

***Streptococcus pneumoniae* için DNA
Aptamerlerin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu**

Sultan İlayda DÖNMEZ
Yüksek Lisans Tezi
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Programı
Yrd. Doç. Dr. Abdullah Tahir BAYRAÇ
Nisan, 2017

**T.C.
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Streptococcus pneumoniae* İÇİN DNA
APTAMERLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Sultan İlayda DÖNMEZ**

Anabilim Dalı: Biyomühendislik

Program : Biyomühendislik

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Abdullah Tahir BAYRAÇ

KARAMAN-2017

TEZ ONAYI

Sultan İlayda DÖNMEZ tarafından hazırlanan “*Streptococcus pneumoniae* için DNA Aptamerlerin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Yrd. Doç. Dr. Abdullah Tahir BAYRAÇ

İmza:



Jüri Üyeleri:

Yrd. Doç. Dr. Abdullah Tahir BAYRAÇ

İmza:



Doç. Dr. Mevlüt BAYRAKCI

Doç. Dr. Veli Cengiz ÖZALP



Tez Savunma Tarihi: 17/04/2017

Yukarıdaki sonucu onaylarım



Doç. Dr. Ahmet İPEK

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Sultan İlayda DÖNMEZ

ÖZET

Pnömonokoklar çocuklarda, yaşlılarda, immün yetmezliği olanlarda yaptığı enfeksiyonlarla dünyada başta gelen hastalık nedenleri arasında bulunmaktadır. Son yıllarda antibiyotiklere dirençli *Streptococcus pneumoniae* suşları giderek yaygınlaşmıştır. Aptamerlerin yüksek afinite ve seçicilik özellikleri sayesinde, terapötik, biyoanalitik uygulama ve moleküler tanı alanlarında kullanımlarının yüksek potansiyele sahip oldukları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bakteriyel-SELEX aptamer üretim yöntemi ile bakterilerdeki bilinmeyen biyomarkörlerin tespit edilmeleri sağlanabilmekte ve geliştirilen bu aptamerler tanı amaçlı kullanılabilir. Bu çalışmada *S. pneumoniae*'ya karşı bakteriyel SELEX yöntemi kullanılarak aptamerler geliştirilmiştir. SELEX esnasında *S. pneumoniae* (ATCC® 49619™) hedef olarak kullanılırken, *Streptococcus mutans* (ATCC® 25175™), *Streptococcus pyogenes* (ATCC® 19615™) ve *Enterococcus faecalis*(ATCC® 19433™) negatif seçimde kullanılarak aptamerlerin özgünlüğü artırılmıştır. Yapılan 20 turluk SELEX sonrasında zenginleşen diziler yeni nesil dizileme ile belirlenmiş ve sentezlenmiştir. Test edilen aptamerler arasında üç aday submikromolar seviyede ($844,7 \pm 163,6$ nM, $1984,8 \pm 347,5$ nM, $661,8 \pm 111,3$ nM) K_d değerlerine sahip olup *S. pneumoniae*'nın dört farklı suşuna karşı bağlanma etkinliği göstermiş fakat seçimde kullanılan bakterilere etkin bağlanma göstermemiştir. Aptamerlerin bağlanma etkinlikleri floresans spektroskopisi, floresans mikroskopisi ve akım sitometrisi kullanılarak gösterilmiştir. Bununla birlikte geliştirilen aptamerlerin biyofilm oluşumu seçici olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Geliştirilen bu aptamerler literatürde bulunan ilk *S. pneumoniae* aptamerleridir, fonksiyonel olarak *S. pneumoniae*'e bağlanmakta ve anti pneumokokal potansiyeli bulunmaktadır.

ABSTRACT

Pneumococci is among the foremost causes of disease in children, the elderly and people with immune deficiency. Lately, antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains have become more and more prevalent. In studies conducted, aptamers through their high affinity and selectivity, have been proven to be of high potential in therapeutic and bioanalytical application and molecular diagnosis. The detection of unknown biofactors in bacteria has been made possible by the bacterial-SELEX aptamer production procedure and these aptamers can then be used for diagnostic purposes. In this study, aptamers against *S. pneumoniae* have been synthesized through the bacterial-SELEX procedure; *S. pneumoniae* (ATCC® 49619™) has been used as target while the distinction of the aptamers have been provided by using *Streptococcus mutans* (ATCC® 25175™), *Streptococcus pyogenes* (ATCC® 19615™) and *Enterococcus faecalis* (ATCC® 19433™) in negative selection. After 20 rounds of SELEX, strains that have been enriched had been detected by new generation sequencing and synthesized. Three candidates among all the aptamers tested demonstrated K_d value in the submicromolar level ($844,7 \pm 163,6$ nM, $1984,8 \pm 347,5$ nM, $661,8 \pm 111,3$ nM) and showed binding activity to four different strains of *S. pneumoniae*, but not to the bacteria used in negative selection. Binding activities of aptamers have been demonstrated with the help of fluorescence spectroscopy, fluorescence microscopy and flow cytometry. It has also been shown that aptamers selectively inhibit the development of biofilm. These aptamers are the first *S. pneumoniae* aptamers found in the literature, they bind *S. pneumoniae* functionally, and they have anti pneumococcal potential.

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın tasarımından, sonuçlandırılmasına kadar her aşamada bilgisini, deneyimini, ilgisini esirgemeyen, maddi ve manevi her anlamda destek olan, yanında çalışmaktan onur ve gurur duyduğum değerli hocam ve tez danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Abdullah Tahir Bayraç'a teşekkür ederim.

Motivasyonu, birikimi ve moral takviyeleriyle her an yardıma koşan hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Ceren Bayraç'a, enerji ve güler yüzlülüğünün yanında birikimi ve deneyimiyle sayın hocam Doç. Dr. Mevlüt Bayrakçı'ya, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca yetişmemde, geleceğe bakmamda emeği geçen, ışık tutan bütün hocalarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca beraber yürüdüğüm KMU-Aptamer grubu arkadaşlarım Muazzez Ceren Poyraz, Berke Bilgenur Kandemir, Gülnur Camızcı ve Elif Yıldız'a, tez düzenlemelerine yardımcı olan Adem Mutlu'ya teşekkür ederim.

Karaman'da bulunduğum süre boyunca ailem olan ve yalnız hissettirmeyen Mukaddes Keskinates'e, hep yanımda olduklarını bildiğim Zeynep Hayırlı, Coşku Öğren, Ahmet Refik Eryılmaz ve saymakla bitiremeyeceğim iyi dileklerini, düşüncelerini, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen bütün arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de her daim yanımda olan, sayelerinde var olduğum biricik aileme, örnek aldığım, gölgesine sığındığım cefakâr canım babam Mehmet Dönmez'e, dünyalara bedel olan şevkatli, merhametli, fedakâr canım annem Muhterem Dönmez'e, kardeşim değil adeta ağabeyim olan, her derdime koşan canım kardeşim M. Doğuşcan Dönmez'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne sağlamış oldukları altyapı için teşekkür ederim.

