRE, Streptococci	+	Stafilokokkal tedavisi (MRSA dahil) ve enterokokkal enfeksiyonları (VRE dahil).	[157]
Microbisporicin	MRSA, VISA, VRE, <i>C. difficile</i>	+	Stafilokokkal tedavisi (MRSA dahil) ve enterokokkal enfeksiyonları (VRE dahil). Akne	[158]
Mutacin B-Ny266	çoklu ilaca dirençli bakteri	+	MRSA ve VRE dahil olmak üzere çoklu ilaca dirençli bakteri tedavisinde	[149]

Lacticin 3147	Gram pozitif bakteri	+	Bakteriyel göğüs iltihaplanması tedavisi, stafilokokkal ve enterokokkal enfeksiyonları (VRE dahil). Akne	[150, 159, 160]
Salivaricin B	Streptococci S. <i>Pyogenes</i> ve S. <i>Sobrinus dahil</i>	+	Neden olan ajanlara ağırlık vererek Streptokokkal enfeksiyonların tedavisinde; boğaz ağrısı (ana nedeni S. <i>pyogenes</i> ) ve diş çürümesi (nedenlerinden biri S. <i>sobrinus</i> )	[161, 162]
Duramycin	klor taşınmasını ve sıvı salgısını arttırmak	+	Sistik fibrozis, gözle ilgili hastalıklar ve rahatsızlıkların tedavisinde	[163, 164]

Lantibiyotikler genel olarak MRSA, enterokoklar gibi nozokomiyal Gram-pozitif bakteriler tarafından ve yine onlara karşı üretilmektedirler, Gram-negatif bakterilerden ise sadece *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *N. Meningitidis* gibi birkaçı nisin ve mikrobisporisin ile inhibe olmaktadır [165]. *Enterobacteriaceae* ve diğer Gram-negatif bakteriler ise esas olarak dış membranının sitoplazmik membranının lantibiyotik girişine engel olmasından ötürü lantibiyotiklere karşı hassas değildir [166, 167].

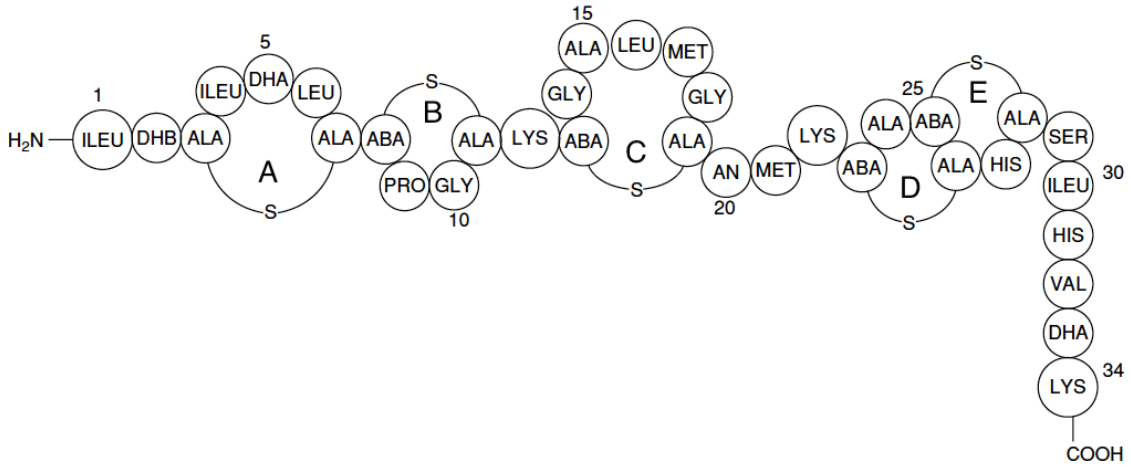
## 2.11. Nisin

Nisin, *Lactococcus lactis* tarafından üretilen polisiklik antibakteriyel bir peptiddir. Lantibiyotik grubuna girer ve IA grubunun en yaygın kullanılan üyesidir. 1990'lerden itibaren gıda koruyucusu olarak kullanılmakta ve önemli bir bakteriyel dirence neden olmadığı bilinmektedir [168]. Penisilin'den bir yıl önce 1928 yılında keşfedilmiştir (Şekil 2.11) [129, 130, 169]. İlk defa 1953 yılında ticari olarak pazara sunulmuştur. 1969 yılında DSÖ, 1988 yılında FDA tarafından onay alınmıştır. 1990'larda gıda koruyucusu olarak kullanılmasının ardından, 2000'lerde biyomühendislik varyantları oluşturulmuştur. Ve yakın zamanda da biyomedikal uygulamalarına başlanmıştır.



**Şekil 2.11** Nisin gelişiminin zaman çizelgesi [170] nolu referanstan izin alınarak uyarlanmıştır. Telif hakkı © 2015 Society for Applied Microbiology

Bünyesinde lantibiyotiklerde görülen ve nadir rastlanan lantiyonin,  $\beta$ -metillantonin, dehidroalanin ve dehidrobütirin bulundurur. Nisin A ve Nisin Z olmak üzere iki doğal nisin molekülü mevcuttur. Nisin A molekülünün yapısı 1971 yılında aydınlatılmıştır ve Şekil 2.12'de gösterilmiştir. 34 aminoasitten oluşan bir polipeptiddir, amino ve karboksil uç gruplarına sahiptir ve beş tane disülfid köprüsü içeren iç halka yapısına sahiptir. Nisin Z yapısında ise Nisin A'dan farklı olarak 27. pozisyonda Histidin yerine asparagin bulundurmaktadır. Nisin Z ile Nisin A benzer antimikrobiyal etkiler göstermektedir. Nisin A 3354 Da molekül ağırlığına sahiptir.



**Şekil 2.12** Nisin A'nın yapısı. ABA, aminobütirik asit; DHA, dehidroalanin; DHB, dehidrobütirin ( $\beta$ -metildehidroalanin); **A)** ALA-S-ALA, lantiyonin; **B), C), D), E)** ABA-S-ALA,  $\beta$ -metillantiyonin [171].

Nisin çift etki mekanizması göstermektedir ve bakterinin hücre duvarı sentezini başlatıcı lipid bileşenlerinden olan lipid II'ye bağlanarak hücre duvarı üretimini aksatmakta ve hücre membranda porlar oluşturarak bileşenlerin sızmasına neden olmaktadır. Bu şekilde bakterisidal etki göstermekte ve şu etki spektrumuna sahiptir, *Lactococcus ssp.*, *Lactobacillus ssp.*, *Streptococcus ssp.*, *Micrococcus ssp.*, *Mycobacterium ssp.*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium ssp.*, *Clostridium ssp.*, *Bacillus ssp.*, *Listeria ssp.* [172-179]

**Çizelge 2.9** Nisin'in biyomedikal uygulamaları. [170] nolu referanstan izin alınarak uyarlanmıştır. Telif hakkı © 2015 Society for Applied Microbiology

Hastalık	Nisin	Model	Sonuçlar	Referanslar
İlaca-dirençli patojenlerle ilişkili enfeksiyonlar	Nisin A (%2.5 w/w saflık)	<i>In vitro</i>	Nisin MRSA, <i>Streptococcus pneumoniae</i> ve <i>entereokok</i> dahil olmak üzere birçok Gram-pozitif bakteriye karşı bakterisidal etki göstermiştir	[180]

Nisaplin (%2.5 w/w saflık)	<i>In vitro</i>	Nisin penisilin ve diğer ilaca dirençli suşları dahil olmak üzere, <i>Strep. pneumoniae</i> 'nin klinik izolatlarına karşı bakterisidal etki göstermiştir	[181]
Nisin A (> %95 saflık)	<i>In vitro</i>	Nisin <i>Clostridium difficile</i> 'e karşı yüksek bakterisidal etki göstermiştir. Nisin gastroentestinal kanal boyunca absorbe olmamış ve tüm bağırsak florası ve anaeroplara karşı rastgele aktivite göstermemiştir.	[182]
Nisin A (%2.5 w/w saflık)	<i>In vitro</i>	Nisin ilaca dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> 'a karşı etkinlik göstermiştir	[150]
Nisin A (%2.5 w/w saflık)	<i>In vitro</i>	Nisin MSSA ve MRSA suşlarına karşı bakterisidal etki göstermiştir. Ek olarak, siprofloksasin ve vankomisin ile beraber kullanıldığında aktivitesini arttırmıştır.	[183]
Nisin A (%2.5 w/w saflık)	<i>In vitro</i>	Nisin medikal cihazlarda büyütülmüş MRSA ve diğer <i>staphylococcal</i> biyofilmlere karşı bakterisidal aktivite göstermiştir.	[184]
Nisaplin (%2.5 w/w saflık)	<i>In vitro</i>	Nisin, 2,3- dihidroksibenzoik asit ile nanofibere dahil olarak MRSA biyofilmlerin oluşumunu engellemiştir.	[185]
Nisin A (>%95 saflık)	<i>In vitro</i>	Nisin'in gastrointestinal kanalındaki enfeksiyonların	[186]

Gastrointestinal enfeksiyonlar			tedavisinde kullanılabileceği önerilmiştir.	
	Nisin A ve Z (>%95 saflık)	<i>In vitro</i>	Nisin A ve Z, geniş bir çeşitlilikteki bağırsak Gram-pozitif bakterilerine karşı benzer inhibisyon özellikleri göstermiştir.	[187]
	Nisaplin (%2.5 w/w saflık)	<i>In vitro</i>	Nisin pektin/HPMC karışımı ile beraber tablet halinde getirilmiştir ve potansiyel konolik ilaç taşınımında enzimatik olarak kontrol edilen taşıma sistemi oluşturulmuştur.	[188]
	Nisin Z	<i>In vitro</i> ve fare	Nisin üreten suş <i>Lc. Lactis</i> enfekte farelerde bağırsak mikrobiyotasını modüle etmiş ve vankomisine dirençli <i>enterokokların</i> bağırsak kolonizasyonunu azaltmıştır.	[189]
	Nisin A ve Z (bilinmeyen saflık)	Fistüle köpeklerden jejunal kimüs kullanarak <i>ex vivo</i>	Nisin'in jejunal kimüs bileşenleri tarafından degradasyona karşı duyarsız olduğu görülmüştür.	[190]
	Nisin F (gelişigüzel birimlerde saflık)	<i>In vitro</i> ve fare	Nisin'in mide-bağırsak kanalında bakteri popülasyonunda sabitleyici etkisi görülmüştür.	[191]
Solunum yolu enfeksiyonları	Nisin F (gelişigüzel saflık birimlerinde)	<i>In vitro</i> ve sıçan	Nisin <i>Staph. aureus</i> enfeksiyonu kontrolünde kullanılmıştır.	[192]



	Nisaplin (%2.5 w/w saflık)	<i>In vitro</i> ve fare	Nisin'in düşük kan ve doku seviyeleri <i>Strep.pneumoniae</i> ile enfekte olmuş farelerin ölümünü engellemek için yeterli olmuştur.	[181]
Cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları	Nisaplin (%2.5 w/w saflık)	<i>In vitro</i> ve fare	Nisin içeren nanofiber yara örtü malzemeleri <i>S. aureus</i> ile uyarılmış cilt enfeksiyonlarını ciddi oranda azaltmıştır.	[193]
Meme iltihabı	Nisin Z (18000 IU mg <sup>-1</sup> )	İnekler	Mandıradaki süt veren ineklerdeki meme iltihabı tedavisinde nisin'in meme içi uygulaması etkili olmuştur.	[194, 195]
	Nisin A (~6 µg ml <sup>-1</sup> )	<i>In vitro</i> ve insan	Nisin'in lokal tedavisinin Stafilokokkal meme iltihabında etkili olduğu görülmüştür.	[196]
Kanser	Nisin A (%2.5 w/w saflık)	<i>In vitro</i> ve fare	Nisin'in (baş ve boyun pullu hücre kanseri) HNSCC tümör gelişimini azalttığı görülmüştür	[197]
	Nisin A (%2.5 w/w saflık)	<i>In vitro</i> ve fare	Nisin ve doksorubisin kombinasyonunun, cilt kanserindeki tümör gelişimini yavaşlattığı görülmüştür.	[198]
	Nisin A ve Z, %95 saflık	<i>In vitro</i> ve fare	Nisin'in HNSCC hücre apoptozunu desteklediği, proliferasyonu baskıladığı, anjiyogenezi inhibe ettiği ve farelerin hayatta kalma sürelerini uzattığı görülmüştür.	[199, 200]
Ağız sağlığı	Nisaplin (%2.5 w/w saflık)	Maymun	Maymunların besinlerinde aldığı nisin dış plağındaki streptokok sayısını azaltmıştır	[201]

	Nisin (Ambicin N) (bilinmeyen saflık)	Köpek	Nisin bazlı ağız çalkalama suyu plak oluşumu ve beagle köpeklerinin diş etindeki inflamasyonunu engellemiştir.	[202]
	Nisin A (%2.5 w/w saflık)	İnsan dişlerinin kök kanallarını kullanarak <i>ex vivo</i>	Nisin <i>Enterococcus faecalis</i> tamamen yok etmiştir	[203]
	Nisin Z (bilinmeyen saflık)	<i>In vitro</i>	Nisin <i>C. albicans</i> büyümesini ciddi oranda azaltmıştır	[204]
	Nisin Z (bilinmeyen saflık)	<i>In vitro</i>	Nisin, diş eti hücreleri ile beraber çalışarak <i>C. albicans</i> enfeksiyonlarına karşı daha büyük direnç göstermiştir	[205]
	Nisin A (%2.5 w/w saflık)	<i>In vitro</i>	Nisin <i>Streptococcus mutans</i> gibi dişte çürük oluşturan bakterilerin büyümesini inhibe etmiştir	[206]
	Nisin A (%2.5 w/w saflık)	<i>In vitro</i>	Poli-lizin ve sodyum florür <i>Strep. Mutans</i> 'ın planktonik ve biyofilm formlarının inhibisyonunda sinerjik etki göstermişlerdir	[207, 208]
	Nisin A (%2.5 w/w saflık)	<i>In vitro</i>	Nisin MTAD ile eşleşerek <i>E. faecalis</i> 'e karşı MTAD'ın antibiyotik sonrası sub-MIC etkilerini geliştirmiştir	[209]
	Nisin Z (%95 saflık)	<i>In vitro</i>	Nisin, Gram-pozitif ve Gram-negatif oral patojenlerin ve tükürükten türetilmiş çoklu tür biyofilmlerin büyümesini inhibe	[210]

			etmiş, insan ağız hücrelerine sitotoksosite göstermemiştir.	
--	--	--	---	--

## 2.12. Kanser

Kanser, vücutta bazı hücrelerin kontrolsüzce büyüyerek vücudun diğer parçalarına da yayılmasına neden olan bir hastalıktır. Vücudun herhangi bir yerinde başlayabilir ve trilyonlarca hücreye oluşabilir. Normal hücreler büyür ve hücre bölünmesi denilen bir süreç ile çoğalırlar. Yaşlanmış ve hasarlı hücreler ölürler ve yerini yeni hücreler alır. Bazen bu proses bozulur ve anormal ya da hatalı hücreler büyür ve çoğalırlar. Bu hücreler tümör oluşturarak, kanserli ya da kanserli olmayan (iyi huylu) olabilirler. Bazı kanserli tümörler yakındaki dokulara yayılabilir ya da ele geçirebilir ve metastaz denilen vücuttaki uzak yerlerde de yeni tümörleri oluşturabilirler. Bazı durumlarda tedaviler metastatik kanserli insanların yaşam sürelerini uzatabilmektedir. Bazı durumlarda ise tedavinin birincil amacı metastatik kanser büyümesini kontrol altına almak ya da semptomları hafifletmektir. Metastatik tümörler vücut fonksiyonlarına birçok zarar verebilir ve kanserden hayatını kaybedenlerin büyük bir çoğunluğu da metastatik kanser nedeniyledir [211].

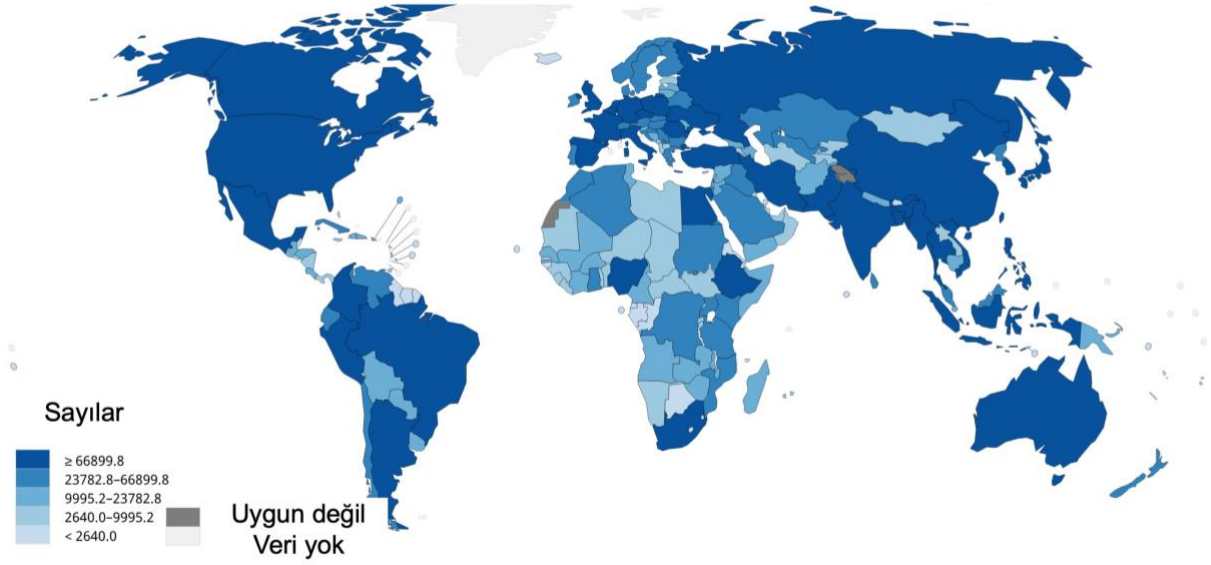
IARC (International Agency for Research On Cancer)'ye göre dünyada her 5 kişiden 1'inin hayatı boyunca kansere yakalanmaktadır, 8 erkekte birinin ve 11 kadından birinin de bu hastalıktan hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir. Dünyada nüfusun yaşlanması ve sosyo-ekonomik risk faktörleri hala bu artıştaki birincil faktör olmayı sürdürmektedir. Dünya genelinde her 4 kanserli kadından 1'ine meme kanseri tanısı koyulmuştur ve kolorektal, akciğer, boyun ve tiroid kanserleri de kadınlar arasında oldukça yaygındır.

İlk defa kadın meme kanseri, akciğer kanserini geçerek en çok teşhis koyulan kanser olmuş, bunun da ana sebebinin düşük ve orta gelirli ülkelerdeki yüksek yaygınlık olduğu düşünülmektedir. Akciğer kanseri sadece düşük ve orta gelirli ülkelerde değil kuzey amerika, avrupa, avustralya gibi yüksek gelirli bölgelerde de halen kanser ölümleri arasında başı çekmektedir.

