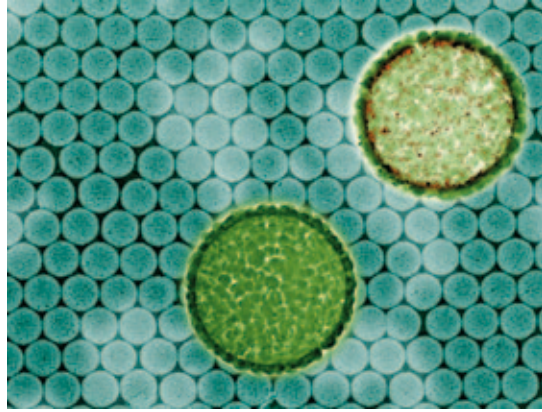


Biyoteşhiste Nanoyapılar

Bilim dünyası son on yılda birçok hastalığın teşhisi için DNA ve protein işaretlerin tayini amacıyla nanomalzemelerin kullanımında bir patlamaya tanık olmuştur. Yoğun araştırmalar mevcut teknolojilerin eksikliklerini gidererek kullanımı kolay, sağlam, yüksek duyarlılıkta ve seçici teşhis araçları geliştirme gereksiniminden kaynaklanıyor. Bu kapsamda kimyacılar teşhis sistemlerinde kullanılmak üzere yeni malzemelerin geliştirilmesinde önemli görevler üstleniyorlar. Nanomalzemelere dayalı teşhis sistemleri mevcut yöntemlere göre teşhisin duyarlılığı, seçiciliği ve kullanım kolaylığı bakımından önemli avantajlara sahiptir. Bu yeni yöntemlerin bazıları biyolojik uygulamalarına ve genel özelliklerine göre gruplandırılmıştır. Bu yazıda nükleik asitler, proteinler ve biyolojik öneme sahip bazı küçük moleküllerin biyoteşhis amacıyla izlenmesi için nanomalzeme temelli sistemlerin geliştirilmesindeki mihenk taşları kısaca anlatılmıştır. Ayrıca bazı nanomalzemelerin onları özel teşhis uygulamaları için eşsiz yapan temel özelliklerine değinilmiştir.

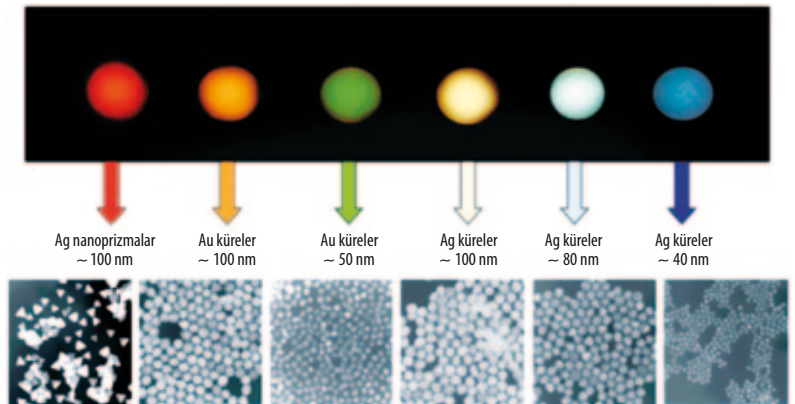
Nükleik asit dizilimi her organizma için (bakteri, virüs veya patojen) özgüdür ve çeşitli hastalıkların teşhisi için kullanışlı bir hedeftir. Hızlı dizi analizi olanaklarının gelişmesi sayesinde birçok hastalık ve ayrıca biyoterör saldırıları için DNA dizi bilgisi elde edilebiliyor. Bu hastalıklarla tıbbi alanda daha etkili bir mücadele ve biyoterör saldırılarına karşı daha hızlı cevap için, DNA işaretlelerinin erken ve doğru teşhisi çok önemlidir. Bu alanda kimyacılar, biyokimyacılar ve fizikçilerden oluşan disiplinlerarası araştırma grupları “moleküler florofor” (florofor: floresans yapan maddeler) tayinine bağlı polimeraz zincir tepkimesi (PCR) ile etkin olarak rekabet edebilecek, nanomalzemeleri kullanan tayin yöntemleri geliştirmeye çalışıyorlar. PCR yani olası hedefin parçalarını çoğaltmaya yarayan teknoloji, duyarlılık bakımından hassas bir yöntemdir. Ancak, kontaminasyonlara duyarlı ve karmaşık olması, maliyeti, taşınma sorunu ve aynı anda birçok analize olanak vermemesi gibi dezavantajlara sahiptir. Birçok araştırmacı bu teknolojiyi, örneğin bir doktorun muayenehanesinde, savaş alanında, üçüncü dünya ülkelerinde ve biyoteröre karşı ilk savunma aşamasında kullanmanın güçlüklerini yaşamıştır. Bu kısıtlamalar ucuz, tek kullanımlık, hızlı ve doğru sonuç veren ve kullanım becerisi gerektirmeyen teşhis yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılıyor. Nanomalzemelerin nükleik asit tayininde PCR ve moleküler florofor teknolojileriyle yarışabilmesi için bu sorunların çözülmesi gerekli. Bazı proteinlerin anormal miktarları sıklıkla çeşitli kanser türlerinin ve diğer hastalıkların varlığını işaret eder. Ancak, mevcut yöntemler, sadece proteinlerin belirli bir eşik düzeyini aşmalarının ardından teşhise olanak verir. Genellikle de bu düzeylerde hastalık önemli derecede ilerlemiştir. Protein işaretlerin daha erken dönemde teşhise olanak verecek daha duyarlı bir yöntemin geliştirilmesi, hastalıkların tedavisinde, hastaların yaşam sürelerinin uzatılmasında ve ölüm oranlarının azaltılmasında muhtemel bir devrim niteliğinde olacaktır. Protein teşhisi alanında mevcut yöntem, pikometre düzeyinde tayin olanağı sağlayan, florofor etiketlemeyle de çalışabilen enzim bağlı immüno-sorbent testidir (ELISA). Protein teşhisi alanında PCR'a eşdeğer bir yöntem mevcut değildir. Ancak, moleküler floroforların tayininde görece pahalı cihazlara ihtiyaç duyulması gibi önemli bir dezavantaj olduğu unutulmamalıdır. Bu kısıtlamalar nedeniyle daha ucuz ve taşınabilir sistemler kullanışlı olacaktır. Protein teşhisi alanında nanomalzemelerin rekabetçi olması için moleküler floroforların kullanımıyla ortaya çıkan bu kısıtlamaları aşması gereklidir.



