

Review article

Peptit Nükleik Asitler (PNA) ve Veteriner Hekimliği Alanındaki Uygulamaları

Peptide Nucleic Acids (PNA) and Its Applications in Veterinary Medicine

Nihan Akgüç Çöl *

Department of Biomedical Sciences & Pathobiology, Virginia-Maryland College of Veterinary Medicine, Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, USA

Özet

Peptit nükleik asitler (PNA), tekrarlayan N-(2-aminoetil) glisin birimlerinin peptit bağlarıyla bağlanmış olduğu bir omurgaya sahip, pürin ve pirimidin nükleobazlarının bu omurgaya metilen karbonil bağları ile bağlandığı, DNA'nın sentetik analoglarıdır. PNA, nükleik asitlere göre üstün hibridizasyon ve geliştirilmiş kimyasal ve enzimatik stabilite gibi çok yönlü özellikleri nedeniyle, teşhis ve farmasötik alanlarda büyük potansiyel taşımaktadır. Bununla birlikte, PNA kullanımında en önemli kısıtlama, hücre içine alınımındaki zorluğudur. Bu nedenle, PNA'nın hücre içine alınımını arttırmak için bazı farklı giriş mekanizmaları geliştirilmektedir. Antisens peptid nükleik asit (PNA) oligomerleri, temel gen ekspresyonunun spesifik olarak azaltılması yoluyla bakteriyel büyümeyi önleyen yeni bir potansiyel antibiyotik sınıfı oluşturur. Antisens olarak etki göstermesinin yanı sıra PNA'nın, birçok araştırmada prob amaçlı olarak kullanımı da mevcuttur. Gen düzenleme gibi daha terapötik uygulamalarda, spesifik genom modifikasyonları oluşturmak için de kullanılmaktadır. Bu derleme, PNA'nın yapısını, özelliklerini ve ayrıca veteriner hekimlik alanında kullanılan uygulamalarını kısaca sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Peptit nükleik asitler (PNA), antisens, antibakteriyal, PNA FISH.

Abstract

Peptide nucleic acids (PNA) are synthetic analogs of DNA possessing a backbone in which the repetitive N-(2-aminoethyl) glycine units are linked by peptide bonds, where the purine and pyrimidine nucleobases are bound to this backbone by methylene carbonyl bonds. PNA has great potential in diagnostic and pharmaceutical fields due to its versatile properties such as superior hybridization to nucleic acids and improved chemical and enzymatic stability. However, the most important limitation in the use of PNA is challenge of achieving sufficient intracellular delivery. Therefore, some different mechanisms of entry are being developed to increase the uptake of PNA into the cell. Antisense peptide nucleic acid (PNA) oligomers form a new class of potential antibiotics that inhibit bacterial growth by specifically reducing baseline gene expression. In addition to acting as an antisense, PNA is also used for probing in many studies. In more therapeutic applications such as gene regulation, it is also used to generate specific genome modifications. This review briefly presents the structure and properties of PNA and its applications in veterinary medicine.

Keywords: Peptide nucleic acids (PNA), antisense, antibacterial, PNA FISH.

Received: 10 June 2019 * **Accepted:** 20 June 2019 * **DOI:** <https://doi.org/10.29329/ijiasr.2019.197.3>

* **Corresponding author:**

Nihan Akgüç Çöl, Department of Biomedical Sciences & Pathobiology, Virginia-Maryland College of Veterinary Medicine, Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, USA.
Email: nihana@vt.edu

GİRİŞ

Veteriner hekimlikte antibiyotikler, başta hasta hayvanların tedavisinde olmak üzere, hastalıklardan koruma ve bazı ülkelerde büyümeyi arttırıcı amaçla da kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin hayvanlarda yoğun kullanımı, antibiyotik direncini arttırmaktadır ve bu durumun insan sağlığı için de potansiyel bir tehdit olduğu belirtilmektedir.

Anti bakteriyel ilaçlara karşı direnç hem insan hem de çiftlik hayvanlarında ciddi bir sorun haline gelmiştir. İnsanlarda ve hayvanlarda tedavi amaçlı kullanılan antibiyotik grupları çoğunlukla aynı olup, enfeksiyona neden olanlar da dahil olmak üzere, dirençli bakterilerin ortaya çıkma ve yayılma riskini arttırmıştır.

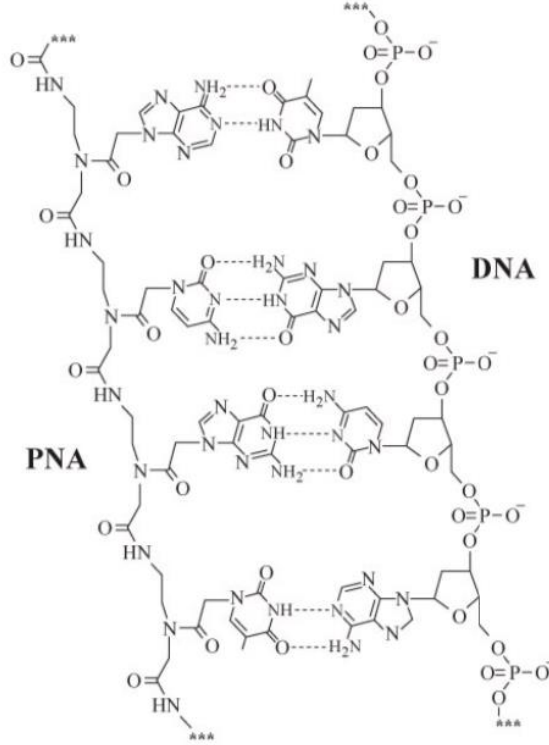
Son senelerde artan direnç sorununa karşı, antimikrobiyal etki için geleneksel antibiyotik tedavi yöntemleri ve antibiyotik üretimi dışında yeni yaklaşımlar ve bu yaklaşımlara uygun yeni ilaç arayışları başlatılmıştır. Bakterilerdeki yaşamsal genlerin hedef alınarak susturulması bu bakımdan umut vaat eden bir mekanizma olarak öne çıkmaktadır.