Türkiye IARC (International Agency for Research On Cancer) Global Cancer Observatory platformuna göre 2020 yılı için dünyada en çok yeni vaka görülen 14. ülkedir Çizelge 2.10 [212]

**Çizelge 2.10** Ülkelere göre 2020 yılı yeni kanserli vaka sayıları [212]

<b>Ülke</b>	<b>Yeni Kanser Vakası</b>
Dünya	19,292,789
Çin	4,568,754
Amerika Birleşik Devletleri	2,281,658
Hindistan	1,324,413
Japonya	1,028,658
Almanya	628,519
Brezilya	592,212
Rusya Federasyonu	591,371
Fransa	467,965
Birleşik Krallık	457,960
İtalya	415,269
Endonezya	396,914
İspanya	282,421
Kanada	274,364
<b>Türkiye</b>	<b>233,834</b>
Kore	230,317
Polonya	204,575
Avustralya	200,021



**Şekil 2.13** Dünyada 2020 yılındaki tahmin edilen yeni vaka sayıları [212]

Türkiye’de 2020 yılında 233,834 yeni vaka tanımlanırken, nüfusun %0.15’inin (126,335 kişinin) kanser nedeniyle hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir. Türkiye’de en çok yeni vaka görülen kanser türü erkeklerde akciğer, prostat ve kalın bağırsak kanseridir, kadınlarda ise meme, tiroid ve kalın bağırsak kanseridir (Çizelge 2.11).

**Çizelge 2.11** Türkiye’deki 2020 yılı için tahmin edilen yeni vaka sayıları, ölüm sayıları ve son beş yıldaki yaygınlık [212]

	Erkek	Kadın	Her ikisi
Nüfus	41,636,125	42,702,942	84,339,067
Yeni Vaka Sayısı	132,816	101,018	233,834
Kanser’den Ölüm Sayısı	78,949	47,386	126,335
Son 5 yıldaki yaygın vakalar	300,071	281,565	581,636
En sık görülen 5 kanser tipi (melanom olmayan cilt kanseri hariç, vaka sayısına göre)	Akciğer Prostat Kalın Bağırsak Mesane	Meme Tiroid Kalın Bağırsak Akciğer	Akciğer Meme Kalın Bağırsak Prostat

	Mide	Korpus uteri	Tiroid
--	------	--------------	--------

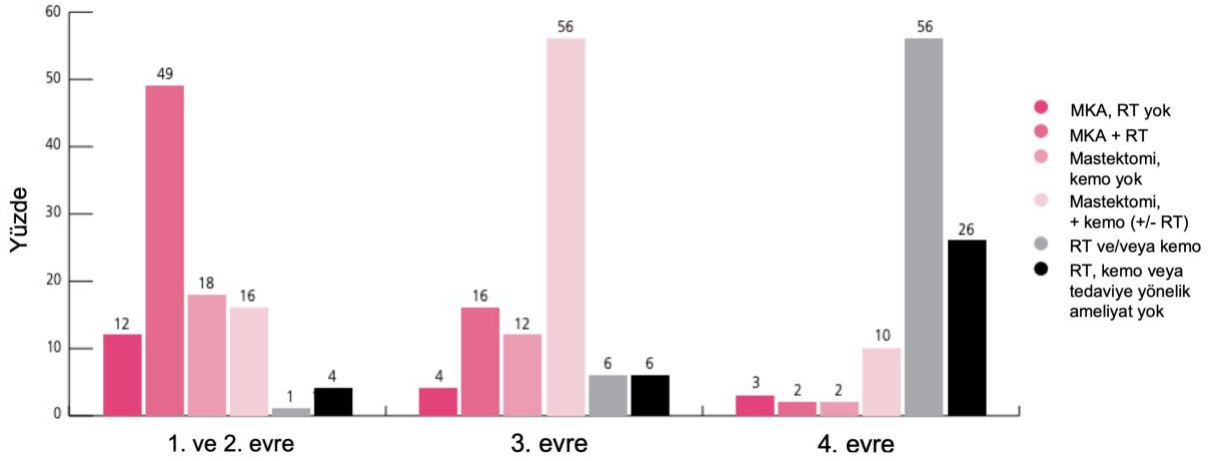
Tüm dünyada 2020 yılındaki 19,292,789 olan yeni vaka sayısının 2040 yılında %49.7 artışla 28,887,940 olacağı tahmin edilmektedir. %89'luk artış ile en çok artışın Afrika'da olması öngörülmektedir [212].

### 2.12.1. Meme kanseri

Meme kanseri, kadınlardaki en kötü huylu kanser türüdür, kanser türleri arasında en yaygın görülen ve ölüm oranı en yüksek olanıdır, her 8 ile 10 kadından 1 tanesi hayatı boyunca meme kanserine yakalanmaktadır [213]. Kuzey Amerika ve Avrupa'daki ölüm oranları erken tedavi ve verimli sistematik tedaviler ile düşmektedir. Buna rağmen az gelişmiş ülkelerdeki en ölümcül kanser türü, gelişmiş ülkelerde ise akciğer kanseri sonrasında en ölümcül kanser türüdür [214].

Meme kanserinin cerrahi tedavisinde meme koruyucu ameliyat (MKA) veya mastektomi uygulanır. MKA'nın lokalize ve bölgesel kanserler için uygun bir şekilde kullanıldığında, ardından da radyoterapi uygulandığında uzun dönemli kurtulmalar mastektomi ile aynı oranda olmaktadır [215].

Amerikan Kanser Derneği'nin 2019 yılındaki raporuna göre, 2016 yılında ABD'deki kadınlar arasında erken-evre (1. ve 2.) meme kanserinin %61'i meme koruyucu ameliyat (MKA), %34'ü mastektomi ve %4'ü radyoterapi ya da kemoterapi geçirmiş ve %1'i ise herhangi bir tedavi almamıştır (Şekil 2.14).



**Şekil 2.14** ABD’de hastalığın evrelerine göre kadın meme kanseri tedavi paternleri, (%), 2016 yılı. MKA: meme koruyucu ameliyat, RT: radyasyon tedavisi, kemo: kemoterapi ve hedeflendirilmiş tedavi ve immünoterapi [216]

3. evrede ise meme kanserli kadınlar arasında %20 MKA, %68 mastektomi, %6 radyoterapi ve/veya kemoterapi, %6 ise herhangi bir tedavi almamıştır. 4. evreye baktığımızda ise artık en yüksek oranı %56 ile radyoterapi ve/veya kemoterapinin aldığı, %26’sının herhangi bir tedavi almadığı, %5’inin MKA geçirdiği, %12’sinin ise mastektomi geçirdiği görülmüştür. Ve tüm bu ameliyat, kemo- ve radyoterapiler normal hücre ve dokulara da zarar vererek hastanın ölümüne neden olabilmektedir.

### 2.13. Kanser Tedavisinde Nisin

Bakteriden üretilen bileşiklerin kullanım potansiyeli enfeksiyon hastalıklarından kansere kadar uzanmaktadır [217, 218]. Örneğin, antimikrobiyal peptitler kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler göstermektedir ve terapötik potansiyeli de olabilmektedir [219, 220]. Nisinin FDA tarafından insanlarda 83.25 mg/kg’a kadar kullanımına onay verilmiştir, bu da etki görülmeyen en üst seviyedir (farede 66.7 mg/kg kanser terapötik doz olarak) ve nisinin antikanser ajanı olarak kullanım potansiyelini göstermektedir.

Joo ve ark. nisin A’nın sitotoksik ve antitümör özelliklerini açığa çıkarmış ve baş ve boyun skuamöz hücre karsinoma (HNSCC) tümör oluşumunu engellediğini

keşfetmiştir [147] (Çizelge 2.9). Nisin hücre membranında bulunan negatif yüklü fosfolipid başları ile etkileşerek yeniden organizasyon olmasına aracılık eder ve porlar oluşturarak iyonların girişine neden olmaktadır [221] [222]. Ayrıca son çalışmalarda ağız bakterileri gibi bazı bakterilerin kanser gelişimini arttırabildiği görülmüştür [223, 224]. Bu türden senaryolarda, nisin hem mikrobiyomu bozmak hem de kanser hücrelerinin büyümesini inhibe etmek gibi iki faydalı şekilde etki gösterebilir. Sonuç olarak nisin hem antimikrobiyal hem de antikanser özelliği sayesinde büyük bir terapötik potansiyel göstermektedir.



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Deneyde Kullanılan Kimyasallar ve Mikroorganizmalar

TRIS (BioUltraPure, Bioshop), Etilendiamintetraasetik asit (E.D.T.A., IMICRYL, Türkiye), Magnezyum Klorür Hekzahidrat ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) (Emsure, Merck), İzopropanol ( $C_3H_8O$ , Sigma), Polietilen Glikol 8000 (PEG8000, Sigma Aldrich), Sodyum Hidroksit (NaOH, %98, Sigma Aldrich), Sodyum klorür (NaCl, Emsure, Merck), Asetik asit ( $CH_3COOH$ , EMPROVE, Merck), 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür (MTT, VWR Life Science).

Nisin, (nisin from *Lactococcus lactis* (2.5% w/w, Sigma Aldrich) stokları, daha önce açıklanmış prosedürün modifiye edilmiş haliyle hazırlanmıştır [145], buna göre 0.25 g nisin 1 mL, 1M HCl içerisinde 2 saat oda sıcaklığında çözülmüştür. Ardından bu hacim 50 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. Nisinin mikropkaka gibi plastik yüzeylere bağlanmasını engellemek amacıyla solüsyona 5 mg/mL konsantrasyonunda sığır serum albümin (BSA) eklenmiştir [225].

Antimikrobiyal aktivite ve sitotoksisite testleri Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yürütülmüştür. Antimikrobiyal aktivite çalışmasında kullanılan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA, ATCC 43300) ve vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* (VRE, ATCC 51299) ATCC'den (American Type Culture Collection)'dan KÜBTUAM tarafından temin edilmiştir ve geliştirme besi ortamı olarak Mueller Hinton Broth (Merck) kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan hücre hatları MCF-7 (meme kanseri hücre hattı) ve L929 (sağlıklı fare fibroblast hücre hatları) ŞAP Enstitüsü hücre kültürü bankasından temin edilmiştir. MCF-7 için besiyeri Roswell Park Memorial Institute (RPMI), %10 fetal bovin serum, %1 penisilin/streptomisin, L929 için ise besiyeri, %89 L-glutamin içermeyen fetal calf serum (FCS)'lu Dulbecco's Modified Eagles Medium/F-12 (DMEM/F-12) (Biological Industries), %10 Fetal bovin serum ve %1 penisilin/streptomisin çözeltisinin steril ortamda karıştırılması ile elde edilmiştir.

### 3.1.1. DNA Primerleri ve İskele

Tek zincirli iskele DNA m13mp18, (tip p7249) Tilbit Nanosystems GmbH, Almanya firmasından temin edilmiştir. M13mp18 fajı *E. coli* ER2738'de çoğaltılmış, faj polietilen glikol presipitasyonu ile saflaştırılmış ve tek zincirli DNA, fenol ile ekstrakte edilmiştir. Zimba zincirler ise Atlas Biyoteknoloji, Ankara'dan temin edilmiştir ve sekansları Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

**Çizelge 3.1** 60 helis demeti oluşturmak için kullanılan 141 zimba DNA'nın sekansları

	<b>Sekans (5' – 3')</b>
1	GATACTTGCCAGTTAAACCATCAATATGGAGCAAACAACAAA
2	GGAGGTTTCGAGCGTAAACAGCGAGAGAA
3	CTTGCAGGAGCCTACCTCCCGGACCTTTATTTCAAGACAGTC
4	AAACGAATTATGCGGGGCTTGCAGAACCACCCATG
5	GAAGAACTCATTACACCAGACACCACCCTCATCTGGTTGAT
6	ATTTTTTCGGAGTGTCTTTCCACAGACAATAGGAGCCACCCGAATAGG
7	ATATTTTGGCCGGACGCAAGGAAAGAAGTTTTGAAATATAAC
8	AGCATGTAAGAATAGCCAACGCAGTTGAAATATCTCCTGCAA
9	TAAGAGAAACGCGCGAAAAATGGGTATTAGCCGTTTAAGAAC
10	CATCCTATTTTAAACTAATAGCTCCTGTGTGAAAGCGTTGC
11	CGTATTGCAGCTGCGGTACGCGACAGTGGTGGCAAATAACCAGGAAGC
12	AGATGATAAAATTATAGATTTTTGCTTTATTATTCAATTTCAATACATTT
13	ACTATATGATTATCGGAGCGGCAGATTCTGAATACG
14	CATTTATTGCTGAAACGAGTAGATTTGTGAGCACTTTAGCATCACCTTG
15	AATATCCAATTACTACAAATTGGTTATC
16	TACCGTACGCCTGTGAGTAATTCATAAGATAGCGT
17	TTACCCTACCAAGCCAAAAGAGTTTATCGACAATG
18	TCAATTCATTAGCACATTATGTTTTAGAAAAGGGTAGCTGAAGGTCAT
19	GAGAGGCCGAGGCAATACCACGTTAATA
20	AAAATCTTGTATCGATACACTACTTTTTAAACTCCCTCCTTTATATGCA
21	ACTTCAATTTTCGCATCCCAATCGCAACTTTAAGTTTGTAATA
22	CAGGCTGTCTGCGATATAATGGATGGCT
23	GCGAAACGACCTGCAACTGACCTGACCTAACAAAGGTAAATTATTTAA
24	TTGACGCTAATATCCATCACTCCGAGTAGGTACGCCAGAATC
25	ACATTAATAACTTAGGCAAGCAGAAAACGAGATCCGCCAGA
26	AGGGTTAAGATGAAAACAATAAGCAAAA
27	CACCGCTATACGAGGATCCCCGGGTACCCAGTGCCGTGCTGC
28	CAGTGCCAAGATAAGTCTTTAAGCGTAAACCAGTC
29	CATAAATAACGGAGACCAACCGTGAATTTCTTAGCAAAAAGG
30	GTAGCAACATTGCATAATGGATGATTGTACCTTTTTATTTTAACAAGCA
31	AGCGAAACTTTTTCGGGATCGTTAACAGCTTGATA
32	CTGTTTAATTATTCAAACGTCACCAAACCCTCAGCAATACGT

33	AGGCGAACCCCTGAGTAATTCGCAACCCGCCAAAAAAATTAACCTCAA
34	TATACAGGTCGCTATCTGAGAACTTGCGGCGAGGCAATACCC
35	CTTATCCGATTAAGGGCAACAGGAGGTTACCCTCA
36	GCTCACCAACAGAGAAACATCGATTAGATCTTTAGATCATATGCAGAGG
37	GGGTCAGAGTGTACCGAACAAATTACGCTCAGATA
38	ATTAATTTTGTATAAGCGCCATTTCGCAAGGTGCA
39	CCACCAGCATCTTTGGCACTACGAAGGCATTTGTA
40	GAAGATGCATCAAGTTCTGTAACAAAAT
41	AGCGCATAATAATAAACCTATAGTTAAT
42	AAAGACAGAGCCGCAGAGCCG
43	CATATTAGTGAATAATTTTCCTAACGTCGAACCTAATATTACGAAATAC
44	TTTTGCGCTGTAGCTCAACATAGTTGATAATGGTC
45	TTTTCTTTTCACCAGTGAGAG
46	AAACCAAGGAATAATATTGACTCATAATCCCCTTATTAGCGTTCTGAAA
47	ACAACAAGCTGAGGGCAACGG
48	TATTTAAGTATAAAAACACCGTTTGAAAAAAGAAC
49	GAAAAACACATTCTCATTATCTTATTAATTTTCATGCCTGTTTGAACAA
50	GAACGGGGTTTTAGATCGAGAGTAATAA
51	GTAGGTATTGTTAATCAAAAAAGAGTTGCGGTTTG
52	GGGATAGCAAGCCCAGCCCTCAGGCTGGCAACTTTATAGTAA
53	ACGGATTCTGTCCATTGATTAGTAATAACAGAACACCATATC
54	CAATGAATAAGCCCTAGACGGGAGAATTCTTTACA
55	AAATCTCTAACAGTTTCTGAAACACGGGCAACAGCCGAAATCGGCAATT
56	CTCAATCAAGGAATTGAGGATAACTCGTACCAGAA
57	AATGGAACGTCATATATAAACTATTCTGGCGGATAAGTGCCG
58	TATTAAGAACGTGAGGGTTGGAAGATTTAAATTTAAGATTC
59	TCTATCAGCCGATTAATTAACCGGGAGA
60	AATGCAATCAACAATAAATTCGAGCTTCCGGGTAA
61	AGGCCGGATTAAGAGGTAAAGTTTATTGAAACGCAAAAGAAGAAACGC
62	TTAATTAACCTTGCAAAACAAAATTAATTTACCTG
63	GGGGGTAGAAAGAGGTGTCGAAAAGGAACAACCTCC
64	AATAAGATACATAAAAACATAAATTGCGTTTGCACTTGCTGGTCAATCG
65	ACCTGAAATGCGCGATACATTTGAGGAACTTACCA
66	TATGTGATTTATCCCTTACCATAGCTATAGAAGGATTTGATGCTCATT
67	TCATCACGTACCGCTAAGTCCCTAAGTTTGACCATTGCATTAA
68	ATAGATAAACTGATCGAACACCAGCAGACGCTGATCAAACC
69	AGGAATCTAGAAGGCAAGATTCCTGAATCAATCCAATGAAAA
70	AGGTCATACCAGACCCGAAAGCAGGTCTTGCTTTAAATGTTT
71	TTTATTTAACTTTTCCTAAATCCTTTGC
72	CAACGCCGTACCGACAAAAGGCAACATGATTTACGTTTCCTT
73	TCATCAAAGCATTTCAGACGTT
74	GAGCCACACCGGAAGGAGGGAGTGAATTAATGCAGATATAAAAACATGT
75	TAGCAGCAACTGAACACAAGAAAAGTATAGTAACA
76	CATTACCTCAGTAGCGACAGACGTTTTCCACCACCAACCGCCGAGGCAG
77	AATTTAGGCGTTATAGAAAACTTCTGATCAAATATAACCTCTCATAGG
78	CGGCTTACATCAATGGAACAACAGTAATCCTTCTG
79	CAGTCGGCGCATCGTAACCTTATCATCA
80	CGACGGCGAGCTCGCAATTCCGTGAGCT
81	AATCATGACGACGTGGGTAACGCCAGGGAACCATT
82	GTCGTGCGGCGCCACGCCTGGAATCCTGCCGAGATGACTCCAACGTCAA