Neden Nanomalzemeler?

Tüm floroforların biyoteşhis ölçümleri için uygun ajanlar olmadığı gibi, tüm nanomalzemeler de biyotayin için avantajlıdır denemez. Bazı nanomalzemeler, küçük boyutları (1-100 nm) ve buna bağlı olarak geniş yüzey/hacim oranları; kimyasal olarak değiştirilebilir, boyut, bileşim ve şekil gibi fiziksel özellikleri; olağanüstü hedef molekül bağlama kapasiteleri; dayanıklılıkları nedeniyle oldukça çekici adaylardır. Nanomalzemenin iç yapısına göre boyutu daha önemlidir. Çünkü hedef molekülün bağlanması nanomalzemenin fiziksel özelliklerinde önemli değişiklikler yapar ve böylelikle sinyal üretimi iç yapıdan bağımsız olarak sağlanabilir. Değiştirilebilir fiziksel özellikler, nanomalzemelerin önemli bir özelliğidir. Aslında nanomalzemeler ile biyoloji, nanoparçacıkların biyobağlanma ve hücresel etiketleme ajanı olarak kullanıldığı uzun bir geçmişe sahiptir. Ancak, nanomalzemeler için yeni sentez, işleme ve karakterizasyon yöntemleri, boyutları, şekilleri ve bileşimleri ile ilgili değişikliklerinin, dolayısıyla özelliklerinin kontrolünün mümkün olduğunu ortaya koymuştur. Nanomalzemelerin fiziksel özelliklerinin kontrol edilebilmesi, biyoteşhis uygulamalarında kullanılabilmesi için gereklidir. Metal nanoparçacıklar ve kuantum nok-

Metal nanoparçacıkların boyutu, şekli ve bileşimi sistematik olarak değiştirilerek farklı ışık saçılma özellikleri elde edilebilir.