Peptit nükleik asitleri (PNA'lar) gibi antisens teknolojilerini kullanarak bakteri genlerini hedefleme, son zamanlarda gram pozitif, gram negatif ve aside dirençli bakterilere karşı yapılan uygulamalarıyla dikkat çekmektedir (Rasmussen vd., 2007). Çalışmaların çoğu, spesifik antisens yapılar ile yapılan tedavinin sonucu olarak, bakteri üremesinde önemli bir bozulmaya yol açtığını ortaya koymaktadır. PNA'lar gibi yeni nükleik asit analogları ve taklitlerinin geliştirildiği ve bu yapıların tamamlayıcı DNA ve/veya mRNA iplikçileriyle son derece güçlü kompleksler oluşturduğu, sonucunda da bakteriyel büyümenin inhibisyonunun yanı sıra gen ekspresyonunun inhibisyonuna da yol açtığı bulunmuştur (Good ve Nielsen, 1998 ve 1999).

Peptit Nükleik Asitlerin Yapısı

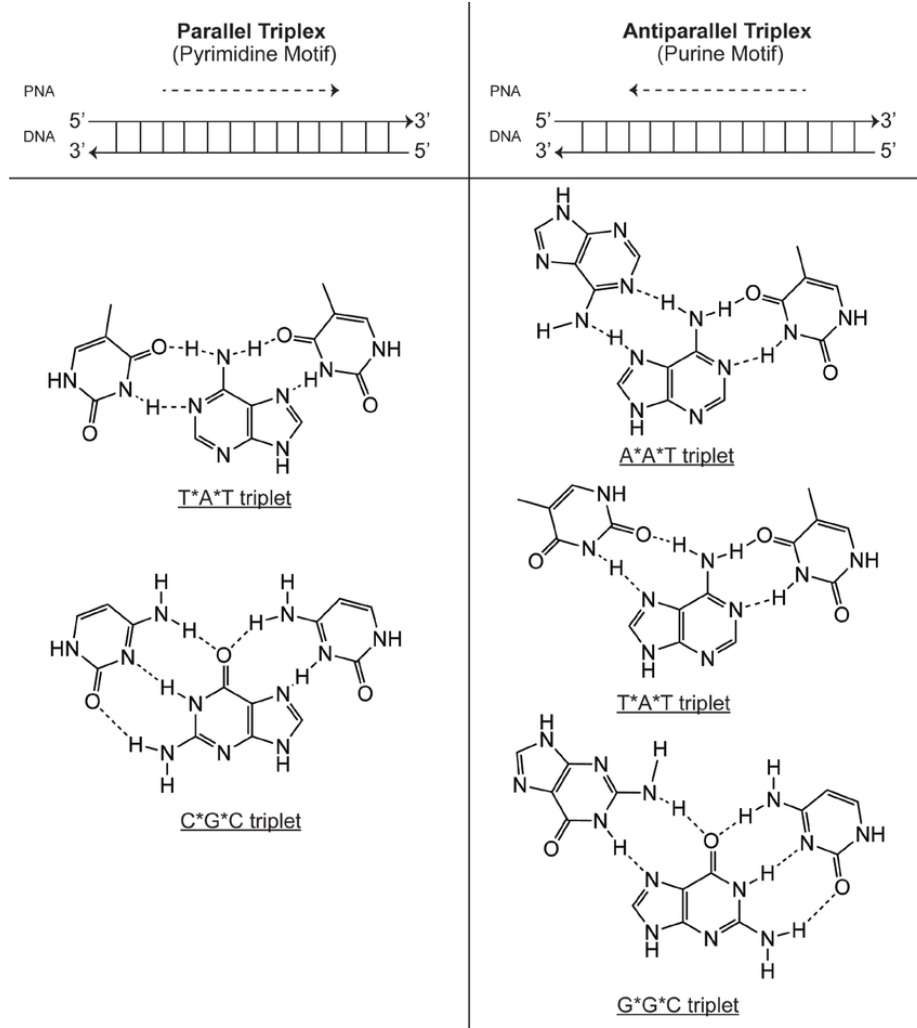
Peptit nükleik asitleri (PNA'lar) ilk olarak 1991 yılında Peter E. Nielsen ve Kopenhag Üniversitesi'ndeki meslektaşları tarafından, omurga bağlarının sayısı ve omurga ile nükleobazlar arasındaki mesafeye göre DNA'ya homomorf olan, poliamid omurgasına sahip bir DNA analogu geliştirmek üzere meydana getirilmişlerdir (Nielsen vd., 1991). PNA, amid bağları ile bağlanmış tekrarlayan N-(2-aminoetil)-glisin birimlerinden oluşan oldukça basit bir yapıya sahiptir. Pürin (A, G) ve pirimidin (C, T) bazları, metilen karbonil bağlantıları yoluyla omurgaya bağlanır. DNA veya DNA analoglarından farklı olarak, PNA'lar şeker parçaları (pentoz) veya fosfat grupları içermez (Şekil.1). Bu nedenle PNA'nın birçok açıdan DNA'nın davranışını taklit etmesi ve bazı uygulamalarda üstün özellikler göstermesi, kullanım alanları açısından büyük avantaj kazandırmıştır. Bu psödopeptit omurga, DNA veya RNA'nın fosfodiester omurgasından farklı olarak, PNA moleküllerinin nötr olmasını sağlar (negatif yüklü DNA ve RNA molekülleriyle karşılaştırıldığında) ve bu durum tamamlayıcı nükleik asitlerle daha güçlü hibridizasyona izin vermektedir (Nielsen, 1995; Ricciardi vd., 2015). DNA için

PNA afinitesi, DNA için DNA'dan daha yüksek olsa da PNA hibridizasyonu, baz çifti uyumsuzluklarına daha az toleranslıdır (Nielsen ve Egholm, 1999). PNA'ların doğal olmayan, poliamid omurgası, onları enzimatik bozulmaya karşı da dirençli kılar (Pellestor vd., 2004; Egholm vd., 1993; Demidov vd., 1994).



