

Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Etiketi Olarak Boya Hapsedilmiş Çekirdek- Kabuk Nanoparçacıklarının Hazırlanması, Karakterize Edilmesi ve 20S ile 26S Proteazomlarının Tayininde Kullanılması

Proje No: 111T151

Prof. Dr. Mürvet VOLKAN
Prof. Dr. Semra KOCABIYIK

TEMMUZ 2013
ANKARA

Önsöz

Son yıllarda hücrelerdeki proteazomların tanısının ve nitel analizinin, hem yaşa bağlı hastalıkların; kalp hastalıklarının ve çeşitli kanser tiplerinin klinik tanısı, hem de bu hastalıkların terapi süreçlerinin izlenmesi ve değerlendirilmesi açısından önem kazandığı bilinmektedir. TÜBİTAK tarafından desteklenen proje kapsamında yürütülmüş olan çalışmalar, proteazomların Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Saçılması (YGRS) spektroskopisi ve YGRS- nanoetiket kullanımı ile tanısına yöneliktir.

İçerik

1	Giriş.....	10
2	Gereç ve Yöntem.....	17
2.1.	Gümüş Nanoparçacıkların Sentezi.....	17
2.2.	Silika Kaplı Gümüş Nanoparçacıkların Hazırlanışı.....	17
2.3.	Raman Boya İçeren Silika Kabuk Gümüş Çekirdek YGRS-Nanoetiketlerin Hazırlanması	17
2.4.	Altın Nanoçubuk Sentezi	18
2.5.	Altın-Gümüş Çekirdek-Kabuk Nanoçubuk Sentezi	18
2.6	BCB ve YGRS nanoetiketlerinin kullanımı ile SERS-gen problemlerinin hazırlanması	18
2.7	Hibridizasyon Deneyleri	19
3	Bulgular ve Tartışma/Sonuç	19
3.1.	Kimyasal İndirgeme Yöntemi ile Gümüş Nanoparçacık Sentezi	19
3.2	Stöber Yöntemi ile Silika Kaplı Gümüş Nanoparçacıkların Hazırlanışı.....	22
3.3	Raman Boya Etiketli Nanoparçacık Problemlerinin Hazırlanışı.....	24
3.4.	Altın Nanoçubuk Sentezi	28
3.4.1.	Büyütme Çözeltisindeki Gümüş Nitrat Konsantrasyonunun Optimizasyonu.....	29
3.5.	Altın-Gümüş Çekirdek-Kabuk Nanoçubuk Sentezi	30
3.6.	Hazırlanan Nanoçubuklar ile Raman Boya Etiketli Nanoparçacık Problemlerinin Hazırlanması	33
3.7.	İnsan Proteazom Gen Dizilimine Dayalı Hedef ve Prob Oligoları ile Yapılan Hibridizasyon Deneyleri.....	34
3.7.1.	Sıcaklığın Hibridizasyona Etkisi	37
3.8.	Yanlış Eşleşen Baz Dizilimine Sahip Problemler ile Hibridizasyon Deneyleri	39
3.9.	Yanlış Eşleşen Baz Çiftleri İçeren İnsan Proteazomu Gen Problemleri ile Yapılan Hibridizasyon Deneylerinin YGRS Sonuçları.....	40
3.10.	İnsan Proteazom Gen Problemleri ile Yürütülen Hibridizasyon Çalışmalarına ait Kantitatif Çalışma Sonuçları.....	42
3.11.	BCB ile işaretlenmiş silika kabuk-gümüş çekirdek YGRS nanoetiketlerinin kullanımı ile SERS-gen problemlerinin hazırlanması.....	44
3.12.	İnsan Proteazom Gen Dizilimine Dayalı, YGRS nanoetiketleri ile işaretlenmiş Hedef ve Prob Oligo DNA lar ile Yapılan Hibridizasyon Deneyleri	45
4	Kaynaklar	47

Tablolar

Tablo 1. Oligonukleotid dizilimleri ve ara tutucu molekül.....	35
Tablo 2. Farklı hibritleme sıcaklıklarında 580 nm'de elde edilen ortalama sinyal şiddetleri.....	42
Tablo 3. 580 nm'de farklı YGRS Gen prob konsantrasyonu ile elde edilen YGRS şiddetleri.....	43

Figürler

Figür 1: Kimyasal indirgeme yöntemi ile sentezlenen gümüş nanoparçacıkların FE-SEM görüntüsü.	20
Figür 2: Sıcaklıkla bozulma ve kimyasal indirgeme yöntemleri ile hazırlanan gümüş nanoparçacıkların plazmon absorpsiyon sinyal pozisyonları.....	21
Figür 3: Kimyasal indirgeme yöntemi ile hazırlanan gümüş kolloidlerin EDX görüntüsü.	22
Figür 4: Stöber yöntemi kullanılan silika kaplı gümüş nanoparçacıkların FE-SEM görüntüsü.	23
Figür 5: Stöber yöntemi ile hazırlanan silika kaplı gümüş nanoparçacıkların absorpsiyon spektrumu.	24
Figür 6: Yüksek konsantrasyonda (10^{-3} M) BCB kullanılarak hazırlanan nano-etiketlerin YGRS spektrumu.	25
Figür 7: Düşük konsantrasyonda (10^{-4} M) BCB kullanılarak hazırlanan nano-etiketlerin YGRS spektrumu.	26
Figür 8: Silika kaplı gümüş nanoparçacıkların FTIR spektrumu.	26
Figür 9: BCB'nin FT-IR spektrumu.	27
Figür 10: YGRS nano-etiketlerin FT-IR spektrumu.....	28
Figür 11: Gümüş nitrat hacmi değiştirilerek (100-250 μ l) hazırlanan altın nanoçubuk çözeltilerinin UV-görünür absorpsiyon spektrumları.....	29
Figür 12: Sentezlenen altın nanoçubukların SEM görüntüleri.	30
Figür 13: AgNO ₃ hacminin değiştirilerek hazırlandığı altın gümüş çekirdek kabuk nanoçubuk çözeltilerinin UV-görünür absorpsiyon spektrumları.....	31
Figür 14: Gümüş kaplı altın nanoçubukların FE-SEM görüntüsü.....	32
Figür 15: Gümüş kaplı altın nanoçubukların EDX görüntüsü.	32
Figür 16: Silika kaplı altın nanoçubukların TEM görüntüsü.	33
Figür 17: Silika kaplı Altın-Gümüş çekirdek -kabuk nanoçubukların TEM görüntüsü.	34
Figür 18: BCB ile etiketlenmiş DNA'nın kontrol hibridizasyon deneyi sırasında altın yüzey üzerinde gümüş kolloid kullanılarak alınmış olan YGRS spektrumları. Ölçümler yüzey kurutulduktan sonra elde edilmiştir. YGRS Gen probu insan proteazom gen dizilimi kullanılarak dizayn edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan aratutucu 11-merkaptto-1-undekanol'dir.....	36
Figür 19: BCB ile etiketlenmiş DNA'nın hibridizasyon deneyi sırasında altın yüzey üzerinde gümüş kolloid kullanılarak alınmış olan üç farklı ölçüme ait YGRS spektrumları. Ölçümler yüzey kurutulduktan sonra elde edilmiştir. YGRS Gen probu insan proteazom gen dizilimi kullanılarak dizayn edilmiştir. Deneylerde ara tutucu olarak 11-merkaptto-1-undekanol kullanılmıştır.	36
Figür 20: Farklı hibritlenme sıcaklıklarında gerçekleştirilen hibridizasyon deneylerinin şematik gösterimi.	37

Figür 21: BCB ile etiketlenmiş DNA'nın 35°C'de yürütülen hibridizasyon çalışmaları sırasında altın yüzey üzerinde gümüş kolloid kullanılarak alınmış olan üç farklı ölçüme ait YGRS spektrumları. Ölçümler yüzey kurutulduktan sonra elde edilmiştir. YGRS Gen probu insan proteazom gen dizilimi kullanılarak dizayn edilmiştir. Deneylerde ara tutucu olarak 11-merkaptto-1-undekanol kullanılmıştır.	38
Figür 22: BCB ile etiketlenmiş DNA'nın 55°Cde yürütülen hibridizasyon çalışmaları sırasında altın yüzey üzerinde gümüş kolloid kullanılarak alınmış olan üç farklı ölçüme ait YGRS spektrumları. Ölçümler yüzey kurutulduktan sonra elde edilmiştir. YGRS Gen probu insan proteazom gen dizilimi kullanılarak dizayn edilmiştir. Bu deneyde kullanılan ara tutucu 11-merkaptto-1-undekanol'dür.	38
Figür 23: Yanlış eşleşen baz dizilimine sahip DNA polimerleri ile yürütülen hibridizasyon deneylerinin şematik gösterimi. Ara tutucu olarak 11-merkaptto-1-undekanol kullanılmıştır.	39
Figür 24: BCB ile etiketlenmiş Yanlış Eşleşen Baz Çifti İçeren İnsan Proteazomu Gen Probu kullanılarak, 35°Cde yürütülen hibridizasyon çalışmalarında altın yüzey üzerinde gümüş kolloid kullanılarak alınmış olan üç farklı ölçüme ait YGRS spektrumları. Bu deneyde kullanılan ara tutucu 11-merkaptto-1-undekanol'dür.	40
Figür 25: BCB ile etiketlenmiş Yanlış Eşleşen Baz Çiftleri İçeren İnsan Proteazomu Gen Probu kullanılarak 55°Cde yürütülen hibridizasyon çalışmalarında altın yüzey üzerinde gümüş kolloid kullanılarak alınmış olan üç farklı ölçüme ait YGRS spektrumları. Bu deneyde kullanılan ara tutucu 11-merkaptto-1-undekanol'dür.	41
Figür 26: BCB ile etiketlenmiş Yanlış Eşleşen Baz Çiftleri İçeren İnsan Proteazomu Gen Probu kullanılarak, 65°Cde yürütülen hibridizasyon çalışmaları sırasında altın yüzey üzerinde gümüş kolloid kullanılarak alınmış olan üç farklı ölçüme ait YGRS spektrumları. Bu deneyde kullanılan ara tutucu 11-merkaptto-1-undekanol'dür.	41
Figür 27: 580 nm'de elde edilen YGRS şiddeti- gen prob derişimi grafiği.	43
Figür 28: BCB içeren silika kabuk gümüş çekirdek YGRS nanoetiketlerinin DNA yüzeyine tutturulmasının şematik gösterimi.	44
Figür 29: DNA probunun boya içeren silika kabuk -gümüş çekirdeğin YGRS nanoetiketleri ile işaretlenmesi.	45
Figür 30: BCB kullanılarak işaretlenmiş DNA probu kullanılarak gerçekleştirilmiş hibridizasyon deneyleri sonucunda elde edilmiş olan SERS sinyalleri.	46
Figür 31: YGRS nanoetiketleri ile işaretlenmiş- DNA probu kullanılarak gerçekleştirilmiş hibridizasyon deneyleri sonucunda elde edilmiş olan SERS sinyalleri.	46

Özet

Übikülin-proteazom sistemi (UPS), hücrede protein yıkımında etkin, başlıca proteolitik yolaktır. Bu sistem yalnız yanlış katlanmış yada kusurlu proteinlerin yıkımından sorumlu olmayıp hücre döngüsü, transkripsiyon kontrolü, apoptoz, ve stres yanıtında da önemli bir düzenleyici mekanizma olarak dikkat çekmektedir. Proteazom işlevindeki bozukluklar proteazom aktivitesi ve/veya genlerinin anlatımında azalma ya da artma şeklinde etkisini göstermekte ve potansiyel patolojik sonuçlar doğurmaktadır. Son yıllardaki araştırmalar UPS deki değişmelerin patogeneze, ve özellikle çeşitli kanser tipleri, yaşa bağlı hastalıklar ve kalp hastalıkları ile ilişkisi olduğunu ortaya koymaktadır. Proteazom gen anlatımının aşırı olduğu patolojik durumlarda, proteazom inhibasyonunun tümör büyümesini çeşitli mekanizmalarla önlediği klinik verilerle doğrulanmış ve bu molekülleri yeni ilaç tasarımında önemli bir hedef konumuna getirmiştir. Bu nedenle hücrelerde proteazomların tanısı ve nitel analizi hem klinik tanı, hem de terapi sürecinin izlenmesi ve değerlendirilmesi açısından önemlidir. Proje kapsamında yapılan çalışmalar proteazomların Yüzeyle Güçlendirilmiş Raman Saçılması (YGRS) spektroskopik yöntemi ile tanısına yöneliktir. Bu bağlamda nanoteknolojik olanaklardan yararlanılarak, YGRS spektroskopik analizinde sinyal güçlendirme ve duyarlılığı arttırmak amacı ile özgün YGRS-nanoetiket sistemi geliştirilmiştir. Proje kapsamında, proteazomun özgün tanısı için kullanılacak oligo prob lar genom veri bankalarından yararlanılarak tasarlanmıştır. Bu prob lar YGRS spektroskopisi ile gözlenmesine olanak sağlayacak çeşitli boya ve YGRS nanoetiket sistemi ile işaretlenmiştir. Oluşturulan DNA-Raman aktif boya konjugatları prob olarak kullanılarak proteazoma özgü DNA dizilerinin tanınması DNA/DNA hibridizasyon yöntemi ile yapılmıştır. Bunu izleyen süreçte daha güçlü sinyal almaya yönelik , altın (veya gümüş) çekirdek-silika kabuk içine hapsedilmiş Raman aktif boyadan oluşan, YGRS-nanoetiket sistemi geliştirilmiştir. Bu bağlamda farklı dalgaboylarında rezonans plazmon absorpsiyonuna sahip üç değişik metal nanoparçacık sentezlenmiştir. Hazırlanan metal nanoyapıların üzerine Raman aktif boya tutturulduktan sonra sol-jel yöntemi kullanarak boya tutturulmuş parçacıkların yüzeyi silika kaplanmıştır. Metal nanoparçacığın boyutu, boya derişimi ve silika kalınlığı optimize edilerek güçlü bir Raman sinyali elde edilmeye çalışılmıştır. YGRS nano etiket sistemi ile işaretlenmiş DNA konjugatları prob olarak kullanılarak proteazoma özgü gen dizilerinin tanınması DNA/DNA hibridizasyon yöntemi ile yapılmıştır. Proje hem proteazom gen anlatımındaki değişikliğin patolojik olgularda bir moleküler belirteç olarak kullanılması yönü

ile hem de bu amaçla Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Saçılması (YGRS) spektroskopisinin uygulanması yönü ile güncel ve özgündür.

Anahtar Kelimeler: Raman spektrometresi, Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Saçılması (YGRS), YGRS–nanoetiket, 26 S Proteozome, Oligo probalar

Abstract

Ubiquitin proteasome system is the major pathway for the efficient protein degradation within the cell. This system is not only responsible for degradation of the misfolded or defective proteins, but also a critical regulator of cell cycle, transcription control, apoptosis and stress response. Failure of proteasome function is implicated as either increase or decrease in the proteasome activity or expression of its genes. Recent studies indicate the relationship between the changes in UPS activity and pathogenesis, especially in various forms of cancer, age related diseases and heart diseases. Clinical data so far proved that proteasome inhibition prevents the tumor growth by means of different mechanisms and therefore these molecules have acquired a critical position for the design of new therapeutics.

The aim of this project is to develop a new nanotag system for the detection of proteasome gene expression /proteins by surface enhanced Raman (SERS) spectroscopy. In this sense, by use of the facilities of nanotechnology, “SERS nano tag system” was developed in order to increase the signal and sensitivity of the SERS analysis. Within the scope of this project, based on the genome data bank analysis, oligo probes were designed for the specific detection of proteasome. These probes were labeled by a variety of different dyes or SERS nanotag system to be detected by surface enhanced Raman spectroscopy. The Raman active dye- labeled DNA was employed as probes for detection of proteasome specific DNA sequences by DNA/DNA hybridization technique.

In the following step, a SERS-nanotag system consists of Raman active dye embedded gold (or silver)-silica core-shell nanoparticles were developed to produce stronger SERS signals. In this respect, three different metal nanoparticles were synthesized that have plasmon absorptions at different wavelengths. Raman active dyes were adsorbed onto the synthesized metal nanoparticle and resulting nanostructure was coated by silica layer by means of sol-gel method. Parameters such as; morphology of metal nanoparticle, dye concentration, silica thickness were optimized to achieve the strongest SERS signal intensity. SERS nano tag labeled DNA conjugates were utilized as a probe for detection of proteasome specific gene sequences by DNA/DNA hybridization. This study is novel, not only for the use of differential expression of proteasome genes as a molecular marker, but also for the application of Surface Enhanced Raman Spectroscopy for this purpose.

Keywords: Raman spectrometer, surface enhanced Raman scattering, SERS-nanotags, 26 S
Proteosome, oligo probes

1 Giriş

İnsan hastalıkları ve enfeksiyon kaynağı patojenlerle ilgili olan çoklu genlerin görüntülenmesi için gereken, kullanımı kolay ve hassas cihazların geliştirilmesi, erken tanı ve tedavi yöntemlerinin iyileştirilmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda biomedikal tanı (VO-DINH, 1999, VO-DINH 2005, KNEIPP, 2005), patojen algılama (YOO, 2004), gen tespiti (VO-DINH, 2002), gen eşleştirme (HULBERT, 1990) ve DNA dizilimi (JING,1998) gibi genom analizleri için gerekli olan optik tekniklerin geliştirilmesi büyük ilgi görmektedir.

DNA dizisinin belirlenmesinde kullanılan tekniklerde, bu amaçla hazırlanmış nükleik asit probunun hedef DNA ile hibritleştirilmesi önemli bir basamaktır. Genetik malzemenin (gen probu) kimyasal ya da rekombinant tekniklerle etiketlenmesi, görüntüleme tekniğiyle izlenmesini sağlamaktadır. Floresans, duyarlı ve seçici olması nedeni ile biyolojik analizlerde ve görüntülemelerde sıkça kullanılan bir algılama teknolojisidir (ZHAO, 2003). Ancak, son yıllarda, Raman spektroskopisinin bir çeşidi olan yüzeyde güçlendirilmiş Raman saçılımı (YGRS) yöntemi genomik analizlerde büyük önem kazanmıştır (KNEIPP, 2005, GELLNER, 2009).

Raman saçılımı tekniği, örneğe bir lazerle ışık gönderilmesi ve hedef sistemden saçılan ışık bileşenlerin ölçülmesi işlemlerini kapsamaktadır. Elde edilen titreşimsel spektrum, kızıl ötesi (IR) spektrometresi ile yapılan ölçümlerde olduğu gibi, analitin yapısı konusunda bilgi vermektedir. Su moleküllerinin Raman saçılımı yok denecek kadar azdır. Dolayısı ile Raman tekniği, görünür bölge lazerleri ve algılayıcıları kullanarak, hızlı ve örneğe zarar vermeden, sulu çözeltilerden titreşimsel spektrum sağlaması yönüyle ve doğrudan görüntüleme özellikleriyle, biyolojik sistemlerle ilgili çalışmalarda büyük avantaj sağlamaktadır (VO-DINH, 1999, VO-DINH 2005, KNEIPP, 2005). Normal Raman spektrometresinin duyarlılığı düşüktür. Resonans Raman (RR) etkisi olarak adlandırılan ve sadece analitin absorpsiyon dalgaboyunun kullanılan lazerin dalgaboyu ile örtüştüğü durumlarda ortaya çıkan, yaklaşık 10^3 seviyesindeki sinyal artışı da düşük derişimdeki örneklerle çalışabilme konusunda yeterli olmamaktadır. İstenilen ölçüm duyarlılığı, yüzeyde güçlendirilmiş Raman saçılımı (YGRS) yönteminin keşfinden sonra elde edilmiştir. YGRS, iletkenliği yüksek metal nano yapıların yüzeyinde yapılan Raman ölçümlerinde analitin sinyalinde gözlenen artıştır. Bu etkinin, kimyasal etmenlerin yanı sıra, ağırlıklı olarak

metalin serbest elektronlarının oluşturduğu güçlü elektromanyetik alandan kaynaklandığı düşünülmektedir (SHUMING, 1997). YGRS tekniğinin kullanımı ile normal Raman ölçümlerine göreceli olarak 10^6 - 10^{12} kat sinyal artışı rapor edilmektedir (DOERING, 2007). Yüzeyde güçlendirilmiş Raman ölçümleri rezonans Raman koşullarında gerçekleştirildiği zaman ise (Yüzeyde güçlendirilmiş rezonans Raman saçılması, YGRRS) sinyal artışlarının 10^{15} düzeyine ulaştığı bildirilmektedir. Son yıllardaki çalışmalar, YGRRS tekniğinin tek-molekül tayini potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (FAULDS, 2007).