200 nm (tüm görüntüler için aynı)



Doç. Dr. Handan Yavuz 1997'de Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü'nden mezun oldu. 1999'da yüksek lisans, 2003 yılında da doktora eğitimini aynı bölümde tamamladı. 2007'de Biyokimya Doçenti oldu. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan 45 araştırma makalesi 500'ün üzerinde atıf alan Yavuz, 2007'de Hacettepe Üniversitesi ve Popüler Bilim Dergisi'nin Temel Bilimler alanında verdiği teşvik ödülünü aldı. Halen Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalında öğretim üyesi olarak görev yapmaktadır.

olarının boyut, şekil ve bileşimleri sistematik olarak değiştirilebiliyor ve özgün emisyon, soğurma ve ışık saçılma özelliklerine sahip, çoklu analizlere uygun yapılar oluşturulabiliyor. Nanotel ve nanotüp gibi nanomalzemelerin bileşimi de kontrol edilebiliyor ve dolayısıyla hedef analit varlığında iletkenlik özelliklerindeki değişimin ölçülmesine olanak veriyor. Ayrıca, yüzey modifikasyonu için geliştirilen araçlar ve yöntemler, biyomoleküllerin nanoölçekli analizinde ilerlemeler sağlamıştır. Bu olanakların her biri araştırmacıların PCR ve ELISA'nın moleküler floresfor temelli yöntemleriyle rekabet edecek yeni analizlere ve gelişmiş sinyal iletim yollarına yönelmelerini sağlamıştır.

Nanoparçacık Temelli Tayin Yöntemleri

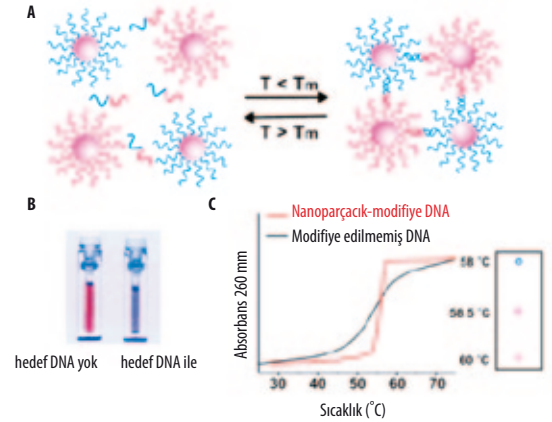
Nükleik Asitler

Nanomalzemelerin teşhis ajanı olarak kullanıma potansiyeline yönelik ilk uygulama, 1996'da oligonükleotid bağlanmış nanoparçacıkların, tamamlayıcı nükleotid dizileriyle birleşmesi temeline göre hedef DNA ile birleşip olağan dışı optik ve erime özellikleri oluşturmasıyla ortaya çıkmıştır. Altın nanoparçacıklar (13 nm çapında) analizde kullanıldığında çözeltinin rengi, analit bağlanmasıyla ışık saçılma özelliklerinin değişmesi sonucu kırmızıdan maviye döner. Bu basit davranış, nanoparçacıkların hedef nükleik asitler için "litmus testi" gibi DNA tayin ajanı olarak kullanımını düşündürmüştür. Gerçekten de, beyaz bir yüzeye çözeltinin damlatılmasıyla kolorimetrik bir değişim gerçekleşir ve her bir test için kalıcı bir kayıt oluşur. Kolorimetrik değişim bir hastalığın teşhisi için basit ve ucuz bir yoldur. Geleneksel moleküler-flofor etiketli yapıların tamamlayıcı DNA ile hibritleştiğinde gösterdiği geniş profile göre daha keskin erime profili sayesinde bu nanoparçacıklarla yapılan deneyler daha seçicidir. Bu yöntem floresans ölçümüne dayalı yöntemlere göre birkaç avantaja sahiptir: mükemmel eşleşen hedef oligonükleotidlerle, tek bir baz çifti eşleşmeyen hedefler arasında çok iyi ayırım sağlar; hızlı ve kolaydır; optik okuması pahalı ve karmaşık cihazlar gerektirmez.

Elektriksel nükleik asit tayin yöntemleri, özellikle çeşitli çevresel uygulamalar için taşınabilirlik olanağı sağlar. Nanoparçacık sandviç yöntemleri gümüş amplifikasyonu ile birlikte kullanılarak elde taşınabilir bir şekilde DNA'nın elektriksel tayini için kullanılabilir. İki elektrot arasına oligonükleotid tanıma dizileri tutturulur, sandviç formatında analiz yapıldığında, DNA iki elektrot arasındaki

elektrik akımı veya direncin değişiminin bir fonksiyonu olarak tayin edilebilir. Hedef DNA ortamda olmadığında elektrod boşluğunda akım akışı yoktur, ama hedef DNA, nanoparçacık probalar ve katalitik olarak biriktirilmiş gümüş varlığında elektrotlar arasından akım geçebilir. Bu yöntemin tayin sınırı 500×10^{-15} molar'dır.