Bu çalışma, 114S856 numaralı araştırma projesi kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Sultan İlayda Dönmez - Nisan,2017

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR	3
2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	3
2.1.1. <i>S. pneumoniae</i> 'nın Kültür Şartları	3
2.1.2. Pnömonokokları Diğer Streptokoklardan Ayıran Özellikler	4
2.1.3. Pnömonokok Yapısı	6
2.1.4. Pnömonokokun Virulans Faktörleri	7
2.1.5. Kolonizasyon Mekanizması	10
2.1.6. <i>S. pneumoniae</i> 'nın Sebep Olduğu Hastalıklar	11
2.1.7. Dünyada ve Türkiye'de Durum.....	13
2.2. Aptamer.....	14
2.2.1. Aptamer ve Antikorların Karşılaştırılması	16
2.3. SELEX	19
2.3.1. Kapiler Elektrophorez-SELEX	21
2.3.2. Manyetik Boncuk Tabanlı SELEX.....	22
2.3.3. GO-SELEX.....	22
2.3.4. Photo-SELEX	23
2.3.5. Bakteriyel-SELEX	23
3. MATERYAL ve METOT	32
3.1. MATERYAL	32
3.2. METOT	33
3.2.1. SELEX'te Kullanılacak Mikroorganizmalar ve Büyütülme Koşulları	33
3.2.2. SELEX'te Kullanılan Kütüphane ve Primerler	34
3.2.3. SELEX İçin Kullanılacak Kütüphanenin PZR Optimizasyonu	35
3.2.4. SELEX	37
3.2.5. Dizileme ve Biyoinformatik.....	44
3.2.6. Bağlanma Afinitesinin Belirlenmesi	49
3.2.7. Akım Sitometresi ile Aptamerlerin Bağlanma Etkinliklerinin Belirlenmesi	49
3.2.8. Floresans Mikroskopisi ile Aptamerlerin Bağlanma Etkinliklerinin Belirlenmesi ..	50
3.2.9. Aptamerlerin Biyofilm Oluşturma Üzerine Etkilerinin İncelenmesi.....	50

4. BULGULAR	52
4.1. Bakterilerin Büyüme Eğrileri ve Bakteri Sayısı Hesaplama.....	52
4.2. PZR Optimizasyonu	57
4.3. SELEX Turları.....	59
4.4. Dizileme ve Biyoinformatik Analizler.....	64
4.5. Bağlanma Afinitesinin Belirlenmesi.....	79
4.6. Aptamerlerin Bağlanma Profilleri	80
4.7. Akım Sitometrisi	81
4.8. Floresans Modifiyeli Aptamerlerle Mikroskop Görüntüsü Alma	84
4.9. Aptamerlerin Biyofilm Oluşturma Üzerine Etkileri	86
5. TARTIŞMA	89
6. KAYNAKÇA	92

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.4.1. Pnömonokok yapısı	7
Şekil 2.1.5.1. <i>S. pneumoniae</i> ve epitel hücreler arasındaki etkileşim	10
Şekil 2.1.6.1. <i>S. pneumoniae</i> enfeksiyonu için patojenik yollar	12
Şekil 2.2.1. Aptamer-hedef etkileşimi	15
Şekil 2.2.1.1. Kafein ve teofilin molekülü	18
Şekil 2.3.1. Kütüphane dizaynı	19
Şekil 2.3.2. SELEX turu	21
Şekil 2.3.1.1. Kapiler elektroforez-SELEX	21
Şekil 2.3.2.1. Manyetik boncuk tabanlı SELEX.	22
Şekil 2.3.5.1. Bakteriyel-SELEX işlemi	23
Şekil 3.2.4.1. Çift zincirli DNA kütüphanesinin tek zincirli hale getirilmesi	41
Şekil 3.2.5.1. Miseq dizilemede kullanılan primerler	45
Şekil 4.1.1. <i>S. pneumoniae</i> 'ya ait büyüme eğrisi	52
Şekil 4.1.2. <i>S. pneumoniae</i> için bakteri sayısı-zaman grafiği	52
Şekil 4.1.3. <i>S. pneumoniae</i> için bakteri sayısı-OD ₆₀₀ grafiği	52
Şekil 4.1.4. <i>S. pyogenes</i> 'e ait büyüme eğrisi	53
Şekil 4.1.5. <i>S. pyogenes</i> için bakteri sayısı-zaman grafiği	53
Şekil 4.1.6. <i>S. pyogenes</i> için bakteri sayısı-OD ₆₀₀ grafiği	54
Şekil 4.1.7. <i>E. feacalis</i> 'e ait büyüme eğrisi	55
Şekil 4.1.8. <i>E. feacalis</i> için bakteri sayısı-zaman grafiği	55
Şekil 4.1.9. <i>E. feacalis</i> için bakteri sayısı-OD ₆₀₀ grafiği	55
Şekil 4.1.10. <i>S. mutans</i> 'a ait büyüme eğrisi	56
Şekil 4.1.11. <i>S. mutans</i> için bakteri sayısı-zaman grafiği	56
Şekil 4.1.12. <i>S. mutans</i> için bakteri sayısı-OD ₆₀₀ grafiği	56
Şekil 4.2.1. T _m optimizasyonu jel görüntüsü.	57
Şekil 4.2.2. Primer optimizasyonu jel görüntüsü	57
Şekil 4.2.3. MgCl ₂ optimizasyonu jel görüntüsü	58
Şekil 4.2.4. Döngü optimizasyonu jel görüntüsü	58
Şekil 4.3.1. SELEX 1 ve SELEX 2 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri	59

Şekil 4.3.2. SELEX 3 ve SELEX 4 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri.....	59
Şekil 4.3.3. SELEX 5 ve SELEX 6 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri.....	60
Şekil 4.3.4. SELEX 7 ve SELEX 8 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri.....	60
Şekil 4.3.5. SELEX 9 ve SELEX 10 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri.....	60
Şekil 4.3.6. SELEX 11 ve SELEX 12 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri.....	61
Şekil 4.3.7. SELEX 13 ve SELEX 14 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri.....	61
Şekil 4.3.8. SELEX 15 ve SELEX 16 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri.....	61
Şekil 4.3.9. SELEX 17 ve SELEX 18 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri.....	62
Şekil 4.3.10. SELEX 19 ve SELEX 20 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri.....	62
Şekil 4.4.1. SELEX 1 DNA havuzlarının amplikon PZR sonuçları	64
Şekil 4.4.2. SELEX 1 DNA havuzlarını amplikon PZR ürünlerinin AmpureXP bead ile temizlenmesi sonrası jel görüntüsü.....	64
Şekil 4.4.3. SELEX 1 DNA havuzlarının indeks PZR ürünleri.....	65
Şekil 4.4.4. SELEX 2 DNA havuzlarının indeks PZR ürünleri.....	65
Şekil 4.4.5. SELEX 1 DNA havuzlarını indeks PZR ürünlerinin AmpureXP bead ile temizlenmesi sonrası jel görüntüsü	66
Şekil 4.4.6. SELEX 2 DNA havuzlarını indeks PZR ürünlerinin AmpureXP bead ile temizlenmesi sonrası jel görüntüsü	66
Şekil 4.4.7. SELEX 1, 20. turda bulunan dizi uzunluk dağılımı.....	69
Şekil 4.4.8. SELEX 1, 20. turun baz dağılım grafiği.....	70
Şekil 4.4.9. Seçilen overrepresented dizilerin filogenetik ağacı.....	71
Şekil 4.4.10. Seçilen overrepresented dizilerin MAFFT alignmentları	72
Şekil 4.4.11. Aday aptamerlerin MAFFT alignmentı.....	74
Şekil 4.4.12. Aday aptamerlerin MAFFT alignmentı	74
Şekil 4.4.13. Aday aptamerlerin filogenetik analizi	75
Şekil 4.4.14. Aday aptamerlerin 37°C'de oluşturdukları şekiller	76
Şekil 4.4.15. Sentezlenen aday aptamerlerin 4 ve 37°C'deki ikincil yapıları	77
Şekil 4.4.16. Sentezlenen aday aptamerlerin 4 ve 37°C'deki üç boyutlu yapıları.....	78
Şekil 4.5.1. 10_1, 20_4 ve 20_7 aptamerlerine ait K_d grafikleri	79
Şekil 4.6.1. Aptamerlerin <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> ve <i>E. faecalis</i> 'e bağlanma etkinlikleri	80
Şekil 4.6.2. Aptamerlerin farklı <i>S. pneumoniae</i> suşlarına bağlanma etkinlikleri.....	81