Altın ve gümüş, YGRS/ YGRRS ölçümlerinde yaygın olarak kullanılan metallerdir. Altın (Au) ve gümüş (Ag) nanoparçacıklarının her ikisi de güçlü ışık Emilimi ve saçılımı yeteneklerine sahiptirler. Bu özellik “ yüzey plazmon rezonansı, SPR ” olarak adlandırılır ve metalin serbest elektronlarının toplu halde uyarılmasından kaynaklanır (LINK, 2000). Plazmon rezonans frekansı parçacıkların büyüklüklerine ve şekillerine (KELLY, 2003, JAIN, 2006) olduğu kadar nanoparçacığın bulunduğu ortamın dielektrik özelliklerine (GHOSH, 2004) ve nanoparçacıkların kendi aralarındaki etkileşimlerine de (JAIN, 2006, STORCHOFF, 2000) bağlıdır. Dolayısı ile SPR frekansını değiştirmek mümkündür. Altın ve gümüş nanoparçacıkların plazmon absorpsiyon dalgaboyları, parçacıkların geometrisini (nanoprism, nanoküp) veya şeklini (nanostar, nanocubuk) değiştirerek, görülebilir bölge ile yakın IR bölgesi arasında (Vis-NIR) ayarlanabilmektedir (HAES, 2002). Optik özellikleri açısından YGRS/YGRRS çalışmalarında en çok kullanılan nanoyapılar nanoküreler, nanoçubuklar ve nanokabuklardır (ROSI, 2005, EL-SAYED, 2005). YGRS ölçümlerinde duyarlılığı daha da çok artırmak için substrat olarak, plazmon frekansı kullanılan lazerin uyarma frekansı ile örtüşen nanoparçacıklar seçilmelidir (SANCI, 2009).

YGRS/YGRRS tekniklerinin medikal tanı için kullanımında, gen problemleri Raman-aktif etiketlerle işaretlenmekte ve metal kolloid veya metal nanoparçacıklarını içeren katı substratlar kullanılarak ölçüm yapılmaktadır. İşaretlemede kullanılan Raman aktif maddeler bilinen floroforlardan seçilebileceği gibi floresans özellik göstermeyen pek çok kimyasal da bu amaçla kullanılabilir (FAULDS, 2005). Raman etiketlerinin çeşitliliğinin yanı sıra Raman bantlarının floresans bant genişliklerine göre çok daha ince olması, çok sayıda gen probunun birlikte görüntülenebilmesine olanak sağlar. Diğer bir deyişle YGRS tekniği, çoklu tayinler (multiplex detection) için floresans tekniğinden çok daha avantajlıdır (CAO, 2002, SUN, 2007). Diğer önemli üstünlüğü ise işaretlemede kullanılan

tüm farklı Raman aktif etiketlerin tek bir lazer kullanılarak eş zamanlı uyarılabilmesidir (YUN, 2003).

Genom analizlerinde genellikle, hibritleşmeyi belirlemek için oligo DNA probu sadece bir veya birkaç boya molekülü ile işaretlenmektedir. Bu yaklaşımın en büyük dezavantajı, hedef molekülün derişiminin düşük olduğu durumlarda elde edilen sinyalinin tayin için yeterli olmamasıdır. Duyarlılıktaki bu sınırlama ancak tek bir oligo proba bağlanan etiket miktarını artırmakla aşılabilir. Nanoteknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak, quantum dot, silika ve metal nanoparçacıkları gibi çeşitli nanomateryaller, sinyali güçlendirebilmek amacıyla biyoanalizlerde işaretleme probu olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu yaklaşımda belirli bir derişimdeki etiket çözeltisi tek bir nanopartikülün içine hapsedilmekte, daha sonra bu parçacık gen probunun işaretlenmesinde kullanılmaktadır. Bu şekilde hazırlanmış gen propları tek bir boya molekülünün kullanıldığı etiketleme sistemine göre çok daha güçlü sinyal vermektedir (ZHAO, 2003).

Bugüne kadar, birçok araştırma grubu tarafından çeşitli Raman etiketli işaretleme propları geliştirilmiştir (VO-DINH, 2005, CAO, 2002, DOERING, 2003). Nanoparçacık seçiminde, YGRS/YGRRS teknikleri için gerekli olan yüzey plazmonlarını sağlaması açısından, metal (altın veya gümüş) nanoyapılar tercih edilmiştir. Bu çalışmalarda ya Raman aktif etiket doğrudan metal nanoparçacığın yüzeyine tutturularak prob olarak kullanılmış (GRAHAM, 2003); ya da etiketle kaplanmış olan metal nanoparçacık bir kabukla çevrilerek çekirdek-kabuk tarzı yapılar oluşturulmuştur (DOERING, 2003). İkinci yaklaşımın daha sağlıklı olduğu düşünülmektedir. Çünkü gen propları ile çalışılan ortamlar iyon şiddeti yüksek çözeltilerdir. Böyle bir ortamda yüzeye tuturulmuş olan etiketlerin çözeltiye geçişi kadar , ortamda bulunan maddelerin metal yüzeyi ile etkileşmesi de olasıdır (VO-DINH, 2005, CAO, 2002, DOERING, 2003). Metal çekirdek-kabuk tarzı işaretleme proplarının hazırlanmasında kaplama malzemesi olarak, biyopolimerler (proteinler), organik polimerler ve silika kullanılmaktadır (QIAN, 2008). Bunlar arasında, yüksek mekanik dayanıklılığı; uzun süreli depolanabilme özelliği; optik özellikleri gibi faktörlere bağlı olarak, silika en çok tercih edilen kabuk malzemesidir (MULVANEY, 2003).

Metal nanoparçacık, Raman aktif etiket ve silika kaplamadan oluşan çekirdek-kabuk yapısı “YGRS nanoetiket” olarak adlandırılmaktadır. Bu parçacıkların sentezi için öncelikle metal nanoparçacıklar hazırlanmakta, yüzeylerine Raman aktif moleküller tuturulmakta ve daha

sonra sol-jel teknolojisi kullanılarak silika kabuk oluşturulmaktadır (MULVANEY, 2003). Daha önce de belirtmiş olduğumuz gibi YGRS ölçümleri için kullanılabilinecek etiket seçeneği çok çeşitlidir. Parçacıklar hazırlanırken kullanılacak Raman aktif made, ölçümlerde kullanılacak lazer kaynağına göre Vis veya NIR bölgesinde sinyal verecek şekilde seçilir. Resonans Raman (YGRRS) katkısının kullanılmasının planlandığı, yüksek duyarlılık gerektiren durumlarda, kullanılacak Raman aktif madde konusunda çok daha seçici olmak gerekmektedir. Yeni nesil Raman cihazlarında doğrudan kullanılabilen lazer sayısı dördü bulabilmektedir. Dolayısı ile her bir lazerin dalga boyuna uygun kromofor içeren Raman aktif maddeler seçilerek YGRS nanoetiketlerinin hazırlanmasında kullanılabilir. Çekirdek olarak kullanılacak metalin seçimi de yine uyarda kullanılan lazerin dalgaboyuna göre yapılır. Genel uygulamalarda Vis bölgede gümüş, NIR bölgesinde ise altın nanoküreler kullanılır. Ancak, daha önce de belirtmiş olduğumuz gibi ölçüm duyarlılığı, kullanılan metalin resonans plazmonlarının absorpsiyon dalgaboyunun uyarıcı lazerin dalga boyu ile örtüştüğü durumlarda artmaktadır (SANCI, 2009). Metal (altın/gümüş) plazmonlarının maksimum absorplama çizgilerini ayarlayabilmek için çubuk, yıldız, tel gibi farklı şekillerde nanoparçacıkların sentezlenmesi ve özellikle YGRRS nanoetiketlerinin hazırlanmasında kullanılması daha duyarlı ölçüm için gerekmektedir. Silika kaplama genelde tetraetoksi silanın (TEOS) bazik ortamda jelleşmesi ile sağlanır. TEOS miktarı ile oynanarak silika kalınlığı değiştirilebilir. Silika yapısı hazırlanan YGRS/ YGRRS nanoetiketlerinin hedeflenen biyomoleküle bağlanmasını sağlayacak işlevsel gruplarla kaplanabilir (LU, 2007).

Daha önce bahsetmiş olduğumuz gibi DNA dizinleri, birden fazla dizinin bulunduğu bir karışımın içinden amaçlanan dizine özgü, görüntülenebilir bir prob yardımı ile tayin edilir. DNA analizi için gerekli olan deney sayısını azaltmak, ve her bir ölçüm sırasında toplanan veri sayısını çoğaltmak için, tek seferde, herhangi bir ayırma yapmaksızın tayinedilebilecek dizin sayısını artırabilmek gerekir. Buna bağlı olarak, son yıllarda çoklu biyoışaretleyicilerin geliştirilmesi çok önem kazanmıştır. YGRS/YGRRS nanoetiketleri, hücresel görüntüleme veya biyosensör uygulamaları için hem hücre içi hem de hücre dışı çalışmalarda çoklandırılmış görüntüleme problemleri olarak yüksek potansiyel göstermektedir (SCHLÜCKER, 2009).

Model sistem : Übikitin Proteazom Sistem

Proteoliz, hücrelerin normal gelişme sürecinde metabolik yollarda işlev gören proteinlerin kontrollü yıkımında rol oynayan önemli bir fizyolojik proses olup, ayrıca hasarlı proteinlerin yok edilmesinde etkin olan stres tepkisinde de önemli işlevi olan kritik mekanizmalardan bir tanesidir. Ökaryotik (*Eucarya*) hücrelerde 26 S proteazomların hücre fizyolojisindeki vaz geçilmez rolleri uzun yıllardır bilinmektedir. (HENDIL, 2002, GACZYNSKA, 2001). Hücre içi proteoliz istenmeyen yıkımları önlemek açısından kontrollü bir şekilde yürütülmek durumundadır. Kompartimentalizasyon, hücrede kontrollü protein yıkımı için geliştirilmiş stratejilerden önemli bir tanesidir. Bunun başlıca örneği proteazomlarda görüldüğü şekli ile oto-kompartimentalizasyondur. Proteazom ökaryotik sistemlerde sitoplazma ve nükleusta enerjiye bağımlı protein yıkımından sorumlu bir proteaz kompleksidir (BAUMEISTER, 1998, BOCHTLER, 1999). Çok farklı proteaz aktivitelerini içeren bu multikatalitik sistem, kimosin benzeri, tripsin benzeri aktiviteler gibi birçok proteaz akativitesine sahiptir. Çeşitli canlı sistemlerinde yaygın olarak yer almaları hücrede protein yıkımında kritik rol oynadıklarının bir göstergesidir. Bu komplekslerin, döngüsel protein yıkımı, stres tepkisi, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi, transkripsiyon kontrolü, kromozom segregasyonu, DNA hasar onarımı, hücre farklılaşması, metabolik adaptasyon ve bağışıklık sistemine ilişkin önemli fizyolojik rolleri bulunmaktadır (GACZYNSKA, 2001). Hedef proteinlerin tanınması ve 26S proteazoma yıkım için yönlendirilmesi çok sayıda, übikütin olarak adlandırılan küçük protein moleküllerinin, hedef proteinlere bağlanması yolu ile olmaktadır. Bu sinyal moleküllerinin varlığı nedeniyle yanlış katlanmış ya da hasar görmüş proteinlerin 20S proteazom tarafından tanınması ve yanlış yıkımların önlenmesi sağlanmaktadır. Bu sistem genel olarak übikütin-proteazom sistemi olarak adlandırılmaktadır (UPS).

26S proteazom ATP'ye bağımlı, çok alt üniteli (yakalaşık 31), silindir şeklinde moleküler büyüklüğü 2.5 MDa olan bir moleküler makinedir (VOGES, 1999). Bu molekül, 20S katalitik kompleks ile ona bir ya da iki ucundan bağlanmış 19S düzenleyici kompleksten oluşmaktadır. 19S düzenleyici alt üniteler übikütin ile işaretlenmiş proteinlerin tanınması ve yapısının çözünüp 20S alt ünite kompleksinin iç boşluğuna taşınmasında aktif rol oynamaktadır. Hedef proteinlerin tanınması ve 26S proteazoma yıkım için yönlendirilmesi küçük bir protein olan (76 amino asit) übikütin molekülünün çoklu olarak hedef proteinlerin lisin grubuna bağlanması yolu ile olmaktadır. Dolayısı ile bu proteinin en önemli

fonksiyonu yanlış katlanmış ya da hasar görmüş proteinlerin 20S proteazom tarafından tanınması için bir sinyal oluşturmaktadır. Hücrede protein döngüsünde kritik işlevi dikkate alındığında UPS 'deki herhangi bir aksama ya da bozukluk fonksiyonel olmayan proteinlerin birikmesine ve hücre işlevi ile ters etkileşimine yol açmakta, çoğu kez toksik etki yapmaktadır. Son yıllarda beyinde çeşitli protein agregatlarının biriktiği birçok nörodejeneratif hastalıklarda (Prion, Huntington, Alzheimer, Parkinson, Amyotrophic Lateral Sclerosis gibi) proteazom aktivitesinde önemli ölçüde azlama olduğu belirlenmiştir (JESENERGER, 2002). Örneğin, Huntington hastalığında beyinde ve diğer dokularda UPS aktivitesinin inhibe olması dolayısı ile nöronlar arası mutant huntingtin proteini agregatlarının birikmesi gibi. Proteazom aktivatörleri kullanılarak proteazom fonksiyonunun yeniden kazanılması bir terapötik strateji olarak uygulandığında Huntington model ve hasta hücrelerinde canlılığın sürdürülmesi yolunda önemli gelişmeler kaydedilmiştir (SEO, 2007).

26S proteazomlar sinyal iletimi, stres tepkisi, transkripsiyon kontrolü, kromozom segregasyonu, DNA tamiri ve hücre döngüsü gibi bir çok hücrel süreçte regülatör rolü oynayan kısa ömürlü proteinlerin yıkımında etkili olmaktadır (HENDIL, 1998). Proteazomlar tarafından parçalanan spesifik proteinlerin neler olduğu dikkate alındığında proteazomlar ile apoptosis, hücre farklılaşması, ve DNA onarımı arasındaki nasıl bir yakın bir ilişki olabileceğini tahmin etmek mümkündür. Bunun ötesinde proteazomlar retinoblastom tümör baskılayıcı yol izinde de yer almaktadır Diğer bir ilginç bağlantı ise, kanser ile olan ilişkisidir. Her ne kadar UPS sistemin inhibisyonu farklı hücre tiplerinde farklı sonuçlara yol açmakta ise de, apoptatik hücre ölümü sıkça rastlanılan bir sonuçtur. Bu bağlamda spesifik bir proteazom inhibitörü olan sitotoksik ajan PS-341'in prostat kanseri ve meme kanserine karşı kullanılması amacı ile yürütülen klinik uygulamalar son derece ümit vericidir (GROLL, 2005).

UPS'in hücrenin işlevsel organizasyonda çok boyutlu rolü ve aktivitesindeki değişikliklerin ya da aksamaların hücrede çeşitli fonksiyonel bozukluklara ve hastalıklara yol açması dolayısı ile bu system son yıllarda araştırmaların odaklandığı sıcak konulardan birisidir. Yüzeysel güçlendirilmiş Raman saçılması (SERS) alanında 1998 yılından buyana kaydedilen hızlı teknolojik gelişmelere paralel olarak tıbbi tanı ve biyolojik görüntü analizine (gen, protein belirleme, hücre görüntüleme) yönelik uygulamalarında da önemli yol

katedilmiştir. Bu süreçte yeni SERS substratları olarak çok çeşitli nanopartiküller ve nano yapıların tasarımı ve üretimi dikkat çekicidir.

Bu proje kapsamında, daha güçlü yüzey plazmon etkisi yaratabilmek için metal morfolojisi değiştirilerek ve rezonans Raman koşullarına uygun Raman aktif kimyasalar seçilerek YGRRS nanoetiketleri hazırlanmıştır. Yeni tasarımı YGRRS etiketlerinin kullanımı ile RAMAN spektroskopinin potansiyel klinik uygulamalarının yeni bir örneği olarak insan 26S ve 20S proteazomlarına özgü RAMAN aktif DNA ve antikor problemleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Projenin son 6 aylık döneminde daha güçlü sinyal almaya yönelik, altın (veya gümüş) çekirdek-silika kabuk içine hapsedilmiş Raman aktif boyadan oluşan, YGRS-nanoetiket sistemi geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda farklı dalga boylarında rezonans plazmon absorpsiyonuna sahip gümüş nanoküre, altın nanoçubuk ve altın üzeri gümüş nanoçubuklar kimyasal indirgeme yöntemleriyle hazırlanmıştır. Hazırlanan metal nano yapıların üzerine Raman aktif boya tutturulmuş ve sol-jel yöntemi ile boya tutturulmuş parçacıkların yüzeylerinin silika ile kaplanması çalışmaları yapılmıştır. Metal nanoparçacıkların boyutu, boya derişimi ve silika kalınlığı optimize edilerek güçlü bir Raman sinyali elde edilmeye çalışılmıştır. Üç farklı metal nanoparçacık sistemi içerisinde silica-gümüş çekirdek-kabuk sistemi ile güçlü sinyaller elde edilmiştir. Daha sonra insan proteazom gen dizilimine dayalı hedef ve prob oligoları ve yanlış eşleşen baz dizilimine sahip problemler ile hibridizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda sıcaklığın hibridizasyona olan etkisi incelenmiştir ve elde edilen yapılarla ilgili YGRS çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalardan sonra BCB ile işaretlenmiş silica kabuk-gümüş çekirdek YGRS nanoetiketlerinin kullanımı ile SERS-gen problemlerinin hazırlanması ve insan proteazom gen dizilimine dayalı, YGRS nanoetiketleri ile işaretlenmiş hedef ve prob oligo DNA lar ile yapılan hibridizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte yapılan çalışmalar ve alınan sonuçlarla ilgili ayrıntılı bilgiler sırası ile aşağıda verilmiştir.

2 Gereç ve Yöntem

2.1. Gümüş Nanoparçacıkların Sentezi

Gümüş nanoparçacıkları, ilk olarak kimyasal indirgeme yöntemi ile sentezlenmiştir. Tipik bir reaksiyonda, 6.0 mg NaBH_4 37.5 mg sodyum sitratı 198 ml deiyonize su içerisinde çözüp, 0°C de soğumaya bırakılır. Daha sonra, hazırlanan çözelti içersine 0.01 M AgClO_4 çözeltisi bu sıcaklıkta eklenerek, manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. Karıştırma işlemi 20 dakika daha devam eder. Reaksiyon sırasında, çözeltinin rengi önce açık sarıya döner, sonra koyu sarı rengini alır. Gümüş kolloid çözeltileri ileriki deneyler için oda sıcaklığında karanlık bir ortamda bekletilir.

2.2. Silika Kaplı Gümüş Nanoparçacıkların Hazırlanışı

Kimyasal indirgeme yöntemi ile sentezlenen gümüş nanoparçacıkları modifiye edilmiş Stöber yöntemi ile silika kaplanmıştır. Bunun için, 5 ml gümüş kolloid 20 ml etanol içerisine eklenir. Daha sonra, 6 μl TEOS eklenir ve 250 μl DMA baz katalizörü ile birlikte silika kaplama prosesi başlatılır. Çözelti daha sonra bir günlüğüne karışmaya bırakılır ve ertesi gün 3 kere etanol-su çözeltisi (5:4 v/v) ve bir kez deiyonize su ile yıkanır. Yıkama işlemleri santrifüj kullanarak, 13500 rpm'de 10 ar dakikalık sürelerde yapılmıştır.