83	CCATCGATAGCAGCTCATAGCCAAAATCCACCCTCCGCCAGC
84	CTGAACCTAAAATAGCCGTCACCGAACGATTTTGCATAATCC
85	TAGAGCTTATCGAGCCAGTAA
86	AAGGCGAGTTGGGACCGGAAAGGGACGATTGGTGT
87	CGAGTAACGTCTGGTTCGCATGTATAAGTAAAAC
88	TCATTTGGAGGCGAGAATACCGAGGCCATGCCTGA
89	GATTGAGCCAGAGCATCGGCATTTTTCGGACCGTAAATTAGCA
90	GCCCCCTACCGTTCACGTGTACAGACCAAATAAGG
91	CCGATAGAAGGCCGACAGCATCGGAACAAGTTTCAAAGAGG
92	ATTACCGGCAAGACTACCGACATTGACTTAGAAGGCTATTAACAGAG
93	GATTAAGTGTTTAGTCATTCTCGGTGCGGGGGATAAGCTTG
94	GTACCAGAAACATGATTGAGTATAGCAAACGCTAATTGAAGCATCAAAA
95	GGCAATTGGTTGGGGCGAGAATCATCGTATCATTCAATCAAT
96	CAGGAACAAAGAGTCGCCTGATCAGGTTCTTAGAATGAATTTCTTAAAT
97	CTAATGAACACAACCTCTGGTGAGGGCGAATATAACGTTTTAATGATAAG
98	GAACTGGAATCTACATTCAACACCGTTC
99	CAAACAAGTCAGACACATACATCATATGGGCTGTC
100	CTGTTCAATAAAATGAAAAATCTAATTCCCAGTCGTCATAG
101	AATTACCCTAACGGGTTGAGAATGCCGG
102	TCTCTGAATACGATCTAAAGT
103	TTTGTCGAGAATAGAATCCGCAAAGTACCAAAAAT
104	AAAACCAATATATTGGTTGTATCGGATTTGGGATAATTAATGGGGGTGC
105	ATAAGTATAGCCCGTCAGAGCACGAGTACTGCTCAGGAATTA
106	ACCACCACCGCCTGATAAATTGACAGAT
107	TCGAGAGATTTTCGGAGCCTGACGAGAAAATACCAGTCAAGGGA
108	CTACATTACACGACAGAAACCATTAAATTTAATGG
109	CTTACCGGATAACCCACCCTGAACAAAGGTCAAAA
110	AAAAGGGGCTCATGCGCCAGCTACTTCTTCACGCAAAGGGATTTTAGA
111	ATCATACTTGCGGGAGAAGCTTTGGATTTGAGTAAGGCTGCCCGCTTTC
112	CGGAAGCCATGAGGGAGGGTACTTGCAGGGAGTTATTGCGCCAGCTTGC
113	CCCTCAGGGAACCGGGCGACACTTGAGCCAATAAATAAAGTAATCGCCA
114	GTGGTTCTGATTGCGTAGCCAGCTTTACACCGTTA
115	TGCCTGAGTAATCGCAAATATGAATAGCTTTGATG
116	TCAAATAGAGCCAGCAGCAAATACCGAAAGCCCTAATAGAAC
117	TTTTGCAATAAAAAACCCTGTATGTGAGAGATGGGGAAACCTAACTCAC
118	ATAAATCATAACAGGTGCCTTGTAAGAGGCGGGGTTTTGCTCA
119	CTTTCCACAAGAAAAATAATACAGTAAGAGCGCAG
120	AACAGTTGCAAAGATACTAATGTTTGAGCCAGGCACCGCTCAAATTCGT
121	CTACAAACAATCATAAACAGAGTGTTGCCCCAGC
122	TTATATATCAATAGTCCTTGAATCAATAAACAATT
123	AATTGCGAATAATATTTTCGAGTAAACGCATTAAAAAAGCGA
124	ATGAACGGAGTCTGATATTCATAATGCA
125	AGGGCGAATCAAATTAATTTGTAAACTAGAATCG
126	GCCAAAATTCAGTGGGCGCATATAGTTAGCGTATTGCTTTCA
127	AAGCCAGATTGACATATAAAATTTGCACCAAGAAC
128	GGATTAGCTGAGACTCAGAGAAAGCCCTATTTTATAGTTGCTAGAAGAG
129	TGTATCACCGTACTCCACCCTAGATGGTACCCAAAAGCAACA
130	TAACATAAAAAACGGACGTTGG
131	AACCCTCAAATAGCAGACTGGGGAACCGTCCATGTGTTTCAGCACGTTG
132	TGTAGCGATCAAGTATCACCAGTAGCACTCACCGA

133	AGTAAATTTCAACATACTTAGCGATTATGACTATT
134	TTCAACCAGAAAATTAAGGTACTCCTTAGTTACC
135	TGAGAAAGTTAAAACCTTCCTCCTCACGGGTGGT
136	GAATCATCATCCTATTTCAGCTATCACCG
137	GAATCCCGCAATAACTGAAAAATCGGCC
138	AGCATGTGGCTATCTAAATTTAGGATAGTAAGTCAACGT
139	ATGAAAGTTTACATCGAATCCCTTATAAAAAACCG
140	TCTGCCAAGTAGTAAGATACAATATCGCGTTTTGAACATGAC
141	GTGCCCGCATGGCTAACCGAGCTGGCATGGTATTC

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. DNA Origami Nanodemetlerinin Oluşturulması

60 Helis demeti DNA nanoyapıları (DNA-NY) daha önce rapor edildiği şekilde m13mp18 virüsünden elde edilmiş 7249 baz uzunluğundaki DNA iskelesinin bir grup kısa zımba zincirler ile katlanması ile oluşturulmuştur [226]. Buna göre şu bileşenler birleştirilerek katlama çözeltisi oluşturulmuştur,

- 20 ml m13mp18 iskele (100 nM)
- 40 ml zımba oligomerler (500 nM)
- 40 ml katlama tamponu, 2.5X TAE, 12.5 mM NaCl ve 50 mM MgCl<sub>2</sub>

Katlama çözeltisinin toplam hacmi 100 µL olacak şekilde thermocycler (TC-Plus, Techne Inc.) kullanılarak termal tavlama işlemine tabi tutulmuştur ve 65 °C'den 60 °C'ye kadar her 15 dakika'da 1 °C düşürülerek işlem gerçekleştirilmiştir. Ardından 60 °C'den başlayarak 40 °C'ye kadar bu sefer her 45 dakikada 0.25 °C düşürülerek işlem gerçekleştirilmiştir. Daha sonra örnekler 12 °C'de termocyclerda muhafaza edilmiştir.

Daha sonra fazla zımba DNA'lar ise polietilen glikol (PEG) bazlı saflaştırma ile uzaklaştırılmıştır [14]. 200 µL DNA-NY ve zımba oligomerlerden oluşan çözelti üzerine 600 µL 1x katlama tamponu (1x TAE, 5 mM NaCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.57) eklenip konsantrasyon 4 kat seyreltilmiş, böylelikle 800 µL'lik bir çözelti elde edilmiştir. Elde edilen çözelti 1:1 oranında 800 µL PEG presipitasyon tamponu

(%15 PEG-800 (ağırlık/hacim), 1xTAE, 505 mM NaCl) ile karıştırılarak oda sıcaklığında, 30 dakika, 14000 rcf ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve çökelti 1x katlama tamponu içerisinde başlangıç hacminde yeniden çözülmüştür. Saflaştırılmış bu stok çözelti, deneyden önce bir gece oda sıcaklığında bekletilerek çalışmalar yapılmıştır.

DNA origami konsantrasyonu Beer-Lambert eşitliği ile hesaplanmıştır;

$$OD_{260} = e_{260} \cdot C_{DNA} \cdot l \quad (3.1)$$

$OD_{260}$  : 260 nm dalga boyundaki optik densite,

$e_{260}$  : yaklaşık ekstinksiyon katsayısı ( $0.9 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-1}$ ) [227],

$C_{DNA}$  : DNA nanoyapı konsantrasyonu,

$l$  : santimetre cinsinden ışığın aldığı yoldur (0.05 cm).

Optik densite Inovia MSP Touch-200 ile ölçülmüştür.

### 3.2.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntülenmesi

Çalışmamızda elde edilen DNA-NY ve nisin yüklü DNA-NY'lerin boyutu ve yüzey özellikleri ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda, Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) (FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin Yüksek Kontrastlı, Oregon, ABD) ile 50 nm ve 100 nm büyütmelerinde incelenmiştir. Her örnek hazırlama aşamasında tuz kristallerinin görüntü almaya engel olmaması için örnekler analiz öncesi su ile yıkanmışlardır.

### 3.2.3. Antimikrobiyal Aktivitelerin Belirlenmesi

Antimikrobiyal etki değerlendirmesi, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA, ATCC 43300) ve vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* (VRE, ATCC 51299) üzerinde incelenmiştir. Mikroorganizmaların Mueller Hinton Broth'ta geliştirilen 24 saatlik bakteri kültürü serum fizyolojik kullanılarak seyreltilmiş, 600 nm'deki spektrofotometrik ölçümleri BIOTEK GEN5 Elisa

Reader PowerWave XS2 (BioTek Instruments, Inc., ABD) ile yapılmış ve çalışmada kullanılacak  $10^5$  konsantrasyona getirilmiştir.

Nisin ve nisin yüklü DNA-NY'ların etki değerlendirmeleri mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla nisin, DNA-NY ve nisin yüklü DNA-NY örnekleri 96 kuyulu mikroparka kullanılarak karşılaştırmalı olarak ele alınmıştır. Çalışmada kullanılacak DNA-NY'lar iki kez su ile yıkanarak ortamdaki TAE tamponu uzaklaştırılmıştır. Çalışmada öncelikle nisin ve DNA 154/1 molar oran olacak şekilde oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bir sütunda DNA (16.20 nM), bir sütunda nisin (2.50  $\mu$ M) ve bir sütunda da nisin yüklü DNA (16.20 nM DNA + 2.50  $\mu$ M nisin) olacak şekilde 7'şer konsantrasyon çalışılmıştır (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2** DNA-NY, nisin ve nisin yüklü DNA-NY çözeltilerinin antimikrobiyal etki değerlendirmesinde kullanılan konsantrasyonları

Örnek	Sadece DNA-NY (nM)	Sadece Nisin Konsantrasyonu ( $\mu$ M)	DNA-NY (nM) ve Nisin ( $\mu$ M) Konsantrasyonları
1	16.20	2.50	16.20 + 2.50
2	8.10	1.25	8.10 + 1.25
3	4.05	0.63	4.05 + 0.63
4	2.03	0.31	2.03 + 0.31
5	1.01	0.16	1.01 + 0.16
6	0.51	0.08	0.51 + 0.08
7	0.25	0.04	0.25 + 0.04

Her bir kuyuya sayısı  $10^5$  olacak şekilde MRSA veya VRE bakterileri eklenmiştir. Ayrıca nisinin mikroparkaya tutunmasını engellemek için 5 mg/ml sığır serum albümini (BSA) eklenerek [225], 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir (Çizelge 3.3).

İnkübasyon sonrası 600 nm'de spektrofotometrede OD ölçülerek, bakteri hücrelerinin % canlılıkları eşitlik 3.2'ye göre hesaplanmıştır.

**Çizelge 3.3** Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar, inkübasyon sıcaklığı, süresi ve geliştiği besi ortamı

Mikroorganizma adı	İnkübasyon sıcaklığı	İnkübasyon süresi	Geliştiği besi ortamı
Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA, ATCC 43300)	37 °C	24 saat	Mueller Hinton Broth
Vankomisine dirençli <i>Enterococcus faecalis</i> (VRE, ATCC 51299)	37 °C	24 saat	Mueller Hinton Broth

#### 3.2.4. Sitotoksik Aktivitelerin Belirlenmesi

Nisin, DNA ve nisin yüklü DNA çözeltilerinin sitotoksik aktiviteleri MCF-7 meme kanseri hücre hattı ve L929 sağlıklı fare fibroblast hücre hatlarına karşı incelenmiştir. -80 °C'de stok halinde bulunan hücreler, 37 °C'de çözündürülerek 2 ml DMEM eklenmiş, 2000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Ardından çöken MCF-7 hücreleri DMEM besiyeri ile L929 hücreleri ise RPMI besiyeri ile homojenize edilerek 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> altında Binder CB150 (Binder, Almanya) inkübatörde inkübe edilmiş, 24 saatlik taze kültür elde edilmiştir (Çizelge 3.4).

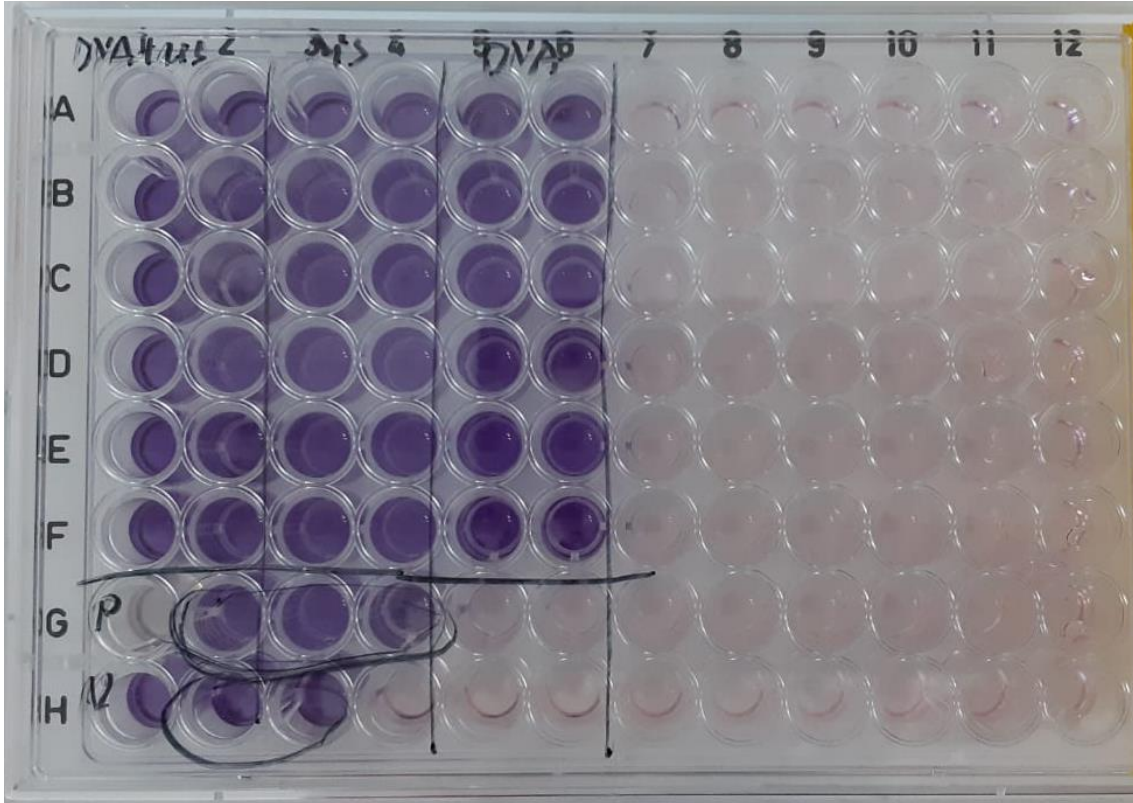
**Çizelge 3.4** Çalışmada kullanılan hücre hatları ve fizyolojik koşulları

Hücre Hattı	İnkübasyon sıcaklığı ve ortamı	İnkübasyon süresi	Geliştiği besi ortamı
MCF-7 (meme kanseri)	37 °C, %5 CO <sub>2</sub>	24 saat	DMEM (%10 FBS, %1 penisilin/streptomisin)



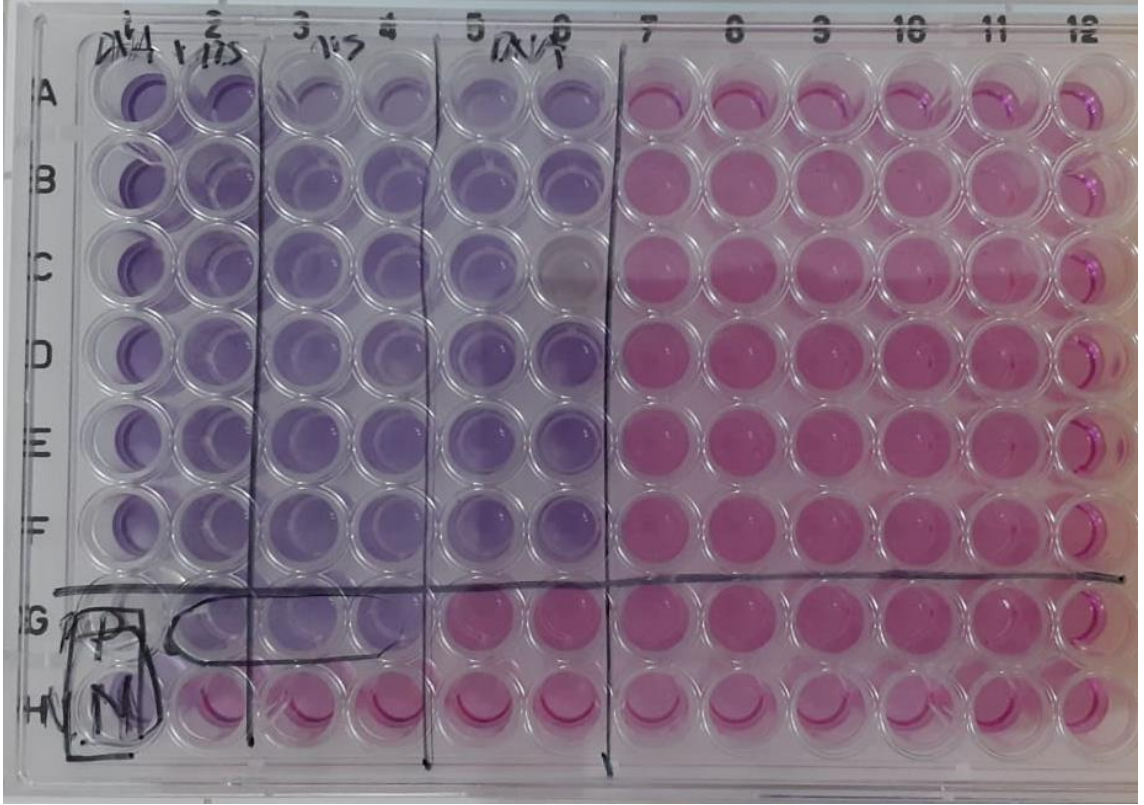
L929 (sağlıklı fare fibroblast)	37 °C, %5 CO <sub>2</sub>	24 saat	RPMI besiyeri (%10 FBS, %1 penisilin/streptomisin)
---------------------------------	---------------------------	---------	--

Logaritmik üreme fazına getirilmesinin ardından MCF-7 meme kanseri ve L929 sağlıklı fare fibroblast hücreleri mikrokuyuculara iki tekrarlı olarak, birinci örneklerimiz sadece DNA-NY (16.20, 8.10, 4.05, 2.03, 1.01, 0.51 nM konsantrasyonlarında), 2. örneklerimiz sadece nisin içeren (2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0.08 µM) ve 3. örneklerimiz yani her ikisini (nisin ve DNA-NY) içeren olacak şekilde 6'şar konsantrasyon çalışılmıştır. Kontrol olarak, negatif kontrolde sadece MCF-7 hücre (Şekil 3.1 H satırı) pozitif kontrolde ise sadece %20 DMSO (Şekil 3.1 G satırı) kullanılmıştır. Bileşiklerin üzerine 5000 adet MCF-7 ve L929 hücresi 96 kuyucuklu mikrolakalara eklenmiş, 24 saat 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde bekletilmiştir, sonuçlar Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de görülmektedir.