Şekil.1. DNA ile eşleşmiş PNA kompleksinin kimyasal yapısı (Chambers, J.P., vd., 2008).

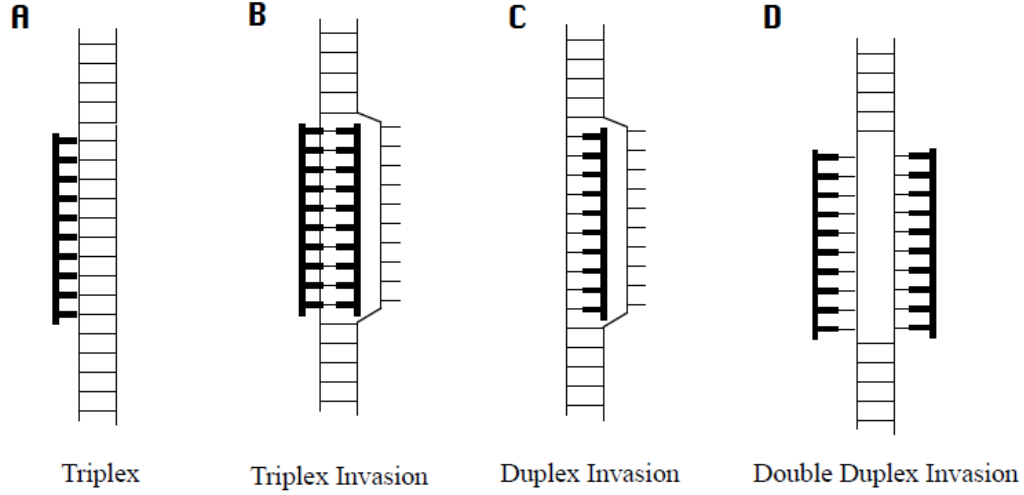
PNA'lar hem Watson-Crick hem de Hoogsteen baz eşleştirme kurallarına uygun olarak tamamlayıcı DNA veya RNA'ya bağlanır (Egholm vd.,1993). Watson-Crick baz eşleşmesine göre adenin (A), timin (T) ile iki hidrojen bağı oluştururken, sitozin (C), guanin (G) ile üç hidrojen bağı oluşturur. Hoogsteen baz eşleşmesine göre de PNA'lar ana oluk boyunca dubleks DNA'ya bağlanabilirler ve baz üçlülerinin oluşumuna imkân sağlarlar. Bu motif timinin bir AT çiftine, sitozinin de bir GC çiftine bağlanmasına izin verir. Antiparalel Hoogsteen baz eşleşmesi olarak bilinen başka bir mekanizma ile, guanin bir GC çiftine bağlanma yeteneğine sahipken, adenin bir AT çiftine bağlanabilir (Bahal vd., 2016) (Şekil.2).



Şekil.2. Watson-Crick ve Hoogsteen baz eşleştirme kurallarına uygun olarak paralel, Pirimidin motifinde (solda) ve antiparalel yönde, Pürin motifinde (sağda) baz üçlülerini oluşturan PNA'lar için bağlayıcı motifler (Arya, 2011).

PNA'lar, PNA tasarımına bağlı olarak, farklı motiflere göre DNA'ya bağlanabilirler (Şekil.3). Basit bir PNA/DNA tripleksi, tipik olarak sitozin bakımından zengin PNA'ların bulunduğu, çift iplikli DNA'nın (dsDNA)'nın ana oluşu boyunca Hoogsteen baz eşleşmesinin sonucudur. Diğer taraftan, homopurin PNA'lar kullanılırken (sekansı tamamen adenin ve guanin nükleotitlerinden oluşmuş olanlar), DNA'nın dubleks invazyonu meydana gelebilir. Watson-Crick baz eşleşmesi ile bir dsDNA dizisine bağlanmada, DNA'nın dubleks invazyonu ayrıca tamamlayıcı dizinin yer değiştirmiş bir D-halkasına neden olur (Nielsen, 2010). DNA'nın dubleks invazyonu, hem Watson-Crick hem de Hoogsteen baz eşleştirme kuralına uygun şekilde dsDNA sarmalına bağlanan bir PNA molekülünün, homopiridin PNA'ların (sekansı tamamen sitozin ve timin nükleotitlerden oluşanlar) gözlemlendiği tripleks oluşumuyla da meydana gelebilir. Bu 2PNA:1DNA tripleks ayrıca bölgesel olarak yer değiştirmiş bir D-döngüsüyle sonuçlanır (Egholm vd., 1995). "Kuyruk kelepçesi" PNA'ları (tcPNA'lar) kimyasal bir bağlayıcı tarafından birleştirilen PNA'lardır ve Watson-Crick kısmını karışık homopurin/homopiridinlerden oluşan DNA'ya bağlanmak için genişletirken, homopiridin sekanslarını

birbirine bağlayan bu çiftleme motifini kullanmaktadırlar (Bentin vd., 2003). Son olarak, birbirlerini tamamlayan, ancak kararlı dupleksler oluşturamayan pseudo tamamlayıcı PNA'lar (pcPNA'lar), çift dubleğe bağlanmaya neden olan Watson-Crick baz eşleşmesini kullanarak dsDNA'yı işgal edebilmektedirler (Egholm vd., 1995).



Şekil.3. Çift sarmallı DNA'ya PNA'ların bağlanma modları (Nielsen ve Egholm, 1999).