2.3. Raman Boya İçeren Silika Kabuk Gümüş Çekirdek YGRS-Nanoetiketlerin Hazırlanması

Kimyasal indirgeme yöntemi ile sentezlenen gümüş nanoparçacıkların pH sı 7 olarak ayarlanmıştır. Brilliant cresyl blue (BCB), Raman etiketinin silika tabakası içerisine hapsedmek için, ilk olarak sentezlenen gümüş kolloidten 5 ml alınarak 20 ml etanol içerisine konur. Daha sonra, 125 μl 10^{-4} M BCB eklenir ve çözelti yarım saatliğine oda sıcaklığında karışmaya bırakılır. Silika kaplama aşaması için, 6 μl TEOS ve 250 μl DMA eklenerek çözelti bir günlüğüne oda sıcaklığında karışmaya bırakılır ve sentezlenen parçacıklar 3 kere etanol-su (5:4 v/v) ve bir kez de-iyonize su ile yıkanır. Yıkama işlemleri santrifüj kullanarak, 13500 rpm'de 5 er dakikalık sürelerde yapılmıştır. Daha sonra, sentezlenen nano etiketler de-iyonize su ile 2 mililitreye seyreltilip, FE-SEM ve YGRS analizleri için kullanılmıştır.

2.4. Altın Nanoçubuk Sentezi

Altın nanoçubukların hazırlanışı, iki aşamadan oluşur. İlk aşamada, çekirdek çözeltisi hazırlanır. Bunun için, 0.20 M 5 ml CTAB çözeltisi ile 0.00050 M HAuCl₄ çözeltisi karıştırılır. Elde edilen çözeltiliye, sıcaklığı 0°C'ye indirilmiş 0.60 ml, 0.01 M NaBH₄ çözeltisi hızlı bir şekilde eklenip, bir saatliğine hızlı bir şekilde karışmaya bırakılır. Bekleme sırasında hidrojen gazının çıkmasına dikkat edilmelidir. Çekirdek çözeltisinin rengi pembeye dönerse kullanılmamalıdır. İkinci aşamada ise, büyütme çözeltisi, 5 ml 0.20 M CTAB, 5 ml 0.0010 M HAuCl₄ ve 0.20 ml 0.0040 M AgNO₃ çözeltileri karıştırılarak hazırlanır. Elde edilen çözeltinin rengi koyu sarı olup, 0.070 ml 0.0788 M askorbik asidin eklenmesi ile, renksiz bir çözelti elde edilir. Hazırlanan çözelti 10 dakika bekletilir ve altın nanoçubuk sentezi için hazır hale gelir. Son olarak, 12 µl çekirdek çözeltisi, büyütme çözeltisine eklenir ve çözelti 25-30° C' de yarım saatliğine karışmaya bırakılır.

2.5. Altın-Gümüş Çekirdek-Kabuk Nanoçubuk Sentezi

Gümüş kaplı altın nanoçubuk sentezi için, Liu ve Guyot-Sionnest tarafından (2004) rapor edilmiş hızlı ve kısa bir yöntem denenmiştir. Bu prosedüre göre, önceden sentezlenen altın nanoçubuk çözeltisinden 0.80 ml alınıp, 4 ml 1% PVP çözeltisine eklenir. Altın nanoçubukların üzerinde gümüş kabuk oluşumu gümüş nitratın askorbik asitle bazik ortamda indirgenmesi ile yapılmıştır. Altın nanoçubukların üzerindeki gümüş katmanı kalınlığıyla değişen optik özellikler, reaktiflerin konsantrasyonunun değiştirilmesi ile kontrol edilmiştir. Gümüş nitrat konsantrasyonunun nanoçubukların uzunluk oranına etkisini anlamak için eklenen 1 mM gümüş nitrat çözeltisinin hacmi 0 µl ile 900 µl arasında değiştirilmiştir.

2.6 BCB boya ve YGRS nanoetiketlerinin kullanımı ile SERS-gen problemlerinin hazırlanması

BCB katyonik bir boyadır. Bu nedenle DNA prop çözeltisine ilave edildiği zaman elektriksel etkileşim yoluyla eksi yüklü posfat gruplarına doğrudan bağlanabilmektedir. 20 µL 10⁻³ M BCB boya çözeltisi 2.25 µL (0.5 OD) oligonucleotide çözeltisi içine ilave edilerek oda sıcaklığında 4 h beklenecek şekilde işaretleme işlemi tamamlanmış olmaktadır.

YGRS nanoetiketlerinin işaretlemede kullanılmasında ise kovalent yöntem kullanılmıştır. 2.25 µl (0.5 OD) lik tek iplik DNA primer imidazol (pH 6.0) içerisinde çözünmüş olan, 1-

etil-3,3-dimetilaminopropil karbodiimit ile 3 saat boyunca 50°C inkübe edilmiştir. Oluşan 5'-fosforoimidazolitler daha sonra ile 50°C 'ta 18 saat boyunca YGRS nano-etiketleri ile etkileşime bırakılmıştır. Bağlanmamış etiketler Mini Hızlı Spin Oligo Kolon jel filtrasyonu kullanılarak reaksiyon ortamından uzaklaştırılmıştır.

2.7 Hibridizasyon Deneyleri

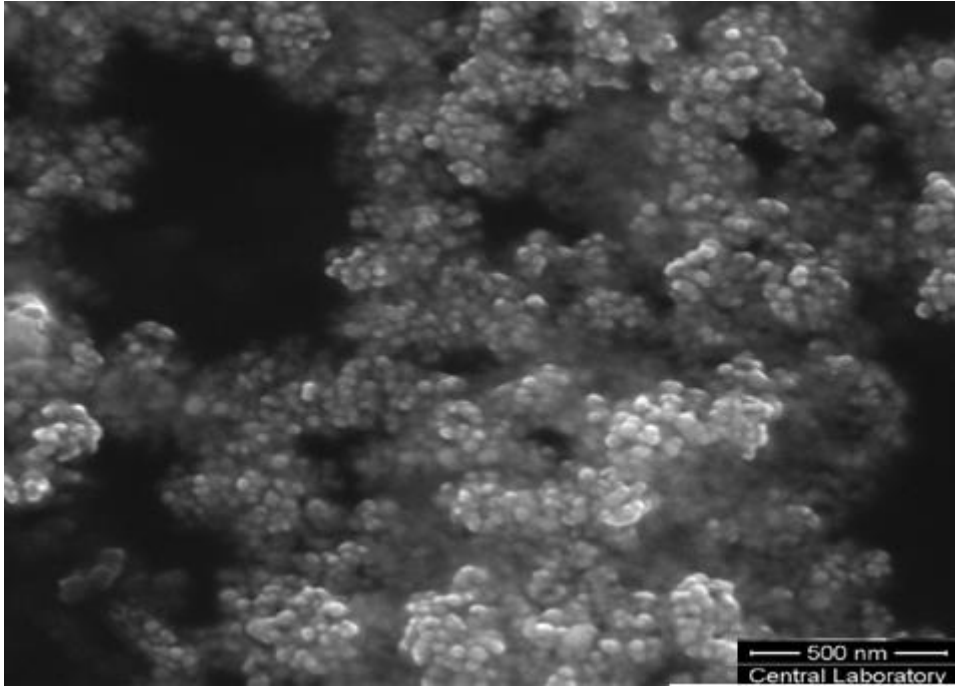
Hibridizasyon deneylerinde, ilk olarak, tiyollenmiş hedef DNA molekülleri 0.1 M'lık dithiothreitol (DTT) içeren fosfat tamponu içerisinde 1 saat inkübe edilmiş, daha sonra, oligonükleotidler mini hızlı spin oligo kolon kullanarak (Sephadex G-25, Roche Applied Science) fazla DTT'den arındırılmıştır. Kolondan geçirilen, tiyollü DNA hedefleri, temiz altın yüzeye eklenerek, 1M'lık fosfat tampon(pH 7) çözeltisi içinde 4 saat boyunca bekledikten sonra, altın yüzey, bağlanmamış hedefleri ortamdaki uzaklaştırmak için, steril su ile yıkanmıştır. Daha sonra, yüzey ara tutucusunun sulu çözeltisi altın yüzey üzerine ilave edilerek DNA iplikçiklerinin aralarına ara tutucunun bağlanması sağlanmıştır. Su ile yıkamadan sonra hibridizasyon için YGRS Gen problemlerinin sulu çözeltisi eklenmiş, 1.5 saat farklı sıcaklıklarda inkübe edilmiş ve steril su ile yıkanmıştır. Analiz öncesinde, bütün yüzeyler önce hibridizasyon tampon çözeltisi, daha sonra steril su ile sallama yöntemi ile yıkanmış ve yüzeylere gümüş kolloid eklendikten sonra YGRS sinyali takip edilmiştir. Hibridizasyonda kullanılan oligonükleotidler ve optimizasyon çalışmalarıyla ilgili ilave bilgiler sonuç ve tartışma bölümünde ayrıca belirtilmiştir.

3 Bulgular ve Tartışma/Sonuç

3.1. Kimyasal İndirgeme Yöntemi ile Gümüş Nanoparçacık Sentezi

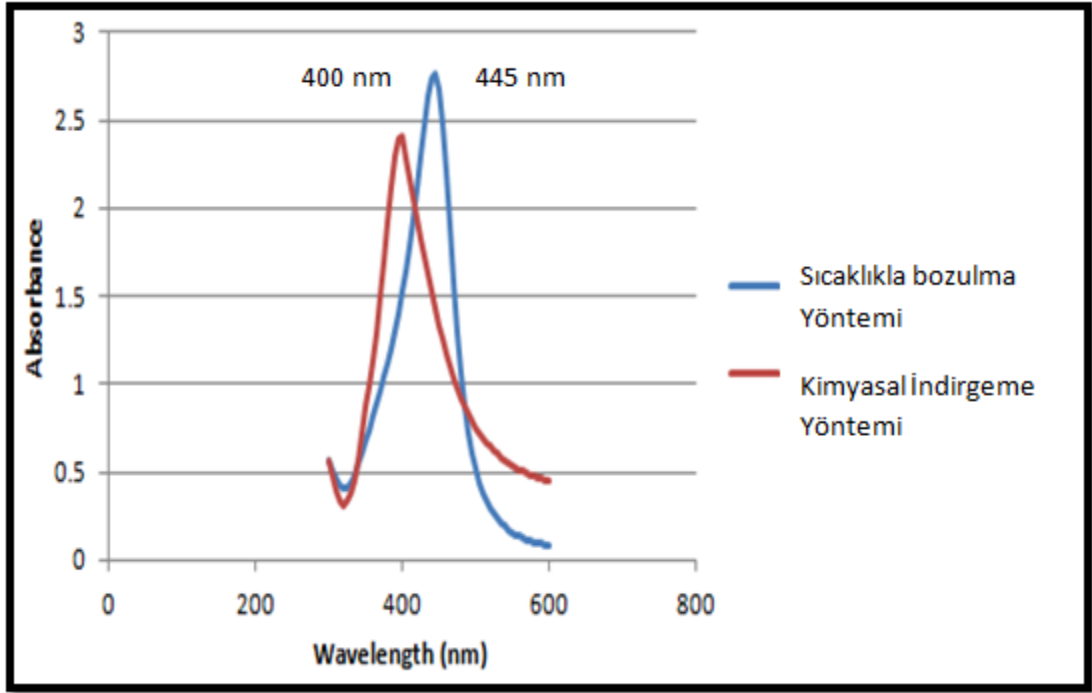
Sitrat ile indirgeme yöntemi genel olarak gümüş nanoparçacıkların sentezinde kullanılan bir yöntemdir. Ancak, bu yöntem ile sentezlenen parçacık boyutları 64 ± 16 nm civarındadır. Daha küçük boyutta gümüş nanoparçacık sentezlemek için indirgen olarak sodyum borohidür seçilmiştir. Bu şekilde sentezlenen, nanokürelerin boyutları 10 nm civarındadır. Parçacıkların stabilitesini sağlamak için ayrıca sodyum sitrat kullanılmıştır. Kimyasal

indirgeme yöntemi kullanılarak elde edilen nanoparçacıkların FE-SEM görüntüsü Figür 1 de verilmiştir.



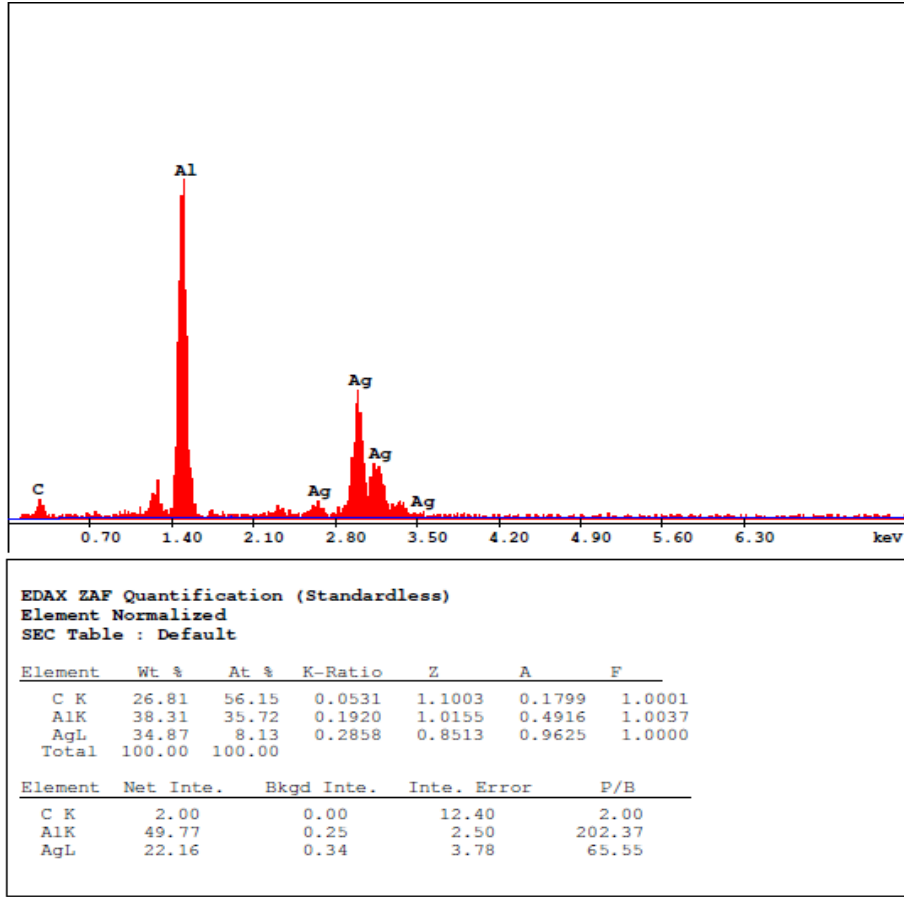
Figür 1: Kimyasal indirgeme yöntemi ile sentezlenen gümüş nanoparçacıkların FE-SEM görüntüsü.

Figür 2, yüksek sıcaklıkla bozulma ve kimyasal indirgeme yöntemleri ile sentezlenen gümüş nanoparçacıkların, plasmon absorpsiyon sinyal pozisyonlarını göstermektedir. Figür 2 de , iki yöntem ile sentezlenen parçacıkların absorpsiyon bantları kıyaslandığında, 45 nm'lik kayma gözlenmektedir. Bu beklenen bir sonuçtur, çünkü görünür bölgede, yüzey plazmon rezonans bantları parçacığın boyutuna, şekline, yapısına, metalin ve etrafındaki çevrenin dielektrik özelliklerine karşı son derece hassastır. Bu faktörler, nanoyapıların etrafındaki elektron yük yoğunluğunu etkilemektedir. Sıcaklıkla bozulma yönteminde, kırılma indeksi 1.426 olan siklohekzan çözücü olarak kullanılırken, kimyasal indirgemedede ise kırılma indeksi 1.000 olan su kullanılır. Dolayısıyla, ortamın kırılma indeksindeki değişim nedeniyle spektrumlarda önemli kayma gözlenmiştir.



Figür 2: Sıcaklıkla bozulma ve kimyasal indirgeme yöntemleri ile hazırlanan gümüş nanoparçacıkların plazmon absorpsiyon sinyal pozisyonları.

Hazırlanan örneklerin elemental analizi ve kimyasal karakterizasyonu Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) ile yapılmıştır (Figür 3). EDX, genel olarak elektron mikroskop teknikleri ile kullanılan analitik bir tekniktir. Kuvvetli alüminyum sinyali SEM-gridlerinden gelmektedir. Sentezlenen nanoparçacıklar çok küçük boyuttadır, ve bu boyutta parçacıkların karbon banda gömülmesi nedeniyle, analizler karbon bant kullanılmadan yapılmıştır.

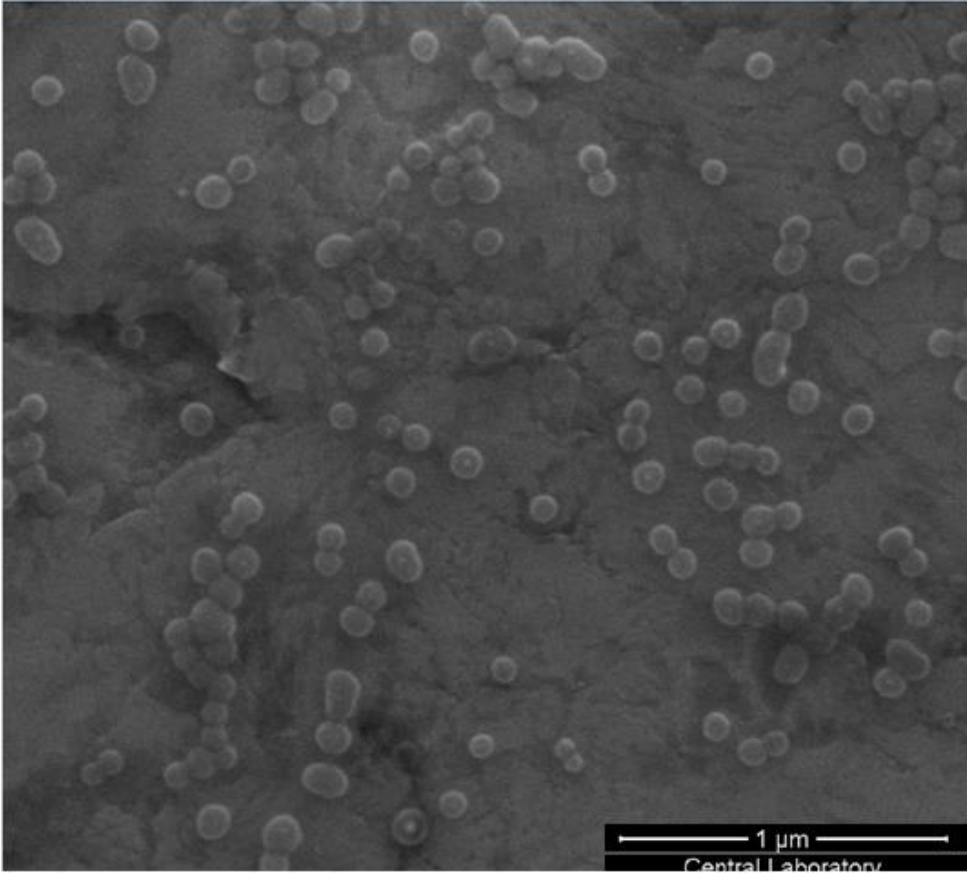


Figür 3: Kimyasal indirgeme yöntemi ile hazırlanan gümüş kolloidlerin EDX görüntüsü.