Şekil 4.7.1. <i>S. pneumoniae</i> ve kontrol aptameri ile inkübe edilmiş <i>S. pneumoniae</i> 'nin akım sitometrisi FL-1 histogramı.....	82
Şekil 4.7.2. <i>S. pneumoniae</i> ve Aptamer 10_1 ile inkübe edilmiş <i>S. pneumoniae</i> 'nin akım sitometrisi FL-1 histogramı.....	82
Şekil 4.7.3. <i>S. pneumoniae</i> ve aptamer 20_1 ile inkübe edilmiş <i>S. pneumoniae</i> 'nin akım sitometrisi FL-1 histogramı.....	83
Şekil 4.7.4. <i>S. pneumoniae</i> ve aptamer 20_7 ile inkübe edilmiş <i>S. pneumoniae</i> 'nin akım sitometrisi FL-1 histogramı.....	83
Şekil 4.7.5. <i>S. pneumoniae</i> 'ya bağlanan aptamerlerin floresans yoğunlukları	84
Şekil 4.8.1. 10_1, 20_4 ve 20_7 aptamerleri bağlı <i>S. pneumoniae</i> 'nin floresan görüntüsü, beyaz ışık görüntüsü ve bu iki görüntünün üst üste oturtulmuş halleri	85
Şekil 4.9.1. 10_1 aptamerinin farklı konsantrasyonlarının, <i>S. pneumoniae</i> 'nin 49619 suşunda biyofilm oluşturma etkisi	86
Şekil 4.9.2. 20_4 aptamerinin farklı konsantrasyonlarının, <i>S. pneumoniae</i> 'nin 49619 suşunda biyofilm oluşturma etkisi	86
Şekil 4.9.3. 20_7 aptamerinin farklı konsantrasyonlarının, <i>S. pneumoniae</i> 'nin 49619 suşunda biyofilm oluşturma etkisi	86
Şekil 4.9.4. 10_1, 20_4, 20_7 aptamerlerinin 5 farklı konsantrasyonunun, <i>S. pneumoniae</i> 'nin 49619 suşu üzerinde biyofilm oluşturma etkisi	87
Şekil 4.9.5. Aptamer 20_7'nin farklı <i>S. pneumoniae</i> suşlarında biyofilm oluşturmaya üzerine etkisi	88
Şekil 4.9.6. 20_7 aptamerinin <i>S. pneumoniae</i> 'nin 6301, 6303, 49136 ve 49619 suşu üzerinde biyofilm oluşturma etkisi.....	88

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1.2.1. <i>S. pneumoniae</i> 'nin farklı serotiplerinin 6 yaşından küçük çocuklarda ve 6 yaşından büyüklerde hastalık oluşturma yüzdeleri	5
Çizelge 2.2.1.1. Bazı biyolojik belirteçlerde aptamer ile antikorlar arasında bağlanma afinitesinin karşılaştırılması	18
Çizelge 2.3.5.1. Bakteriyel-SELEX'lerle çeşitli bakterilere karşı seçilmiş aptamerler..	29
Çizelge 2.3.5.2. Bütün hücreye yönelik yapılan SELEX'le çeşitli memeli hücrelerine seçilmiş aptamerler	30
Çizelge 3.2.3.1. T_m optimizasyonu için kullanılan PZR şartları	35
Çizelge 3.2.3.2. Primer optimizasyonu için kullanılan PZR şartları	36
Çizelge 3.2.3.3. $MgCl_2$ optimizasyonu için kullanılan PZR şartları.....	36
Çizelge 3.2.3.4. Döngü optimizasyonu için kullanılan PZR şartları	37
Çizelge 3.2.4.1. SELEX 1 için yapılacak 1 mL'lik PZR koşulları	39
Çizelge 3.2.4.2. Bütün SELEX'ler için yapılacak olan döngü optimizasyonu PZR koşulları	40
Çizelge 3.2.4.3. Bütün SELEX'ler için yapılacak olan 2 mL'lik PZR koşulları	40
Çizelge 3.2.4.4. SELEX turlarına ait bilgiler.....	43
Çizelge 3.2.5.1. Index 1 primer dizisi	46
Çizelge 4.3.1. SELEX turlarında seçilen optimum PZR döngü sayıları	63
Çizelge 4.4.1. İndeks PZR ürünlerinin Qubit sonuçları ve konsantrasyonları	67
Çizelge 4.4.2. Dizileme sonrası elde edilen okuma sayıları.....	68

1. GİRİŞ

Aptamerler *in vitro* geliştirilen, belirli hedeflere özgü olarak seçilen ve hedeflerine yüksek afinite ile bağlanan deoksiribonükleik asit (DNA) veya ribonükleik asit (RNA) zincirleridir. Aptamer kelimesi Latince 'uymak' anlamına gelen aptus kelimesinden türetilmiştir. 1990 yılında üç farklı çalışma ekibi tarafından yakın zamanlarda yayımlanan araştırma sonuçları ile günümüzde aptamer teknolojisi olarak adlandırılan çalışmaların temeli oluşturulmuştur (Ellington ve Szostak, 1990; Robertson ve Joyce, 1990; Tuerk ve Gold, 1990). Aptamerler küçük moleküller, peptitler, proteinler, organik moleküller, virüs, bakteri, ökaryotik hücreler gibi çok çeşitli hedef moleküllere bağlanabilmeleri sayesinde birçok sistemde tanıyıcı olarak kullanılabilir. Günümüzde aptamerler yüksek seçicilik, *in vitro* üretilme, ucuz olma gibi taşıdıkları birçok avantajdan dolayı antikörlere alternatif oluşturmaktadır.

Aptamerler SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (Üssel Zenginleştirmeye Ligandların Sistemik Evrimi)) isimli bir *in vitro* çoğaltma seçme tekniği ile geliştirilmektedir. Teknik 10^{15} molekül içeren bir sentetik oligonükleotid havuzundan hedefe bağlanabilen dizilerin zenginleştirilerek seçilmesinden oluşur. Oligonükleotid havuz 30-80 arası rastgele nükleotidler içeren ve iki ucunda sabit primer bağlanma bölgeleri bulunan diziler bütünüdür.

SELEX işlemi sırasında oligonükleotid havuzu hedef ile inkübe edilir ve bağlanmayan diziler yıkanarak uzaklaştırılır. Bağlanan diziler hedeften ayrılır ve uçlarındaki primer bağlanma bölgeleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılırlar. Zenginleştirilen bu ikincil havuz tek zincirli DNA'ya çevrilerek SELEX'in ikinci turunda kullanılmak için hazır hale getirilir. Bu ayırıştırma ve zenginleştirme işlemi hedefin kompleksliğine bağlı olarak 8 ila 20 tur arasında tekrarlanmaktadır. Hedefe karşı pozitif bir seçim uygulanırken amaca göre bağlanması istenmeyen hedeflere karşı negatif bir seçim de uygulanabilmektedir. Böylece oligonükleotid havuz hedefe karşı zenginleştirilirken istenmeyen moleküllere bağlanması engellenebilir.

SELEX turları ile zenginleştirilen havuzlar hedefe belli bir afinite ile bağlandığında seçim sona erdirilir ve son oligonükleotid havuz dizilenir. Dizileme sonucu elde edilen

sonuçlarda en çok rastlanan diziler aday aptamer olarak seçilir ve hedefle oluşturdıkları kompleksin çözülüm katsayıları (K_d) hesaplanır. Düşük çözülüm katsayısına sahip diziler aptamer olarak seçilir ve ilerleyen çalışmalarda kullanmak için hazırdır (Bayraç ve ark., 2011).

Pnömonokok hastalıklar öncelikli olarak bakteri daha sonra virüs ve mantar kaynaklıdır. Dolayısıyla pnömonokok hastalıkların çeşitli enfeksiyon kaynakları bulunmaktadır. Toplum kökenli pnömoninin en yaygın enfeksiyon ajanı ise vücudun farklı bölgelerinde ciddi enfeksiyonlar gösteren ve hastaların %48'inden izole edilen *Streptococcus pneumoniae* adlı bakteri türüdür (Sharma, 2007). Özellikle bebekler ve küçük çocuklarda ölümcül olabilen ya da kalıcı hasarlara yol açan hastalıklara neden olan pnömonokoklar; menenjit, sinüzit, zatürre, orta kulak iltihabı gibi hastalıklara neden olabilir. Antibiyotiklerin kullanıma girmesiyle *S. pneumoniae*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde belirgin iyileşmeler sağlanmıştır. *S. pneumoniae* suşlarının penisiline duyarlı olması ve yan etkilerinin az olması sebebiyle penisilin yıllarca bu bakteriye karşı kullanılmıştır ancak 1960'lı yılların sonlarından itibaren penisiline dirençli suşlar ortaya çıkmaya başlamıştır (Neu, 1992).

Tezim bu önemli bakteriye yüksek afinite ve özgünlükte bağlanabilen DNA aptamerlerin seçilmesini ve karakterize edilmesini hedeflemektedir.