Kararlılıkları, yük nötrlüğü ve tasarım kolaylığı göz önüne alındığında, PNA'lar çeşitli uygulamalar için kullanılabilirler. Çok yönlülükleri ve hem Watson-Crick hem de Hoogsteen baz eşleştirme kuralları ile DNA ya da RNA'ya bağlanabilir olmaları, terapötik potansiyellerini daha da arttırmaktadır.

Peptit Nükleik Asitlerin Önemli Özellikleri

PNA, doğal oligonükleoitlere kıyasla, daha çeşitli, farklı ve benzersiz kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklere sahiptir. PNA'ların doğal olmayan omurgasına, bağlanma afinitesi üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olan elektrostatik itme özelliğinin ortadan kaldırılmasıyla nötr olması, hedef sekansa mükemmel hibridizasyon afinitesi özelliğini kazandırmıştır. Yanı sıra, PNA'ların orta tuz konsantrasyonundan bağımsız olarak bağlanabilme kolaylığı sağlar, oysa düşük iyonik kuvvet, DNA-DNA duplekslerinin stabilitesini azaltır. Aynı zamanda, PNA'lar asidik pH'ta (pH 4.5-6.5) stabilite gösterirken, DNA düşük pH'da depurine olur. PNA'lar, karşılık gelen DNA-DNA veya DNA-RNA duplekslerine kıyasla, daha yüksek termal erime sıcaklığına (T_m) sahiptirler. Baz çifti başına bir PNA/DNA dubleksinin T_m 'sinin DNA-DNA dubleksinden 1°C daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur. PNA'ların doğal olmayan omurgasının diğer önemli bir özelliği de bu oligomerin ömrünü hem *in vitro*, hem de *in vivo* olarak uzatan, nükleaz ve proteaz kaynaklı bozulmaya karşı olan dirençtir (Pellestor vd., 2004; Egholm vd., 1993). PNA'lar baz çifti uyumsuzluklarını çok iyi ayırt eder. DNA ve RNA'ya karşı güçlü bağlanma afinitesine sahiptirler (Demidov vd., 2004). PNA, DNA ve RNA polimerazlarının, telomeraz, ters transkriptaz, endonükleaz ve transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini bloke etme

kapasitesine sahiptir. Bu ifadelerle orantılı olarak, DNA/RNA tanıma kapasitesi, PNA'nın antijen ve antisens mekanizması aracılığıyla gen ekspresyonunun modülasyonu yoluyla terapötik uygulama için umut verici bir aday olmasını sağlamaktadır (Siddiquee vd., 2015; Nielsen, 2008).

Peptit Nükleik Asitlerin Veterinerlik Alanında Uygulamaları

PNA'lar çok çeşitli önemli uygulamalara sahip güçlü bir moleküler araçtır. Bir gen dizisinde seçilen bir hedefe yüksek dizi özgüllüğü ile etkileşime girme kabiliyetleri nedeniyle, tıbbi ve biyoteknolojik alanlarda büyük ilgi uyandırmaktadır (Marin vd., 2004; Nielsen, 2001).

PNA'ların uygulamaları, antijen ve antisens tedavisi için PNA (Siddiquee vd., 2015; Nielsen, 2008; Marin vd., 2004), moleküler biyoloji ve fonksiyonel genomik için bir araç olarak PNA (Demidov vd., 2001 ve 1993; Veselkov vd., 1996; Demers vd., 1995; Perry-O'Keefe vd., 1996; Orum vd., 1995), tanı ve tespit için prob olarak PNA (Orum vd., 1993; Demidov, 2002; Igloi, 2003; Stender, 2003; Lansdorp vd., 1996) ve biyosensor olarak PNA (Tyagi ve Kramer, 1996; Kuhn vd., 2001; Wolffs, 2001; Isacson vd., 2000; Brandt, 2003; Brandt, 2004) gibi dört ana kategoriye ayrılabilir.

PNA veteriner hekimlik alanında, bilhassa çoklu ilaca dirençli bakterilerden kaynaklı hasta hayvanların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin yerine, bakteri için esansiyel genleri hedef alarak gen ekspresyonunu inhibe edebildiği için, üçüncü nesil bir antisens tedavisi olarak kullanılmaktadırlar.

Antisens Antimikrobiyal olarak PNA

Çoklu ilaç direnci olan bakteri oranının artmış olması, antimikrobiyal etki için yeni yaklaşımlar ve bu yaklaşımlara uygun yeni ilaçlar geliştirilmesi ihtiyacını meydana getirmiştir. Hücrenin içinde, antibakteriyel PNA oligomerleri, antisens molekülleri olarak işlev görür veya mRNA boyunca ribozomların hareketini bloke ederek ya da translasyon başlangıç bölgesinin etrafındaki ribozomun düzeneğini keserek translasyonun inhibisyonunu gerçekleştirir. Antisens PNA'nın, klinik olarak en yaygın olan ve çoklu antibiyotik direncine sahip türü olan, *Pseudomonas aeruginosa*'da çeşitli genleri hedefleyebileceği bildirilmiştir (Maekawa vd., 2015). Son bulgular ayrıca antisens PNA'ların, *Plasmodium falciparum*'nın hayatta kalabilmesi için esansiyel olan önemli bir genin (*PfSec13*) gen ekspresyonunu yönetme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (Kolevzon vd.,2014; Amit-Avraham vd., 2015). Rajasekaran ve arkadaşları hücreye nüfuz eden peptidlere (CPP'ler) kovalent olarak bağlanmış PNA kullanılarak *Brucella suis* büyümesinin inhibisyonu üzerine çalışmışlardır (Rajasekaran vd., 2013). 24 saatlik tedaviden sonra, *Brucella* genleri, kültür ve makrofajlarda *B. suis*'in büyümesini inhibe eden; DNA, RNA, hücre çeperi, yağ asidi ve protein sentezinde rol oynadıkları tespit edilmiştir. 2014 yılında çoklu ilaç direnci gösteren *Acinetobacter baumannii*' de, PNA oligomerleri kullanılmış ve DNA giraz A (*gyrA*) geni hedef alınmıştır. Çalışma sonucunda PNA'ların anti-*gyrA* gen ifadesini etkili şekilde inhibe ettiği ve bakterinin büyümesini engellediği ortaya konmuştur (Wang vd., 2014).