**Şekil 3.1** MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı bulunan mikrolak

İnkübasyon sonunda kuyuların tabanında bulunan hücrelerin üzerindeki besiyerleri mikropipetle alınarak her kuyucuğa 10 µl MTT çözeltisi eklenmiş ve 37 °C %5 CO<sub>2</sub> ortamında 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda MTT çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırılarak her kuyucuğa 100 µl izopropanol eklenmiş ve 570 nm'de optik dansite (OD) ölçümleri yapılmıştır.



**Şekil 3.2** L929 sağlıklı fare fibroblast hücre hattı bulunan mikropilaka

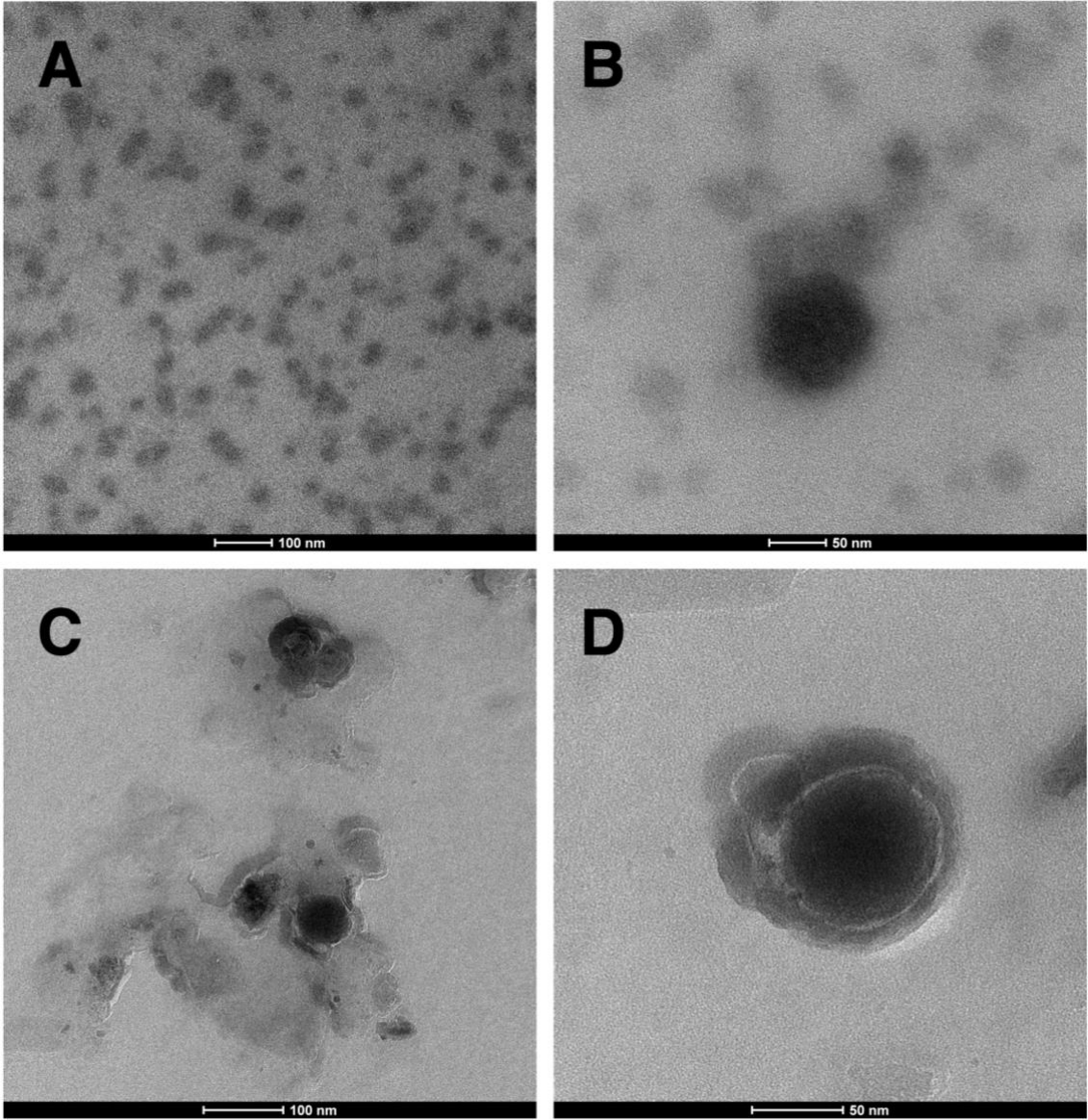
Negatif kontrol grubu ile üç grup örneklerin kıyaslaması yapılmış, ardından % hücre canlılığı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = \left( \frac{\text{Örnek OD}}{\text{Kontrol OD}} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. DNA Nanoyapının Karakterizasyonu

Yapılan tez çalışmasında DNA nanoyapıları, Bölüm 3.2'de belirtildiği gibi DNA origami yöntemi ile oluşturulmuştur [226]; özel katlanma tamponu içerisinde tek zincirli uzun iskele DNA (m13mp18) ve 141 farklı kısa 'zımba' zincir, 65°C sıcaklıktan başlayarak soğutma işlemine tabi tutulmuş, oligonükleotitlerde bulunan sekanslar eşlenikleriyle bir araya getirilmiş ve katlanarak istenilen en son DNA-NY elde edilmiştir. DNA nanoyapının oluşumunda komşu çift zincirler arasındaki elektrostatik etkileşimleri azaltmak amacıyla Mg<sup>2+</sup> iyonları içeren TAE tamponuna yer verilmiştir [56]. Bu süreç sonunda polietilen glikol (PEG) bazlı saflaştırma ile reaksiyona girmeyen fazla zımba zincirler uzaklaştırılmıştır.



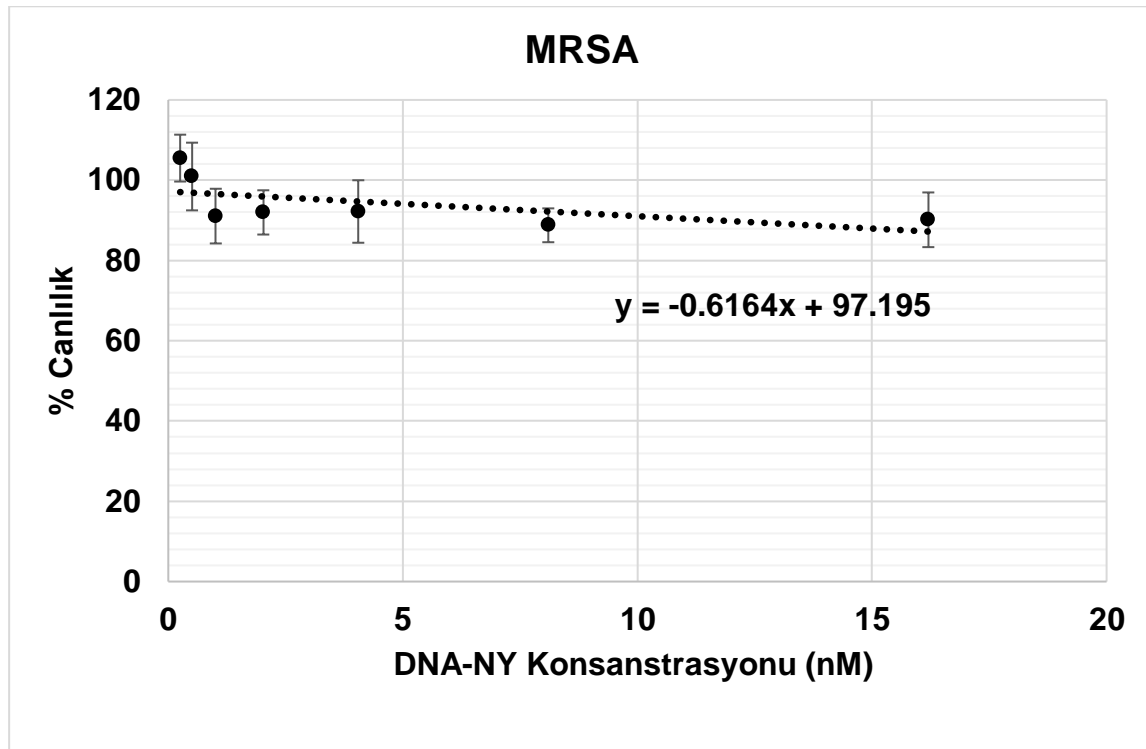
**Şekil 4.1** A,B) DNA Nanoyapıların ve C,D) Nisin yüklü DNA nanoyapıların Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) görüntüleri. Ölçekler: A) ve C) 100nm, B) ve D) 50 nm.

Oluşturulan DNA nanoyapıların yüzey, şekil ve boyut özellikleri geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile karakterize edilmiştir. Şekil 4.1 incelendiğinde DNA nanoyapıların 50 nm boyutunda olduğu ve boyutunun nisin yüklendiğinde 70 nm civarına çıktığı gözlemlenmiştir. Bu boyut artışı, katyonik nisin ile negatif yüklü DNA nanoyapının elektrostatik olarak bağlandığını göstermektedir.

## 4.2. Antimikrobiyal aktivitenin incelenmesi

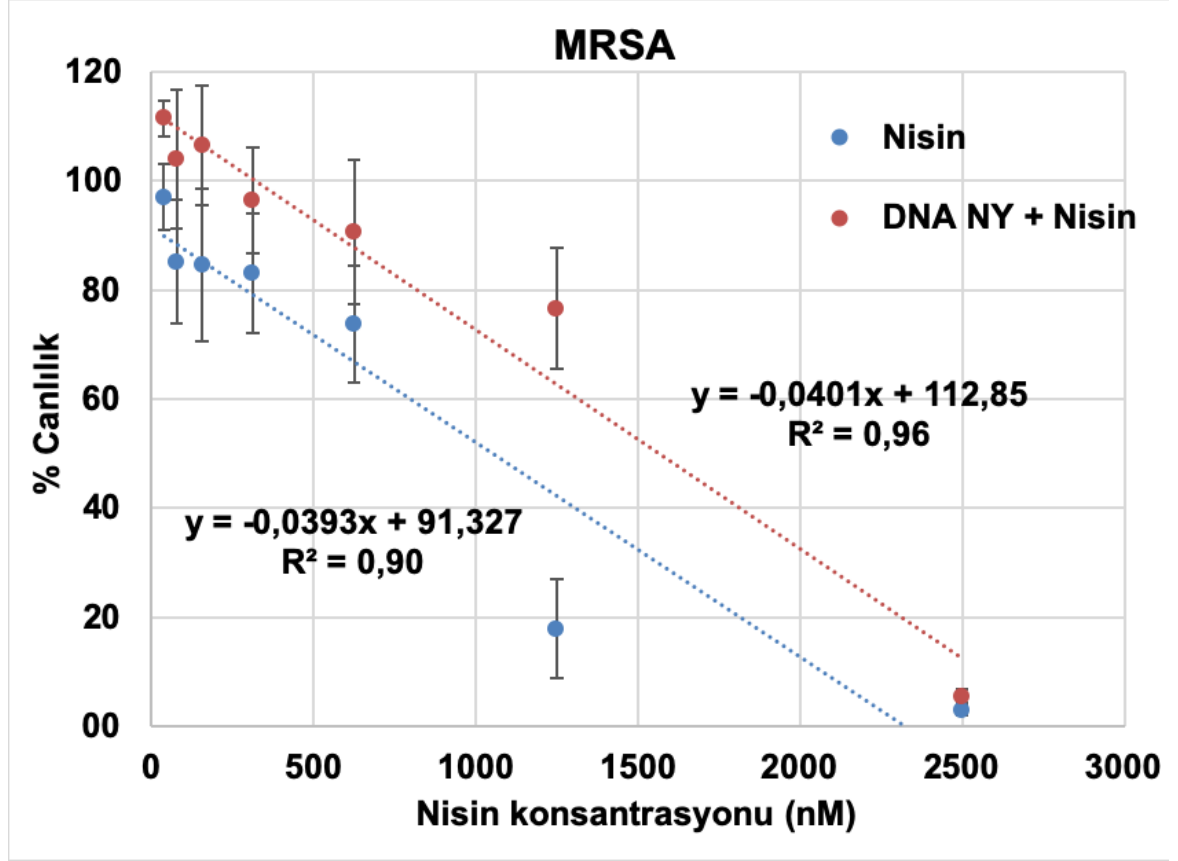
Geliştirilen nisin yüklü DNA nanoyapı bazlı ilaç taşıma sisteminin antimikrobiyal etki değerlendirmeleri metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* (VRE) üzerinde incelenmiştir. Deneysel çalışmalarda açıklanan mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen örnekler incelenmiş, sadece nisin, sadece DNA-NY ve nisin yüklü DNA-NY içeren kuyucuklardaki MRSA ve VRE bakterilerinin yüzde canlılık değerleri deneysel çalışmalardaki eşitlik 3.2'ye göre hesaplanarak grafiklendirilmiştir.

1. örneğimiz olan sadece DNA-NY kullanıldığında konsantrasyon arttıkça canlılık oranları %90-95 civarında korunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2)



**Şekil 4.2** Sadece DNA-NY ile inkübe edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) bakterilerinin değişen DNA-NY konsantrasyonlarına karşılık gelen % canlılık değerleri

Bu sonuç değişen DNA-NY konsantrasyonu ile MRSA bakterilerinin sayısının hemen hemen değişmeden kaldığını göstermektedir ve DNA-NY'nın kendi başına MRSA üzerinde bir bakterisidal etkisinin olmadığını göstermektedir.

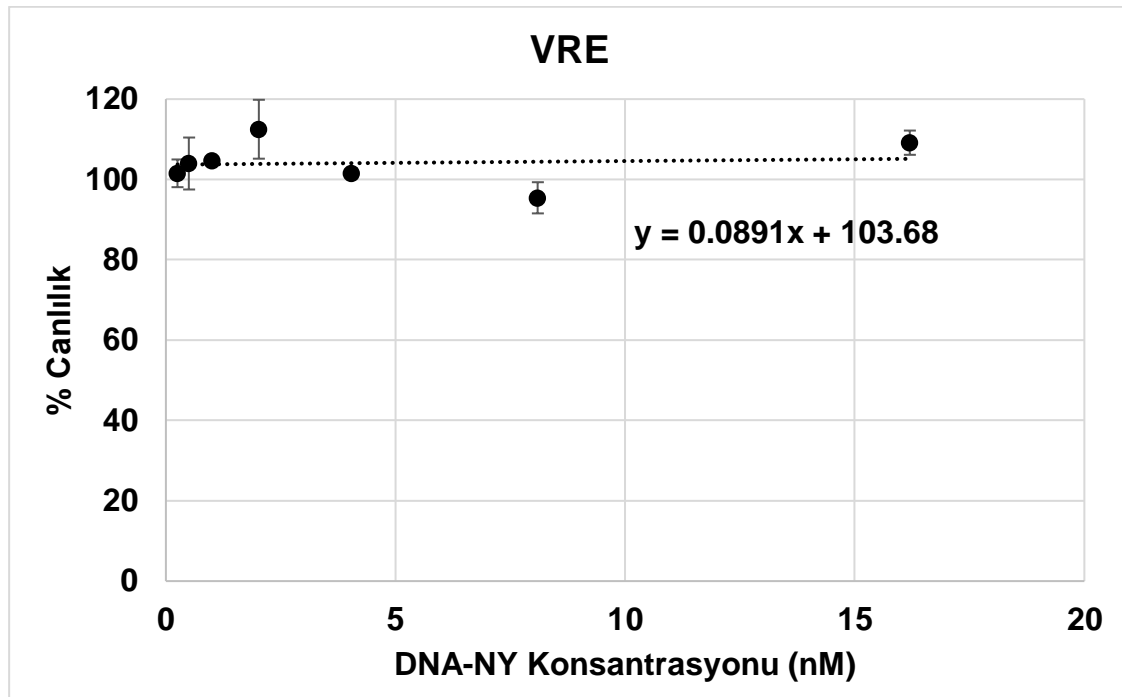


**Şekil 4.3** Nisin konsantrasyonuna karşılık gelen sadece nisin ve nisin yüklü DNA-NY'lar ile inkübe edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) % canlılıkları

2. ve 3. örneğimiz olan nisin ve nisin yüklü DNA-NY sonuçları Şekil 4.3'te verilmiştir. Şekil incelendiğinde sadece nisin içeren kuyucuklarda nisin konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak canlılık oranının düştüğü, inhibisyon oranının arttığı görülmüştür. Bu canlılık oranı 2500 nM'da %3'e kadar düşmektedir. 3. örneğimiz olan DNA-NY'ya nisin yüklü kuyucuklarda da hemen hemen aynı değerler (%5) saptanmıştır. İnhibisyon oranı yönünden baktığımızda her iki örneğimizde de inhibisyon oranının %95 ve %97 civarında olduğu bu da nisin lantibiyotiginin MRSA'ya karşı oldukça etkili olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.3'te görüldüğü gibi, nisin MRSA bakterilerinin %50'sini öldürdüğü IC<sub>50</sub> değeri 1051 nM (3.50 mg/L), nisin yüklü DNA-NY'nın ise 1567 nM (5.20 mg/L) olarak bulunmuştur. R<sup>2</sup> korelasyon katsayılarına (0.90 ve 0.96) bakıldığında deney sonuçlarının güvenilir olduğu doğrulanmıştır.