3.2 Stöber Yöntemi ile Silika Kaplı Gümüş Nanoparçacıkların Hazırlanışı

Literatürde, Stöber yönteminin daha çok 50 nm civarı boyutlardaki büyük nanoparçacıkların silika kaplamada kullanıldığından bahsedilmektedir. Ancak, bu çalışmada, genel inanın tersine, Stöber yöntemi ile, küçük nanoparçacıkların da silika tabakası ile kaplamak için kullanılabileceğini gözlemlemiş bulunmaktayız. Stöber yöntemi ile silika kaplama için, kimyasal indirgeme yöntemi ile hazırlanan gümüş nanoparçacıklar başlangıç malzemesi olarak kullanılmıştır.

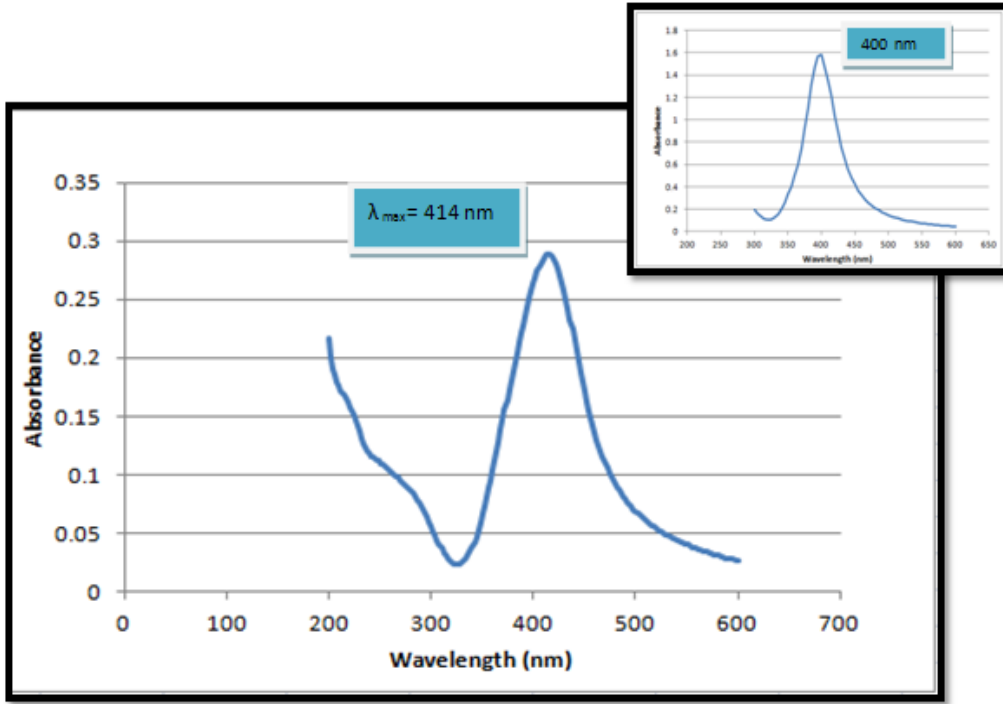
Bu çalışmada, standard Stöber yönteminde kullanılan baz katalizörü olan amonyak yerine dimetilamin kullanılarak, tetraetilortosilikat (TEOS) ile birlikte, gümüş parçacıkların etrafında düzgün silika kabuğu oluşturulmuştur. Figür 4 te verilen FE-SEM görüntüsü homojen çekirdek-kabuk parçacık oluşumunu göstermektedir.



Figür 4: Stöber yöntemi kullanılan silika kaplı gümüş nanoparçacıkların FE-SEM görüntüsü.

Merkezdeki parlak renkteki kısım gümüş çekirdeğine ve bulanık kısım ise gümüş nanoparçacıkların etrafında oluşan silika katmanını göstermektedir. FE-SEM görüntüsü, parçacıkların etrafında oluşan homojen silika katmanını iyi bir şekilde göstermektedir.

Stöber yöntemi ile hazırlanan silika kaplı gümüş nanoparçacıkların, tek plazmon bandı UV-Görünür Bölge Spektroskopisi ile 414 nm'de ölçülmüştür. Kaplanmamış nanoparçacıklar ile karşılaştırıldığında ($\lambda_{\max} = 400$ nm), silika ile kaplanmış parçacıklarda gözlenen kırmızıya kayma, parçacıkların etrafındaki bölgesel kırılma indeksinin artmasına bağlanmaktadır. Figür 5 silika kaplamadan sonra bölgesel yüzey plazmon absorpsiyon dalgaboyunun kırmızı bölgeye doğru kaydığını göstermektedir.



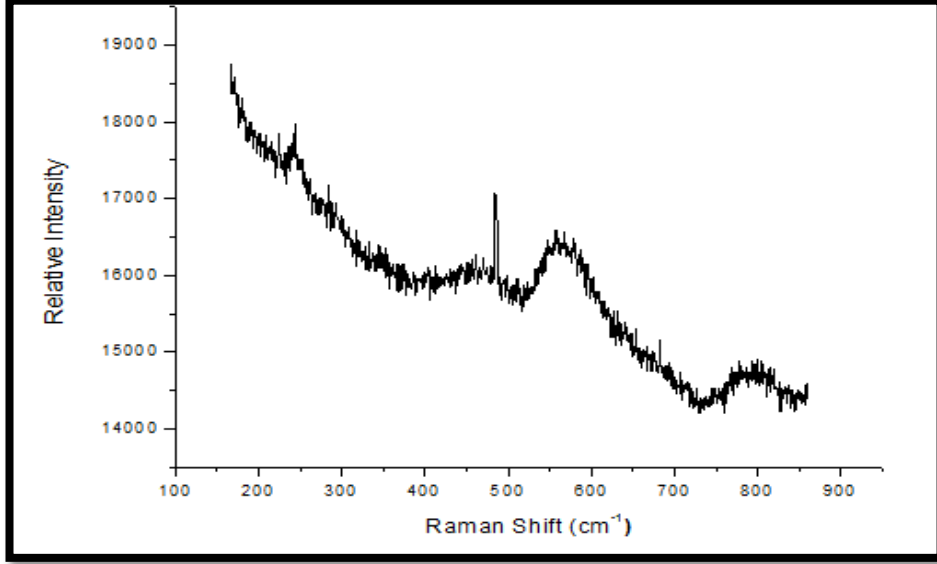
Figür 5: Stöber yöntemi ile hazırlanan silika kaplı gümüş nanoparçacıkların absorpsiyon spektrumu.

3.3 Raman Boya Etiketli Nanoparçacık Problarının Hazırlanışı

Son yıllarda YGRS'ye dayalı biyolojik tayin yöntemleri önem kazanmıştır. Raman-aktif tanıyıcı moleküller sayesinde, çeşitli Raman nano-etiketleri tasarlanıp, biyolojik moleküllerin duyarlı bir şekilde tayin edilmesinde kullanılabilir. Bu çalışmada, içinde Raman tanıyıcı molekül taşıyan, çekirdek-kabuk nanoparçacıklarını hazırlanmış, bunun için, kimyasal indirgeme yöntemi ile sentezlenen gümüş nanoparçacıkları çekirdek olarak kullanılmış ve silika kaplama için Stöber yöntemi uygulanmıştır. Raman tanıyıcısının silika kabuğuna gömülmesini sağlamak için, silika kaplama öncesinde, brilliant cresyl blue (BCB) reaksiyon karışımına eklenmiştir. BCB, pozitif yüklü Raman boyasıdır ve YGRS ölçümlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. BCB karakteristik bandı benzen halka deformasyonu nedeniyle 580 cm^{-1} 'de göstermektedir.

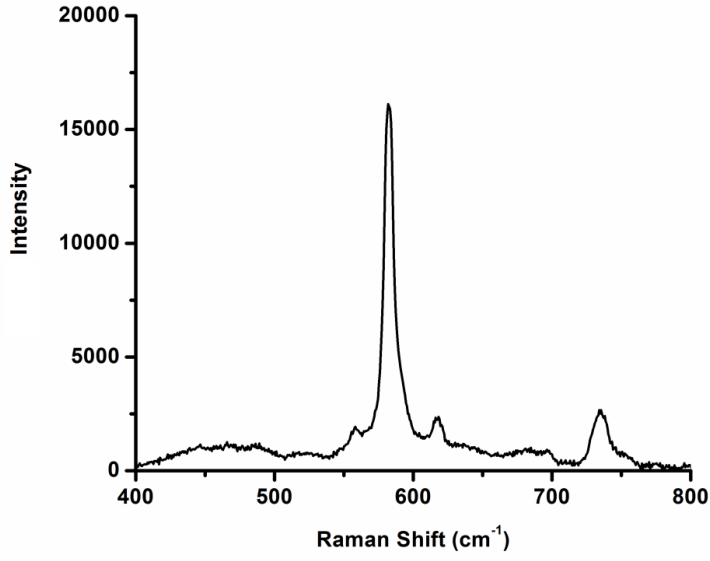
Deneylerde kullanılan, Raman tanıyıcı molekülün konsantrasyonu önemli bir parametredir. Yapılan denemelerde, 10^{-3} M boya konsantrasyonunun, gümüş nanoparçacıkların yükseltgenmesine neden olduğu anlaşılmıştır. Bu değişim, nanoparçacıkların, UV-görünür

bölge spektrometresi ile ölçülen yüzey plazmon absorpsiyon bandının ortadan kalkması ile fark edilmiştir, dolayısıyla BCB'nin karakteristik bandı YGRS ölçümlerinde de gözlenememiştir. Sonuç Figür 6 da verilmiştir.



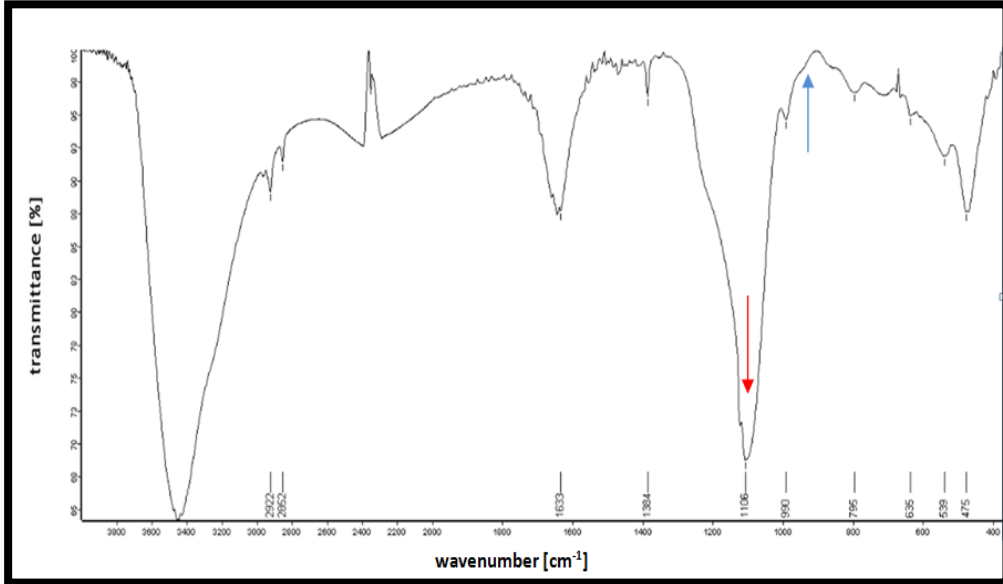
Figür 6: Yüksek konsantrasyonda (10^{-3} M) BCB kullanılarak hazırlanan nano-etiketlerin YGRS spektrumu.

YGRS nanoetiketlerin, sinyal devamlılığı boya konsantrasyonunun 10^{-4} M' a azaltılması ile elde edilmiştir. Raman sinyal şiddetlerinden elde edilen sonuçlara göre, bu konsantrasyon ile hazırlanan YGRS nano etiketlerin rutin analizlerde kullanılması mümkündür. Figür 7 10^{-4} M BCB kullanılarak hazırlanan YGRS nanoetiketlerinin YGRS spektrumunu göstermektedir.



Figür 7: Düşük konsantrasyonda (10^{-4} M) BCB kullanılarak hazırlanan nano-etiketlerin YGRS spektrumu.

Gümüş nanoparçacıkların üzerindeki silika kaplamayı göstermek için FE-SEM görüntülerinin yanı sıra, FTIR spektrometresi de kullanılmıştır. Silika ile kaplı gümüş nanoparçacıkların FTIR spektrumu Figür 8'de gösterilmiştir.

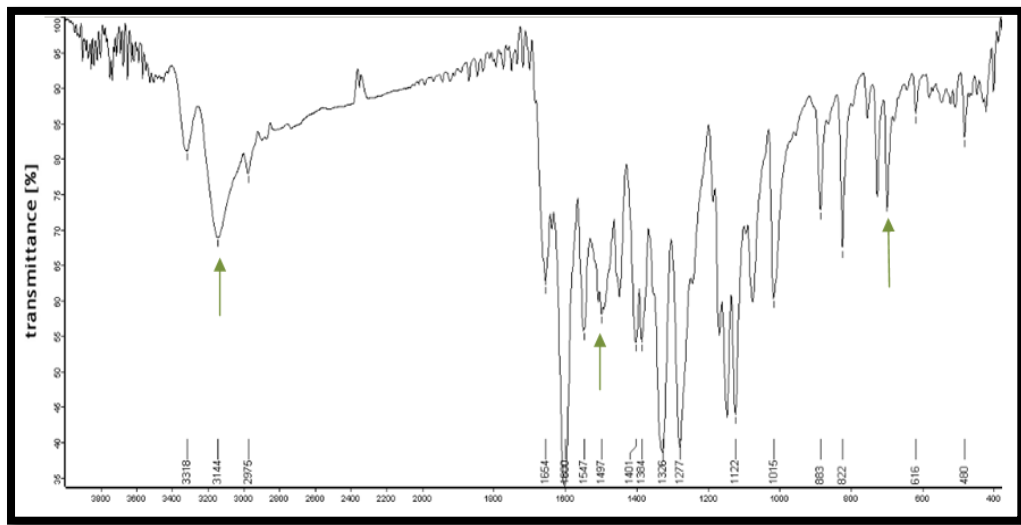


Figür 8: Silika kaplı gümüş nanoparçacıkların FTIR spektrumu.

FTIR spektrumunda gösterildiği gibi, Si-O-Si titreşimlerinin asimetrik gerilmesi 1079 cm^{-1} (kırmızı ok ile gösterilen) ve simetrik gerilmesi 878 cm^{-1} (mavi ok ile gösterilen)

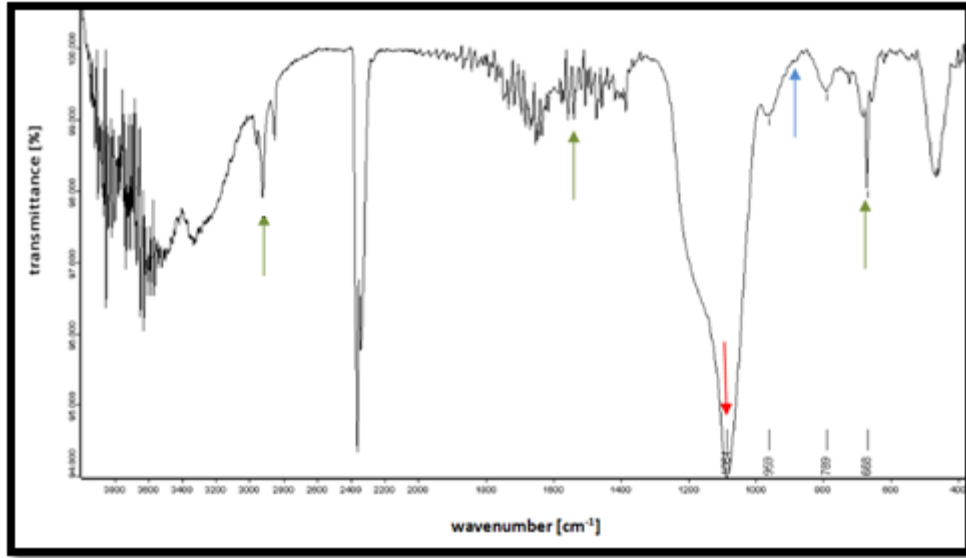
gözlenmiştir. FTIR spektrumu gümüş etrafındaki silika tabakasını gösteren bir diğer önemli kanıttır. Silika tabakasının yanı sıra, parçacıkların üzerine tutunan BCB Raman boyasını da FTIR spektrometresini kullanarak incelemek mümkündür.

BCB Raman boyasının FTIR spektrumu Figür 9 da gösterilmiştir. N-H titreşiminden gelen absorpsiyon piki belirgin bir şekilde 670 cm^{-1} de gözlenmiştir. Diğer bantlar, boya molekülünün kimyasal yapısında bulunan benzen halkasındaki C-C çift bağların gerilmesi (1497 cm^{-1}) ve C-H gerilmesini (3144 cm^{-1}) olarak yorumlanmıştır. Bahsedilen bantlar yeşil ok ile gösterilmiştir.



Figür 9: BCB'nin FT-IR spektrumu.

Figür 10 da ise, hazırlanan YGRS nano-etiketlerin FTIR spektrumu gösterilmiştir. YGRS ölçümlerinden önce, boyanın gümüş yüzeyine tutunup tutunmadığını anlamak için, silika kaplı gümüş nanoparçacıkların, BCB'nin ve YGRS nano-etiketlerin FTIR spektrumları karşılaştırılmıştır.



Figür 10: YGRS nano-etiketlerin FT-IR spektrumu.

YGRS nano-etiketlerin FTIR spektrumu, silika kaplı gümüş nanoparçacıkların ve BCB raman boyasının birleşimidir. Figür 10 da görüldüğü gibi, Si-O-Si bağı asimetrik gerilmesi 1083 cm^{-1} (kırmızı ok ile gösterilen) ve simetrik gerilmesi 884 cm^{-1} (mavi ok ile gösterilen) olarak gözlenmiştir. N-H bağı sallanmasından gelen absorpsiyon piki net bir şekilde 654 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Benzen halkasındaki C-C çift bağı ve C-H bağı gerilmeleri sırasıyla 1500 cm^{-1} ve 2920 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. BCB'nin FTIR spektrumundaki absorpsiyon bantlarının varlığı, YGRS nano-etiketlerin başarılı bir şekilde hazırlandığını kanıtlamaktadır.

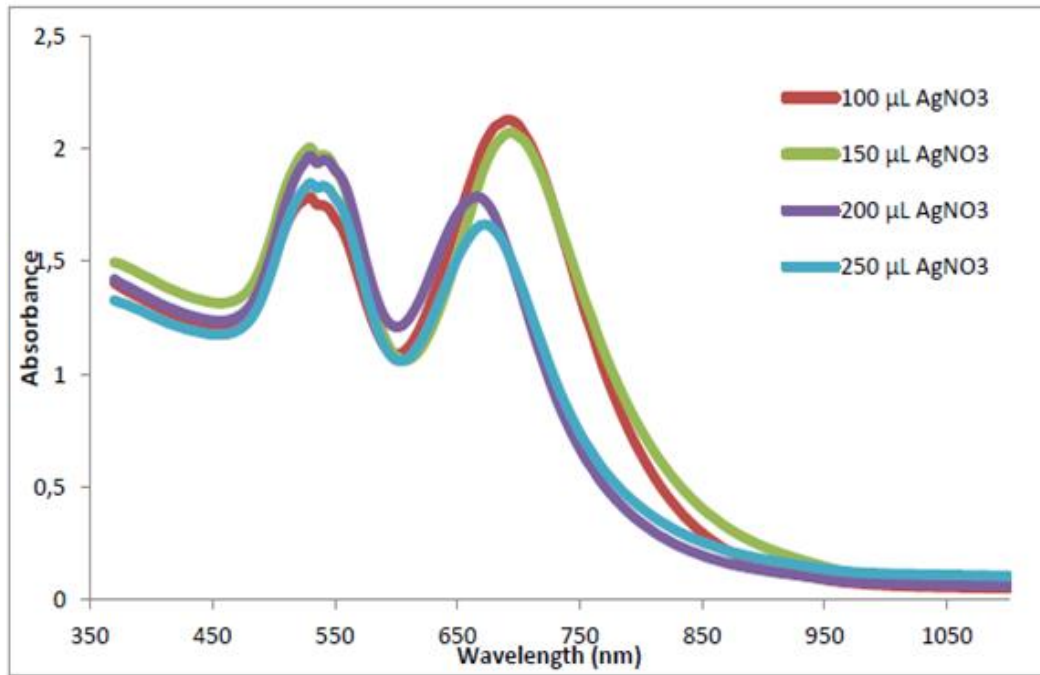
3.4. Altın Nanoçubuk Sentezi

Bu çalışmada gümüş nanokürelerin yanı sıra, homojen altın nanoçubukların sentezi üzerine de çalışılmıştır. Nanoçubuklar sulu ortamda çekirdek aracılı büyüme tekniği ile oda sıcaklığında sentezlenip, YGRS substratı olarak kullanılabilir. İstenilen uzunluk oranında altın nanoçubuklarını elde etmek için, altın çekirdek hazırlanırken kullanılan indirgenin tipi, kullanılan yüzey aktif maddenin (genelde Cetyltrimethylammonium Bromide: CTAB) konsantrasyonu, gümüş nitrat konsantrasyonu, askorbik asit konsantrasyonu ve eklenen altın çekirdek solüsyonunun hacmi önemlidir.