2. LİTERATÜR

2.1. *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae, bakterilerin *Diplococci* sınıfının, *Lactobacillales* takımının, *Streptococcaceae* ailesinde bulunan, *Streptococcus* cinsine ait bir türdür. 16S rRNA genleri temel alınarak yapılan çalışmaya göre viridans grubu streptokoklardandır. Bu bakteriler 0,5- 1µm büyüklüğünde, mum alevi veya lanset biçiminde, iki uçları sivri, tek kok veya dipkok şeklindedir. Sıvı besi yerinde uzun zincirler halinde; balgam, irin gibi sıvılarda kısa zincirler şeklinde görülebilir. Organizmadan yeni ayrıldıklarında tipe özel dar ya da kalın kapsülleri vardır. Bakteriyolojik boyalarla kolay boyanan, hareketsiz ve sporsuz olan bu bakteriler gram pozitiflerdir.

2.1.1. *S. pneumoniae*'nın Kültür Şartları

S. pneumoniae, fakültatif anaerobdur. Son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanabilirlerken, organik bileşiklerden de fermentatif yolla enerji elde edebilirler. Solunumdan fermantasyona geçmeyi belirleyen faktörler oksijen yoğunluğu ve ortamda fermente edilebilecek malzemelerin olmasıdır. Büyüyen bir kültürde ortamda yeterince şeker bulunduğu sürece solunuma geçiş olmaz. Bulyon, jeloz gibi basit besiyerlerinde zor ürerler, serum gibi maddelerle zenginleştirilmiş kompleks ortamlara ihtiyaç duyarlar. Kan ilave edilmiş besi yerlerinde ve genellikle % 5'lik CO₂'li ortamda daha iyi ürerler. Kanlı agarda *S. pneumoniae* 24 saat içinde etrafı yeşil bir hemoliz zonu ile çevrilmiş küçük koloniler şeklinde ürer. Hemoglobinin parçalanması sonucu koloniler yeşil renklidir, burada hemoglobini methemoglobine indirgerler. Bu hemolizden sorumlu olan madde alfa hemolizindir ve bütün pnömokoklar tarafından salgılanır (Martin ve ark., 1995). *S. pneumoniae* anaerob şekilde katı besiyerleri yüzeyinde 37°C'de 24-32 saatlik inkübasyonun ardından yuvarlak, küçük, parlak, hafif konveks, 0,5-1,5 mm çapında koloniler meydana getirir. Büyümeleri için gerekli optimal pH 7,4-7,8'dir (Akan , 1993).

2.1.2.Pnömonokokları Diğer Streptokoklardan Ayıran Özellikler

Pnömonokokların kanlı agarda hemoliz zonu oluşturma özelliği onu diğer streptokoklardan ayıran özelliklerden bir tanesidir ve bu özellik bütün pnömonokoklar için ortaktır.

Pnömonokoklar oksijenli ortamda ürediklerinde peroksidaz ve katalaz enzimleri olmadığı için hidrojen peroksidi parçalayamazlar, buna bağlı olarak hidrojen peroksit birikimi olur ve çabuk ölürler. Pnömonokoklar ayrıca karbonhidrat fermentasyonu yapıp çok miktarda laktik asit oluşturabilirler.

Pnömonokoklar inülin şekerini, asit oluşturup parçalamaktadırlar ancak daha sonra *Streptococcus salivarius* ve *Streptococcus sanguinis*'in de inülini fermente ettiği ve bazı pnömonokok türlerinin de inüline etki göstermediği belirlendiği için bu yöntem günümüzde geçerliliğini kaybetmiştir (Abigail ve ark., 1994).

S. pneumoniae tanısında kullanılan önemli bir özellik de optokin (Etil hidrokuprein hidroklorid) duyarlılığıdır. Pnömonokoklar optokine duyarlıdır ve optokinin çok düşük konsantrasyonlarında bile üreyemezler. Bu özellik özgün olup pnömonokokların viridans streptokoklardan ayırıcı tanısında kullanılır (Balows ve ark., 1991). Daha kesin bir ayırım için safrada erime testi yapılabilir. Safra tuzları, pnömonokoklarda bulunan otolitik enzim sentezini etkinleştirir ve böylece pnömonokoklar safra tuzları ile etkileşime girdiğinde otolize uğrarlar. Genellikle safra tuzlarının % 1'lik konsantrasyonları en uygun kimyasal yapıyı teşkil etmeleri nedeniyle tercih edilmektedir. Pnömonokokların bu özellikleri optokin duyarlılığından daha özgündür (Berkiten , 2006).

Pnömonokoklar kapsül şişme testi ile de ayrılabilir, kapsül şişme reaksiyonu pnömonokoklar için oldukça özgündür. Antikorlar kendilerine özgü antiserumlarla karşılaştırıldığında kapsülün üzerinde bulunan bu antiserumlara bağlanırlar. Antikorların bağlanması optik kırıcılığını değiştirir ve kapsülün normalden daha şişkin görünmesiyle sonuçlanır. (Werno ve Murdoch, 2008).

Pnömonokoklarda kapsül üzerinde bulunan yapılara antiserumlar eklenerek serotiplendirme yapılmaktadır, *S. pneumoniae* bu kapsamda incelendiğinde doksanın

üzerinde serotipi tespit edilmiştir. Serotip dağılımı coğrafyaya, yaşa, enfeksiyonun olduğu bölgeye göre farklılık gösterir (Sniadack ve ark., 1995). Aşağıdaki tabloda *S. pneumoniae*'nin farklı serotiplerinin 6 yaşından küçük çocuklarda ve 6 yaşından büyüklerde hastalık oluşturma yüzdeleri verilmiştir, bu serotipler ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi tarafından aynı dönemde kan ve omurilik sıvılarından alınan örneklerde bakılmıştır (Kalin, 1998).

Çizelgede 2.1.2.1'de de görüldüğü üzere 14, 6B, 19F ve 18C küçük çocuklarda çok daha yaygın serotiplerdir. Yetişkinlerdeki serotip dağılımı ise daha eşit dağılmaktadır. Bizim aptamer seçtiğimiz 19F suşu tabloda görüldüğü üzere 6 yaşından küçük çocuklarda %11, toplamda ise %14 bulunma oranına sahiptir.

Çizelge 2.1.2.1. *S. pneumoniae*'nin farklı serotiplerinin 6 yaşından küçük çocuklarda ve 6 yaşından büyüklerde hastalık oluşturma yüzdeleri (Kalin, 1998)

Serotipler	1	3	4	6A	6B	7F	8	9N	9V	12F	14	18C	19A	19F	23F
< 6 yaş	1	2	7	3	14	1	1	1	6	1	28	8	4	11	7
≥ 6 yaş	4	5	13	3	6	3	4	3	7	6	11	3	3	3	7

Aşıların hazırlanmasında bölgesel serotiplerin bilinmesi önemlidir çünkü aşıların içeriği o bölgedeki izolasyon sıklığına ve bakterinin kapsülünde bulunan polisakkarit yoğunluğuna göre belirlenmektedir (Briles ve ark., 2000). Böylece aşılar içerdiği serotip çeşidine göre ayrılmaktadırlar, bunlardan en sık kullanılanlar 23 değerlikli ve 7 değerlikli aşılardır. Sadece polisakkarit bulunduran aşılar iki yaşın altındaki çocuklarda bağışıklık sağlayamaz. Bu yüzden polisakkaritlerin proteinlerle konjuge edildiği konjuge aşılar da üretilmiştir (Berkiten, 2006). 7 değerlikli konjuge pnömokok aşısının Türkiye'de yaygınlaşmasından sonra yapılan bir çalışmada 2 yaşın altındaki çocuklardaki etkisine bakılmış ve sonuç olarak kullanılan aşının çocuklarda en yaygın serotiplerden olan 19F ve 6B'deki kapsama oranının %69,5 olduğu tespit edilmiştir (Ceyhan ve ark., 2011).

Tez çalışmasında *S. pneumoniae* (Klein) Chester (ATCC® 49619™) 19F suşu kullanmıştır. Bu suşun seçilme sebebi VITEK, BD Phoenix™, Sensititre gibi otomatik mikrobiyoloji tanımlama sistemlerinde *S. pneumoniae* için kalite kontrol ve disk testlerinde kontrol suşu olarak kullanılmasıdır. Aptamerin doğrudan bu suş üzerine

geliştirilmesi uluslararası kalite kontrol sistemlerine entegre olmasını kolaylaştıracak ve diğer araştırmacılar için erişimini kolaylaştıracaktır.