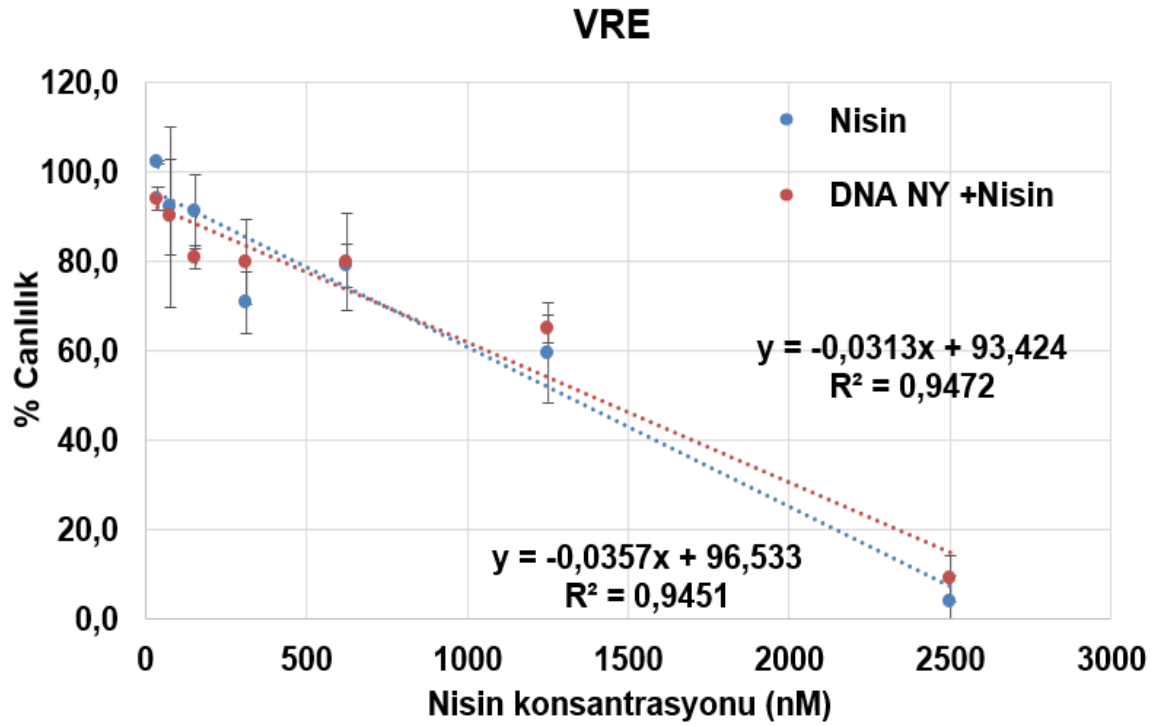
Yapılan kaynak araştırmasında nisin MRSA'ya karşı IC<sub>50</sub> değeri Brumfitt ve arkadaşlarının ulaştığı 6 mg/L ile uyumluluk göstermektedir [145]. MİK değerleri ile ilgili kaynaklar incelenmiş ve çalışmalarda %100 öldürmenin gerçekleştiği minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri 12.8 mg/L [228], 1.5-16 mg/L [145], 1-32 mg/L [229] olarak bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada nisin MRSA popülasyonunun %97'sini inhibe ettiği değer 8.3 mg/L (2.50 µM) elde edilmiştir bu da literatürdeki veriler ile paralellik arz ettiğini göstermektedir. Nitekim Piper ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı çalışmada *S. aureus* suşlarına karşı nisin ve laktisin 3147 lantibiyotikleri karşılaştırıldığında nisin, laktisin 3147'ye kıyasla daha iyi aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [150]. Bu da nisin metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'ya karşı antimikrobiyal ajan olarak kullanım potansiyelini desteklemektedir.





**Şekil 4.4** Sadece DNA-NY ile inkübe edilen vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis*'in değişen DNA-NY konsantrasyonlarına karşılık gelen % canlılık değerleri

Yapılan diğer % canlılıkla ilgili deneysel çalışmamızda VRE'ye karşı sadece DNA-NY kullanılan örneklerde, artan DNA-NY konsantrasyonuna karşılık VRE bakterilerinin canlılık oranlarında bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.4). Bu veriler DNA-NY'sının sadece kendi başına VRE üzerinde öldürücü bir etkisinin olmadığını göstermektedir.



**Şekil 4.5** Nisin konsantrasyonuna karşılık gelen sadece nisin ve nisin yüklü DNA-NY'lar ile inkübe edilen vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis*'in % canlılık değişimleri

Artan nisin konsantrasyonlarına bağlı olarak, sadece nisin içeren kuyucuklarda 2500 nM konsantrasyonda kullanılarak vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis*'in %96'sının inhibe olduğunu söyleyebiliriz, nisin yüklü DNA-NY'ların ise %91'ine kadarını inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.5). Artan nisin



konsantrasyonu ile vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* canlılıklarının azaldığı, inhibisyon oranlarının arttığı görülmüştür.

Diğer taraftan Şekil 4.5'te görüldüğü gibi, nisinin vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis*lerin %50'sinde bakterisidal etki yaptığı IC<sub>50</sub> değeri 1303 nM, nisin yüklü DNA-NY'ların ise 1387 nM olarak bulunmuştur. R<sup>2</sup> korelasyon katsayıları ise sırasıyla 0.94 ve 0.95 olarak saptanmış olup sonuçlarımızın güvenli olduğunu göstermektedir. Bununla ilgili yapılan kaynak araştırmasında nisinin VRE'ye karşı IC<sub>50</sub> değeri Brumfitt ve arkadaşlarının ulaştığı 4 mg/L ile uyumluluk göstermektedir [145]. Ve yukarıda belirtilen literatür taramasında bazı çalışmalarda minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerinin ise 1.5-16 mg/L [145] aralığında olduğu görülmüştür. Çalışmamızda sadece nisinin, vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis*'in %96'sını inhibe ettiği değer 8.3 mg/L (2.50 µM) de literatür ile paralellik arz etmektedir. Bunun yanında nisinin *S. aureus* suşlarına karşı vankomisine dirençli *enterekoklara* kıyasla daha etkili olduğu bilinmektedir, nitekim çalışmamızda da yine aynı konsantrasyon değerlerinde nisinin MRSA'ya karşı VRE'ye kıyasla daha etkin olduğu gözlemlenmiştir [150].

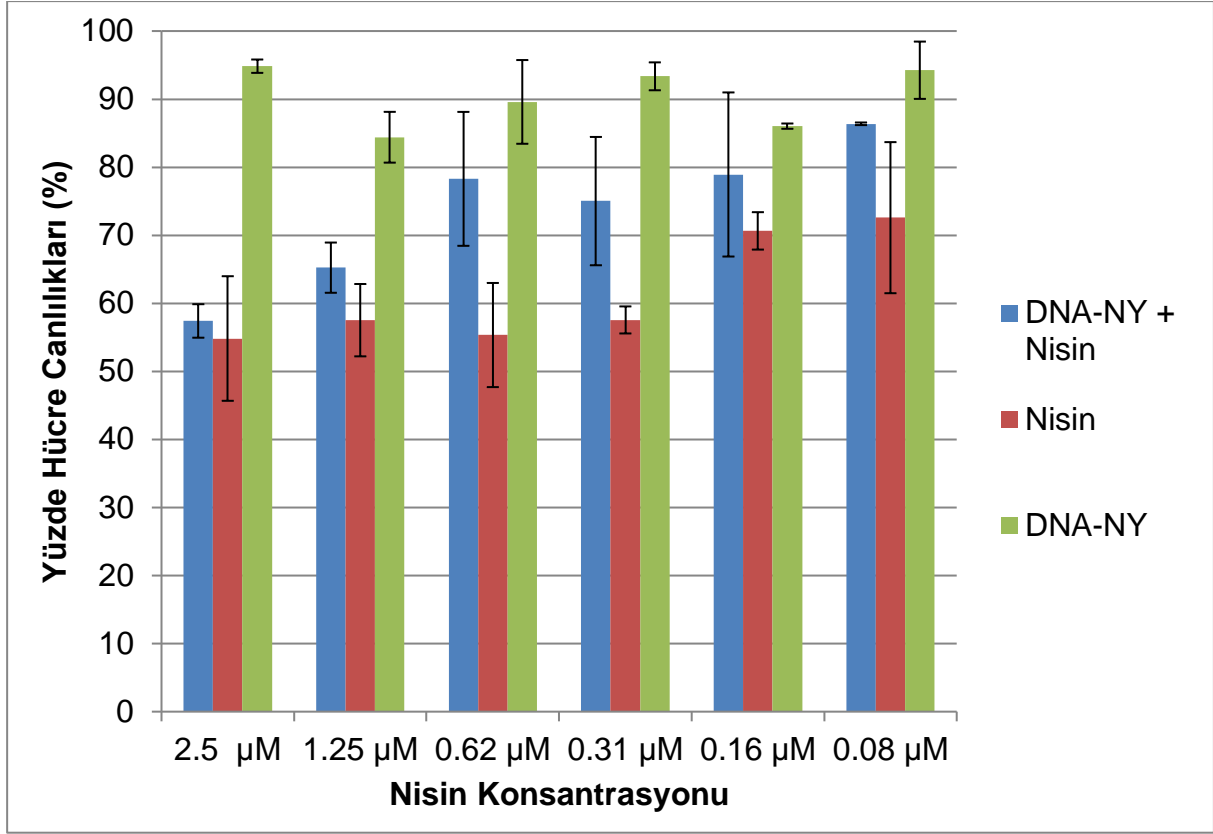
Her iki bakteri suşu için de sadece DNA-NY kullanılan kuyucuklarda canlılık üzerinde herhangi bir etkide bulunmadığı görülmüştür. Fakat sadece nisin ve nisin yüklü DNA-NY kullanılan kuyucuklarda her iki bakterinin de inhibisyonunun gerçekleştiği görülmüştür ve bakterisidal etkinin nisin kaynaklı olduğunu göstermiştir. Nisinin stafilokok suşlarında antimikrobiyal etkisini hücre zarında 2 nm boyutunda porlar açarak göstermekte, böylece hücreyi lizize götürmektedir [230]. Ayrıca, nisinin yine bazı stafilokok suşlarında bölünen hücreler arasındaki septanın hücre duvarında degradasyona neden olarak lizize neden olduğu bildirilmektedir [231]. Lantibiyotikler bakteriler tarafından endositoz ile alınmazlar bu yüzden nisinin antimikrobiyal özellik göstermesi için bakteri yüzeyine erişimi önemlidir [113]. Sadece nisin, nisin yüklü DNA-NY'lara kıyasla her iki bakteriye karşı da görece daha yüksek canlılık göstermiştir, buna neden olarak nisinin bir kısmının DNA-NY içerisine interkale olarak daha az nisinin bakteri hücresinin yüzeyi ile temasa geçmesi gösterilebilir. Sonuç olarak antimikrobiyal aktivitesi

nisini çoklu ilaca dirençli MRSA ve VRE gibi suşlar ile mücadelede mükemmel bir aday yapmaktadır [143]. Bu çalışma ile de nisinin murein sentezini engellediği, zarda porlar oluşturarak hücreyi lizize götürdüğü, DNA nano yapılı ilaç taşıma sistemi geliştirilerek nisinin bu bakterilere karşı etkin bir şekilde kullanılabilirliği gösterilmiştir.

### **4.3. Bazı Doku Hücrelerinde Sitotoksik Aktivitenin İncelenmesi - İn Vitro Çalışmalar**

Nisinin sitotoksik aktivitelerinin incelenmesi amacıyla insan meme kanseri hücreleri (MCF-7) ve fare fibroblast hücreleri (L929), 96 kuyucuklu mikropalakaya ekilerek 6 farklı konsantrasyondaki (2.5  $\mu$ M, 1.25  $\mu$ M, 0.625  $\mu$ M, 0.312  $\mu$ M, 0.156  $\mu$ M, 0.078  $\mu$ M), a) sadece nisin, b) DNA-NY ve c) nisin yüklü DNA-NY ile 24 saat inkübe edilmiştir. MTT yöntemine dayanarak her biri için oluşan formazan miktarı belirlenmiş ve kontrol kültürlerindeki değerler ile kıyaslanmıştır. Bileşiklerin insan meme kanseri hücreleri (MCF-7) ve fare fibroblast hücrelerine (L929) karşı etki değerlendirilmeleri

Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’te gösterilmiştir.

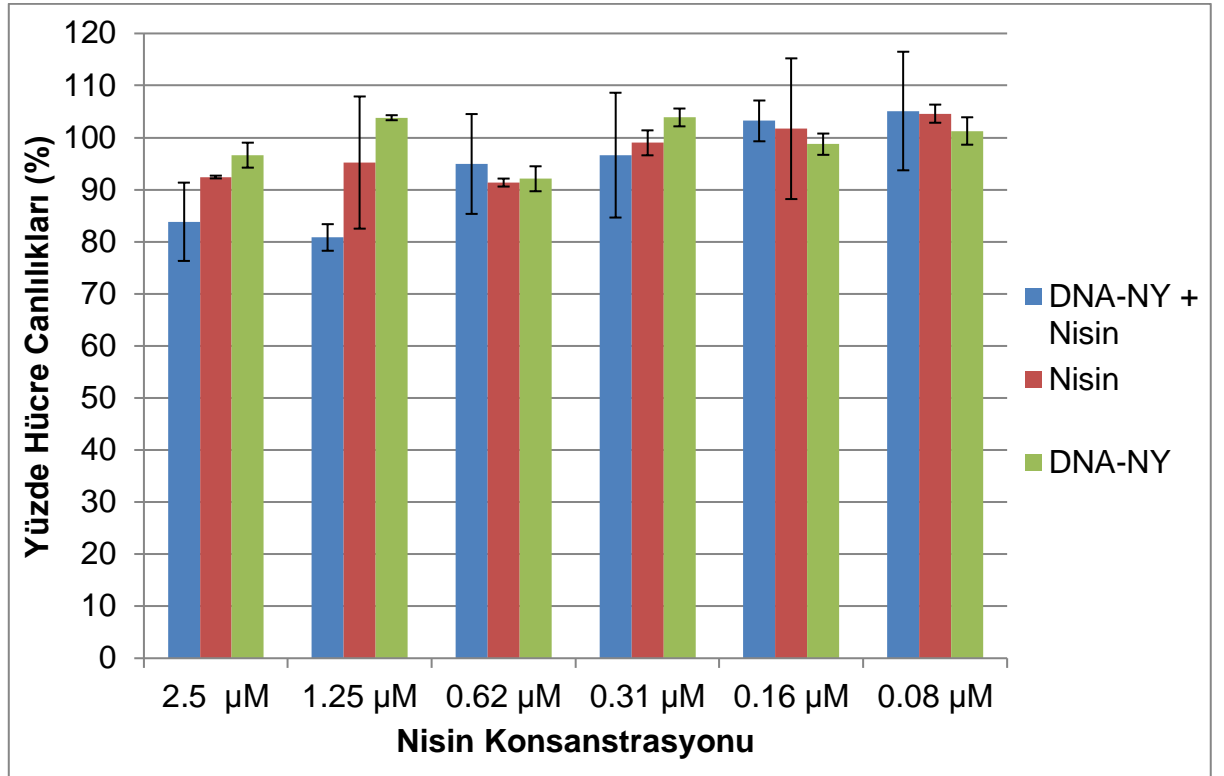


**Şekil 4.6** Değişen nisin konsantrasyonlarında A) sadece nisin, B) DNA-NY ve C) nisin yüklü DNA-NY ile etkileştirilen meme kanseri hücrelerinin (MCF-7) % hücre canlılık değişimleri

Şekil 4.6 değerlendirildiğinde nisinin insan meme kanseri hücrelerine (MCF-7) karşı 0.31 µM nisin konsantrasyonundan başlayarak artan nisin miktarlarında hücreye sitotoksik etkisi görülmektedir. Buna göre sadece nisin, hücrelerin yaklaşık %45’inde sitotoksik etki göstermektedir. Nisinin DNA-NY ile beraber kullanıldığı durumlarda ise sitotoksik değerler %43 oranında olduğu görülmektedir. Bu da Avand ve arkadaşlarının nisinin MCF-7’ye karşı bulduğu sitotoksik değerleri (2.5 µM nisin ile %45 inhibisyon, 1.25 µM nisin ile %35 inhibisyon) ile karşılaştırıldığında uyumluluk göstermektedir [232]. Sadece nisin ve nisin yüklü DNA-NY’lerin kendi aralarında kıyaslama yapıldığında nisinin görece daha etkin olduğu görülmüştür.

Kaynak araştırmalarında da görüldüğü üzere, katyonik olan nanopartiküller negatif yüklü olan hücre yüzeyinden kaynaklı olarak, nötr ya da negatif yüklü

nanopartiküllere kıyasla hücre içerisine daha iyi alınmaktadır. Bu nedenle katyonik olan nisin, negatif yüklü DNA-NY üzerine yüklenmesinin ardından oluşan yük değişimi hücre membranı ile olan elektrostatik bağlanmayı azalttığı ve dolayısıyla da daha az hücre inhibisyonu sağladığı söylenebilir [233, 234]. Nisin'in kullanılmadığı ve sadece DNA nanoyapının kullanıldığı örneklerde ise %95'lere varan hücre canlılığı görülmüştür bu da DNA nanoyapısının tek başına sitotoksik etki göstermediğini kanıtlamıştır.



**Şekil 4.7** Değişen nisin konsantrasyonlarında A) sadece nisin, B) DNA-NY ve C) nisin yüklü DNA-NY ile etkileştirilen sağlıklı fare fibroblast hücrelerinin (L929) % hücre canlılık değişimleri

Nisinin sağlıklı fare fibroblast hücrelerine (L929) karşı etkinliği incelendiğinde ise 2.5 µM (8.3 mg/L) konsantrasyonda sadece nisin kullanıldığında hücrelerin %8'lik bir kısmının, DNA-NY üzerine yüklendiğinde ise %17'lik bir kısmının sitotoksik etki gösterdiği görülmüş, 0.312 µM'dan ve daha düşük konsantrasyonlarda ise ihmal edilebilecek bir düzeyde hücre ölümü gerçekleşmiştir (Şekil 4.7). Nisin yüklenmiş DNA-NY'lar sadece nisin ile karşılaştırıldığında ise kayda değer bir

fark gözlenmemiştir. Benzer şekilde sadece DNA-NY'lar ile inkübe edildiğinde de hücrelerin canlılıkları üzerinde bir etki görülmemiştir. Nisin taşıma için geliştirilmiş olan DNA nanoyapı temelli ilaç taşıma sistemi MCF-7 ve L929 hücrelerine karşı etki değerleri beraber incelendiğinde, MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı %40-45 oranında bir hücre ölümüne karşılık L929 normal fare fibroblast hücrelerinin sadece %8'lik bir kısmı ölmüştür. Buna göre ilaç taşıma sistemi kanserli hücreleri öldürmede oldukça başarılıyken sağlıklı hücrelerin ise sadece küçük bir kısmını öldürmüştür. Nisinin seçici olarak kanser hücrelerini öldürmesi, hücrelerin membranlarındaki farklılıklara bağlı olduğu; hücreler arası bağlantı bölgelerinden olan ve haberleşme sisteminde önemli yeri bulunan gap junctionları (hücreler arası geçit bölgeleri) ve hücreler arası haberleşmeyi bozduğu şeklinde açıklanabilir [235]. Tümör hücreleri kontakt inhibisyon kuralına uymazlar, genel olarak net negatif yük taşırlar, hücre membranında fosfatidiller, fosfatidil serin ve etanolamin gibi anyonik molekülleri bulundururlar [236-238]. Nisin hem katyonik hem de hidrofobik karakterlidir, böylece hücre membranında bulunan fosfolipitlerin hem negatif yüklü baş kısmı ile hem de lipofilik kuyruk kısmı ile etkileşime geçerler [239]. Katyonik nisin ile kanser hücrelerinin anyonik membranı arasındaki bu elektrostatik etkileşim nisinin seçici sitotoksitesinde büyük bir rol oynamaktadır.

## 5. YORUM

DNA nanoteknolojisi nanometre düzeyindeki mühendisliğin dikkate değer örneklerindedir; nanoteknoloji, nanotıp ve biyomedikaldeki biyolojik yaklaşımların, biyonanoteknoloji ve nanobiyoteknolojinin önemli olduğu günümüzde ağırlığını hissettirmeye başlamıştır. Özellikle genomik ve proteomik alanlarında ciddi gelişmeler olmaktadır [240]. Kansere dünya genelinde önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır, 2020 yılında yaklaşık 10 milyon ölümden sorumludur [241].