Manyetik nanoparçacıklar da DNA'nın çözelti temelli tayinlerinde umut vaat ediyor. Topaklaşma ile manyetik nanoparçacıklar, çevreleyen sudaki protonların spinlerini etkileyerek durulum (relaxation) süresinde uzama sağlayan manyetik durulum dönüştürücü (MRS) gibi davranırlar. Bu durum bazı araştırmacılarca biyotayinde kullanılmıştır. Örneğin oligonükleotid bağlı demir oksit parçacıklar hedef oligonükleotid varlığında (20×10^{-12} molar sınır) topaklaşır ve çevreleyen suda durulum zamanında ölçülebilir bir artış (30 milisaniye, ms) sağlar. Hedef dizide tek baz çifti uyuşmaması 1-21 ms artışa neden olur. Bu durum bahsedilen sistemlerin DNA mutasyonlarının belirlenmesinde potansiyel kullanımını düşündürür.

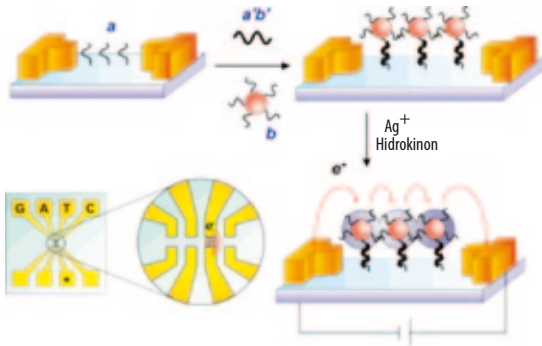


Tamamlayıcı hedef DNA varlığında oligonükleotid taşıyan altın nanoparçacıklar topaklaşır (A), çözeltide kırmızıdan maviye renk değişimi gerçekleşir (B), topaklaşma işlemi UV-Vis spektrofotometriyle veya basitçe çözeltiyi silika yüzeye damlatarak izlenebilir (C).

Proteinler ve küçük biyolojik moleküller

Nanoparçacıklarla protein ve küçük moleküllerin teşhisi genellikle nanoparçacığa bağlı antikorlarla hedef arasındaki etkileşimlerin oluşturduğu optik yanıtın ölçülmesine dayalıdır. Bu uygulamalar için nanoparçacık yüzeyinin değişken kimyası önemlidir ve nanoparçacıklar uygun antikorlarla modifiye edilerek sayısız uygulama için kullanılabilirler. Yapılan bir çalışmada sulu ortamda, serumda ve kanda, antikor bağlanmış altın kaplı nanoparçacıklarla protein tayini yapılmıştır. Hedef proteinle etkileşimin ardından antikor bağlı nanopar-

çacıklar topaklaşır ve 720 nm'de gerçekleşen nanokabuk sönüm pikinde orantılı bir genişleme gözlenir. Bu yöntem basit ve hızlıdır (10 dakika). Ayrıca ELISA'nın ölçüm aralığı olan 88-0,88 ng/mL derişimlerdeki proteinleri tayin edebilir. Bu yöntemin göz ardı edilmemesi gereken diğer bir önemli özelliği de örnek hazırlama ve ön saflaştırmanın gerçekleştirilemeyeceği koşullarda serum ve kanda protein analizine olanak vermesidir.



Yakalayıcı/hedef/prob sandviç iki elektrot arasındaki boşluğa yerleştiğinde sandviç sistem üzerinde katalitik gümüş indirgenmesi gerçekleşir ve sinyal elektriksel olarak ölçülür.

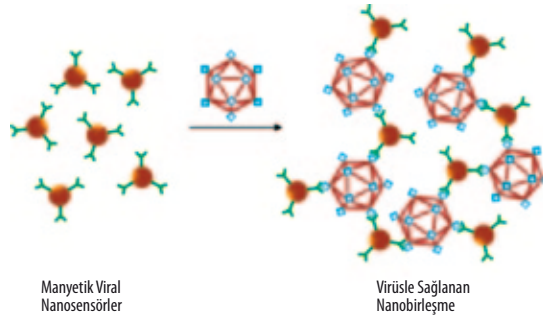
Bir başka yol da protein tanıma moleküllerine altın nanoparçacık yüzeyini kaplayan oligonükleotidlerle tamamlayıcı oligonükleotid kuyrukların eklenmesidir. Bu moleküller daha sonra çözeltideki özgül proteinlerle etkileşecek ve nanoparçacık sisteminde topaklaşmaya yol açacaktır. Bu yöntemin de oligonükleotid kuyruk takılmış birçok farklı protein hedef için geliştirilebilme özelliği vardır.