2.1.3.Pnömonokok Yapısı

Pnömonokok N- asetilglukozamin ve N- asetilmuraminik asitten oluşan bir peptidoglikan tabaka, kolin, fosfat bakımından zengin ve teikoik asitten oluşan bir hücre duvarına sahiptir. Pnömonokotta bu yapıların yanı sıra peptidoglikan tabaka ve hücre duvarının dışında bulunan ve bu yapıları kaplayan bir kapsül de bulunmaktadır. Peptidoglikan tabaka, hücre duvarının geniş bir bölümünü oluşturur ve antijenik yapıdan sorumludur ayrıca bakteriyi osmotik etkilere karşı korur. Bu işlevin yerine getirilmesi yan bağlarla örülü şeker zincirleri aracılığı ile sağlanmaktadır (Musher, 1995).

Pnömonokollarda antibiyotik dirençliliğin gelişiminde protein bağlayıcı proteinlerin (PBP) önemli rolü vardır. Bu proteinlerin penisiline azalmış ilgileri dirençlilik gelişimine neden olmaktadır. Hücre duvar sentezini sağlayan PBP'ler, beta-laktam antibiyotikler tarafından inaktive edilerek pnömonokolların üremesini inhibe ederler (Livermore ve Williams, 1996). PBP'lerde oluşan yapısal değişiklikler antibiyotiklere karşı oluşan direnç gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Bu değişiklikler PBP genlerinde spontan kromozomal mutasyon gelişmesi ya da dirençli farklı bir bakteriden gelen DNA segmentlerinin pnömonokollarda PBP genlerini kodlayan DNA segmentlerinin arasına yerleşmesi ile mozaik gen meydana gelmesi olmak üzere iki şekilde olabilmektedir (Musher, 1995).

S. pneumoniae'nin antijenik yapısında kapsül önemli bir yer tutar. Kapsül antijeni haptan özelliğinde bir polisakkarit bileşigidir bu yüzden kapsülün tiplendirmedeki rolü büyüktür. *S. pneumoniae*'nin bilinen 85'ten fazla tipi gösterilmiştir. Serumlarında, enfeksiyonu yapan pnömonokokun kapsül polisakkaridine (Poly-ribozil-fosfat, PRP) karşı antikor bulunan kimseler, o tip pnömonokokun enfeksiyonuna karşı dayanıklılık gösterirler.

Kapsülün dışında diğer virölans faktörleri arasında pnömolizin (ply), pnömonokal yüzey protein A (PspA) ve pnömonokal yüzey adezini A (PsaA) gibi proteinler yer almaktadır.

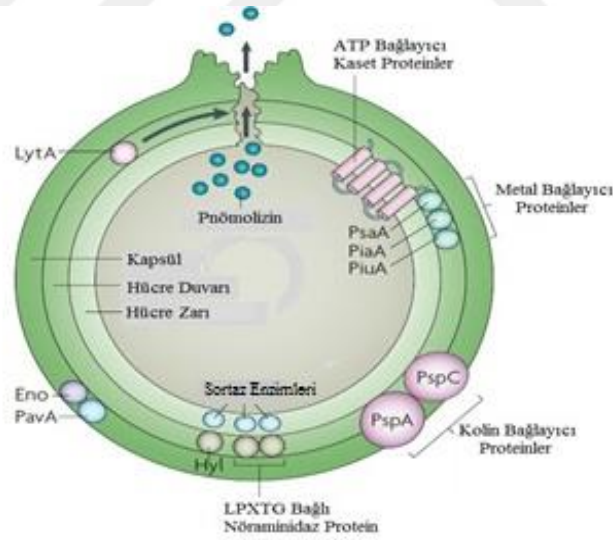
Bu proteinler hücre duvarında bulunmalarına rağmen kapsülü penetre edebilir ve bağışıklık sistemi tarafından algılanabilirler (Rajam ve ark., 2008).

Pnömonokokların oluşturduğu nöraminidaz enzimi hücre zarı ve vücut sıvılarında bulunan glikoprotein ve glikolipide etki ederek asetilnöraminik asidi ayırır. Bu enzim pnömonokokların vücutta yayılımını artırır (Abigail ve ark., 1994).

2.1.4. Pnömonokokun Virulans Faktörleri

Pnömonokokların canlı dokularda tutunmaya ve enfeksiyona sebep olan çeşitli proteinleri vardır ve çeşitli toksinler üretmektedirler (Şekil 2.1.4.1).

Pnömolizin O (Ply); bu pnömonokoklarda potansiyel virulans faktörlerden bir tanesidir, otolizin etkisi ile salınan bir enzimdir. Pnömolizin, bütün pnömonokoklar tarafından üretilir ve 52 kDa ağırlığındadır. Konak hücre zarında kolesterole tutunup porlar oluşturur. Yaklaşık 260 Å olan bu porlar hücrelerin parçalanmasına yol açar. Pnömolizinin sitotoksik etkileri doğrudan fagositozu veya immün hücre fonksiyonunu inhibe edebilmekte, bu da konakçı immün yanıtını baskılar (Jedrzejewski, 2001).



Şekil 2.1.4.1. Pnömonokok yapısı (Kadioglu ve ark., 2008)

Kolin bağlayıcı proteinler; Pnömonokokların hücre duvarında kolin ile non-kovalent bağlarla bağlanmış çeşitli proteinler bulunmaktadır. Bu kolin bağlayıcı proteinler (KBP) topluluğu (PspA), kolin bağlayıcı protein A (CbpA), otolizin (LytA) gibi önemli molekülleri içermektedir (Tuomanen, 1999). CbpA proteini PspC diye de adlandırılır,

663 aminoasitten oluşur ve 75 kDa ağırlığındadır. CbpA insan antikorları ile sıklıkla etkileşen yüzeyde bulunan bir proteindir ve üç bölgesi, bükülü halka bir yapı göstermektedir. CbpA'da teikoik ve lipoteikoik asit kalıntılarına bağlanmadan sorumlu N-terminal tekrar bölgesi, bir pralin bağlanma bölgesi ve bir N-terminal fonksiyonel bölge bulunmaktadır. CbpA pnömokok virülansında temel rol oynamaktadır, zira pnömokokal hastalığın yerleşiminden yayılıma kadar olan gelişiminde etkili olduğuna inanılmaktadır. CbpA, teikoik asidin kolini ile konakçı hücre glikoproteinleri arasında köprü olarak görev yapmaktadır (Rosenow ve ark., 1997).

PspA (pnömokokal yüzey protein A), *S. pneumoniae*'nin hücre duvarı üzerinde yerleşmiş bir yüzey proteindir ve bugüne kadar keşfedilmiş her *S. pneumoniae* suşunda bulunmaktadır (Watson ve ark., 1995). PspA kapsül stabilizasyonunu sağlamaktadır. Büyük ölçüde sarmal, bükülü halka N-terminal ucu hücre duvarından çıkmakta ve kapsülün dışına taşmaktadır. Diğer yandan C-terminalinin PspA'yı pnömokokal hücre yüzeyine bağladığı görülmektedir. Bu bölge prolin açısından zengin bir bölgedir ve esneklik sağlayarak N-terminal fonksiyonel modülünün hareketliliğine izin vermektedir. PspA'nın pnömokoklar üzerinde komplement çökmesi ile etkileşim içinde olduğu ve böylece bakterinin konakçı bağışıklık sistemi tarafından temizlenmesini azalttığı gösterilmiştir. Aşı ile indüklenmiş insan PspA antikorları, konakçı hücrelerinde, PspA ile etkileşmektedir ve bu nedenle PspA antikorları *S. pneumoniae*'nin konakçı immün fonksiyonları ile etkileşmesini nötralize eden immüniteyi ortaya çıkarmaktadır (Tomasz, 1981).