Genomik ve klinik mikrobiyoloji alanında, enfeksiyon hastalıkları başta olmak üzere kanser vb. hastalıkların tedavisinde biyoyumlu, biyobozunur ve toksik olmayan ilaç taşıma ajanlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında DNA origami yöntemiyle sorunların çözümüne katkı sağlanmak amaçlanmıştır.

DNA origami yöntemi ülkemizde çok yeni bir alandır ve grubumuz dışında ülkemizde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır [242]. Teze yönelik ön çalışmalarda DNA origami yöntemi ile DNA nanoyapılar oluşturulmuş, sistein-maleimit bağının seçiciliğinden faydalanarak bu yapıları polimer ile kaplamak için başlatıcı geliştirilmiştir [15]. İlaç salım sistemlerinde, partikül boyutu, şekil ve fonksiyonellikler çok önemli parametrelerdir ve konvansiyonel sistemler bu konuda yetersiz kalmaktadır, DNA origami yöntemi ile sınırlar aşılarak hemen hemen istenilen tüm şekiller elde edilebilmektedir [243]. Ayrıca aptamerler ile beraber kullanılarak seçicilikleri ve etkinlikleri de artırılabilen böylelikle üstün özelliklere sahip DNA nanoyapılar geliştirilebilmektedir [244, 245]. Lantibiyotikler ve özellikle nisin bakteriyel direnç oluşturma olasılığının düşük olması, FDA onayına sahip olması, geniş spektrumda etkinlik göstermesi ve antimikrobiyal konsantrasyonlarda düşük sitotoksite oluşturmamasından dolayı antibiyotik direnci kazanmış patojenlere karşı tedavide umut vadetmektedir [246, 247].

Tez çalışmamızda, lantibiyotik taşınmasında kolay ve yaygın olarak kullanılabilir DNA origami yöntemiyle DNA nanoyapılar geliştirilmeye çalışılmıştır.

Bu amaca yönelik olarak m13mp18 tek zincirli viral uzun iskele DNA ve 'zımba' DNA'lar katlama solüsyonu içerisinde deneysel çalışmalarda belirtildiği üzere termal tavlama yöntemiyle DNA nanoyapı elde edilmiştir. Daha sonra reaksiyona girmemiş olan fazla zımba DNA'ları uzaklaştırmak amacıyla PEG bazlı saflaştırma çözeltisi kullanılmıştır.

Elde edilen DNA nanoyapıların Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) görüntülerinin incelemesi yapılmış ve DNA nanoyapıların (DNA-NY) boyutlarının 50 nm civarında olduğu görülmüştür. Deneyimizin amacına göre lantibiyotik olan nisini DNA-NY'ya yüklediğimizde oluşan yapıya ait çapın 70 nm civarına çıktığı gözlenmiştir. Bu sonuç da katyonik nisin ile negatif yüklü DNA nanoyapının elektrostatik olarak bağlandığını göstermiştir.

Nisin yüklenmiş DNA nanoyapıların hastanede bulaşan (nozokomiyal) patojenlere karşı antimikrobiyal etki değerlendirmeleri sağlık merkezlerinde yaygın bulaşıcılık hızına sahip Gram-pozitif bakterilerden metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA, ATCC 43300) ve vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* (VRE, ATCC 51299) kullanılarak yapılmıştır.

1. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşuna karşı artan nisin konsantrasyonlarında a) sadece nisin kullanılan kuyucuklarda ve b) DNA nanoyapı üzerine nisin yüklendiğinde artan inhibisyon görülürken, c) sadece DNA-NY kullanıldığında ise inhibisyon görülmemiştir. Bu sonuçlar bize sadece nisin lantibiyotiğinin ve nisin yüklü DNA-NY'ların bakteri suşu üzerinde anlamlı bir inhibisyon yaptığını göstermiştir.

2. Vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* suşu ile yapılan çalışmalarda artan nisin konsantrasyonlarında hem sadece nisin hem de nisin yüklü DNA-NY'lar ile inhibisyonun arttığı gözlemlenmiştir.

Ayrıca her iki bakteri suşuna karşı da sadece nisin ve nisin yüklü DNA-NY kullanıldığında ise canlılığın düştüğü görülmüştür. Bu da bakterisidal etkinin nisin kaynaklı olduğunu göstermektedir.

İlaç sisteminin sitotoksik etkilerinin incelenmesi ise insan meme kanseri hücreleri (MCF-7) ve fare fibroblast hücreleri (L929) üzerinde yapılmış ve hem nisin hem de nisin yüklü DNA-NY'ların seçici olarak kanser hücreleri üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği gözlenmiştir.

Bu sonuçlardan elde edilen bilgiler ışığında ürettiğimiz DNA Nanoyapıların antibiyotik ve lantibiyotik taşınımında, kontrollü ilaç salımında, kanser ve benzeri hastalıkların tedavisinde ve hastane kaynaklı, antibiyotik direnci kazanmış epidemik nitelikteki enfeksiyon yaratan patojenlerin sağıtımında nanoteknolojik ve biyomedikal uygulamalarda yerini bulacağı inancındayız.



## KAYNAKLAR

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, Sixth Edition, Garland Science, Taylor & Francis, New York, **2015**.
- [2] J.D. Watson, F.H. Crick, Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature*, 171 (**1953**) 737-738.
- [3] N.C. Seeman, Nucleic acid junctions and lattices, *Journal of Theoretical Biology*, 99 (**1982**) 237-247.
- [4] N.R. Kallenbach, R.-I. Ma, N.C. Seeman, An immobile nucleic acid junction constructed from oligonucleotides, *Nature*, 305 (**1983**) 829-831.
- [5] X. Wang, N.C. Seeman, Assembly and Characterization of 8-Arm and 12-Arm DNA Branched Junctions, *Journal of the American Chemical Society*, 129 (**2007**) 8169-8176.
- [6] Y. Wang, J.E. Mueller, B. Kemper, N.C. Seeman, Assembly and characterization of five-arm and six-arm DNA branched junctions, *Biochemistry*, 30 (**1991**) 5667-5674.
- [7] T.J. Fu, N.C. Seeman, DNA double-crossover molecules, *Biochemistry*, 32 (**1993**) 3211-3220.
- [8] T.H. LaBean, H. Yan, J. Kopatsch, F.R. Liu, E. Winfree, J.H. Reif, N.C. Seeman, Construction, analysis, ligation, and self-assembly of DNA triple crossover complexes, *Journal of the American Chemical Society*, 122 (**2000**) 1848-1860.
- [9] H. Yan, X. Zhang, Z. Shen, N.C. Seeman, A robust DNA mechanical device controlled by hybridization topology, *Nature*, 415 (**2002**) 62-65.
- [10] P.W. Rothemund, Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns, *Nature*, 440 (**2006**) 297-302.
- [11] E.S. Andersen, M. Dong, M.M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdouh, M.M. Golas, B. Sander, H. Stark, C.L. Oliveira, J.S. Pedersen, V. Birkedal, F. Besenbacher, K.V. Gothelf, J. Kjems, Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid, *Nature*, 459 (**2009**) 73-76.
- [12] S.M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Hogberg, F. Graf, W.M. Shih, Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes, *Nature*, 459 (**2009**) 414-418.
- [13] D. Han, S. Pal, J. Nangreave, Z. Deng, Y. Liu, H. Yan, DNA origami with complex curvatures in three-dimensional space, *Science*, 332 (**2011**) 342-346.
- [14] E. Stahl, T.G. Martin, F. Praetorius, H. Dietz, Facile and scalable preparation of pure and dense DNA origami solutions, *Angewandte Chemie International Edition*, 53 (**2014**) 12735-12740.

- [15] A. Bilir, E. Emül, N. Sağlam, Development of albumin macroinitiator for polymers to use in DNA origami coating, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50 (2020) 1461-1469.
- [16] S. Han, W. Liu, S. Yang, R. Wang, Facile and Label-Free Electrochemical Biosensors for MicroRNA Detection Based on DNA Origami Nanostructures, *Acs Omega*, 4 (2019) 11025-11031.
- [17] D. Wang, Y. Chai, Y. Yuan, R. Yuan, Precise Regulation of Enzyme Cascade Catalytic Efficiency with DNA Tetrahedron as Scaffold for Ultrasensitive Electrochemical Detection of DNA, *Analytical Chemistry*, 91 (2019) 3561-3566.
- [18] S.M. Douglas, I. Bachelet, G.M. Church, A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads, *Science*, 335 (2012) 831-834.
- [19] M. Langecker, V. Arnaut, T.G. Martin, J. List, S. Renner, M. Mayer, H. Dietz, F.C. Simmel, Synthetic lipid membrane channels formed by designed DNA nanostructures, *Science*, 338 (2012) 932-936.
- [20] V. Linko, S.T. Paasonen, A. Kuzyk, P. Torma, J.J. Toppari, Characterization of the conductance mechanisms of DNA origami by AC impedance spectroscopy, *Small*, 5 (2009) 2382-2386.
- [21] A. Kuzyk, R. Schreiber, Z. Fan, G. Pardatscher, E.M. Roller, A. Hogege, F.C. Simmel, A.O. Govorov, T. Liedl, DNA-based self-assembly of chiral plasmonic nanostructures with tailored optical response, *Nature*, 483 (2012) 311-314.
- [22] R. Langer, New methods of drug delivery, *Science*, 249 (1990) 1527-1533.
- [23] R. Langer, Drug delivery and targeting, *Nature*, 392 (1998) 5-10.
- [24] A.Z. Wang, R. Langer, O.C. Farokhzad, Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs, *Annual Review of Medicine*, 63 (2012) 185-198.
- [25] Y. Ma, R.J.M. Nolte, J.J.L.M. Cornelissen, Virus-based nanocarriers for drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (2012) 811-825.
- [26] L. Steidler, W. Hans, L. Schotte, S. Neiryneck, F. Obermeier, W. Falk, W. Fiers, E. Remaut, Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10, *Science*, 289 (2000) 1352-1355.
- [27] N. Nishiyama, K. Kataoka, Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery, *Pharmacology & Therapeutics*, 112 (2006) 630-648.
- [28] C.-M.J. Hu, L. Zhang, S. Aryal, C. Cheung, R.H. Fang, L. Zhang, Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (2011) 10980-10985.
- [29] P.L. Felgner, G. Ringold, Cationic liposome-mediated transfection, *Nature*, 337 (1989) 387-388.
- [30] W.T. Al-Jamal, K. Kostarelos, Liposomes: from a clinically established drug delivery system to a nanoparticle platform for theranostic nanomedicine, *Accounts of chemical research*, 44 (2011) 1094-1104.
- [31] D.W. Pack, A.S. Hoffman, S. Pun, P.S. Stayton, Design and development of polymers for gene delivery, *Nature reviews Drug discovery*, 4 (2005) 581-593.

- [32] B. Duncan, C. Kim, V.M. Rotello, Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems, *Journal of controlled release*, 148 (2010) 122-127.
- [33] Z. Liu, J.T. Robinson, S.M. Tabakman, K. Yang, H. Dai, Carbon materials for drug delivery & cancer therapy, *Mater Today*, 14 (2011) 316-323.
- [34] E. Keles, Y. Song, D. Du, W.-J. Dong, Y. Lin, Recent progress in nanomaterials for gene delivery applications, *Biomaterials Science*, 4 (2016) 1291-1309.
- [35] H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan, Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 114 (2006) 100-109.
- [36] O. Zelphati, L.S. Uyechi, L.G. Barron, F.C. Szoka, Jr., Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells, *Biochimica et Biophysica Acta* 1390 (1998) 119-133.
- [37] A. Magrez, S. Kasas, V. Salicio, N. Pasquier, J.W. Seo, M. Celio, S. Catsicas, B. Schwaller, L. Forró, Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials, *Nano Letters*, 6 (2006) 1121-1125.
- [38] W.H. De Jong, W.I. Hagens, P. Krystek, M.C. Burger, A.J. Sips, R.E. Geertsma, Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration, *Biomaterials*, 29 (2008) 1912-1919.
- [39] G.D. Hamblin, K.M.M. Carneiro, J.F. Fakhoury, K.E. Bujold, H.F. Sleiman, Rolling Circle Amplification-Templated DNA Nanotubes Show Increased Stability and Cell Penetration Ability (vol 134, pg 2888, 2012), *Journal of the American Chemical Society*, 134 (2012) 5426-5426.
- [40] Q. Jiang, S. Liu, J. Liu, Z.G. Wang, B. Ding, Rationally Designed DNA-Origami Nanomaterials for Drug Delivery In Vivo, *Advanced Materials*, 31 (2019) e1804785.
- [41] J. Li, H. Pei, B. Zhu, L. Liang, M. Wei, Y. He, N. Chen, D. Li, Q. Huang, C. Fan, Self-assembled multivalent DNA nanostructures for noninvasive intracellular delivery of immunostimulatory CpG oligonucleotides, *Acs Nano*, 5 (2011) 8783-8789.
- [42] A. Udomprasert, T. Kangsamaksin, DNA origami applications in cancer therapy, *Cancer Science*, 108 (2017) 1535-1543.
- [43] A.S. Walsh, H. Yin, C.M. Erben, M.J. Wood, A.J. Turberfield, DNA cage delivery to mammalian cells, *Acs Nano*, 5 (2011) 5427-5432.
- [44] W. Zhang, C.H. Tung, Sequence-Independent DNA Nanogel as a Potential Drug Carrier, *Macromol Rapid Comm*, 38 (2017).
- [45] Q. Mei, X. Wei, F. Su, Y. Liu, C. Youngbull, R. Johnson, S. Lindsay, H. Yan, D. Meldrum, Stability of DNA origami nanoarrays in cell lysate, *Nano Letters*, 11 (2011) 1477-1482.
- [46] J. Hahn, S.F. Wickham, W.M. Shih, S.D. Perrault, Addressing the instability of DNA nanostructures in tissue culture, *Acs Nano*, 8 (2014) 8765-8775.

- [47] C. Kielar, Y. Xin, B. Shen, M.A. Kostianen, G. Grundmeier, V. Linko, A. Keller, On the Stability of DNA Origami Nanostructures in Low-Magnesium Buffers, *Angewandte Chemie*, 130 (2018) 9614-9618.
- [48] C.E. Castro, F. Kilchherr, D.N. Kim, E.L. Shiao, T. Wauer, P. Wortmann, M. Bathe, H. Dietz, A primer to scaffolded DNA origami, *Nature Methods*, 8 (2011) 221-229.
- [49] Y. Ahmadi, E. De Llano, I. Barisic, (Poly)cation-induced protection of conventional and wireframe DNA origami nanostructures, *Nanoscale*, 10 (2018) 7494-7504.
- [50] Q. Hu, H. Li, L. Wang, H. Gu, C. Fan, DNA Nanotechnology-Enabled Drug Delivery Systems, *Chemical Reviews*, 119 (2019) 6459-6506.
- [51] Q. Jiang, C. Song, J. Nangreave, X. Liu, L. Lin, D. Qiu, Z.G. Wang, G. Zou, X. Liang, H. Yan, B. Ding, DNA origami as a carrier for circumvention of drug resistance, *Journal of the American Chemical Society*, 134 (2012) 13396-13403.
- [52] Y.X. Zhao, A. Shaw, X. Zeng, E. Benson, A.M. Nystrom, B. Hogberg, DNA origami delivery system for cancer therapy with tunable release properties, *ACS Nano*, 6 (2012) 8684-8691.
- [53] H. Lee, A.K. Lytton-Jean, Y. Chen, K.T. Love, A.I. Park, E.D. Karagiannis, A. Sehgal, W. Querbes, C.S. Zurenko, M. Jayaraman, C.G. Peng, K. Charisse, A. Borodovsky, M. Manoharan, J.S. Donahoe, J. Truelove, M. Nahrendorf, R. Langer, D.G. Anderson, Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery, *Nature Nanotechnology*, 7 (2012) 389-393.
- [54] A. Ora, E. Jarvihaavisto, H. Zhang, H. Auvinen, H.A. Santos, M.A. Kostianen, V. Linko, Cellular delivery of enzyme-loaded DNA origami, *ChemComm*, 52 (2016) 14161-14164.
- [55] C. Ülger, E.Ö. Yaylagül, A. Bilir, N. Sağlam, Recent Advances in Nanomaterial based Diagnosis and Treatment: Next Generation Sequencing, Microarray and DNA Origami, in: N. Sağlam, F. Korkusuz, R. Prasad (Eds.) *Nanotechnology Applications in Health and Environmental Sciences*, Springer Nature, İsviçre, 2021, 135-146.
- [56] H. Bila, E.E. Kurisinkal, M.M.C. Bastings, Engineering a stable future for DNA-origami as a biomaterial, *Biomaterials Science*, 7 (2019) 532-541.
- [57] T. Teesalu, K.N. Sugahara, V.R. Kotamraju, E. Ruoslahti, C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (2009) 16157.
- [58] N. Haspel, D. Zanuy, R. Nussinov, T. Teesalu, E. Ruoslahti, C. Aleman, Binding of a C-end rule peptide to the neuropilin-1 receptor: a molecular modeling approach, *Biochemistry*, 50 (2011) 1755-1762.
- [59] V. Gribova, C. Gauthier-Rouvière, C. Albigès-Rizo, R. Auzely-Velty, C. Picart, Effect of RGD functionalization and stiffness modulation of polyelectrolyte multilayer films on muscle cell differentiation, *Acta Biomaterialia*, 9 (2013) 6468-6480.
- [60] Z. Xia, P. Wang, X. Liu, T. Liu, Y. Yan, J. Yan, J. Zhong, G. Sun, D. He, Tumor-Penetrating Peptide-Modified DNA Tetrahedron for Targeting Drug Delivery, *Biochemistry*, 55 (2016) 1326-1331.