PNA oligomerlerinin antisens antibakteriyel maddeler olarak kullanımının önerilmesinden sonra, hedef gen seçimi ve antisens moleküllerin hücre içerisine gönderilmesi konusunda da çok sayıda çalışma yapılmıştır. Yapılan ilk çalışmalarda, PNA moleküllerinin, dış zarda kusurlu *E. coli* suşunun büyümesini önleyebildiği belirlenmiştir. Yıllar sonra yapılan ayrı bir çalışma, KFFKFFKFFK peptidi ile birlikte PNA oligomerinin yabancı tip *E. coli* suşunun büyümesini de engelleyebildiğini göstermiştir (Good vd., 1998, 2001).

PNA, çeşitli bakteri cinslerinde korunan diziye seçici olarak bağlanabilmesiyle, geniş spektrumlu olarak bakteri üremesini önleyebilmektedir. PNA'nın, karışık bir kültürde *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Shigella flexneri* ve *Streptococcus pyogenes* gibi farklı bakteri türlerinde peptid-PNA konjugatlarının spesifik genlerin translasyon başlatma bölgesini hedefleyerek antibakteriyel aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir (Rajasekaran vd., 2013; Ghosal, 2013; Jeon, 2009; Nekhotiaeva vd., 2004; Kulyté, 2005; Ghosal ve Nielsen, 2012; Kurupati vd., 2017; Ghosal vd., 2013; Bai vd., 2012; Patenge vd., 2013).

PNA Floresans In Situ Hibridizasyon (PNA-FISH) Yöntemi

Floresan in situ hibridizasyon (FISH), DNA/rRNA'nın spesifik problemler kullanarak kültür yöntemlerine başvurulmaksızın, direkt olarak karışık durumdaki örneklerden, mikroorganizmaların epifloresan mikroskop, konfokal lazer taramalı mikroskop veya flow sitometri ile filogenetik olarak tanımlanmasını sağlayan moleküler bir yöntemdir (Lehtola vd., 2005).

Lac663 PNA probu kullanılarak Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) metodu ile *Lactobacillus* cinsi, diğer türler ve *Lactobacillus* olmayan suşlardan ziyade tüm *Lactobacillus* suşları ile hibridize olmasıyla, yüksek prob özgüllüğü ve seçiciliği sayesinde saptanabilmiştir (Machado vd., 2013). *Lactobacillus* suşları, diğer bakteriler ve patojenik bakteriler eklenmiş taze süt örnekleri ile test edildiğinde, Lac663 probu yalnızca *Lactobacillus* cinlerini belirleyici olmuştur.

Xiao Feng ve çalışma grubu, *Listeria* türlerinin in situ tespiti için 16S rRNA-tabanlı FISH metodu kullanarak floresan etiketli PNA problemleri geliştirmişlerdir (Zhang vd., 2012). Keefe ve arkadaşları ayrıca hızlı tespit için gram negatif ve gram pozitif bakteriler ve maya türlerinden oluşan bakteri türlerinin spesifik rRNA dizilerini hedef alan floresan etiketli PNA-FISH probu geliştirmiştir (Perry-O'Keefe vd., 2001). Kısa PNA oligonükleotidi, hidrofobik bir hücre duvarına nüfuz edebilmekte, ek enzimatik adımları ve gerekli basit fiksasyon aşaması olmadan rRNA ile hibritleşebilmektedir.

Campylobacter spp. (*C. coli*, *C. jejuni* ve *C. lari*) hızlı PNA FISH yöntemlerini kullanılarak tespit edilebilmiş cinslerdendir (Lehtola vd., 2005).

Zhang ve arkadaşları tarafından bildirilen *Vibrio* cinsinin spesifik tespiti için de bir peptid nükleik asit probu geliştirilmiştir. BLAST ve ProbeCheck tarafından yapılan silico analizinde, 16S rRNA'larını

hedef alan tasarlanmış PNA probunun *Vibrio*'nun spesifik tanımlanması için uygun olduğu gösterilmiştir. PNA-FISH testi, biyokimyasal tanımlama ve gerçek zamanlı PCR ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmak suretiyle, su ürünleri ve ortamlarından zenginleştirilmiş kültürlerinden elde edilen 510 tane örnek arasından 47 *Vibrio* pozitif numuneyi tespit edebilmiştir. Bu nedenle PNA-FISH'in *Vibrio* türlerinin deniz ürünlerinden ya da ilgili örneklerden hızlı bir şekilde tespiti için alternatif bir yöntem olabileceği sonucuna varılmıştır (Zhang vd., 2015).

Peptit Nükleik Asitlerin Hücre İçine Alınimleri

PNA'lar çok büyük terapötik potansiyele sahip olsalar da nötr yüklü olmasına rağmen, hücreler tarafından kolayca alınamamaktadırlar. Önce hücre zarına nüfuz etmek için elektroporasyon, nükleofeksiyon ve mikroenjeksiyon gibi yapay tekniklerle çalışılmışlardır (Ray vd., 2000). PNA'ların deneysel ortamlarda uygulanabilirliği olsa da *in-vivo* araştırmaların yapılabilmesi ve canlı sistemler üzerine uygulanabilmesi, mevcut teknolojilerin eksikliği nedeniyle onların sistemik kullanımını engellemektedir. Bu nedenle PNA'ların yeterli hücre içine alınımını sağlama zorluğunun aşılması gerekmektedir. Hücresel zarı geçmeden, PNA'lar hedeflenen gen dizilerine ulaşamazlar ve böylece sitozol içindeki mikroRNA'lar veya mRNA'lar üzerinde etkili olamazlar ya da çekirdekdeki DNA hedefleri ile hibritleşemezler. Bu nedenle, araştırmacılar PNA'ların hücre zarını kendi başlarına ya da klinik olarak geçebilmeleri için uygulanabilir tekniklerin araştırması içeresindedirler.