3.4.1. Büyütme Çözeltisindeki Gümüş Nitrat Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Gümüş iyonları içeren büyütme çözeltisinin absorpsiyon spektrumu ölçüldü ve 400 nm'de gümüş plazmon bandı gözlenemedi. Bu beklenen bir sonuçtur, çünkü büyütme çözeltisinde kullanılan askorbik asit zayıf bir indirgendir ve bu nedenle gümüş, büyütme çözeltisinin içerisinde iyonik halde bulunmaktadır. Oluşan gümüş iyonları çubukların homojen büyümesini ve dolayısıyla stabilitesini sağlar.

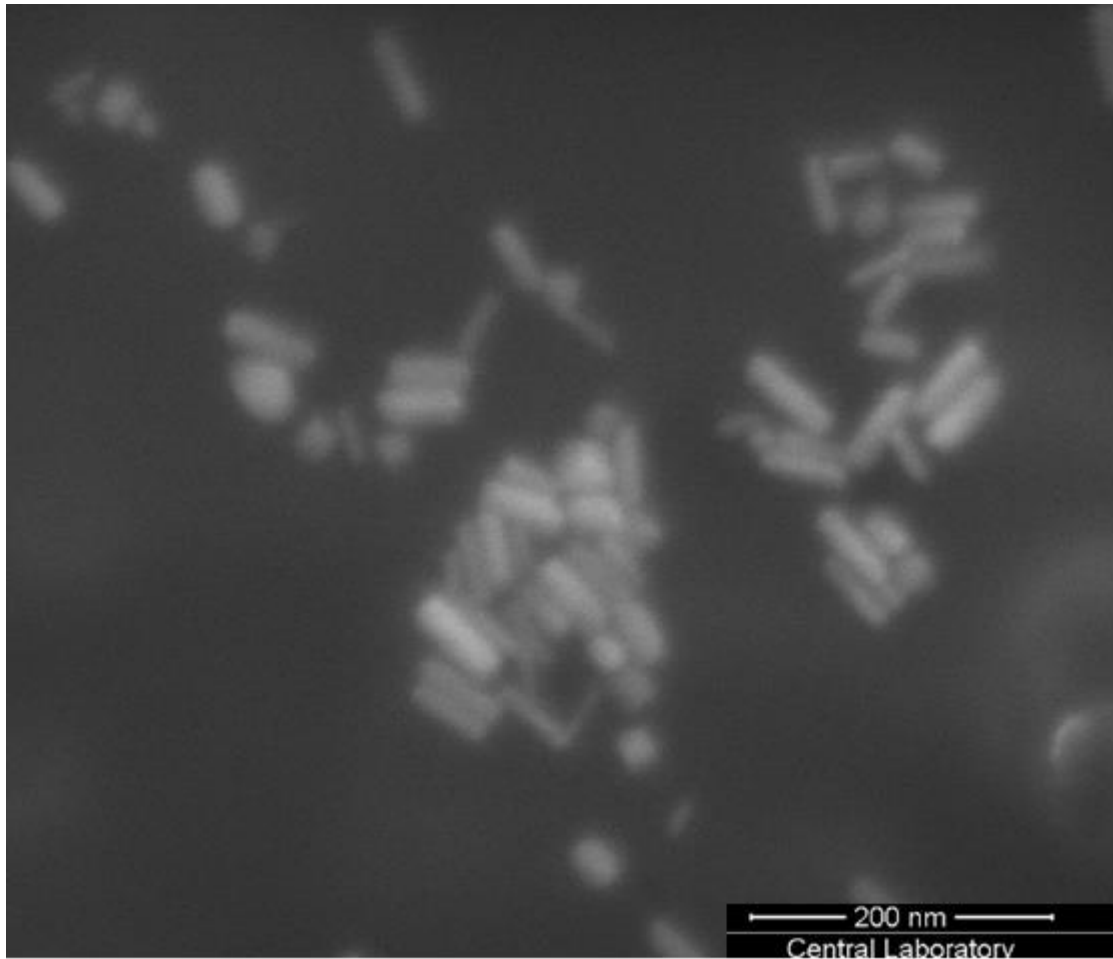
AgNO₃ miktarının nanoçubukların uzunluk oranına etkisini anlamak için, AgNO₃ hacmi 100 µl ile 250 µl arasında değiştirildi. Oluşan parçacıkların plazmon absorpsiyon spektrası Figür 11 de gösterilmiştir.



Figür 11: Gümüş nitrat hacmi değiştirilerek (100-250 µl) hazırlanan altın nanoçubuk çözeltilerinin UV-görünür absorpsiyon spektrumları

Görüldüğü gibi, büyütme çözeltisine 150 µl'ye kadar gümüş nitrat çözeltisi eklendiğinde, absorpsiyon pikinde herhangi bir değişim görülmemiştir, ancak daha fazla gümüş nitrat eklenmesi ile (200-250 µl AgNO₃) enine ve uzunlamasına plazmon absorpsiyon piklerinin sinyal şiddetinde azalma gözlenmiştir. Bu sonuç, gümüş nitrat derişiminin çok iyi optimize

edilmesi gerektiğini göstermektedir. Sentezlenen nanoçubukların FE-SEM görüntüsü Figür 12 de verilmektedir.



Figür 12: Sentezlenen altın nanoçubukların SEM görüntüleri.

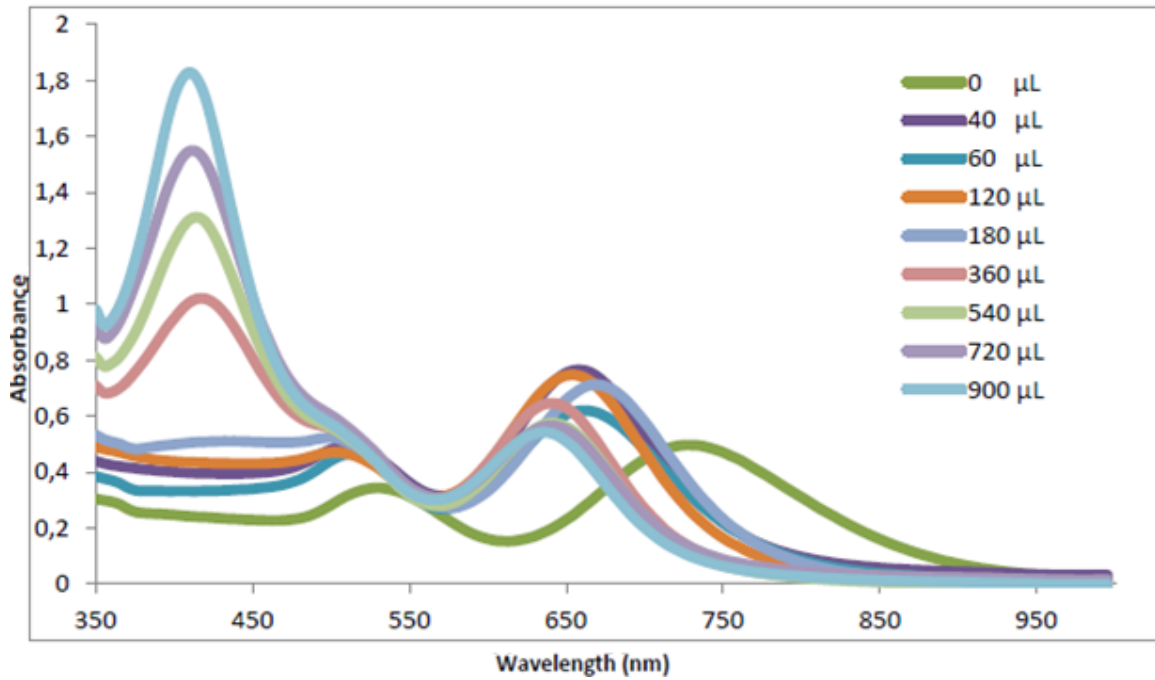
3.5. Altın-Gümüş Çekirdek-Kabuk Nanoçubuk Sentezi

Gümüş nanoyapıların, YGRS sinyal şiddetini artırma etkisi spektrumun görünür bölgesinde altın nanoparçacıklarından daha fazladır. Ancak, yaptığımız denemelerde, hazırlanan gümüş nanoçubukların yüksek miktarda sferoid ve nano-küre içerdiği, dolayısıyla homojen nanoçubuk sentezinin yapılamadığı anlaşılmıştır.

Bu yüzden, homojen altın nanoçubuklar hazırlayıp, bu parçacıkları altın çekirdek gümüş kabuk nanoçubukları üretmek için platform olarak kullanılmasına karar verildi. Bunun yanı sıra, çekirdek kabuk bimetalik morfolojisine sahip olan altın nanoçubukları gümüş ile

kaplandığında ikili karakter özelliği gösterir ve gümüş kabuğun kalınlığına bağlı olarak farklı yüzey plazmon sinyali gösterebilirler.

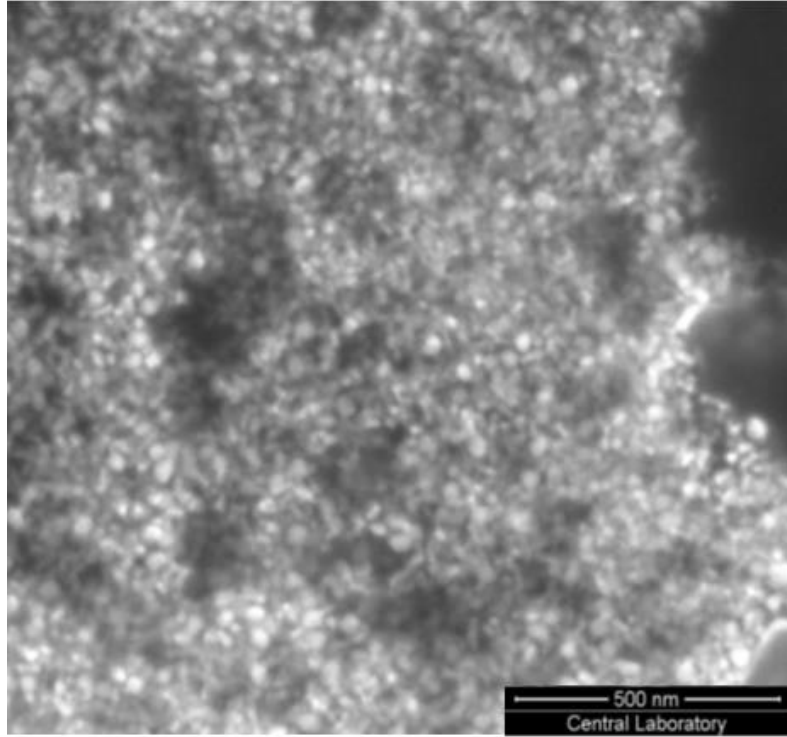
Gümüş kaplı altın nanoçubuk sentezi için, altın nanoçubuk çözeltisinden 0.80 ml alınıp, 4 ml 1% PVP çözeltisine eklenir. Altın nanoçubukların üzerinde gümüş kabuk oluşumu gümüş nitratin askorbik asitle bazik ortamda indirgenmesi ile yapılmıştır. Altın nanoçubukların üzerindeki gümüş katmanı kalınlığıyla değişen optik özellikler, reaktiflerin konsantrasyonunun değiştirilmesi ile kontrol edilmiştir. Gümüş nitrat konsantrasyonunun nanoçubukların uzunluk oranına etkisini anlamak için eklenen 1 mM gümüş nitrat çözeltisinin hacmi 0 µl ile 900 µl arasında değiştirildi. Oluşan parçacıkların plazmon absorpsiyon spektrumları Figür 13 te gösterilmiştir.



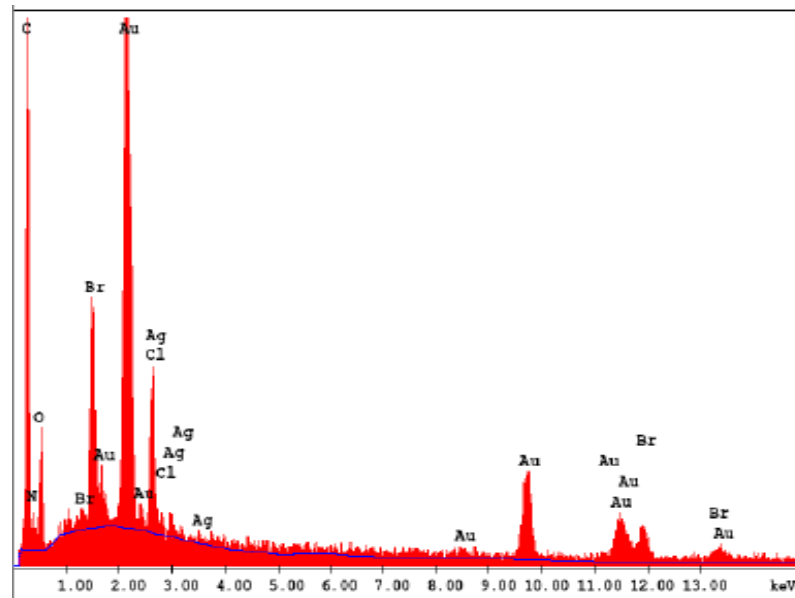
Figür 13: AgNO₃ hacminin değiştirilerek hazırlandığı altın gümüş çekirdek kabuk nanoçubuk çözeltilerinin UV-görünür absorpsiyon spektrumları.

Figür te de gösterildiği gibi, 400 nm'deki yüzey plazmon absorpsiyon pikinin şiddeti gümüş kalınlığının artması ile artmıştır. Öte yandan, kalınlığın artması ile uzunlamasına yüzey plazmon absorpsiyon bandı maviye kaymıştır. Gümüş tabakasının artması aynı zamanda çubukların kalınlığı arttırmaktadır, dolayısıyla uzunluk oranı düşmektedir.

Sentezlenen gümüş kaplı altın nanoçubukların FE-SEM görüntüleri ve EDX spektrumu sırasıyla Figür 14 ve Figür 15 te verilmiştir. FE-SEM görüntüleri gümüş ve altının elektron yoğunluklarının benzer olması nedeniyle, yeterli bilgi vermiyor olsa da, altın nanoçubukların üzerindeki gümüş tabakanın oluşumu EDX spektrumu ile gösterilmiştir.



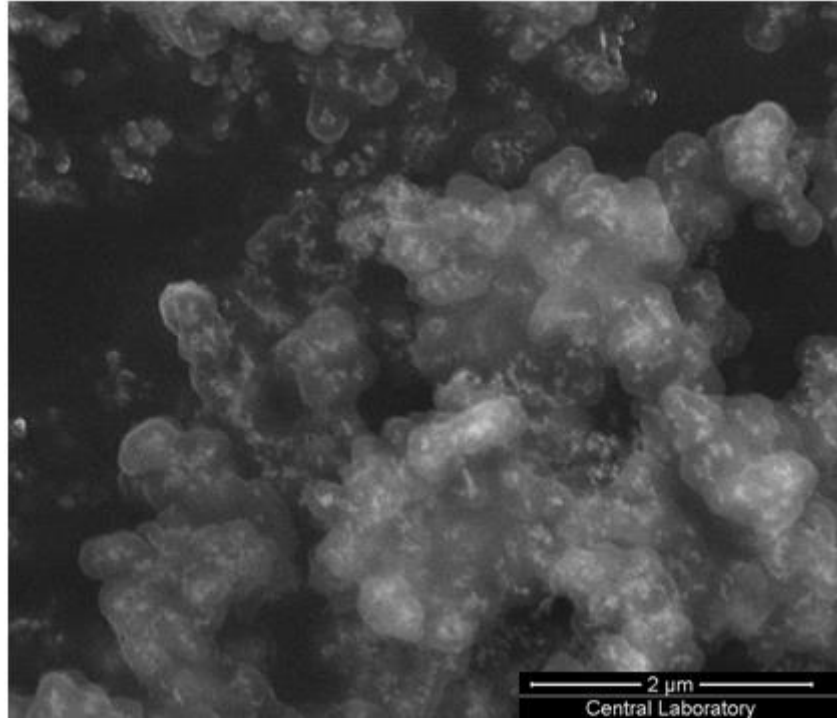
Figür 14: Gümüş kaplı altın nanoçubukların FE-SEM görüntüsü.



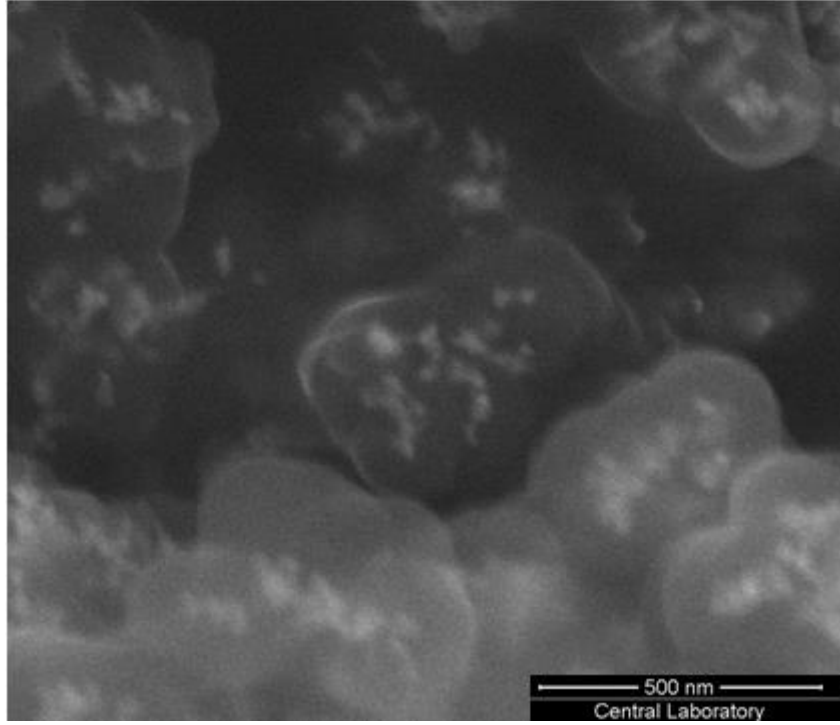
Figür 15: Gümüş kaplı altın nanoçubukların EDX görüntüsü.

3.6. Hazırlanan Nanoçubuklar ile Raman Boya Etiketli Nanoparçacık Problemlerinin Hazırlanması

Gümüş nanoparçacıkların Raman boya içeren silika kabuk ile kaplanarak etiket hazırlanması çalışmalarında kullanılan yöntem aynen altın ve gümüş kaplı altın nanoçubukların Raman boyası ile etiketlenmesi işlemine uyarlanmıştır. Ancak nanoçubuk sentezi sırasında kullanılmış olan yüksek derişimli yüzey aktif maddenin (CTAB) kaplama öncesi ortamdaki tamamen uzaklaştırılmaması nedeniyle silika kaplama çalışmaları beklendiği gibi ince film halinde olmamıştır. Nanoçubukların silika kaplama işleminden sonra alınan TEM görüntüleri sırası ile Figür 16 ve Figür 17 de verilmiştir.