- [61] S.D. Perrault, W.M. Shih, Virus-inspired membrane encapsulation of DNA nanostructures to achieve in vivo stability, *Acs Nano*, 8 (2014) 5132-5140.
- [62] J. Mikkila, A.P. Eskelinen, E.H. Niemela, V. Linko, M.J. Frilander, P. Torma, M.A. Kostianen, Virus-encapsulated DNA origami nanostructures for cellular delivery, *Nano Letters*, 14 (2014) 2196-2200.
- [63] N. Ponnuswamy, M.M. Bastings, B. Nathwani, J.H. Ryu, L.Y. Chou, M. Vinther, W.A. Li, F.M. Anastassacos, D.J. Mooney, W.M. Shih, Oligolysine-based coating protects DNA nanostructures from low-salt denaturation and nuclease degradation, *Nature communications*, 8 (2017) 1-9.
- [64] N.P. Agarwal, M. Matthies, F.N. Gur, K. Osada, T.L. Schmidt, Block Copolymer Micellization as a Protection Strategy for DNA Origami, *Angewandte Chemie International Edition*, 56 (2017) 5460-5464.
- [65] D. Wang, Q. Liu, D. Wu, B. He, J. Li, C. Mao, G. Wang, H. Qian, Isothermal Self-Assembly of Spermidine–DNA Nanostructure Complex as a Functional Platform for Cancer Therapy, *ACS applied materials & interfaces*, 10 (2018) 15504-15516.
- [66] H. Auvinen, H. Zhang, Nonappa, A. Kopilow, E.H. Niemela, S. Nummelin, A. Correia, H.A. Santos, V. Linko, M.A. Kostianen, Protein Coating of DNA Nanostructures for Enhanced Stability and Immunocompatibility, *Advanced Healthcare Materials*, 6 (2017) 6.
- [67] A. Hernandez-Garcia, N.A. Estrich, M.W. Werten, J.R. Van Der Maarel, T.H. LaBean, F.A. de Wolf, M.A. Cohen Stuart, R. de Vries, Precise coating of a wide range of DNA templates by a protein polymer with a DNA binding domain, *Acs Nano*, 11 (2017) 144-152.
- [68] A.I. Lacroix, T.G. Edwardson, M.A. Hancock, M.D. Dore, H.F. Sleiman, Development of DNA nanostructures for high-affinity binding to human serum albumin, *Journal of the American Chemical Society*, 139 (2017) 7355-7362.
- [69] T. Gerling, M. Kube, B. Kick, H. Dietz, Sequence-programmable covalent bonding of designed DNA assemblies, *Science advances*, 4 (2018) eaau1157.
- [70] P. O'Neill, P.W. Rothmund, A. Kumar, D.K. Fygenson, Sturdier DNA nanotubes via ligation, *Nano letters*, 6 (2006) 1379-1383.
- [71] A. Rajendran, M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, Photo-cross-linking-assisted thermal stability of DNA origami structures and its application for higher-temperature self-assembly, *Journal of the American Chemical Society*, 133 (2011) 14488-14491.
- [72] V. Cassinelli, B. Oberleitner, J. Sobotta, P. Nickels, G. Grossi, S. Kempter, T. Frischmuth, T. Liedl, A. Manetto, One-Step Formation of “Chain-Armor”-Stabilized DNA Nanostructures, *Angewandte Chemie International Edition*, 54 (2015) 7795-7798.
- [73] M. De Stefano, K. Vesterager Gothelf, Dynamic Chemistry of Disulfide Terminated Oligonucleotides in Duplexes and Double-Crossover Tiles, *ChemBioChem*, 17 (2016) 1122-1126.
- [74] Q. Liu, G. Liu, T. Wang, J. Fu, R. Li, L. Song, Z.G. Wang, B. Ding, F. Chen, Enhanced Stability of DNA Nanostructures by Incorporation of Unnatural Base Pairs, *Chemphyschem*, 18 (2017) 2977-2980.

- [75] J.W. Conway, C.K. McLaughlin, K.J. Castor, H. Sleiman, DNA nanostructure serum stability: greater than the sum of its parts, *Chemical Communications*, 49 (2013) 1172-1174.
- [76] K.E. Bujold, J. Fakhoury, T.G. Edwardson, K.M. Carneiro, J.N. Briard, A.G. Godin, L. Amrein, G.D. Hamblin, L.C. Panasci, P.W. Wiseman, Sequence-responsive unzipping DNA cubes with tunable cellular uptake profiles, *Chem Sci*, 5 (2014) 2449-2455.
- [77] Y. Zhang, R. Peng, F. Xu, Y. Ke, Hierarchical Self-Assembly of Cholesterol-DNA Nanorods, *Bioconjugate Chemistry*, 30 (2019) 1845-1849.
- [78] J. Willem de Vries, S. Schnichels, J. Hurst, L. Strudel, A. Gruszka, M. Kwak, K.-U. Bartz-Schmidt, M.S. Spitzer, A. Herrmann, DNA nanoparticles for ophthalmic drug delivery, *Biomaterials*, 157 (2018) 98-106.
- [79] K.-m. Choi, I.C. Kwon, H.J. Ahn, Self-assembled amphiphilic DNA-cholesterol/DNA-peptide hybrid duplexes with liposome-like structure for doxorubicin delivery, *Biomaterials*, 34 (2013) 4183-4190.
- [80] S. Obuobi, N. Skalko-Basnet, Nucleic Acid Hybrids as Advanced Antibacterial Nanocarriers, *Pharmaceutics*, 12 (2020).
- [81] A.F. Jorge, A. Aviñó, A.A.C.C. Pais, R. Eritja, C. Fàbrega, DNA-based nanoscaffolds as vehicles for 5-fluoro-2'-deoxyuridine oligomers in colorectal cancer therapy, *Nanoscale*, 10 (2018) 7238-7249.
- [82] H.V.P. Thelu, S. Atchimnaidu, D. Perumal, K.S. Harikrishnan, S. Vijayan, R. Varghese, Self-Assembly of an Aptamer-Decorated, DNA-Protein Hybrid Nanogel: A Biocompatible Nanocarrier for Targeted Cancer Therapy, *ACS Applied Bio Materials*, 2 (2019) 5227-5234.
- [83] L. Wan, Q. Chen, J. Liu, X. Yang, J. Huang, L. Li, X. Guo, J. Zhang, K. Wang, Programmable Self-Assembly of DNA-Protein Hybrid Hydrogel for Enzyme Encapsulation with Enhanced Biological Stability, *Biomacromolecules*, 17 (2016) 1543-1550.
- [84] Y. Wu, C. Li, F. Boldt, Y. Wang, S.L. Kuan, T.T. Tran, V. Mikhalevich, C. Förtsch, H. Barth, Z. Yang, D. Liu, T. Weil, Programmable protein-DNA hybrid hydrogels for the immobilization and release of functional proteins, *Chemical Communications*, 50 (2014) 14620-14622.
- [85] Y. Xu, S. Jiang, C.R. Simmons, R.P. Narayanan, F. Zhang, A.-M. Aziz, H. Yan, N. Stephanopoulos, Tunable Nanoscale Cages from Self-Assembling DNA and Protein Building Blocks, *Acs Nano*, 13 (2019) 3545-3554.
- [86] S. Julin, A. Korpi, Nonappa, B. Shen, V. Liljeström, O. Ikkala, A. Keller, V. Linko, M.A. Kostianen, DNA origami directed 3D nanoparticle superlattice via electrostatic assembly, *Nanoscale*, 11 (2019) 4546-4551.
- [87] T. Zhou, Y. Wang, Y. Dong, C. Chen, D. Liu, Z. Yang, Tetrahedron DNA dendrimers and their encapsulation of gold nanoparticles, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22 (2014) 4391-4394.
- [88] K.E. Bujold, A. Lacroix, H.F. Sleiman, DNA Nanostructures at the Interface with Biology, *Chem*, 4 (2018) 495-521.

- [89] S. Huo, N. Gong, Y. Jiang, F. Chen, H. Guo, Y. Gan, Z. Wang, A. Herrmann, X.-J. Liang, Gold-DNA nanosunflowers for efficient gene silencing with controllable transformation, *Science Advances*, 5 (2019) eaaw6264.
- [90] S. Pal, Z. Deng, B. Ding, H. Yan, Y. Liu, DNA-origami-directed self-assembly of discrete silver-nanoparticle architectures, *Angewandte Chemie International Edition*, 49 (2010) 2700-2704.
- [91] A.-P. Eskelinen, R.J. Moerland, M.A. Kostianen, P. Törmä, Self-Assembled Silver Nanoparticles in a Bow-Tie Antenna Configuration, *Small*, 10 (2014) 1057-1062.
- [92] S. Pal, R. Varghese, Z. Deng, Z. Zhao, A. Kumar, H. Yan, Y. Liu, Site-specific synthesis and in situ immobilization of fluorescent silver nanoclusters on DNA nanoscaffolds by use of the Tollens reaction, *Angewandte Chemie International Edition*, 50 (2011) 4176-4179.
- [93] S. Hu, T. Yi, Z. Huang, B. Liu, J. Wang, X. Yi, J. Liu, Etching silver nanoparticles using DNA, *Materials Horizons*, 6 (2019) 155-159.
- [94] Z. Deng, A. Samanta, J. Nangreave, H. Yan, Y. Liu, Robust DNA-Functionalized Core/Shell Quantum Dots with Fluorescent Emission Spanning from UV-vis to Near-IR and Compatible with DNA-Directed Self-Assembly, *Journal of the American Chemical Society*, 134 (2012) 17424-17427.
- [95] L. Zhang, S.R. Jean, S. Ahmed, P.M. Aldridge, X. Li, F. Fan, E.H. Sargent, S.O. Kelley, Multifunctional quantum dot DNA hydrogels, *Nature Communications*, 8 (2017) 381.
- [96] P.R. Murray, K.S. Rosenthal, M.A. Pfaller, *Medical microbiology E-book*, Elsevier Health Sciences 2020.
- [97] M.T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker, *Brock biology of microorganisms*, Prentice hall Upper Saddle River, NJ 1997.
- [98] K.J. Ryan, C.G. Ray, *Medical microbiology*, McGraw Hill, 4 (2004) 370.
- [99] H.W. Boucher, G.H. Talbot, J.S. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, L.B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, J. Bartlett, Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America, *Clinical infectious diseases*, 48 (2009) 1-12.
- [100] M. Vestergaard, D. Frees, H. Ingmer, Antibiotic resistance and the MRSA problem, *Microbiology spectrum*, 7 (2019) 7.2. 18.
- [101] Centers for Disease Control and Prevention <https://www.cdc.gov/mrsa/community/index.html>, (Erişim tarihi : 19 Ekim 2021).
- [102] N. Çöplü, The first results of national antimicrobial resistance surveillance system in Turkey, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 75 (2018) 323-458.
- [103] P. Wayne, Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, (2011).
- [104] S.M. McBride, V.A. Fischetti, D.J. LeBlanc, R.C. Moellering Jr, M.S. Gilmore, Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*, *PloS one*, 2 (2007) e582.

- [105] S. Handwerger, B. Raucher, D. Altarac, J. Monka, S. Marchione, K.V. Singh, B.E. Murray, J. Wolff, B. Walters, Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin, and gentamicin, *Clinical Infectious Diseases*, 16 (1993) 750-755.
- [106] E.A.R.S. System, Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011, European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC) Solna, Sweden, 2014.
- [107] D. Gülmez, G. Hasçelik, Comparison of microdilution method and Phoenix automated system for testing antimicrobial susceptibilities of *Enterococcus* strains, *Mikrobiyoloji bulteni*, 45 (2011) 21-27.
- [108] S. Li, Q. Jiang, S. Liu, Y. Zhang, Y. Tian, C. Song, J. Wang, Y. Zou, G.J. Anderson, J.Y. Han, Y. Chang, Y. Liu, C. Zhang, L. Chen, G. Zhou, G. Nie, H. Yan, B. Ding, Y. Zhao, A DNA nanorobot functions as a cancer therapeutic in response to a molecular trigger in vivo, *Nature Biotechnology*, 36 (2018) 258-264.
- [109] Q. Zhang, Q. Jiang, N. Li, L. Dai, Q. Liu, L. Song, J. Wang, Y. Li, J. Tian, B. Ding, Y. Du, DNA origami as an in vivo drug delivery vehicle for cancer therapy, *Acs Nano*, 8 (2014) 6633-6643.
- [110] L. Song, Q. Jiang, J. Liu, N. Li, Q. Liu, L. Dai, Y. Gao, W. Liu, D. Liu, B. Ding, DNA origami/gold nanorod hybrid nanostructures for the circumvention of drug resistance, *Nanoscale*, 9 (2017) 7750-7754.
- [111] M.I. Setyawati, R.V. Kutty, C.Y. Tay, X. Yuan, J. Xie, D.T. Leong, Novel theranostic DNA nanoscaffolds for the simultaneous detection and killing of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *ACS applied materials & interfaces*, 6 (2014) 21822-21831.
- [112] Y. Liu, Y. Sun, S. Li, M. Liu, X. Qin, X. Chen, Y. Lin, Tetrahedral framework nucleic acids deliver antimicrobial peptides with improved effects and less susceptibility to bacterial degradation, *Nano letters*, 20 (2020) 3602-3610.
- [113] I. Mela, P.P. Vallejo-Ramirez, S. Makarchuk, G. Christie, D. Bailey, R.M. Henderson, H. Sugiyama, M. Endo, C.F. Kaminski, DNA Nanostructures for Targeted Antimicrobial Delivery, *Angewandte Chemie International Edition*, 59 (2020) 12698-12702.
- [114] I. Mela, C.F. Kaminski, Nano-vehicles give new lease of life to existing antimicrobials, *Emerging Topics in Life Sciences*, 4 (2020) 555-566.
- [115] N. Oh, J.-H. Park, Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells, *International journal of nanomedicine*, 9 (2014) 51.
- [116] A. Fleming, On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*, *Br J Exp Pathol*, 10 (1929) 226.
- [117] A. Willke Topçu, G. Söyletir, M. Doğanay, Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Sistemlere Göre Enfeksiyonlar 3. Baskı, Nobet Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008.
- [118] S. Jana, J. Deb, Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance, *Applied microbiology and biotechnology*, 70 (2006) 140-150.



- [119] P. Dadgostar, Antimicrobial resistance: implications and costs, *Infection and drug resistance*, 12 (2019) 3903.
- [120] E.Y. Klein, T.P. Van Boeckel, E.M. Martinez, S. Pant, S. Gandra, S.A. Levin, H. Goossens, R. Laxminarayan, Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115 (2018) E3463-E3470.
- [121] F. Prestinaci, P. Pezzotti, A. Pantosti, Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon, *Pathogens and global health*, 109 (2015) 309-318.
- [122] C. Llor, L. Bjerrum, Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem, *Therapeutic advances in drug safety*, 5 (2014) 229-241.
- [123] Antibiotic resistance threats in the United States; 2013. <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. Erişim tarihi 24 Kasım 2021.
- [124] WHO report on surveillance of antibiotic consumption; 2016. [https://www.who.int/medicines/areas/rational\\_use/who-amr-amc-report-20181109.pdf](https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/who-amr-amc-report-20181109.pdf). Erişim Tarihi : 25 Kasım 2021.
- [125] Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations  
the review on antimicrobial resistance chaired by JIMO'NEILL;  
2016. [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final\\_paper\\_with\\_cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final_paper_with_cover.pdf). Erişim tarihi: 25 Kasım, 2021.
- [126] Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. 2014. [https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations\\_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf) (Erişim tarihi : 23 Kasım 2021).
- [127] G. Santoro-Lopes, E.F. de Gouvêa, Multidrug-resistant bacterial infections after liver transplantation: an ever-growing challenge, *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20 (2014) 6201.
- [128] A. Gratia, Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de coïl bacille, *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales*, 93 (1925) 1040-1041.
- [129] L.A. Rogers, The Inhibiting Effect of *Streptococcus Lactis* on *Lactobacillus Bulgaricus*, *Journal of Bacteriology*, 16 (1928) 321-325.
- [130] L.A. Rogers, E.O. Whittier, Limiting Factors in the Lactic Fermentation, *Journal of Bacteriology*, 16 (1928) 211-229.
- [131] H.R. Whitehead, A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci, *Biochemical Journal*, 27 (1933) 1793-1800.
- [132] A. Mattick, A. Hirsch, Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci, *Lancet*, 5 (1947) 5-8.
- [133] H.C. And, D. Hoover, Bacteriocins and their food applications, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2 (2003) 82-100.

- [134] O. Gillor, L.M. Nigro, M.A. Riley, Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials, *Current pharmaceutical design*, 11 (2005) 1067-1075.
- [135] J. Cleveland, T.J. Montville, I.F. Nes, M.L. Chikindas, Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation, *International journal of food microbiology*, 71 (2001) 1-20.
- [136] M. Bodaszewska-Lubas, M. Brzychczy-Wloch, T. Gosiewski, P.B. Heczko, Antibacterial activity of selected standard strains of lactic acid bacteria producing bacteriocins--pilot study, *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej*, 66 (2012) 787-794.
- [137] N. Schnell, K.D. Entian, U. Schneider, F. Gotz, H. Zahner, R. Kellner, G. Jung, Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings, *Nature*, 333 (1988) 276-278.
- [138] J. Nagao, S.M. Asaduzzaman, Y. Aso, K. Okuda, J. Nakayama, K. Sonomoto, Lantibiotics: insight and foresight for new paradigm, *J Biosci Bioeng*, 102 (2006) 139-149.
- [139] L. O'Sullivan, R.P. Ross, C. Hill, Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality, *Biochimie*, 84 (2002) 593-604.
- [140] T. Zendo, M. Fukao, K. Ueda, T. Higuchi, J. Nakayama, K. Sonomoto, Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67 (2003) 1616-1619.
- [141] J. Reunanen, Lantibiotic nisin and its detection methods, (2007).
- [142] J. Delves-broughton, Nisin as a food preservative, *Food Australia*, 57 (2005) 525-527.
- [143] C. Piper, P.D. Cotter, R.P. Ross, C. Hill, Discovery of medically significant lantibiotics, *Current drug discovery technologies*, 6 (2009) 1-18.
- [144] D. Field, P.D. Cotter, C. Hill, R.P. Ross, Bioengineering Lantibiotics for Therapeutic Success, *Frontiers in Microbiology*, 6 (2015) 1363.
- [145] W. Brumfitt, M.R. Salton, J.M. Hamilton-Miller, Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50 (2002) 731-734.
- [146] P.D. Cotter, C. Hill, R.P. Ross, Bacterial lantibiotics: Strategies to improve therapeutic potential, *Current Protein & Peptide Science*, 6 (2005) 61-75.
- [147] N.E. Joo, K. Ritchie, P. Kamarajan, D. Miao, Y.L. Kapila, Nisin, an apoptogenic bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHAC1, *Cancer Medicine*, 1 (2012) 295-305.
- [148] P. Kamarajan, T. Hayami, B. Matte, Y. Liu, T. Danciu, A. Ramamoorthy, F. Worden, S. Kapila, Y. Kapila, Nisin ZP, a Bacteriocin and Food Preservative, Inhibits Head and Neck Cancer Tumorigenesis and Prolongs Survival, *Plos One*, 10 (2015).