Araştırmacılar, hücresel membranları taklit edebilir yapısı ve biyolojik sistemlere uyumları nedeniyle lipozomları kullanmışlardır. Farklı uzunluktaki PNA'ların hedef DNA ya da RNA üzerine etki etmek için hücresel alımın sürelerinin oldukça uzun olduğu sonucuna varmışlardır (Wittung vd., 1995). Bu sınırlamaların üstesinden gelmek ve PNA'ların hücresel alınımını arttırmak için araştırmacılar, hücreye nüfuz eden peptitler (CPP'ler) üzerinde durmuşlardır (Fabani vd., 2008; Aldrian-Herrada vd., 1998; Pooga vd., 1998). CPP'ler, uzunluğu 9 ila 30 amino asit arasında değişen, kısa, katyonik peptitlerdir (Shiraishi vd., 2004). PNA-penetratin konjugatlarının, hedef peptidlerle etkin bir şekilde hibritleşebileceği gösterilmiştir. Nielsen ve grubu daha sonra penetratin konjugasyonunun *in vitro* PNA alınımını arttırdığını, ancak konjugatların hücresel alınımının hücre tipine, sıcaklığa ve konsantrasyona bağlı değişken olduğunu göstermişlerdir (Koppelhus vd., 2002). CPP aracılı PNA uygulaması, *in vitro* ve *in vivo* uygulamalar için ümit verici bir yaklaşım olsa da terapötik etkiler elde etmek için aşırı yüksek ve tekrarlanan dozaj ihtiyacından kaynaklı, klinikte uygulaması sınırlı olarak değerlendirilmiştir.

Son zamanlarda bazı bakterilerin B12 vitamini alım kabiliyetine sahip olması, PNA antisens oligomerlerinin B12 vitaminine konjuge edilmesiyle, *S. typhimurium* ve *E. coli*'ye daha fazla PNA iletimi sağlamak için kullanılmıştır (Pieńko vd., 2017; Równicki vd., 2017). B12 vitamini ile bu konjugasyonun, PNA'yı, yaygın olarak kullanılan CPP (KFF) 3K'dan daha verimli bir şekilde *E. coli* hücrelerine taşıdığı sonucuna ulaşılmıştır.

SONUÇ

Peptit nükleik asit (PNA), tıp bilimi ve biyoteknolojinin çeşitli alanlarında birçok uygulama bulan, kendine has bir bileşiktir. PNA'nın temel avantajı, doğal DNA'nın özelliklerine çok benzeyen pek çok özelliğin yanında, oldukça farklı olan ek özelliklerle birleşimidir. Bu hibrit yapının kimyasal ve biyolojik çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında PNA, özellikle antijen ve antisens tedavisi ve prob bazlı çalışma alanlarında bir etki gösterebilmektedir. PNA antibiyotiklerinin geliştirilmesinin, çoklu ilaç direnci olan bakteriyel enfeksiyonlarını kontrol etmek için alternatif bir yaklaşım olabileceği vurgulanmaktadır. Ayrıca antisens PNA oligomerleri, bakterilerde gen fonksiyonunu incelemek için de kullanılabilir. Birçok engelin hala üstesinden gelinmesi gerekmektedir, ancak bakteriler ve deney farelerinde yapılan son antisens çalışmaları umut vericidir. PNA'nın yeni teknolojilere bağlı olarak da gelişmelerinin istikrarlı bir şekilde arttığı göz önünde bulundurulursa, PNA yeni uygulamalar açısından gelecekte daha farklı ufuklar açacak potansiyel ve öneme sahiptir.

KAYNAKÇA

- Aldrian-Herrada, G., Desarmenien, M.G., Orcel, H., Boissin, Agasse, L., Mery, J., Brugidou, J., et al. (1998). A peptide nucleic acid (PNA) is more rapidly internalized in cultured neurons when coupled to a retro-inverso delivery peptide. The antisense activity depresses the target mRNA and protein in magnocellular oxytocin neurons. *Nucleic Acids Research*, 26(21):4910-6.
- Amit-Avraham, I., Pozner, G., Eshar, S., Fastman, Y., Kolevzon, N., Yavin, E., et al. (2015). Antisense long noncoding RNAs regulate var gene activation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(9): E982-9.
- Arya, DP. (2011). New approaches toward recognition of nucleic acid triple helices. *Acc Chem Res*, 44(2):134-46.
- Bahal, R., Gupta, A., Glazer, P.M. (2016). Precise Genome Modification Using Triplex Forming Oligonucleotides and Peptide Nucleic Acids. *Adv Exp Med Biol*, 895:93-110.
- Bai, H., You, Y., Yan, H., Meng, J., Xue, X., Hou, Z., Zhou, Y., Ma, X., Sang, G.L.X. (2012). Antisense inhibition of gene expression and growth in gram negative bacteria by cell penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids targeted to *rpoD* gene. *Biomaterials*, 33: 659–667.
- Bentin, T., Larsen, H.J., Nielsen, P.E. (2016). Combined triplex/duplex invasion of double stranded DNA by "tail clamp" peptide nucleic acid. *Biochemistry-Us*, 42(47):13987-95.
- Brandt, O. (2003). PNA microarrays for hybridisation of unlabelled DNA samples. *Nucleic Acids Res*, 31: E119.
- Brandt, O. and Hoheisel, J.D. (2004). Peptide nucleic acids on microarrays and other biosensors. *Trends Biotechnol*, 22:617 – 622.
- Chambers, J.P., Arulanandam, B.P., Matta, L.L., Weis, A., Valdes, J.J. (2008). Biosensor Recognition Elements. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 10: 1–12.
- Demers, D.B., Curry, E.T, Egholm, M., Sozer, A.C. (1995). Enhanced PCR amplification of VNTR locus D1S80 using peptide nucleic acid (PNA). *Nucleic Acids Res*, 23:3050–3055.