OtolizinA (LytA) bakteriyel organizmaların geniş dağılımı olan bir enzim grubunun üyesidir. Otolizinler hücre zarı üzerinde bulunmakta, hücre büyümesi ve hücre bölünmesinde görev almaktadırlar. LytA amidaz, polipeptidin N- ve C- terminal uçları ile ilişkili iki farklı bölgelerden oluşan 36 kDa büyüklüğünde bir otolizindir. C-terminal ucu teikoik ve lipoteikoik asitin pnömokok yüzeyine bağlanmasından sorumludur. LytA'nın pnömokokal virulans üzerindeki kesin rolü hala tartışılmakta iken, hücre duvarı komponentleri ve pnömolizin gibi bakteriyel virülans faktörleri dahil olmak üzere sitoplazmik bakteriyel proteinlerin salımının *S. pneumoniae* patojenitesine katkıda bulunduğu öne sürülmektedir.

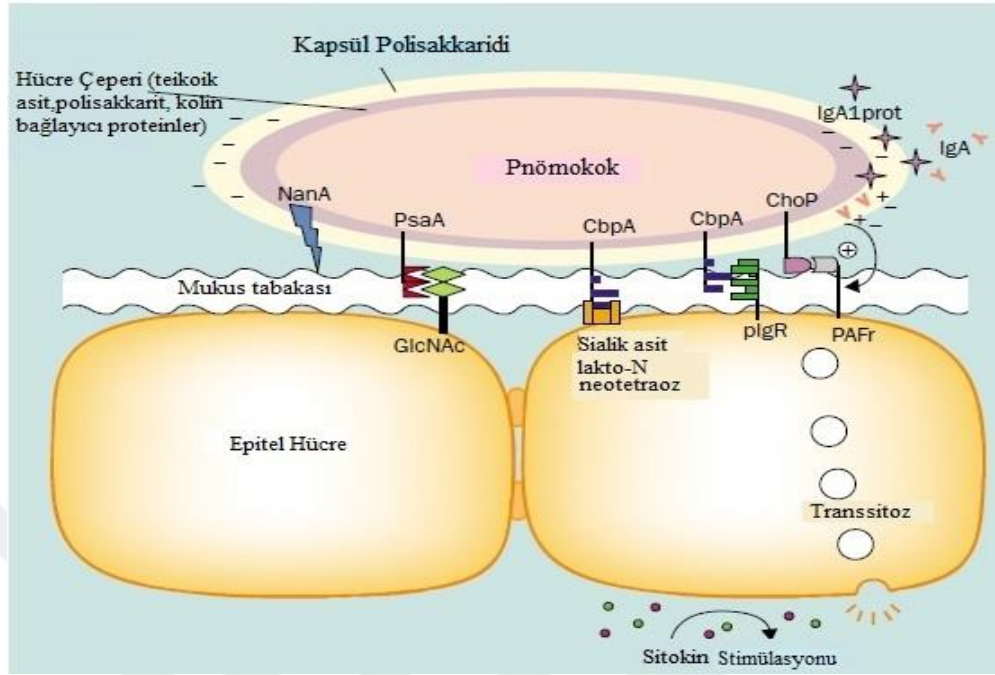
S. pneumoniae'nın hücre duvarında bulunan bir diğer yapı hyaluronat liyaz (Hly)'dır. Hly, hyaluronan içeren hücre dışı matris bileşenleri yıkarak üst solunum yolu kolonizasyonlarına katkı sağlamaktadır (Kadioğlu ve ark., 2008).

Nöraminidaz (Nan) konakçı glikolipidleri ve gangliositlerinden siyalik asidi ayırmak için epitelyal hücrelere bağlanmayı kolaylaştırır. NanA ve NanB olmak üzere iki çeşit nöraminidaz enzimi vardır. Genel olarak adezyon ve yayılmada görevlidirler. Etkisi için konakçı hücrelerin glikozilasyon birimleri ile etkileşim gösterilmelidirler. Bu etkileşim konakçı hücre reseptörlerini pnömokoklar ile etkileşimi için ortaya çıkarmakta ve genel pnömokok bağlanmasını arttırmaktadır (Krivan ve ark., 1988).

Pnömokokal yüzey adesin A (PsaA); *S. pneumoniae*'nin virülansına katkıda bulunan bir diğer unsur olan PsaA, Mn^{+2} taşıyıcısıdır. PsaA'nın moleküler ağırlığı 37 kDa'dur ve 309 birimden oluşmaktadır. Pnömokokların PsaA negatif mutantları virülan özelliklerini kaybetmektedir. PsaA proteini *S. pneumoniae*'ya bakteriyel hücre zarı ile bağlanır ve hücre duvarından taşmaz (Tomasz, 1981). Ayrıca en son gözlemler edinilmiş PsaA antikorlarına sahip farelerin *S. pneumoniae* tehdidine karşı yeterince korunmadığını göstermektedir. Bu nedenle PsaA'nın *S. pneumoniae* virulansı üzerindeki rolü ve PsaA yönlendirilmiş antikorun potansiyel koruyucu etkisi halen araştırılmaktadır (Gor ve ark., 2005).

S. pneumoniae'nin adezyonunda görev alan PavA ve enolaz (Eno) olmak üzere iki tane daha yüzey adezini vardır. PavA ve Eno adezinleri ekstraselüler matriks komponentlerinden sırasıyla fibronektin ve plasminojene bağlanarak adezyona yardımcı olurlar (Holmes ve ark., 2001).

2.1.5. Kolonizasyon Mekanizması



Şekil 2.1.5.1. *S. pneumoniae* ve epitel hücreler arasındaki etkileşim (Bogaert ve ark., 2004)

Pnömonokoklar için hastalık oluşturmadaki ilk adım kolonizasyondur. Pnömonokoklara spesifik PspA ve kolin bağlayıcı proteinler gibi yüzey proteinleri ve epitel hücre reseptörlerin düzgün etkileşimleri sonucu epitel hücrelere bağlanırlar. *S. pneumoniae*'nın yüzeyindeki bu protein yapıları adezinler ile epitel hücre reseptörleri arasında spesifik bir bağlanma söz konusudur (Şekil 2.1.5.1) (Martin ve ark., 1995).

Pnömonokoklardaki yüzey proteinlerin ve reseptörlerin etki mekanizmaları çok iyi anlaşılamamıştır ancak konakçı doku proteinleri ile bakteri yüzeyindeki konakçı savunma mekanizması ile etkileşime girmesi enfeksiyon sürecinde rol oynayan başlıca iki mekanizmadır. Geleneksel olarak *S. pneumoniae*'nın polisakkarit kapsülünün kolonizasyonundaki başlıca virülans faktörü olduğu düşünülmektedir.

Nöraminidaz enzimi, mukoz membran yüzeyinde bulunan sialik asidi parçalar ve böylece mukusun viskozitesini azaltır. Böylece bakterinin tutunduğu N-asetilglukozaminoglikan (GlcNAc) gibi molekülleri açığa çıkararak bakterinin tutunmasına sebep olur (bkz. Şekil 2.1.5.1). Böylece PspA proteini, GlcNAc molekülüne tutunarak kolonizasyona katkı sağlar (Martin ve ark., 1995).

Kolonizasyona yardım eden bir diğer etmen ChoP (Fosforilkolin)'dir. ChoP birçok patojen mikroorganizmada bulunur. ChoP'lar bakterinin solunum yollarında yapacağı kolonizasyona, insan solunum yolu epitel hücrelerindeki rPAF (trombosit aktive edici reseptör)'lara bağlanarak yardım eder (Cundell ve ark., 1995).