- [149] M. Mota-Meira, G. LaPointe, C. Lacroix, M.C. Lavoie, MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (2000) 24-29.
- [150] C. Piper, L.A. Draper, P.D. Cotter, R.P. Ross, C. Hill, A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64 (2009) 546-551.
- [151] A.N. Appleyard, S. Choi, D.M. Read, A. Lightfoot, S. Boakes, A. Hoffmann, I. Chopra, G. Bierbaum, B.A.M. Rudd, M.J. Dawson, J. Cortes, Dissecting Structural and Functional Diversity of the Lantibiotic Mersacidin, *Chemistry & Biology*, 16 (2009) 490-498.
- [152] A. Hoffmann, U. Pag, I. Wiedemann, H.G. Sahl, Combination of antibiotic mechanisms in lantibiotics, *Farmaco*, 57 (2002) 685-691.
- [153] W.W. Niu, H.C. Neu, ACTIVITY OF MERSACIDIN, A NOVEL PEPTIDE, COMPARED WITH THAT OF VANCOMYCIN, TEICoplanin, AND DAPTOMYCIN, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35 (1991) 998-1000.
- [154] M.J. Dawson, R.W. Scott, New horizons for host defense peptides and lantibiotics, *Current Opinion in Pharmacology*, 12 (2012) 545-550.
- [155] R.R. Bonelli, T. Schneider, H.G. Sahl, I. Wiedemann, Insights into in vivo activities of lantibiotics from gallidermin and epidermin mode-of-action studies, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (2006) 1449-1457.
- [156] K.I. Mohr, C. Volz, R. Jansen, V. Wray, J. Hoffmann, S. Bernecker, J. Wink, K. Gerth, M. Stadler, R. Mueller, Pinensins: The First Antifungal Lantibiotics, *Angewandte Chemie International Edition*, 54 (2015) 11254-11258.
- [157] F. Castiglione, L. Cavaletti, D. Losi, A. Lazzarini, L. Carrano, M. Feroggio, I. Ciciliato, E. Corti, G. Candiani, F. Marinelli, E. Selva, A novel lantibiotic acting on bacterial cell wall synthesis produced by the uncommon actinomycete *Planomonospora* sp, *Biochemistry*, 46 (2007) 5884-5895.
- [158] F. Castiglione, A. Lazzarini, L. Carrano, E. Corti, I. Ciciliato, L. Gastaldo, P. Candiani, D. Losi, F. Marinelli, E. Selva, F. Parenti, Determining the structure and mode of action of microbisporicin, a potent lantibiotic active against multiresistant pathogens, *Chemistry & Biology*, 15 (2008) 22-31.
- [159] M. Galvin, C. Hill, R.P. Ross, Lacticin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays, *Letters in Applied Microbiology*, 28 (1999) 355-358.
- [160] E.M. Lawton, R.P. Ross, C. Hill, P.D. Cotter, Two-peptide lantibiotics: A medical perspective, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 7 (2007) 1236-1247.
- [161] J.R. Tagg, Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*, *Indian Journal of Medical Research*, 119 (2004) 13-16.
- [162] P.A. Wescombe, N.C.K. Heng, J.P. Burton, C.N. Chilcott, J.R. Tagg, Streptococcal bacteriocins and the case for *Streptococcus salivarius* as model oral probiotics, *Future Microbiology*, 4 (2009) 819-835.

- [163] H. Grasemann, F. Stehling, H. Brunar, R. Widmann, T.W. Laliberte, L. Molina, G. Doring, F. Ratjen, Inhalation of Moli1901 in patients with cystic fibrosis, *Chest*, 131 (2007) 1461-1466.
- [164] I. Oliynyk, G. Varelogianni, G.M. Roomans, M. Johannesson, Effect of duramycin on chloride transport and intracellular calcium concentration in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis epithelia, *Apmis*, 118 (2010) 982-990.
- [165] F. Castiglione, L. Cavaletti, D. Losi, A. Lazzarini, L. Carrano, M. Feroggio, I. Ciciliato, E. Corti, G. Candiani, F. Marinelli, A novel lantibiotic acting on bacterial cell wall synthesis produced by the uncommon actinomycete *Planomonospora* sp, *Biochemistry*, 46 (2007) 5884-5895.
- [166] M. Kordel, R. Benz, H. Sahl, Mode of action of the staphylococcinlike peptide Pep 5: voltage-dependent depolarization of bacterial and artificial membranes, *Journal of bacteriology*, 170 (1988) 84-88.
- [167] K. Stevens, B. Sheldon, N.A. Klapes, T. Klaenhammer, Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria, *Applied and environmental microbiology*, 57 (1991) 3613-3615.
- [168] J. Delves-Broughton, P. Blackburn, R.J. Evans, J. Hugenholtz, Applications of the bacteriocin, nisin, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69 (1996) 193-202.
- [169] A. Fleming, On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*, *Br J Exp Pathol*, 10 (1929) 226-236.
- [170] J.M. Shin, J.W. Gwak, P. Kamarajan, J.C. Fenno, A.H. Rickard, Y.L. Kapila, Biomedical applications of nisin, *Journal of applied microbiology*, 120 (2016) 1449-1465.
- [171] G.C. Williams, Broughton J.D., Nisin, in: B. Caballero (Ed.) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Academic Press, Cambridge, 2003, 4128-4135.
- [172] A. Hurst, Nisin, in: D. Perlman, A.I. Laskin (Eds.) *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press 1981, 85-123.
- [173] T. Montville, H.J. Chung, M. Chikindas, Y. Chen, Nisin A depletes intracellular ATP and acts in bactericidal manner against *Mycobacterium smegmatis*, *Letters in applied microbiology*, 28 (1999) 189-193.
- [174] S. Maisnier-Patin, N. Deschamps, S. Tatini, J. Richard, Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter, *Le Lait*, 72 (1992) 249-263.
- [175] A. Hillier, B. Davidson, Bacteriocins as food preservatives.[Conference paper], *CSIRO Food Research Quarterly (Australia)*, (1991).
- [176] K. Eckner, Bacteriocins and food applications, *Scope (Technical Bulletin from Silliker Laboratories)*, 6 (1991) 1-5.
- [177] M.A. Daeschel, Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives, *Food Technology (Chicago)*, 43 (1989) 164-167.
- [178] T.R. Klaenhammer, Bacteriocins of lactic acid bacteria, *Biochimie*, 70 (1988) 337-349.

- [179] N. Benkerroum, W.E. Sandine, Inhibitory Action of Nisin Against *Listeria monocytogenes*, *Journal of Dairy Science*, 71 (1988) 3237-3245.
- [180] E. Severina, A. Severin, A. Tomasz, Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 41 (1998) 341-347.
- [181] B.P. Goldstein, J. Wei, K. Greenberg, R. Novick, Activity of nisin against *Streptococcus pneumoniae*, in vitro, and in a mouse infection model, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 42 (1998) 277-278.
- [182] A. Bartoloni, A. Mantella, B. Goldstein, R. Dei, M. Benedetti, S. Sbaragli, F. Paradisi, In-vitro activity of nisin against clinical isolates of *Clostridium difficile*, *Journal of chemotherapy*, 16 (2004) 119-121.
- [183] S. Dosler, A.A. Gerceker, In vitro activities of nisin alone or in combination with vancomycin and ciprofloxacin against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains, *Chemotherapy*, 57 (2011) 511-516.
- [184] K.-i. Okuda, T. Zendo, S. Sugimoto, T. Iwase, A. Tajima, S. Yamada, K. Sonomoto, Y. Mizunoe, Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57 (2013) 5572-5579.
- [185] J.J. Ahire, L.M. Dicks, Nisin Incorporated With 2,3-Dihydroxybenzoic Acid in Nanofibers Inhibits Biofilm Formation by a Methicillin-Resistant Strain of *Staphylococcus aureus*, *Probiotics Antimicrob Proteins*, 7 (2015) 52-59.
- [186] S. Maher, S. McClean, Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro, *Biochemical pharmacology*, 71 (2006) 1289-1298.
- [187] G.L. Blay, C. Lacroix, A. Zihler, I. Fliss, In vitro inhibition activity of nisin A, nisin Z, pediocin PA-1 and antibiotics against common intestinal bacteria, *Letters in Applied Microbiology*, 45 (2007) 252-257.
- [188] T. Ugurlu, M. Turkoglu, U.S. Gurer, B.G. Akarsu, Colonic delivery of compression coated nisin tablets using pectin/HPMC polymer mixture, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67 (2007) 202-210.
- [189] M. Millette, G. Cornut, C. Dupont, F. Shareck, D. Archambault, M. Lacroix, Capacity of human nisin-and pediocin-producing lactic acid bacteria to reduce intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci, *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (2008) 1997-2003.
- [190] J. Reunanen, P. Saris, Survival of nisin activity in intestinal environment, *Biotechnology letters*, 31 (2009) 1229-1232.
- [191] D. Van Staden, A. Brand, A. Endo, L. Dicks, Nisin F, intraperitoneally injected, may have a stabilizing effect on the bacterial population in the gastrointestinal tract, as determined in a preliminary study with mice as model, *Letters in applied microbiology*, 53 (2011) 198-201.
- [192] M. De Kwaadsteniet, K. Ten Doeschate, L. Dicks, Characterization of the structural gene encoding nisin F, a new lantibiotic produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolate from freshwater catfish (*Clarias gariepinus*), *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (2008) 547-549.

- [193] T.D. Heunis, C. Smith, L.M. Dicks, Evaluation of a nisin-eluting nanofiber scaffold to treat *Staphylococcus aureus*-induced skin infections in mice, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57 (2013) 3928-3935.
- [194] L. Cao, J. Wu, F. Xie, S. Hu, Y. Mo, Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows, *Journal of dairy science*, 90 (2007) 3980-3985.
- [195] J. Wu, S. Hu, L. Cao, Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51 (2007) 3131-3135.
- [196] L. Fernández, S. Delgado, H. Herrero, A. Maldonado, J.M. Rodriguez, The bacteriocin nisin, an effective agent for the treatment of staphylococcal mastitis during lactation, *Journal of Human Lactation*, 24 (2008) 311-316.
- [197] N.E. Joo, K. Ritchie, P. Kamarajan, D. Miao, Y.L. Kapila, Nisin, an apoptogenic bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHAC 1, *Cancer medicine*, 1 (2012) 295-305.
- [198] S. Preet, S. Bharati, A. Panjeta, R. Tewari, P. Rishi, Effect of nisin and doxorubicin on DMBA-induced skin carcinogenesis—a possible adjunct therapy, *Tumor biology*, 36 (2015) 8301-8308.
- [199] P. Kamarajan, T. Hayami, B. Matte, Y. Liu, T. Danciu, A. Ramamoorthy, F. Worden, S. Kapila, Y. Kapila, Nisin ZP, a bacteriocin and food preservative, inhibits head and neck cancer tumorigenesis and prolongs survival, *PLoS one*, 10 (2015) e0131008.
- [200] Global Medical Discovery (2015) <https://globalmedicaldiscovery.com/key-drug-discoveryarticles/nisin-synergizes-with-cisplatin-induce-apoptosis-inhnscc-cells-highly-resistant-to-ionizing-radiation-cisplatin/>
- [Erişim tarihi: 28 Kasım 2021].
- [201] I. Johnson, H. Hayday, G. Colman, The effects of nisin on the microbial flora of the dental plaque of monkeys (*Macaca fascicularis*), *Journal of Applied Bacteriology*, 45 (1978) 99-109.
- [202] T. Howell, J. Fiorellini, P. Blackburn, S. Projan, J. De la Harpe, R. Williams, The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagle dogs, *Journal of Clinical Periodontology*, 20 (1993) 335-339.
- [203] S. Turner, R. Love, K. Lyons, An in-vitro investigation of the antibacterial effect of nisin in root canals and canal wall radicular dentine, *International endodontic journal*, 37 (2004) 664-671.
- [204] C. Le Lay, B. Akerey, I. Fliss, M. Subirade, M. Rouabhia, Nisin Z inhibits the growth of *Candida albicans* and its transition from blastospore to hyphal form, *Journal of applied microbiology*, 105 (2008) 1630-1639.
- [205] B. Akerey, C. Le-Lay, I. Fliss, M. Subirade, M. Rouabhia, In vitro efficacy of nisin Z against *Candida albicans* adhesion and transition following contact with normal human gingival cells, *Journal of applied microbiology*, 107 (2009) 1298-1307.
- [206] Z. Tong, L. Dong, L. Zhou, R. Tao, L. Ni, Nisin inhibits dental caries-associated microorganism in vitro, *Peptides*, 31 (2010) 2003-2008.

- [207] M.B. Najjar, D. Kashtanov, M.L. Chikindas, Natural antimicrobials  $\epsilon$ -poly-l-lysine and Nisin A for control of oral microflora, Probiotics and antimicrobial proteins, 1 (2009) 143-147.
- [208] Z. Tong, L. Zhou, J. Li, W. Jiang, L. Ma, L. Ni, In vitro evaluation of the antibacterial activities of MTAD in combination with nisin against *Enterococcus faecalis*, Journal of endodontics, 37 (2011) 1116-1120.
- [209] Z. Tong, Y. Zhang, J. Ling, J. Ma, L. Huang, L. Zhang, An in vitro study on the effects of nisin on the antibacterial activities of 18 antibiotics against *Enterococcus faecalis*, PLoS One, 9 (2014) e89209.
- [210] J.M. Shin, I. Ateia, J.R. Paulus, H. Liu, J.C. Fenno, A.H. Rickard, Y.L. Kapila, Antimicrobial nisin acts against saliva derived multi-species biofilms without cytotoxicity to human oral cells, Frontiers in microbiology, 6 (2015) 617.
- [211] What Is Cancer? <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> Erişim Tarihi : 23.12.2021.
- [212] World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Global Cancer Observatory <https://gco.iarc.fr/> [Erişim Tarihi 4 Aralık 2021].
- [213] A.Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global cancer statistics, CA: a cancer journal for clinicians, 61 (2011) 69-90.
- [214] N. Harbeck, M. Gnant, Breast cancer, Lancet, 389 (2017) 1134-1150.
- [215] I. Jatoi, M.A. Proschan, Randomized trials of breast-conserving therapy versus mastectomy for primary breast cancer: a pooled analysis of updated results, American journal of clinical oncology, 28 (2005) 289-294.
- [216] Breast Cancer Facts & Figures 2019-2020, American Cancer Society, <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2019-2020.pdf>. Erişim tarihi : 5 Aralık 2021.
- [217] A.E. Frankel, B.L. Powell, N.S. Duesbery, G. Vande Woude, S.H. Leppla, Anthrax fusion protein therapy of cancer, Current Protein and Peptide Science, 3 (2002) 399-407.
- [218] J.I. Lundin, H. Checkoway, Endotoxin and cancer, Environmental health perspectives, 117 (2009) 1344-1350.
- [219] J.E. Meyer, J. Harder, Antimicrobial peptides in oral cancer, Current pharmaceutical design, 13 (2007) 3119-3130.
- [220] R. J Boohaker, M. W Lee, P. Vishnubhotla, J. LM Perez, A. R Khaled, The use of therapeutic peptides to target and to kill cancer cells, Current medicinal chemistry, 19 (2012) 3794-3804.
- [221] C. Giffard, S. Ladha, A. Mackie, D. Clark, D. Sanders, Interaction of nisin with planar lipid bilayers monitored by fluorescence recovery after photobleaching, The Journal of membrane biology, 151 (1996) 293-300.
- [222] G.N. Moll, J. Clark, W.C. Chan, B.W. Bycroft, G. Roberts, W.N. Konings, A. Driessen, Role of transmembrane pH gradient and membrane binding in nisin pore formation, Journal of Bacteriology, 179 (1997) 135-140.

- [223] J. Ahn, C.Y. Chen, R.B. Hayes, Oral microbiome and oral and gastrointestinal cancer risk, *Cancer Causes & Control*, 23 (2012) 399-404.
- [224] D.S. Michaud, J. Izard, Microbiota, oral microbiome, and pancreatic cancer, *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 20 (2014) 203.
- [225] A. Nyyssölä, A. Pihlajaniemi, A. Palva, N. Von Weymarn, M. Leisola, Production of xylitol from D-xylose by recombinant *Lactococcus lactis*, *Journal of biotechnology*, 118 (2005) 55-66.
- [226] V. Linko, B. Shen, K. Tapio, J.J. Toppari, M.A. Kostianen, S. Tuukkanen, One-step large-scale deposition of salt-free DNA origami nanostructures, *Scientific reports*, 5 (2015) 15634.
- [227] A.M. Hung, C.M. Micheel, L.D. Bozano, L.W. Osterbur, G.M. Wallraff, J.N. Cha, Large-area spatially ordered arrays of gold nanoparticles directed by lithographically confined DNA origami, *Nature nanotechnology*, 5 (2010) 121-126.
- [228] Y. Tang, J. Larsen, J. Kjeldgaard, P.S. Andersen, R. Skov, H. Ingmer, Methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* from retail meat in Denmark, *International journal of food microbiology*, 249 (2017) 72-76.
- [229] A. Giacometti, O. Cirioni, F. Barchiesi, G. Scalise, In-vitro activity and killing effect of polycationic peptides on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics, *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 38 (2000) 115-118.
- [230] I. Wiedemann, R. Benz, H.-G. Sahl, Lipid II-mediated pore formation by the peptide antibiotic nisin: a black lipid membrane study, *Journal of Bacteriology*, 186 (2004) 3259-3261.
- [231] H.E. Hasper, N.E. Kramer, J.L. Smith, J. Hillman, C. Zachariah, O.P. Kuipers, B. De Kruijff, E. Breukink, An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II, *Science*, 313 (2006) 1636-1637.
- [232] A. Avand, V. Akbari, S. Shafizadegan, In vitro cytotoxic activity of a *Lactococcus lactis* antimicrobial peptide against breast cancer cells, *Iranian journal of biotechnology*, 16 (2018).
- [233] A. Asati, S. Santra, C. Kaittanis, J.M. Perez, Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles, *Acs Nano*, 4 (2010) 5321-5331.
- [234] D. Manzanares, V. Ceña, Endocytosis: the nanoparticle and submicron nanocompounds gateway into the cell, *Pharmaceutics*, 12 (2020) 371.
- [235] A. Noyan, Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji.
- [236] I. Dobrzyńska, E. Skrzydlewska, Z.A. Figaszewski, Changes in electric properties of human breast cancer cells, *The Journal of membrane biology*, 246 (2013) 161-166.
- [237] B. Szachowicz-Petelska, I. Dobrzyńska, M. Skrodzka, B. Darewicz, Z.A. Figaszewski, J. Kudelski, Phospholipid composition and electric charge in healthy and cancerous parts of human kidneys, *The Journal of membrane biology*, 246 (2013) 421-425.



- [238] A. Yamaji-Hasegawa, M. Tsujimoto, Asymmetric distribution of phospholipids in biomembranes, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29 (2006) 1547-1553.
- [239] P.M. Hwang, H.J. Vogel, Structure-function relationships of antimicrobial peptides, *Biochemistry and Cell Biology*, 76 (1998) 235-246.
- [240] N.R. Council, Genomics, Proteomics, and the Changing Research Environment, Reaping the Benefits of Genomic and Proteomic Research.
- [241] Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020 (<https://gco.iarc.fr/today>, Erişim Tarihi : 23 Aralık 2021).
- [242] C.U. Tas, P. Akkus, M. Culha, G. Yeditepe Univ Nanotechnology, Development of DNA origami based nanocarriers for cancer therapy, *Febs J.*, 281 (2014) 391-391.
- [243] S. Nummelin, J. Kommeri, M.A. Kostianen, V. Linko, Evolution of structural DNA nanotechnology, *Advanced Materials*, 30 (2018) 1703721.
- [244] Q. Li, D. Zhao, X. Shao, S. Lin, X. Xie, M. Liu, W. Ma, S. Shi, Y. Lin, Aptamer-Modified Tetrahedral DNA Nanostructure for Tumor-Targeted Drug Delivery, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9 (2017) 36695-36701.
- [245] P. Sun, N. Zhang, Y. Tang, Y. Yang, X. Chu, Y. Zhao, SL2B aptamer and folic acid dual-targeting DNA nanostructures for synergic biological effect with chemotherapy to combat colorectal cancer, *International Journal of Nanomedicine*, 12 (2017) 2657-2672.
- [246] S.M. Asaduzzaman, K. Sonomoto, Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action, *Journal of bioscience and bioengineering*, 107 (2009) 475-487.
- [247] P.D. Cotter, R.P. Ross, C. Hill, Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics?, *Nature Reviews Microbiology*, 11 (2013) 95-105.