Figür 16: Silika kaplı altın nanoçubukların TEM görüntüsü.



Figür 17: Silika kaplı Altın-Gümüş çekirdek -kabuk nanoçubukların TEM görüntüsü.

TEM desenlerinden de görülebildiği gibi nanoçubuklar tekil olarak değilde gruplar halinde silika ile kaplanmıştır. Silika yüzeyinde ince bir film elde edilememiştir.

3.7. İnsan Proteazom Gen Dizilimine Dayalı Hedef ve Prob Oligoları ile Yapılan Hibridizasyon Deneyleri

İnsan proteazom gen dizileri bazlı tasarlanan hedef ve prob oligoları ve ara tutucu molekül Tablo 1 de gösterilmektedir. Hibridizasyon ve hibridizasyon kontrol deneyleri, merkaptoundekanol ara tutucusu kullanılarak yapılmıştır. Test ve kontrol hibridizasyon deneylerinden elde edilen YGRS sonuçları arke proteazom gen dizilimine dayalı oligonükleotidlerle elde edilenlerle uyumludur.

Tablo 1. Oligonukleotid dizilimleri ve ara tutucu molekül.

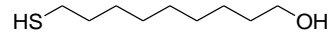
İnsan proteozomu gen dizilimi

Hedef oligo dizilimi SH- 5'- TTTTTTTTTT GCA **GTG GAT TCT CGG GCC**

Prob dizilimi 5'- **GGC CCG AGA ATC CAC**

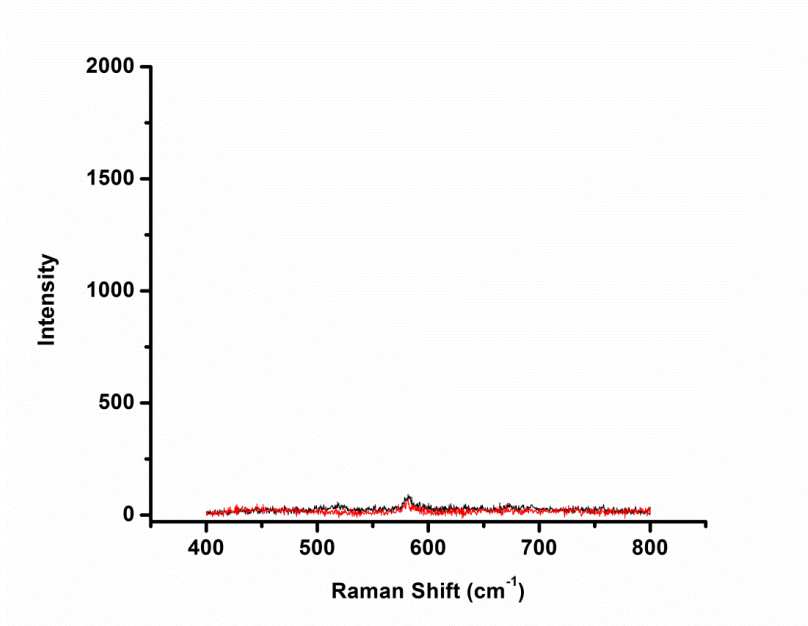
Ara tutucu

11-mercapto-1-undekanol

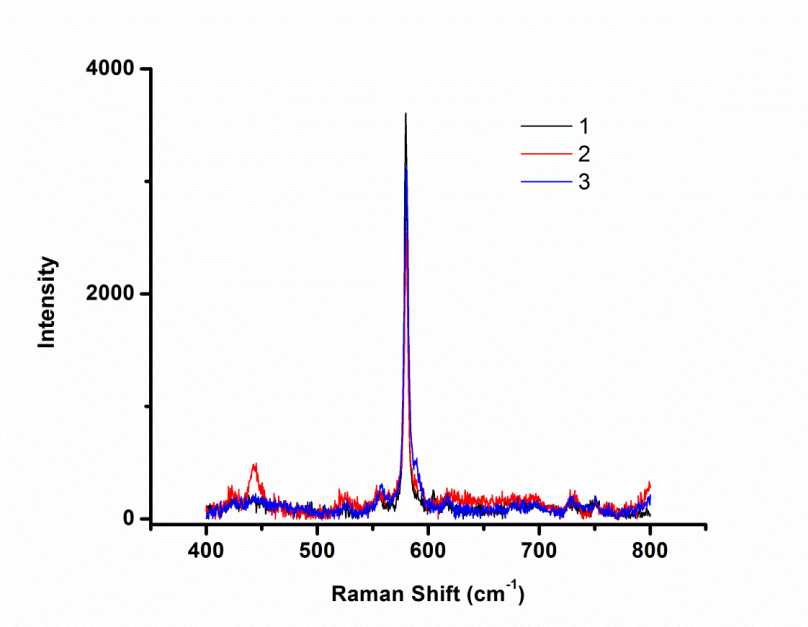


Not: Tamamlayıcı bazlar kırmızı ile yazılmıştır.

Hibridizasyonlarda, hedef DNA lar, altın yüzeye tutturulan tek zincir DNA molekülleridir. Bu hedef DNA dizilerine tamamlayıcı dizilimde olan ve hibridizasyon sonrasında hedef DNA moleküllerine bağlanan DNA dizileri, prob DNA olarak tanımlanmıştır. Hibridizasyon deneyleri, ara tutucular varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir. Bütün deneylerde, ilk olarak, tiyollenmiş hedef DNA molekülleri 0.1 M'lık dithiothreitol (DTT) içeren fosfat tamponu içerisinde 1 saat inkübe edilmiş, daha sonra, oligonükleotidler mini hızlı spin oligo kolon kullanarak (Sephadex G-25, Roche Applied Science) fazla DTT'den arındırılmıştır. Kolondan geçirilen, tiyollü DNA hedefleri, temiz altın yüzeye eklenerek, 1M'lık fosfat tampon(pH 7) çözeltisi içinde 4 saat boyunca bekledikten sonra, altın yüzey, bağlanmamış hedefleri ortamdan uzaklaştırmak için, steril su ile yıkanmıştır. Daha sonra, altın yüzey steril su ile yıkanmış ve yüzey ara tutucu sulu çözeltisi ile kaplanmıştır. Su ile yıkamadan sonra hibridizasyon için YGRS Gen problemlerinin sulu çözeltisi eklenmiş, 1.5 saat farklı sıcaklıklarda inkübe edilmiş ve steril su ile yıkamadan sonra, YGRS sinyali takip edilmiştir. Sonuçlar Figür 18 ve Figür 19 da verilmiştir.



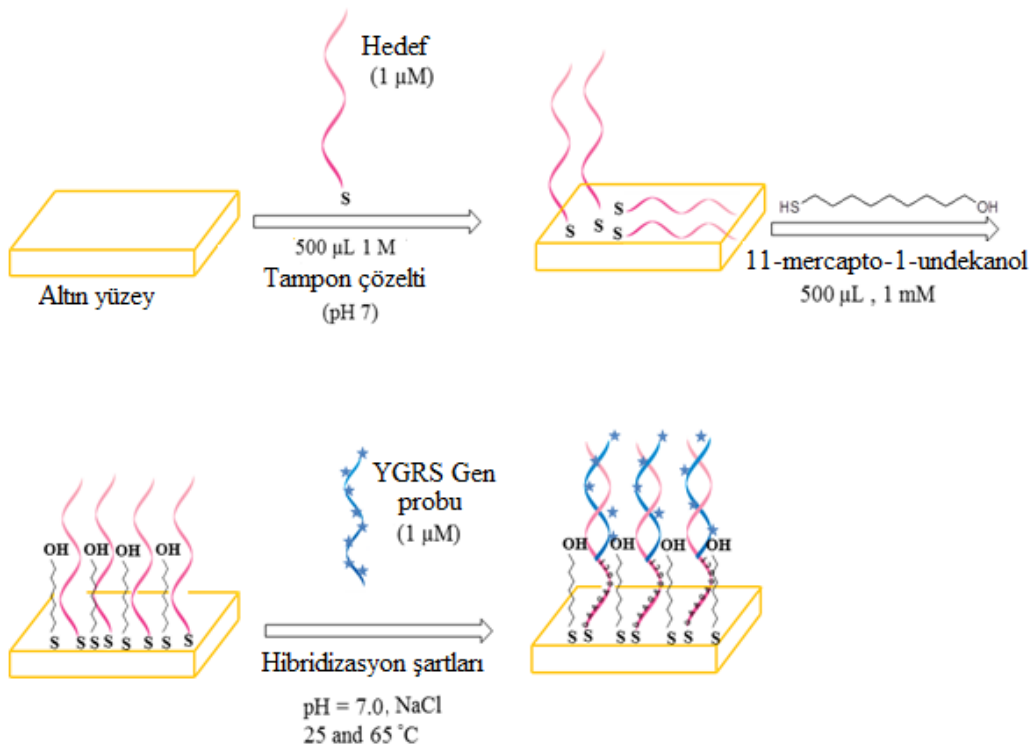
Figür 18: BCB ile etiketlenmiş DNA'nın kontrol hibridizasyon deneyi sırasında altın yüzey üzerinde gümüş kolloid kullanılarak alınmış olan YGRS spektrumları. Ölçümler yüzey kurutulduktan sonra elde edilmiştir. YGRS Gen probu insan proteazom gen dizilimi kullanılarak dizayn edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan araturucu 11-merkapt-1-undekanol'dir.



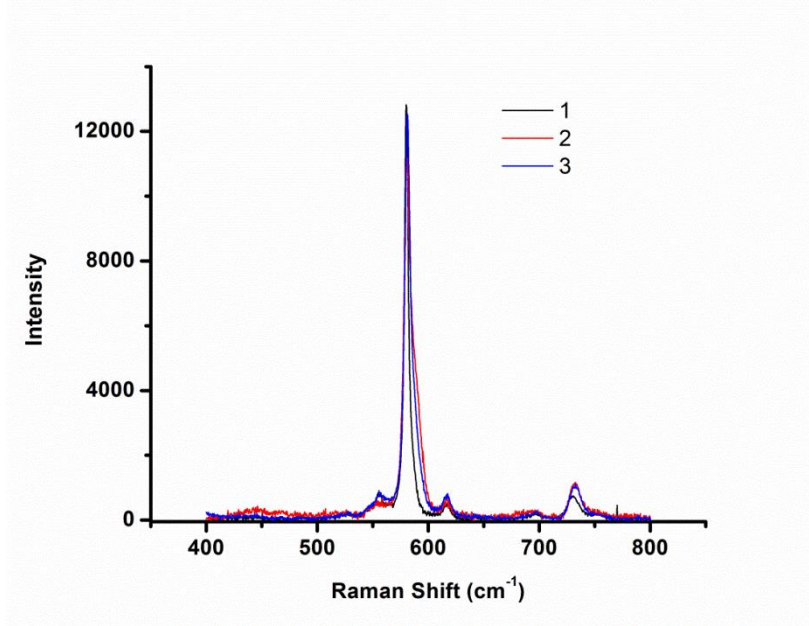
Figür 19: BCB ile etiketlenmiş DNA'nın hibridizasyon deneyi sırasında altın yüzey üzerinde gümüş kolloid kullanılarak alınmış olan üç farklı ölçüme ait YGRS spektrumları. Ölçümler yüzey kurutulduktan sonra elde edilmiştir. YGRS Gen probu insan proteazom gen dizilimi kullanılarak dizayn edilmiştir. Deneylerde ara tutucu olarak 11-merkapt-1-undekanol kullanılmıştır.

3.7.1. Sıcaklığın Hibridizasyona Etkisi

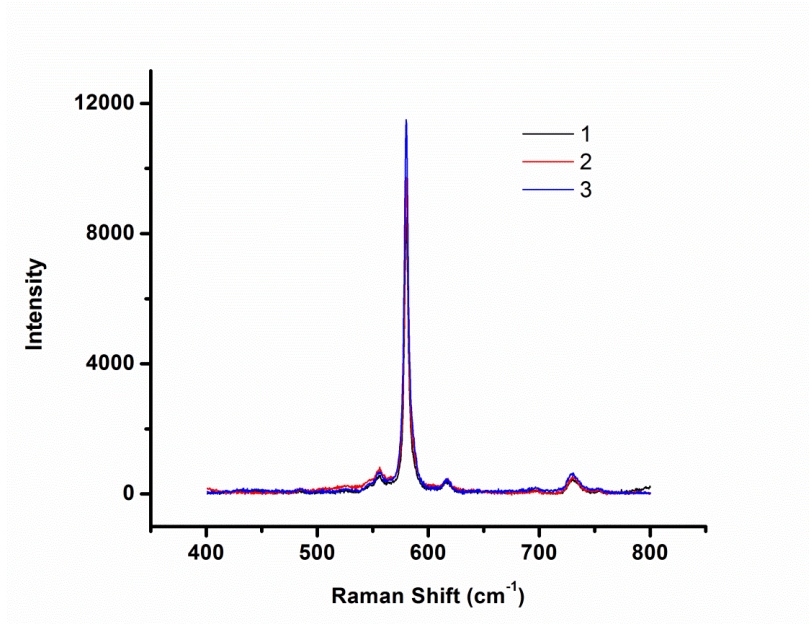
Bekleme sıcaklığının hibridizasyona etkisini anlamak için, hibridizasyon deneyleri 35 ve 55 C⁰ sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Deneylerin şematik gösterimi Figür 20 de görülmektedir. Bu deneylerde, insan proteazom oligonükleotidleri ve ara tutucu olarak 11-merkapto-1-undekanol kullanılmıştır. Sonuçlar Figür 21 ve Figür 22 de verilmektedir.



Figür 20: Farklı hibritlenme sıcaklıklarında gerçekleştirilen hibridizasyon deneylerinin şematik gösterimi.



Figür 21: BCB ile etiketlenmiş DNA'nın 35°C'de yürütülen hibridizasyon çalışmaları sırasında altın yüzey üzerinde gümüş kolloid kullanılarak alınmış olan üç farklı ölçüme ait YGRS spektrumları. Ölçümler yüzey kurutulduktan sonra elde edilmiştir. YGRS Gen probu insan proteazom gen dizilimi kullanılarak dizayn edilmiştir. Deneyleerde ara tutucu olarak 11-merkapt0-1-undekanol kullanılmıştır.

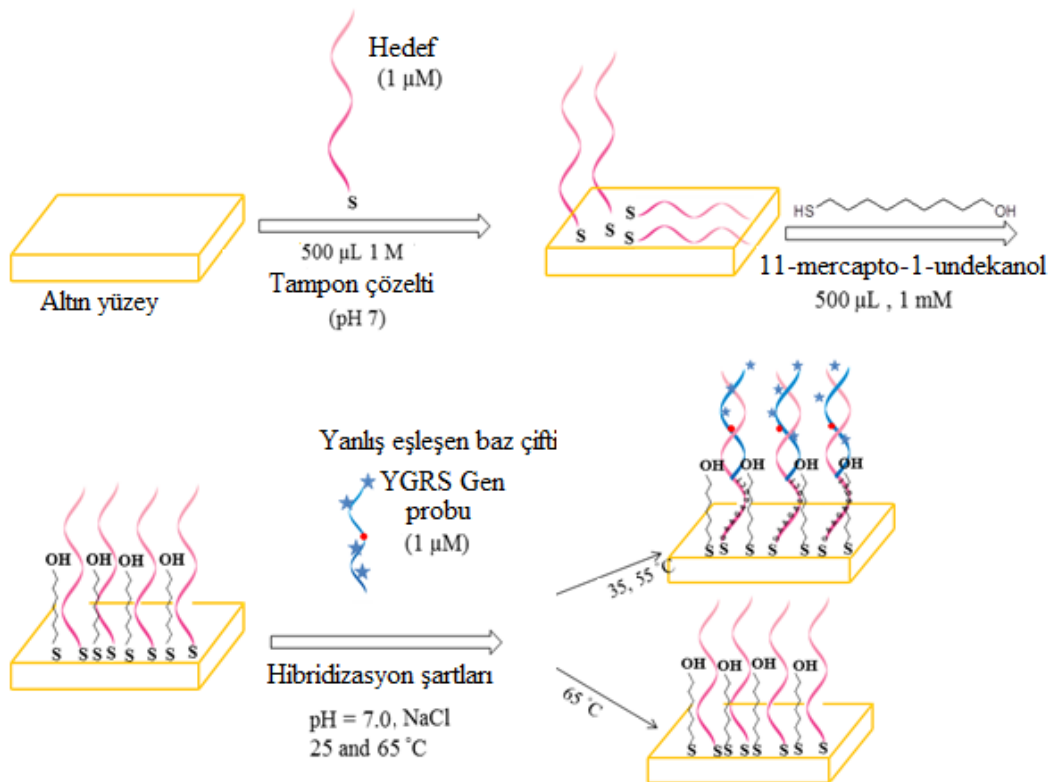


Figür 22: BCB ile etiketlenmiş DNA'nın 55°C'de yürütülen hibridizasyon çalışmaları sırasında altın yüzey üzerinde gümüş kolloid kullanılarak alınmış olan üç farklı ölçüme ait YGRS spektrumları. Ölçümler yüzey kurutulduktan sonra elde edilmiştir. YGRS Gen probu insan proteazom gen dizilimi kullanılarak dizayn edilmiştir. Bu deneyde kullanılan ara tutucu 11-merkapt0-1-undekanol'dür.

Farklı hibritlenme sıcaklıklarında yapılan deneylerde, yüzeyin farklı noktalarından alınan ölçümlerde, sinyal şiddetlerinin benzer sonuçlar verdiği görülmüştür. Bu da bize birbiri ile tam olarak eşleşmiş olan oligonükleotid çiftlerinde, 35°C ve 55 °C hibritlenme sıcaklığında ölçülen sinyallerin birbirlerinden farklı olmadığını göstermektedir.

3.8. Yanlış Eşleşen Baz Dizilimine Sahip Problar ile Hibridizasyon Deneyleri

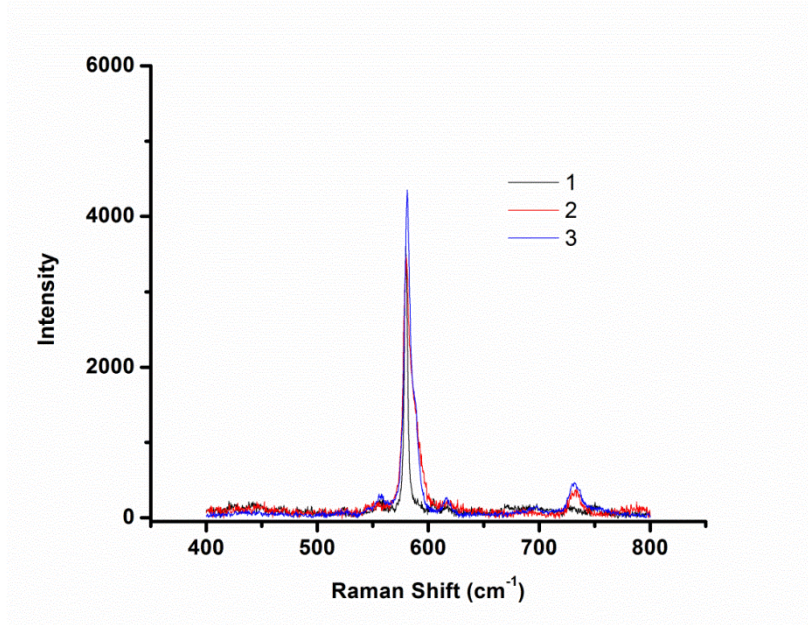
Bu deneylerdeki amacımız hibridizasyon deneylerini, yanlış eşleşen baz çifti içeren insan proteazomuna özgü problemleri kullanarak yürüttüğümüzde sıcaklığın DNA sarmalının erime (melting point) sıcaklığını nasıl etkilediğini dolayısı ile bu koşulda optimum hibritleme sıcaklığını bulmaktır. Deneyler farklı hibritleme sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. YGRS problemleri yanlış eşleşen bir baz çifti içerecek şekilde hazırlanmış ve hibridizasyon deneyleri önceden anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Deneylerin şematik gösterimi Figür 23 te verilmektedir.