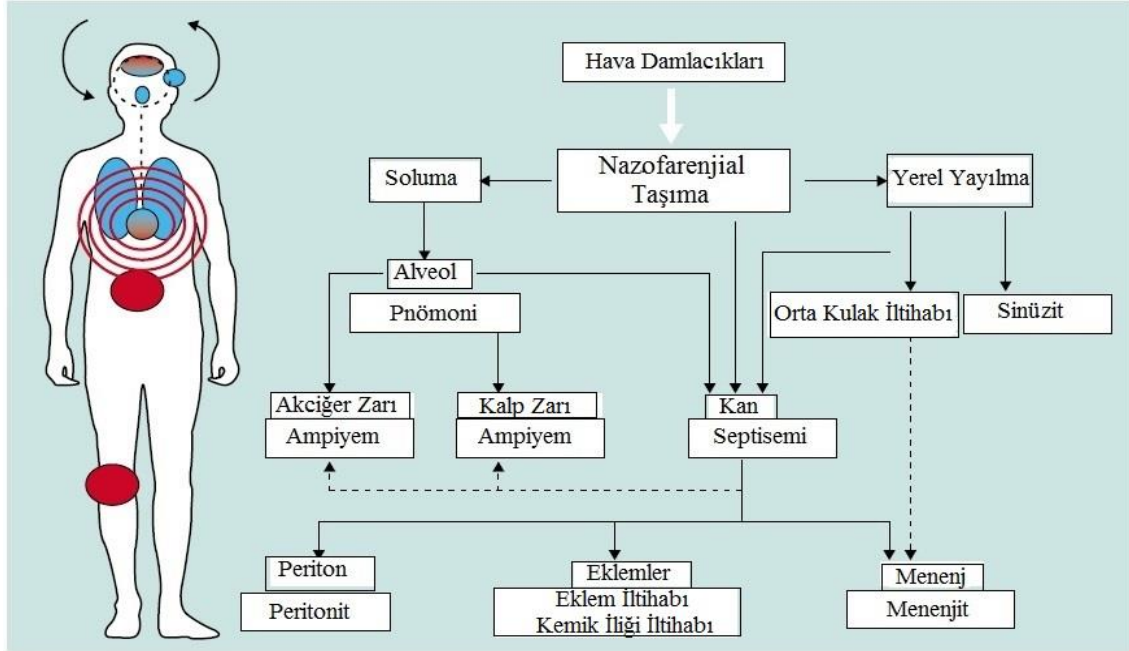
S. pneumoniae'nin kapsülünde bulunan protein ve enzimlerin ekspresyonundaki azalış, antikorların bakteri yüzeyine daha fazla tutunması ile sonuçlanır. Sonuç olarak bağışıklık sisteminden temizlenme kolaylaşmış olur. İnvazyon mekanizmasında en öne çıkan etkenlerden biri pnömokokal hücre duvarı kolinini ve konakçı epitelyal ve endotelial hücrelerinin stimülasyonundan sorumlu trombosit aktive edici faktör reseptörüne bağlanmasıdır. Bu reseptöre bağlanma pnömokoklarda solunum epitelleri ile damar endotelinden göçü teşvik etmektedir, bu da bakteri yayılımı ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca CbpA'nın özgün sitokin elementlerine ilgisi artmıştır. Konakçı hücreleri böylece aktive olur, bu da mukoz bariyerden yayılımı arttırmaktadır (McCullers ve Rehg, 2002).

2.1.6. *S. pneumoniae*'nin Sebep Olduğu Hastalıklar

Pnömokok enfeksiyonlarının tedavisi penisilinin kullanılması uzun yıllar boyunca sorun oluşturmamış ama 1967 yılında Avustralya'da ilk kez penisiline dirençli pnömokokların belirlenmesiyle penisiline dirençli pnömokok enfeksiyonları tüm dünyada sorun olmaya başlamıştır. Bundan sonraki on yıl boyunca penisilin dışındaki antibiyotiklere karşı önemli bir direnç sorunu görülmemiştir ancak 1977 yılında Güney Afrika'da penisilin dışında eritromisin ve kloramfenikol'e de direnç gösteren ilk *S. pneumoniae* suşları bildirilmiştir. 1980'li yıllardan başlayarak antibiyotiklere dirençli *S. pneumoniae* suşları giderek yaygınlaşmış ve dünya genelinde önemli bir sorun haline gelmiştir (Hansman ve Bullen, 1967).

S. pneumoniae genizde kolonize olan normal flora bakterilerinden birisidir. Hastalar ve taşıyıcı olanlar öksürük yoluyla çevreye saçılan damlacıklar ile bakteriyi yayarlar. Pnömokokların genizde yerleşimi ve taşıyıcılık, enfeksiyon gelişimi ile sıkı bir ilişki göstermektedir. Genizde yerleşen pnömokoklar, direk yayılım göstererek orta kulak, sinüsler, trakea, bronşlar ve akciğerlerde enfeksiyona zemin hazırlayabilir. Bakterinin kana karışmasıyla sepsis ve menenjit gibi enfeksiyonlar meydana gelirken eklem, kemik

ve yumuşak dokular gibi uzak bölgelerde de enfeksiyonlara yol açabilir (Şekil 2.1.6.1) (Abramson ve Overturf, 2004).



Şekil 2.1.6.1. *S. pneumoniae* enfeksiyonu için patojenik yollar (Bogaert ve ark., 2004)

Pnömonokok hastalıklar, *S. pneumoniae* adlı bakteri türünün, vücudun farklı bölgelerinde ciddi enfeksiyonlar göstermesiyle oluşur ve dünyada yılda, 1,2 milyon çocuğun ölümüne neden olmaktadır. En yüksek ölüm oranına %21 ile pnömokokal menenjit sahiptir (Appelbaum, 1992). Geçirilen bir enfeksiyon sonrasında bakteri uygun ortam bulduğunda kana geçer, beyin ya da omurilik zarına ulaşan bu bakteri menenjite neden olur. Menenjitin en yaygın semptomları arasında baş ağrısı, ense sertliği, ateş, kusma, bilinç kaybı, ışığa ve sese tahammül edememe gelmektedir. Tanı için omurilik kanalına sokulan bir iğne yardımıyla beyin-omurilik sıvısından örnek alınır ve alınan örnek laboratuvar ortamında kültüre edilir. Mikrobiyolojik tanıda tespit edilemezlerse antijen taraması ve lateks testi yapılarak tanı konur (Scott ve ark., 1999).

Geçmiş yıllara göre pnömokokal pnömoni görülme sıklığındaki büyük düşüşe rağmen, özellikle gelişmiş ülkelerde, *S. pneumoniae* akciğerlerin bakteriyel enfeksiyonlarının hala en yaygın sebebidir. Üst hava yolları ile hava keselerinde iltihaplar oluşturur ayrıca öksürük, nefes darlığı, ateş, göğüs ağrısı gösterilebilir.

Orta kulak iltihabı, kulak zarı arkasında iltihap toplanması sonucu meydana gelir, tıptaki adı otitis media'dır. Sıklıkla nezle, grip gibi bir üst solunum yolu enfeksiyonu ile beraber meydana gelir, dolayısıyla bu durumların en fazla olduğu kış aylarında veya ilkbahar mevsiminin ilk aylarında görülür. Belirtileri genellikle bir veya her iki kulakta ağrı ve beraberinde ateştir. Östaki tüplerinin asıl görevleri orta kulağı geniz sekresyonlarına karşı korumak olmasına rağmen, orta kulak boşluğunu genize bağlar ve bakteriyel yayılımın doğal yolunu oluşturur. Otitis media görülme sıklığındaki artışa katkıda bulunan risk faktörleri *S. pneumoniae* enfeksiyonu yanında nikotine maruz kalmak ve kalabalık bölgelerde yaşamak da gelmektedir (Green ve Rothrock, 1993).

Sinüzit; yüz sinüsleri yüzeyindeki mukoza zarının iltihaplanması sonucu ortaya çıkan hastalıktır. Bu iltihaplanma genellikle *S. pneumoniae* enfeksiyonu ile meydana gelmektedir. Yüz ve baş ağrıları, gerginlik, yüzde ödem, öksürük ve burun akıntısı en yaygın belirtileridir (Newman ve ark., 1994).

2.1.7. Dünyada ve Türkiye’de Durum

Pnömonokoklar çocuklarda, yaşlılarda, immün yetmezliği olanlarda yaptığı enfeksiyonlarla dünyada ve ülkemizde başta gelen hastalık ve ölüm nedenleri arasında bulunmaktadır (Musher, 1995).

1997 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde yılda yaklaşık 4 milyon kişide pnömoni olduğu ve bunların 600.000 kadarının hastanede tedavi edilmesinin gerektiği bildirilmiştir (Fine ve ark., 1997). Pnömoni kaynaklı ölümler, ABD’de ölüm nedenleri arasında 6. sırayı alırken enfeksiyonlara bağlı ölümler arasında ise 1. sırayı almaktadır (Pinner ve ark., 1996).