Manyetik nanoparçacıklarla gözlenen manyetik durulum özelliği, protein ve virüslerin tayininde de kullanılabilir. Çözelti ve serumda virüslerin belirlenmesi için araştırmacılar *Herpes simplex* virüs kılıfındaki antijenlere özgü antikorları, manyetik nanoparçacık yüzeyine bağlayarak bu parçacıkları virüs içeren serum ve çözeltilerle etkileştirmişlerdir. Bunun sonucunda virüsün varlığının topaklaşma oluşumunu tetiklediği görülmüş ve dolayısıyla çevreleyen ortamın durulum zamanında orantılı bir artış ölçülmüştür. Virüs parçacıklarının derişimi arttıkça durulum zamanının da miktar ölçümünü sağlayacak şekilde arttığını görmüşlerdir. Manyetik sinyal analit ortamının bulanıklığından etkilenmediğinden bu tayin yöntemi analizler için oldukça uygundur.

Metal İyonları

Kolorimetrik tayin yöntemi basitliği sayesinde çok çeşitli türde analite uygulanabilir genel bir

yöntemdir. Bazı araştırmacılar sulu çözeltilerde ve kurşun içeren boya örneklerinde Pb(II) iyonlarının tayini için oligonükleotid-bağlı nanoparçacıklar oluşturmuşlardır. Bağlayıcı dizinin orta bölgesi Pb(II) iyonlarına ilgisi yüksek DNAzime (enzimatik aktivite gösteren DNA) tamamlayıcıdır. Pb(II) varlığında DNAzim, bağlayıcı diziyi hidroliz eder ve nanoparçacık topağının ayrışmasına ve mordan kırmızıya renk dönüşümüne yol açar. Bu yöntemle Pb(II) 400×10^{-15} molar kadar düşük derişimlerde tayin edilebilir. Fenantrolin ligand ile etkileştirilmiş bir başka altın nanoparçacık Li⁺ iyonları için kullanılmıştır. Li⁺ iyonları varlığında parçacıklar topaklaşır Li⁺ iyonlarının tayinine olanak verir. Altın nanoparçacık sistemleri ayrıca Na⁺ iyonları varlığında K⁺ iyonlarının tayinine olanak verir. Yöntem yüksek oranda Na⁺ içeren serum örneklerinde K⁺ iyonlarının ölçülmesi için oldukça kullanışlıdır. Ligand tasarımındaki gelişmeler daha fazla sayıda ve daha seçici olarak metal iyonlarının tayinine olanak verecektir. Metal iyonlarının in vivo tayini ve izlenmesi için hücre içi ortama dayanabilecek oldukça seçici ve sağlam teşhis araçları gereklidir. Nanoparçacık temelli yöntemler bu anlamda kullanışlı araçlardır. Özellikle, biyouyumlu bir polimer matrikste bağlanmış floresan boyalar içeren farklı nanoparçacık problemler çeşitli hücre içi katyonların (kalsiyum, çinko ve magnezyum gibi) tayini için tasarlanabilir. Polimer matriksin değiştirilmesi hem hidrofobik hem hidrofilik boyaların bağlanmasına olanak verir. Ayrıca farklı boyalar tek bir parçacıkta toplanarak miktar tayini için sinyal ölçeklemesi yapılabilir.



Virüs kapsüller (kırmızı) üzerindeki antijene (mavi) özgü antikor ile etiketli (yeşil) süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklar (kahverengi küreler), hedef virüslerin varlığında topaklar oluştururlar ve ortamın manyetik durulum zamanında ölçülebilir bir derişim oluşur.

Kaynaklar
Rosi, N. L., Mirkin, C. A., "Nanostructures in Biodiagnostics", *Chemical Reviews*, Cilt 105, Sayı 4, 2005.
Diltemiz, S. E., Say, R., Büyüktiryaki, S., Hür, D.,

Denizli, A., Ersöz, A., "Quantum dot nanocrystals having guanosine imprinted nanoshell for DNA recognition" *Talanta The International Journal of Pure and Applied Analytical Chemistry*, Sayı 75, 2008.



Prof. Dr. Adil Denizli
1985 yılında Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nden mezun oldu. Yüksek lisans ve doktora eğitimini aynı bölümde tamamladı. 1994'te Kimyasal Teknolojiler Doçenti oldu. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan 300'ün üzerinde araştırma makalesi 4000'in üzerinde atıf alan Prof. Dr. Denizli, 1998'de TÜBİTAK teşvik ödülü, 2006 yılında da TÜBİTAK Bilim Ödülü'nü kazandı. Türkiye Bilimler Akademisi üyesi olan Denizli, halen Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı'nda öğretim üyesi olarak görev yapıyor.