- Demidov, V.V. (2001). PD-loop technology: PNA openers at work. *Expert Rev Mol Diagn*, 1:343–351.
- Demidov, V.V. (2002). New kids on the block: emerging PNA-based DNA diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*, 2:199–201.
- Demidov, V.V., Frank-Kamenetskii, M.D, Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P.E. (1993). Sequence specific double strand DNA cleavage by peptide nucleic acid (PNA) targeting using nuclease S1. *Nucleic Acids Res*, 21:2103–2107.
- Demidov, V.V., Potaman, V.N., Frank-Kamenetskii, M.D., Egholm, M., Buchard, O., Sonnichsen, S.H., et al. (1994). Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochem Pharmacol*, 48(6):1310-3.
- Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S.M., Driver, D.A. et al. (1993). PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen bonding rules. *Nature*, 365(6446):566-8.
- Egholm, M., Christensen, L., Dueholm, K.L, Buchardt, O., Coull, J., Nielsen, P.E. (1995). Efficient pH independent sequence specific DNA binding by pseudoisocytosine containing bis PNA. *Nucleic Acids Res*, 23(2):217-22.
- Fabani, M.M., Gait, M.J. (2008) miR-122 targeting with LNA/2'-O-methyl oligonucleotide mixmers, peptide nucleic acids (PNA), and PNA-peptide conjugates. *RNA*, 14(2):336- 46.
- Ghosal, A., Nielsen, P.E. (2012). Potent antibacterial antisense peptide nucleic acid conjugates against *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acid Ther*, 22: 323–334.
- Ghosal, A., Vitali, A., Stach, J.E.M., Nielsen, P.E. (2013) Role of SbmA in the uptake of peptide nucleic acid (PNA)-peptide conjugates in *E. coli*. *ACS Chem Biol*, 8: 360–367.
- Ghosal, A. (2013). Novel antibacterial agents (antibiotics) based on RNA interference using Peptide Nucleic Acid (PNA). Doctorate thesis in Health Science. *University of Copenhagen, Copenhagen-Hovedstaden*. 107p.
- Good, L., Nielsen, P.E. (1998) Antisense inhibition of gene expression in bacteria by PNA targeted to mRNA. *Nat Biotechnol*, 16:355–8.
- Good, L., Nielsen, P.E. (1998) Inhibition of translation and bacterial growth by peptide nucleic acid targeted to ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:2073–6.
- Good, L., Nielsen, P.E. (1999) Peptide nucleic acid (PNA) antisense effects in *Escherichia coli*. *Curr Issues Mol Biol*, 1:111–6.
- Good, L., Awasthi, S.K., Dryselius, R., Larsson, O.N.P. (2001) Bactericidal antisense effects of peptide–PNA conjugates. *Nat Biotechnol*, 19: 360–364.
- Igloi, G.L. (2003). Single-nucleotide polymorphism detection using peptide nucleic acids. *Expert Rev Mol Diagn*, 3:17–26.
- Isacsson, J., Cao, H., Ohlsson, L., Nordgren, S., Svanvik, N., Westman, G., et al. (2000). Rapid and specific detection of PCR products using light-up probes. *Mol Cell Probes*, 14:321–328.
- Jeon, B.Z.Q. (2009). Sensitization of *Campylobacter jejuni* to fluoroquinolone and macrolide antibiotics by antisense inhibition of the CmeABC multidrug efflux transporter. *J Antimicrob Chemother*, 63: 946–948.

- Kolevzon, N., Nasereddin, A., Naik, S., Yavin, E., Dzikowski, R. (2014). Use of peptide nucleic acids to manipulate gene expression in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*, 9(1): e86802.
- Koppelhus, U., Awasthi, S.K., Zachar, V., Holst, H.U., Ebbesen, P., Nielsen, P.E. (2002). Cell-dependent differential cellular uptake of PNA, peptides, and PNA-peptide conjugates. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 12(2), 51–63.
- Kuhn, H., Demidov, V.V., Gildea, B.D., Fiandaca, M.J., Coull, J.M. and Frank-Kamenetskii, M.D. (2001). PNA beacons for duplex DNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 11:265–270.
- Kulyté, A., Nekhotiaeva, N., Awasthi, S.K.G.L. (2005). Inhibition of *Mycobacterium smegmatis* gene expression and growth using antisense peptide nucleic acids. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 9: 101–109.
- Kurupati, P., Tan, K.S., Kumarasinghe, G.P.C. (2007). Inhibition of gene expression and growth by antisense peptide nucleic acids in a multiresistant beta lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 805– 811.
- Lansdorp, P.M., Verwoerd, N.P., Van de Rijke, F.M., Dragowska, V., Little, M.T., Dirks, R.W, *et al.* (1996). Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet*, 5:685–691.
- Lehtola, M.J., Loades, C.J., Keevil, C.W. (2005). Advantages of peptide nucleic acid oligonucleotides for sensitive site directed 16S rRNA fluorescence in situ hybridization (FISH) detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari*. *J Microbiol Methods*, 62: 211-219.
- Machado, A., Almeida, C., Carvalho, A., Boyen, F., Haesebrouck, F., *et al.* (2013). Fluorescence in situ hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of *Lactobacillus* spp. in milk samples. *Int J Food Microbiol*, 162:64-70.
- Maekawa, K., Azuma, M., Okuno, Y., Tsukamoto, T., Nishiguchi, K., Setsukinai, K., *et al.* (2015). Antisense peptide nucleic acid peptide conjugates for functional analyses of genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg Med Chem*, 23(22):7234-9.
- Marin, V.L., Roy, S., Armitage, B.A. (2004). Recent advances in the development of peptide nucleic acid as a gene-targeted drug. *Expert Opin Biol Ther*, 4:337-348.
- Nekhotiaeva, N., Awasthi, S.K., Nielsen, P.E. and G.L (2004) Inhibition of *Staphylococcus aureus* gene expression and growth using antisense peptide nucleic acids. *Mol Ther*, 10: 652–659.
- Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H., Buchardt, O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, 254(5037):1497-500.
- Nielsen, P.E. (1995) DNA analogues with nonphosphodiester backbones. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 24:167-83.
- Nielsen, P.E., Egholm, M. (1999). An introduction to peptide nucleic acid. *Curr Issues Mol Biol*, 1(1-2):89-104.
- Nielsen, P.E. (2001). Peptide nucleic acid: A versatile tool in genetic diagnostics and molecular biology. *Curr Opin Biotechnol*, 12(1):16-20.
- Nielsen, P.E. (2008). Modulating gene function with peptide nucleic acids (PNA). In: Crooke ST, editor. *Antisense drug technology*, Taylor & Francis P. 507-18.
- Nielsen, P.E. (2010). Targeted gene repair facilitated by peptide nucleic acids (PNA). *Chembiochem*, 11(15):2073-6.