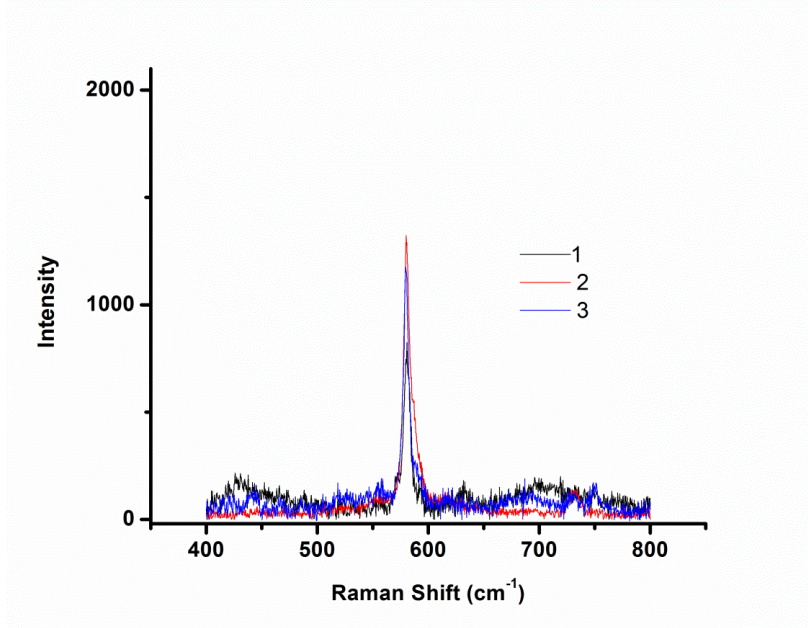
Figür 23: Yanlış eşleşen baz dizilimine sahip DNA problemleri ile yürütülen hibridizasyon deneylerinin şematik gösterimi. Ara tutucu olarak 11-merkapt-1-undekanol kullanılmıştır.

3.9. Yanlış Eřeleřen Baz Çiftleri İçeren İnsan Proteazomu Gen Probları ile Yapılan Hibridizasyon Deneylerinin YGRS Sonuçları

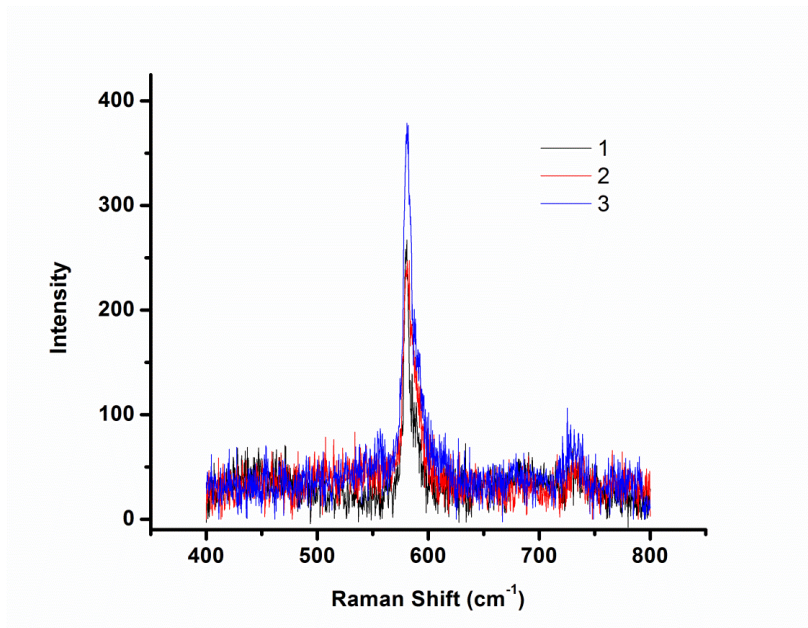
Bu deneylere ait YGRS spektrumları, Figür 24, Figür 25 ve Figür 26 da verilmektedir. Farklı hibritleme sıcaklıklarında (35, 55, 65 °C'de) yapılan hibridizasyon deneylerinde, aynı yüzeyin farklı noktalarından alınan ölçümlerin, sinyal şiddetleri benzerdir. Yanlış eşleşen iki baz çifti içeren dupleksin erime sıcaklığı, yanlış eşleşen tek baz çifti içeren duplekslerden ve tam olarak eşleşmiş DNA çiftlerden daha düşüktür. Sonuçlardan da görüleceği üzere, eşleşmeyen çift baz çifti içeren problarla 55 °C'de yürütölen hibridizasyonda sinyal yoğunluğunda önemli bir düşüş gözlenmiştir, bu düşüş 65 °C'de yürütölen hibridizasyonda çok daha fazladır. Farklı hibritleme sıcaklıkları için 580 nm'de ölçölen ortalama sinyal şiddetleri Tablo 2 de verilmiştir.



Figür 24: BCB ile etiketlenmiş Yanlış Eřeleřen Baz Çifti İçeren İnsan Proteazomu Gen Probu kullanılarak, 35°Cde yürütölen hibridizasyon çalışmalarında altın yüzey üzerinde gümüş kolloid kullanılarak alınmış olan üç farklı ölçöme ait YGRS spektrumları. Bu deneyde kullanılan ara tutucu 11-merkaptol-1-undekanol'dür.



Figür 25: BCB ile etiketlenmiş Yanlış Eşleşen Baz Çiftleri İçeren İnsan Proteazomu Gen Probu kullanılarak 55°Cde yürütülen hibridizasyon çalışmalarında altın yüzey üzerinde gümüş kolloid kullanılarak alınmış olan üç farklı ölçüme ait YGRS spektrumları. Bu deneyde kullanılan ara tutucu 11-merkapt0-1-undekanol'dür.



Figür 26: BCB ile etiketlenmiş Yanlış Eşleşen Baz Çiftleri İçeren İnsan Proteazomu Gen Probu kullanılarak, 65°Cde yürütülen hibridizasyon çalışmaları sırasında altın yüzey üzerinde gümüş kolloid kullanılarak alınmış olan üç farklı ölçüme ait YGRS spektrumları. Bu deneyde kullanılan ara tutucu 11-merkapt0-1-undekanol'dür.

Tablo 2. Farklı hibritleme sıcaklıklarında 580 nm'de elde edilen ortalama sinyal şiddetleri.

Sıcaklık (°C)	580 nm'de Ortalama Şiddet
35	3400 (\pm 500)
55	1000 (\pm 300)
65	300 (\pm 50)

Not: Herbir yüzeyde üç farklı noktadan ölçüm alınmış olup, ortalama değerler hesaplanmıştır.

Bu sonuçlar bize yanlış eşleşen iki baz çifti içeren insan proteazomu gen probu kullanılarak yürütülen hibridizasyon çalışmalarında DNA sarmallarının 55 °C de ayrılmaya başladığını ve 65°C de nerede ise tek DNA iplikçığı haline geldiğini göstermektedir. Yüzeye tutunmuş olan DNA iplikçığından ayrılan prob yıkama yoluyla ortamdan uzaklaştırılmakta dolayısı ile ölçülen Raman sinyali düşmektedir.

3.10. İnsan Proteazom Gen Problemleri ile Yürütülen Hibridizasyon Çalışmalarına ait Kantitatif Çalışma Sonuçları

Hibridizasyon deneylerinde, YGRS sinyal şiddeti ile YGRS gen prob konsantrasyonu arasında ilişki olup olmadığını anlamak için, hedef gen konsantrasyonu 5 μ M' da sabit tutulup, YGRS Gen probunun konsantrasyonu 0.8, 1.6, 2.4 ve 4.8 μ M olarak değiştirilmiştir. Farklı altın yüzeyler üzerindeki hedef DNA konsantrasyonu 5 μ M' da sabit tutulup , YGRS Gen problemleri hibridizasyon için bu yüzeylere 5 μ L (0.8 μ M), 10 μ L (1.6 μ M), 15 μ L (2.4 μ M) and 30 μ L (4.8 μ M) miktarlara eklenmiştir. Spesifik olmayan eşleşmeleri önlemek için hibridizasyon deneyleri 55 °C' de yapılmıştır. Bu çalışmada, insan proteazom gen dizilimli oligonükleotidler kullanılmıştır. 580 nm'de farklı YGRS Gen prob konsantrasyonu ile elde edilen YGRS şiddet değerleri Tablo 3 'te verilmiştir. Prob hacmine karşı 580 nm'de ölçülmüş YGRS şiddetini gösteren kalibrasyon doğrusu ise Figür 27 de verilmiştir.

Tablo 3. 580 nm'de farklı YGRS Gen prob konsantrasyonu ile elde edilen YGRS şiddetleri.

Prob Konsantrasyonu (μM)	580 nm'de Şiddet
0.8	4621
1.6	10509
2.4	13223
4.8	25980

Not: Herbir yüzeyde üç ölçüm alınmış olup, ortalama değerler hesaplanmıştır.

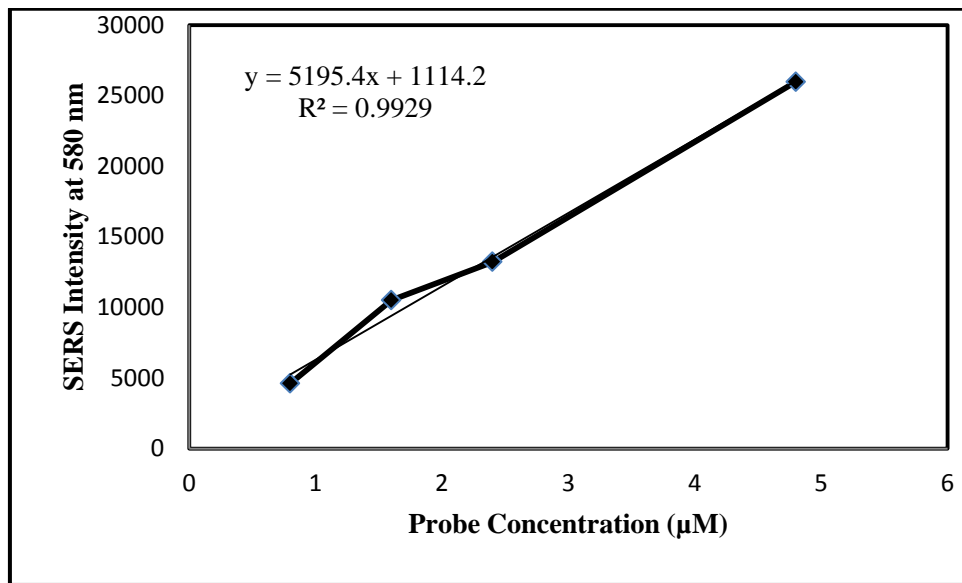
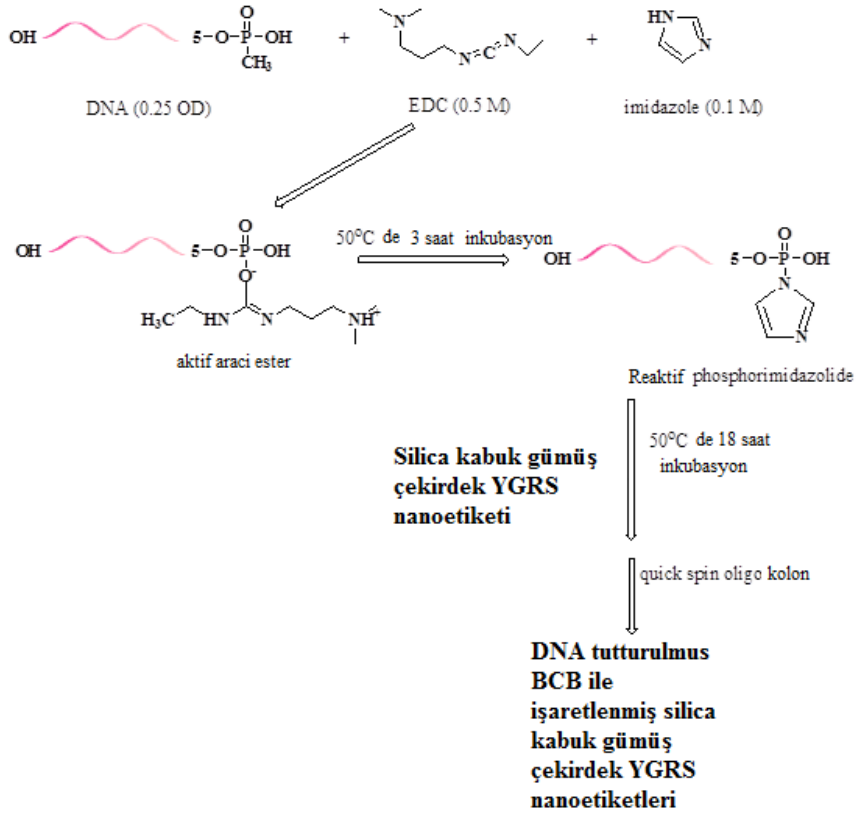


Figure 27: 580 nm'de elde edilen YGRS şiddeti- gen prob derişimi grafiği.

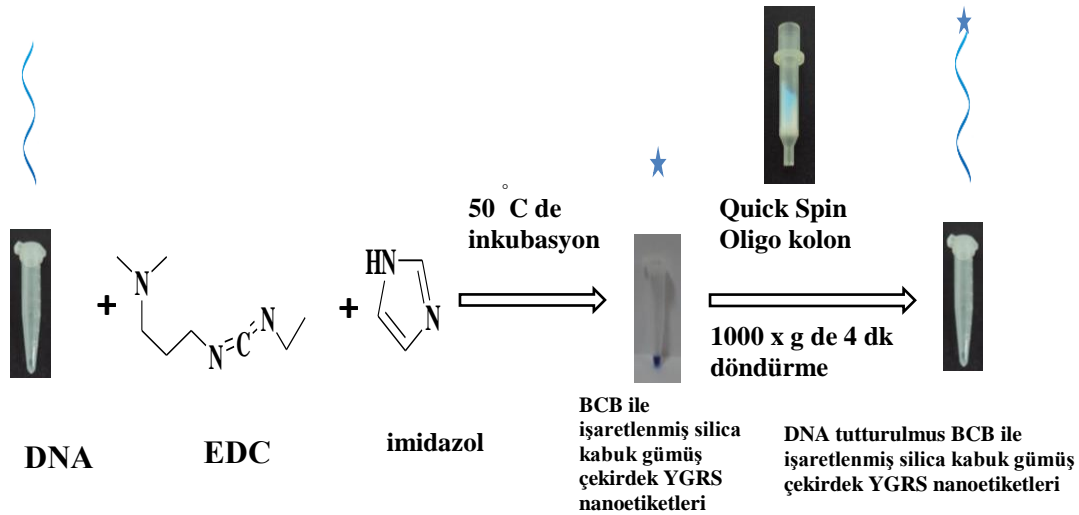
Elde edilen sonuçlara göre, oligo prob konsantrasyonu arttıkça sinyal şiddetinin de doğrusal olarak arttığı gözlenmiştir. Figure 27 de verilen grafiğe göre, bağlantı katsayısı $y = 831.27x + 1114.2$ ve $R^2 = 0.9929$ olarak elde edilmiştir. Tablo 3 te görüldüğü gibi, prob hacmini 5 μL 'den iki (10 μL), üç (15 μL) ve 6 kat (30 μL) arttırdığımızda, sırasıyla sinyal şiddetlerinde 2,3 ve 6 kat artma gözlenmiştir. Bu sonuç, geliştirdiğimiz YGRS / hibridizasyon sisteminin hibritleşmiş DNA miktarının tayini için uygun olduğunu ve sonuç olarak bu sistemin klinik örneklerin analizleri için uyarlanıp, kullanılabileceğini göstermektedir.

3.11. BCB ile işaretlenmiş silica kabuk-gümüş çekirdek YGRS nanoetiketlerinin kullanımı ile SERS-gen problemlerinin hazırlanması

YGRS nano-etiketleri, (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES) kullanarak amin grupları ile kaplanmıştır. BCB içeren silica kabuk gümüş çekirdek YGRS nanoetiketlerinin oligonükleotide kovalent olarak bağlanması, literatürden (Chu & Orgel, 1983) ve (Vo-Dinh, Stokes, Griffin, Volkan, Kim, & Simon, 1999) alınan yöntemde bazı değişiklikler yapılarak sağlanmıştır. DNA'nın BCB ile işaretlenmiş silica kabuk gümüş çekirdek YGRS nanoetiketleri ile kovalent etiketlenmesini ve etiketleme işlemi sırasında oluşan kimyasal reaksiyonlar şematik olarak Figür 28 ve Figür 29 da gösterilmektedir.



Figür 28: BCB içeren silica kabuk gümüş çekirdek YGRS nanoetiketlerinin DNA yüzeyine tutturulmasının şematik gösterimi.

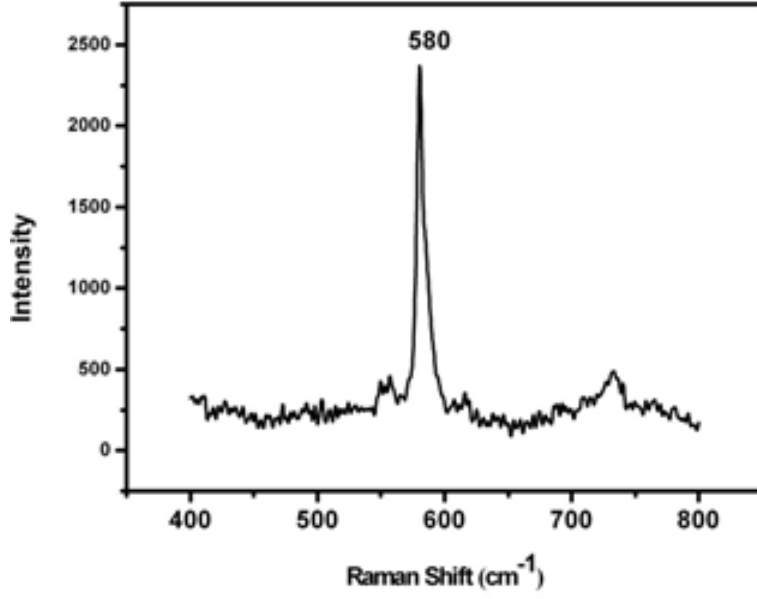


Figür 29: DNA probunun boya içeren silika kabuk -gümüş çekirdeğin YGRS nanoetiketleri ile işaretlenmesi.

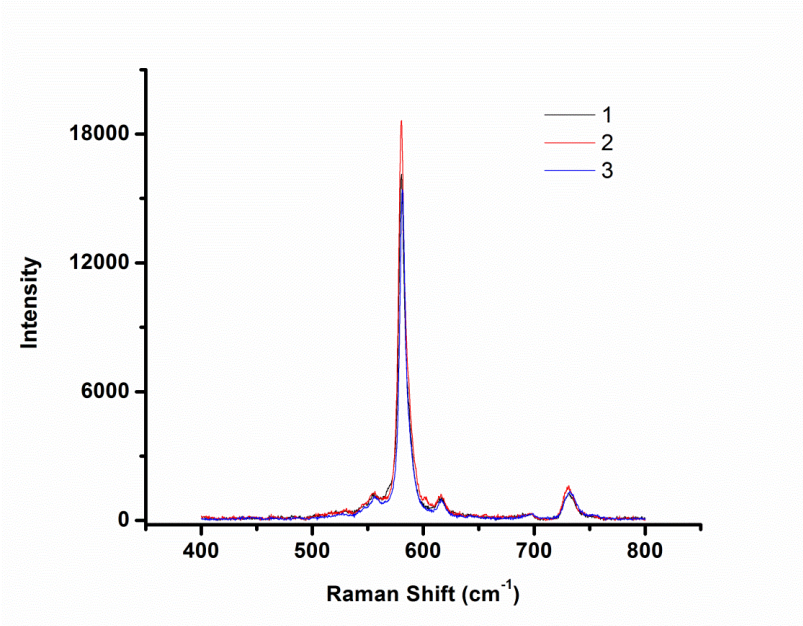
YGRS nanoetiketinin oligonükleotide kovalent bağlanması, oligonükleotid üzerindeki 5' fosfat grubunu aktifleştirmek için EDC kullanılması ile sağlanmıştır. YGRS nanoetiket, oligonükleotide amin fonksiyonel grubunun çıkıcı grupla yer değiştirmesi sonucu bağlanmaktadır. Reaksiyona girmemiş olan etiketler, Mini Hızlı Spin Oligo Kolon kullanılarak reaksiyon ortamından uzaklaştırılmıştır.