- Orum, H., Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H., Buchardt, O. and Stanley, C. (1993). Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res*, 21:5332–5336.
- Orum, H., Nielsen, P.E., Jorgensen, M., Larsson, C., Stanley, C. and Koch, T. (1995). Sequence-specific purification of nucleic acids by PNA-controlled hybrid selection. *BioTechnique*, 19:472–480.
- Patenge, N., Pappesch, R., Krawack, F., Walda, C., Mraheil, M.A., Jacob, A., Hain, T., Kreikemeyer, B. (2013). Inhibition of growth and gene expression by PNA-peptide conjugates in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2: e132.
- Pellestor, F., Paulasova, P. (2004). The peptide nucleic acids (PNAs), powerful tools for molecular genetics and cytogenetics. *Eur J Hum Genet*, 12(9):694-700.
- Perry-O'Keefe, H., Yao, X.W., Coull, J.M., Fuchs, M. and Egholm, M. (1996). Peptide nucleic acid pre gel hybridization: an alternative to Southern hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:14670–14675.
- Perry-O'Keefe, H., Rigby, S., Oliveira, K., Sørensen, D., Stender, H., et al. (2001). Identification of indicator microorganisms using a standardized PNA FISH method. *J Microbiol Methods*, 47: 281-292.
- Pieńko, T., Wierzba, A.J., Wojciechowska, M., Gryko, D., Trylska, J. (2017). Conformational dynamics of cyanocobalamin and its conjugates with peptide nucleic acids. *J Phys Chem B*, 121:2968– 2979.
- Pooga, M., Soomets, U., Hallbrink, M., Valkna, A., Saar, K., Rezaei, K., et al. (1998) Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat Biotechnol*, 16(9):857-61.
- Ray, A., Norden, B. (2000). Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *FASEB J*, 14(9):1041-60.
- Rajasekaran, P., Alexander, J.C., Seleem, M.N., Jain, N., Sriranganathan, N., et al. (2013). Peptide nucleic acids inhibit growth of *Brucella Suis* in pure culture and in infected murine macrophages. *Int J Antimicrob Agents*, 41: 358-362.
- Rasmussen, L.C., Sperling-Petersen, H.U., Mortensen, K.K. (2007). Hitting bacteria at the heart of the central dogma: sequence-specific inhibition. *Microb Cell Fact*, 6:24.
- Równicki, M., Wojciechowska, M., Wierzba, A.J., Czarnecki, J., Bartosik, D., Gryko, D., Trylska, J. (2017). Vitamin B12 as a carrier of peptide nucleic acid (PNA) into bacterial cells. *Sci Rep*, 7:7644.
- Ricciardi, A.S., McNeer, N.A., Anandalingam, K.K., Saltzman, W.M., Glazer, P.M. (2014). Targeted genome modification via triple helix formation. *Methods Mol Biol*, 1176:89-106.
- Siddiquee, S., Rovina, K., Azriah, A. (2015). A review of peptide nucleic acid. *Adv Tech Biol Med*, 3(2).
- Shiraishi, T., Nielsen, P.E. (2014). Cellular delivery of peptide nucleic acids (PNAs). *Methods Mol Biol*, 1050:193-205.
- Stender, H. (2003). PNA FISH: an intelligent stain for rapid diagnosis of infectious diseases. *Expert Rev Mol Diagn*, 3:649–655.
- Tyagi, S. and Kramer, F.A. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, 14:303–308.
- Veselkov, A.G., Demidov, V., Nielsen, P.E. and Frank-Kamenetskii, M.D., (1996). A new class of genome rare cutters. *Nucleic Acids Res*, 24:2483–2487.

- Wang, H., He, Y., Xia, Y., Wang, L., Liang, S. (2014). Inhibition of gene expression and growth of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* by antisense peptide nucleic acids. *Mol Biol Rep*, 41:7535-41.
- Wittung, P., Kajanus, J., Edwards, K., Haaima, G., Nielsen, P.E., Norden, B., et al. (1995). Phospholipid membrane permeability of peptide nucleic acid. *FEBS Lett*, 375(3):27-9.
- Wolffs, P. (2001). PNA-based light-up probes for real-time detection of sequence-specific PCR products. *Biotechniques*, 31:766-771.
- Zhang, X., Wu, S., Li, K., Shuai, J., Dong, Q., et al. (2012). Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization for identification of *Listeria* genus, *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. *Int J Food Microbiol*, 157: 309-313.
- Zhang, X., Li, K., Wu, S., Shuai, J., Fang, W. (2015). Peptide nucleic acid fluorescence in-situ hybridization for identification of *Vibrio* spp. in aquatic products and environments. *Int J Food Microbiol*, 206: 39-44.