3.12. İnsan Proteazom Gen Dizilimine Dayalı, YGRS nanoetiketleri ile işaretlenmiş Hedef ve Prob Oligo DNA lar ile Yapılan Hibridizasyon Deneyle

Bu hibridizasyon deneyle, merkaptto undekanol ara tutucuları kullanılarak yapılmıştır. Benzer koşullarda sonuç alabilmek için işaretlemeler hem boya (BCB) hem de YGRS nanoetiketleri ile yapılmıştır. Ölçümlerde gümüş nanoparçacıkları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Figür 30 ve Figür 31 de gösterilmektedir



Figür 30: BCB kullanılarak işaretlenmiş DNA probu kullanılarak gerçekleştirilmiş hibridizasyon deneyleri sonucunda elde edilmiş olan SERS sinyalleri.



Figür 31: YGRS nanoetiketleri ile işaretlenmiş- DNA probu kullanılarak gerçekleştirilmiş hibridizasyon deneyleri sonucunda elde edilmiş olan SERS sinyalleri.

Nanoyapıların hazırlanışıyla ilgili bölümde bahsetmiş olduğumuz gibi nanoçubuk yapılarının yüzeyine silika kaplama işlemi henüz tamamlanamamıştır. Nanoçubukların yüzeylerine ince tabaka halinde silica kaplanamaması nedeniyle yüzeye boya tutturma işlemi de

gerçekleştirilememiştir. Dolayısı ile altın nanoçubuk ve gümüş kaplanmış altın nanoçubuk yapılarının SERS nanoetiket olarak kullanımı gösterilememiştir. Amaç kısmında belirtilen çalışmaların hepsi silika kaplı gümüş nanoparçacıklar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4 Kaynaklar

- BAUMEISTER W., Walz J., Zuhl F, et al., The proteasome: Paradigm of a self-compartmentalizing protease, *CELL*, 92, 367-380, (1998).
- BOCHTLER M., Ditzel L, Groll M, et al.,The proteasome, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 28, 295+ (1999).
- CAO Y.C., Jin R., Mirkin C.A., Nanoparticles with Raman Spectroscopic Fingerprints for DNA and RNA Detection, *Science* 1536:1540, (2002).
- DOERING W.E., Nie S. , Spectroscopic Tags Using Dye-Embedded Nanoparticles and Surface-Enhanced Raman Scattering *Anal. Chem.*, 75, 6171, (2003).
- DOERING W.E., Piotti M.E, Natan M.J., Freeman R.G, SERS as a Foundation for Nanoscale, Optically Detected Biological Labels, *Adv. Mater.*, 19, 3100–3108, (2007).
- EL-SAYED I.H., Huang X., El-Sayed M.A., Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles in Cancer Diagnostics: Applications in Oral Cancer, *Nano Lett.* 5:829, (2005).
- FAULDS K. , Stewart L.,Smith W. E., Graham D., Quantitative detection of dye labelled DNA using surface enhanced resonance Raman scattering (SERRS) from silver nanoparticles, *Talanta*, 67, 667–671, (2005).
- FAULDS K., McKenzie F., Smith W.E., Graham D., Quantitative Simultaneous Multianalyte Detection of DNA by Dual-Wavelength Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 1829-1831, (2007).
- GACZYNSKA M, Osmulski PA., Ward WF., Caretaker or undertaker? The role of the proteasome in aging , *Mechanisms of Ageing and Development*,122, 235-254 , (2001).
- GELLNER M., Kömpe K., Schlücker S., Multiplexing with SERS Labels Using Mixed SAMs of Raman Reporter Molecules, *Anal Bioanal. Chem.*, 394, 1839–1844, (2009).
- GHOSH S.K., Nath S., Kundu S., Esumi K., Pal T., Solvent and Ligand Effects on the Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) of Gold Colloid, *J. Phys. Chem B* 108:13963, (2004).

GRAHAM D, Mallinder B.J., Whitcombe D., Watson N.D., Smith W.E., Simple Multiplex Genotyping by Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering, *Anal. Chem.* 1069:1074, (2002).

GROLL M., Bochtler M, Brandstetter H, Clausen T, Huber R Molecular machines for protein degradation *ChemBioChem* 6,222-256, (2005).

HAES A. J., Van Duyne R. P., A Nanoscale Optical Biosensor: Sensitivity and Selectivity of an Approach Based on the Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Silver Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, , 124, 10596, (2002).

HENDIL KB., Hartmann-Petersen R, Tanaka K 26 S proteasomes function as stable entities, *Journal of Molecular Biology*, 315, 627-636 (2002).

HENDIL KB., Khan S., Tanaka K., Simultaneous Binding of PA28 and PA700 Activators to 20 S Proteasome, *The Biochemical Journal*, 15,749-54 (1998).

HULBERT S. H., Richter T. E., Axtello J. D., Bennetzen, Genetic Mapping and Characterization of Sorghum and Related Crops by Means of Maize DNA Probes, *J. L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4251-4255, (1990).

JAIN P.K., Eustis S., El-Sayed M.A., Plasmon Coupling in Nanorod Assemblies: Optical Absorption, Discrete Dipole Approximation Simulation, and Exciton-Coupling Model, *J. Phys. Chem. B*, 110:18243, (2006).

JAIN P.K., Lee K.S., El-Sayed I. H. , El-Sayed M.A., Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine, *J. Phys. Chem B*, 110:7238, (2006).

JESENBERGER V, Jentsch,S., 2002. Deadly encounter: Ubiquitin meets apoptosis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3,112-121 (2002).

JING J. et al., Automated High Resolution Optical Mapping Using Arrayed, Fluid-fixed DNA Molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 8046–8051, (1998).

KELLY K.L., Coronado E., Zhao L.L., Schatz G.C., The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment, *J. Phys. Chem. B*, 107:668, (2003).

KNEIPP J., Kneipp H., Rice W. L., Kneipp K., Optical Probes for Biological Applications Based on Surface-Enhanced Raman Scattering from Indocyanine Green on Gold Nanoparticles *Anal. Chem.*, 77, 2381-2385, (2005).

LINK S., El-Sayed M. A., Shape and Size Dependence of Radiative, Non-radiative and Photothermal Properties of Gold Nanocrystals, *Int. Reviews in Physical Chemistry*, 19, 3, 409-453, (2000).

LU A., Salabas E.L., Schüth F., Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1222 – 1244. (2007).

MULVANEY S. P., Musick M.D. , Keating C.D., Natan M.J., Glass-Coated, Analyte-Tagged Nanoparticles: A New Tagging System Based on Detection with Surface-Enhanced Raman Scattering, *Langmuir*, 19, 4784, (2003).

QIAN X. M., Nie S. M., Single-molecule and single-nanoparticle SERS: from fundamental mechanisms to biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.*, 37, 912–920, (2008).

ROSI N.L., Mirkin C.A., Nanostructures in Biodiagnostics, *Chem. Rev.*, 105:1547, (2005)

SANCI R., Volkan M., Surface-enhanced Raman scattering (SERS) studies on silver nanorod substrates, *Sensors and Actuators B*, 139, 150–155, (2009).

SCHLÜCKER S., SERS Microscopy: Nanoparticle Probes and Biomedical Applications. *ChemPhysChem.*, 10(9-10), 1344-54, (2009).

SEO H, Sonntag K-C, Kim W, Cattaneo E, Isacson O Proteasome Activator Enhances Survival of Huntington's Disease Neuronal Model Cells. *PLoS ONE* 2,e238. (2007).

SHUMING NIE, et al., Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering, *Science*, 275, 1102-1106, (1997).

STORCHOFF J.J., Lazarides A.A., Mucic R.C., Mirkin C.A., Letsinger R.L., Schatz G.C., What Controls the Optical Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies?, *J. Am. Chem. Soc.*, 122:4640, (2000).

SUN L., Sung K.B., Dentinger C., Lutz B., Nguyen L., Zhang J., Qin H., Yamakawa M., Cao M., LU Y., Chmura A.J., Zhu J., Su X., Berlin A.A., Chan S., Knudsen B., Composite Organic–Inorganic Nanoparticles as Raman Labels for Tissue Analysis, *Nano Lett* 351:356,(2007).

VO-DINH T., Allain L. R., Stokes D. L., Cancer Gene Detection Using Surface-enhanced Raman Scattering (SERS), *J. Raman Spectrosc.*, 33, 511–516, (2002).

VO-DINH T., Stokes D. L., Griffin G. D., Volkan M., Kim U. J. , Simon M. I., Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) Method and Instrumentation for Genomics and Biomedical Analysis , *J. Raman Spectrosc.*, 30, 785–793, (1999).

VO-DINH T., Yan F. , Wabuyele M. B., Surface-enhanced Raman Scattering for Medical Diagnostics and Biological Imaging, *J. Raman Spectrosc.*, 36, 640–647, (2005).

VOGES D., Zwickl P., Baumeister W., The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis, *Annual Review of Biochemistry*, 68,1015-68, (1999).

YOO S. M., Keum K. C., Yoo1 S. Y., Choi J. Y., Chang K. H., Yoo N. C, Yoo W. M., Kim J. M., Lee D., Lee S. Y., Development of DNA Microarray for Pathogen Detection, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9, 93-99, (2004).

YUN S. H., Chung A., Erickson D., Surface enhanced Raman spectroscopy and its application to molecular and cellular analysis, *Microfluid Nanofluid*, 6:285–297, (2009).

ZHAO X., Tapeç-Dytioco R., Tan W., Ultrasensitive DNA Detection Using Highly Fluorescent Bioconjugated Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 11474-11475, (2003).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 111T151
Proje Başlığı: Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Etiketli Olarak Boya Hapsedilmiş Çekirdek- Kabuk Nanoparçacıklarının Hazırlanması, Karakterize Edilmesi ve 20S ile 26S Proteazomlarının Tayininde Kullanılması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof. Dr. MÜRVET VOLKAN, SEMRA KOCABIYIK
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ORTA DOĞU TEKNİK Ü. FEN-EDEBİYAT F. KİMYA B.
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/11/2011 - 01/05/2013
Öz (en çok 70 kelime) Übikütin-proteazom sistemi (UPS), hücrede protein yıkımında etkin, başlıca proteolitik yolaktır. Bu sistem yalnız yanlış katlanmış yada kusurlu proteinlerin yıkımından sorumlu olmayıp hücre döngüsü, transkripsiyon kontrolü, apoptoz, ve stres yanıtında da önemli bir düzenleyici mekanizma olarak dikkat çekmektedir. Proteazom işlevindeki bozukluklar Proteazom aktivitesi ve/veya genlerinin anlatımında azalma ya da artma şeklinde etkisini göstermekte ve potansiyel patolojik sonuçlar doğurmaktadır. Son yıllardaki araştırmalar UPS deki değişmelerin patogenezele, ve özellikle çeşitli kanser tipleri, yaşa bağlı hastalıklar ve kalp hastalıkları ile ilişkisi olduğunu ortaya koymaktadır. Proteazom gen anlatımının aşırı olduğu patolojik durumlarda, Proteazom inhibasyonunun tümör büyümesini çeşitli mekanizmalarla önlediği klinik verilerle doğrulanmış ve bu molekülleri yeni ilaç tasarımında önemli bir hedef konumuna getirmiştir. Bu nedenle hücrelerde proteazomların tanısı ve nitel analizi hem klinik tanı, hem de terapi sürecinin izlenmesi ve değerlendirilmesi açısından önemlidir. Proje kapsamında yürütülecek olan çalışmalar proteazomların Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Saçılması (YGRS) spektroskopik yöntemi ile tanısına yöneliktir. Bu bağlamda nanoteknolojik olanaklardan yararlanılarak, YGRS spektroskopik analizinde sinyal güçlendirme ve duyarlılığı arttırmak amacı ile özgün YGRS-nanoetiket sistemi geliştirilecektir. Proje kapsamında,

proteazomun özgün tanısı için kullanılacak oligo problemler genom veri bankalarından yararlanılarak tasarlanacaktır. Bu problemler YGRS spektroskopisi ile gözlenmesine olanak sağlayacak çeşitli boya ve YGRS nanoetiket sistemi ile işaretlenecektir. Oluşturulacak DNA-Raman aktif boya konjugatları prob olarak kullanılarak proteazoma özgü DNA dizilerinin tanınması DNA/DNA hibridizasyon yöntemi ile yapılacaktır. Bunu izleyen süreçte daha güçlü sinyal almaya yönelik , altın (veya gümüş) çekirdek-silika kabuk içine hapsedilmiş Raman aktif boyadan oluşan, YGRS-nanoetiket sistemi geliştirilecektir. Bu bağlamda farklı dalga boylarında rezonans plazmon absorpsiyonuna sahip üç değişik metal nanoparçacık sentezlenecektir. Hazırlanan metal nano yapıların üzerine Raman aktif boya tutturulacak ve sol-jel yöntemi kullanarak boya tutturulmuş parçacıkların yüzeyine silika kaplanacaktır. Metal nanoparçacığın boyutu, boya derişimi ve silika kalınlığı optimize edilerek güçlü bir Raman sinyali elde edilmeye çalışılacaktır. YGRS nano etiket sistemi ile işaretlenmiş DNA konjugatları prob olarak kullanılarak proteazoma özgü gen dizilerinin tanınması DNA/DNA hibridizasyon yöntemi ile yapılacaktır. Proje hem proteazom gen anlatımındaki değişikliğin patolojik olgularda bir moleküler belirteç olarak kullanılması yönü ile hem de bu amaçla Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Saçılması (YGRS) spektroskopisinin uygulanması yönü ile güncel ve özgündür.

Anahtar Kelimeler: Raman spektrometresi, Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Saçılması, 26 S Proteozome, Oligo problemler

Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet Gerekli Değil
Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.

Projeden Yapılan Yayınlar:

- 1.) Y. Akpınar, M. Kaya, M. Volkan, "Usage of Silica Coated Magnetic Nanoparticles and SERS Nanotags for Gene Detection", 22nd IUBMB Congress/37th FEBS Congress, FEBS Journal, 2012, 279, SI, 350.
- 2.) C. Uzun, S. Kocabiyik and M. Volkan, Application of SERS nanotag labeled probes for DNA studies, 22nd IUBMB Congress/37th FEBS Congress, FEBS Journal, 2012, 279, SI, 350.
- 3.) C. Uzun, Y. Akpınar, M. Kaya, M. Volkan, Raman-Dye-Labeled Nanoparticle Probes for DNA Studies, NanoTR8, 2012, Nanoscience and Nanotechnology Conference, Hacettepe University, Ankara, Turkey.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. MÜRVET VOLKAN
Proje No:	111T151
Proje Başlığı:	Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Etiketli Olarak Boya Hapsedilmiş Çekirdek- Kabuk Nanoparçacıklarının Hazırlanması, Karakterize Edilmesi ve 20S ile 26S Proteazomlarının Tayininde Kullanılması
Proje Türü:	Araştırma
Proje Süresi:	18
Araştırmacılar:	SEMRA KOCABIYIK
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. FEN-EDEBİYAT F. KİMYA B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/11/2011 - 01/05/2013
Onaylanan Bütçe:	164462.5
Harcanan Bütçe:	149205.0
Öz:	<p>Übikütin-proteazom sistemi (UPS), hücrede protein yıkımında etkin, başlıca proteolitik yolaktır. Bu sistem yalnız yanlış katlanmış yada kusurlu proteinlerin yıkımından sorumlu olmayıp hücre döngüsü, transkripsiyon kontrolü, apoptoz, ve stres yanıtında da önemli bir düzenleyici mekanizma olarak dikkat çekmektedir. Proteazom işlevindeki bozukluklar proteazom aktivitesi ve/veya genlerinin anlatımında azalma ya da artma şeklinde etkisini göstermekte ve potansiyel patolojik sonuçlar doğurmaktadır. Son yıllardaki araştırmalar UPS deki değişmelerin patogenezele, ve özellikle çeşitli kanser tipleri, yaşa bağlı hastalıklar ve kalp hastalıkları ile ilişkisi olduğunu ortaya koymaktadır. Proteazom gen anlatımının aşırı olduğu patolojik durumlarda, proteazom inhibasyonunun tümör büyümesini çeşitli mekanizmalarla önlediği klinik verilerle doğrulanmış ve bu molekülleri yeni ilaç tasarımında önemli bir hedef konumuna getirmiştir. Bu nedenle hücrelerde proteazomların tanısı ve nitel analizi hem klinik tanı, hem de terapi sürecinin izlenmesi ve değerlendirilmesi açısından önemlidir. Proje kapsamında yürütülecek olan çalışmalar proteazomların Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Saçılması (YGRS) spektroskopik yöntemi ile tanısına yöneliktir. Bu bağlamda nanoteknolojik olanaklardan yararlanılarak, YGRS spektroskopik analizinde sinyal güçlendirme ve duyarlılığı arttırmak amacı ile özgün YGRS-nanoetiket sistemi geliştirilecektir. Proje kapsamında, proteazomun özgün tanısı için kullanılacak oligo problemler genom veri bankalarından yararlanılarak tasarlanacaktır. Bu problemler YGRS spektroskopisi ile gözlenmesine olanak sağlayacak çeşitli boya ve YGRS nanoetiket sistemi ile işaretlenecektir. Oluşturulacak DNA-Raman aktif boya konjugatları prob olarak kullanılarak proteazoma özgü DNA dizilerinin tanınması DNA/DNA hibridizasyon yöntemi ile yapılacaktır. Bunu izleyen süreçte daha güçlü sinyal almaya yönelik, altın (veya gümüş) çekirdek-silika kabuk içine hapsedilmiş Raman aktif boyadan oluşan, YGRS-nanoetiket sistemi geliştirilecektir. Bu bağlamda farklı dalgaboylarında rezonans plazmon absorpsiyonuna sahip üç değişik metal nanoparçacık sentezlenecektir. Hazırlanan metal nanoyapıların üzerine Raman aktif boya tutturulacak ve sol-jel yöntemi kullanılarak boya tutturulmuş parçacıkların yüzeyine silika kaplanacaktır. Metal nanoparçacığın boyutu, boya derişimi ve silika kalınlığı optimize edilerek güçlü bir Raman sinyali elde edilmeye çalışılacaktır. YGRS nano etiket sistemi ile işaretlenmiş DNA konjugatları prob olarak kullanılarak proteazoma özgü gen dizilerinin tanınması DNA/DNA hibridizasyon yöntemi ile yapılacaktır. Proje hem proteazom gen anlatımındaki değişikliğin patolojik olgularda bir moleküler belirteç olarak kullanılması yönü ile hem de bu amaçla Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Saçılması (YGRS) spektroskopisinin uygulanması yönü ile güncel ve özgündür.</p>
Anahtar Kelimeler:	Raman spektrometresi, YGRS, YGRS?nanoetiket, 26 S Proteozome, Oligo problemler
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

Projeden Yapılan Yayınlar:

- 1- Usage of silica coated magnetic nanoparticles and SERS nanotags for gene detection (Bildiri),
- 2- Application of SERS nanotag labeled probes for DNA studies (Bildiri),
- 3- Determination of proteasome activity using surface enhanced raman scattering (SERS) spectroscopy (Bildiri)

TÜBİTAK