Türkiye’de, Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1992 yılında bakteriyel pnömoni tanısı ile seksen yedi bin kişi hastaneye başvurmuş ve bu hastaların yaklaşık dörtte biri hayatını kaybetmiştir (Savaş ve Kaya, 2000). Yine Sağlık Bakanlığının 2002 yılındaki verilerine göre pnömoni tanısıyla yaklaşık yüz on dokuz bin kişi hastaneye kaldırılmış ve bu hastaların %2,2’si hayatını kaybetmiştir (Bülbül, 2014).

Toplumda gelişen pnömoniler ölüm oranlarının yanında tedavi süresi ve maliyeti açısından da önemlidir. Yapılan bir çalışmada ortalama yatış süresi $11 \pm 6,6$ gün olarak tespit edilirken bu süre boyunca yatan hastanın ilaç maliyeti, radyoloji maliyeti ve laboratuvar maliyetinin toplamı 1660,77 Euro olarak bildirilmiştir (Bülbül, 2014).

2.2.Aptamer

Aptamerler farklı hedeflere yüksek etkinlik ve özgünlükte bağlanabilen tek zincirli oligonükleotidlerdir ve 1990 yılında üç farklı grup tarafından birbirinden bağımsız olarak bulunmuştur (Ellington ve Szostak, 1990; Robertson ve Joyce, 1990; Tuerk ve Gold, 1990). Aptamer kavramı latince “uymak” anlamına gelen “aptus” kelimesinden türetilmiştir (Jayasena, 1999).

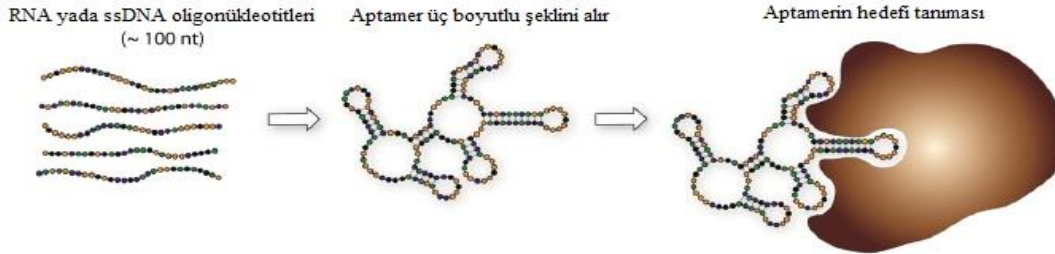
Nükleik asitlerin üç boyutlu yapılarına bağlı bir şekilde özgül ligandlara karşı gösterdikleri yüksek afinitenin anlaşılması, günümüzde aptamer tabanlı moleküler tanıma mekanizmalarının ve yeni tekniklerin geliştirilmesi üzerine yeni bir araştırma ve geliştirme alanını oluşturmuştur. Büyük oligonükleotit kütüphanelerinden seçilen aptamerlerin, hedef moleküllere karşı gösterdikleri pikomolar seviyelerine erişebilen K_d değerleri ile ifade edilen yüksek afinite bu teknolojinin protein tabanlı monoklonal antikorların yerini alabileceğini ortaya koymaktadır (Jenison ve ark., 1994).

Aptamerler hedeflerine farklı dizilerin oluşturduğu üç boyutlu yapı sayesinde bağlanırlar. Aptamer ve hedef molekül arasındaki etkileşim geniş bir yüzey alanında gerçekleşmektedir. Yüzey alanının geniş olması sebebi ile hedef moleküldeki en küçük değişiklikler bile aptamerin bağlanmasını engelleyebilmektedir, örneğin ATP aptameri sadece bir fosfat grubu eksik olmasına rağmen ADP’ye bağlanmayarak ATP’yi etkin bir şekilde ayırt edebilmektedir (Sassanfar ve Szostak, 1993). Aptamerler bu özellikleri sayesinde, belirli bir protein ailesindeki benzer proteinleri ya da aynı proteinin farklı biçimsel durumlarını dahi birbirlerinden ayrılabilirler.

Literatürde bulunan aptamerlerin birçoğu RNA veya tek zincir DNA molekülleridir, bunların yanında modifiye ve sentetik nükleik asitlerden yapılmış bazı aptamerler de mevcuttur. Literatürde etanolamin, asetilkolin gibi küçük organik molekülleri, büyük

protein komplekslerini, ve farklı bütün hücreleri hedef alan birçok aptamer bulunmaktadır (Bayraç ve ark., 2011). Aptamer-hedef kompleksleri pikomolar-submikromolar aralığında çözünüm katsayılarına (K_d) sahip olabilmektedir.

DNA aptamerlerinin hedefe bağlanmasının baz eşleşmesi ile bir ilgisi olmadığı ve hedefin bir gen olmadığını anlamak oldukça önemlidir. DNA bahis olduğunda bilim insanlarında oluşan bağlanma algısı Watson-Crick baz eşleşmesinde bulunan adenin-timin ve guanin-sitozin eşleşmesi olduğu için DNA aptamerlerinin bağlanmasını anlamakta problemler oluşabilmektedir. Kütüphanedeki 10^{15} dizinin her biri birbirinden farklı üç boyutlu şekillere sahiptir. Bu nedenle, içlerinden bir grubun hedef molekülle üç boyutlu şekil eşleşmesine, diğer bir deyişle indüklenmiş uyum ilişkisine girmeleri olası görülmektedir. Bu eşleşme grubu her döngüde çoğaltılarak ve tekrar yeni bir döngüye sokularak en iyi eşleşme elde edilmeye çalışılmaktadır. Yani aptamer hedef eşleşmesi Watson-Crick baz eşleşmesi değil, Şekil 2.2.1’de de gösterildiği gibi tamamen üç boyutlu yapı eşleşmesi anlamına gelmektedir.



Şekil 2.2.1. Aptamer-hedef etkileşimi (Stoltenburg ve ark., 2007)

Aptamer seçiliminde kullanılan DNA'yı dört alt birimli bir polimer olarak düşünerek, oluşturulan farklı dizilerle elde edilen farklı şekillerin bağlanmayı sağladığını ve hedefin küçük moleküller, proteinler, makromoleküller, hücreler vb. olabileceğini unutmamak gerekmektedir.

Aptamerlerin yüksek afinite ve seçicilik özellikleri göz önüne alındığında, bu moleküllerin yakın gelecekte terapötik, biyoanalitik uygulama ve moleküler tanı alanlarında sahip olduğu yüksek potansiyel görülmektedir (Deisingh, 2006).

Sensör ve biyosensör alanlarında aptamerler gıda tahlillerinde kullanılırken (Tombelli ve ark., 2007), kokain (Stojanovic ve ark., 2000), dopamin (Mannironi ve ark., 1997) gibi kimyasalların teşhisinde ve asetamiprid (He ve ark., 2011) gibi insektisitlerin teşhisinde de kullanılabilmektedir. Hastalığa neden olan moleküle karşı hedefleme amaçlı üretilen aptamer olan anti VEGF aptameri FDA tarafından 2004'te ilk onay alan aptamer temelli ilaç özelliği taşımaktadır ve bu ilaç ile VEGF büyüme faktörü inhibe edilmiştir (Keefe ve ark., 2010).

Aptamerler SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (Üssel Zenginleştirmeye Ligandların Sistemik Evrimi)) isimli bir *in vitro* çoğaltma tekniği ile geliştirilmektedir. Teknik 10^{15} molekül içeren bir sentetik oligonükleotid havuzundan hedefe bağlanabilen dizilerin zenginleştirilerek seçilmesinden oluşur.

2.2.1. Aptamer ve Antikorların Karşılaştırılması

Antikorlar *in vivo* şekilde belirli bir moleküle karşı oluşturulan protein yapılarıdır. Benzer görevler üstlenen antikorlar ile aptamerlerin birbirlerine göre bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

Monoklonal antikorlar protein yapıda oldukları için proteazlara karşı dayanıklı değildirler. Aptamerler nükleik asit zinciri oldukları için nükleazlara karşı hassastırlar. Antikorlar ise nükleaz yıkımına uğramazlar. Bununla beraber protein yapılar pH, sıcaklık, tuzluluk oranı gibi çevresel koşullara karşı dayanıklı olmadıkları için antikorlarda bu koşullara dayanıklı değildirler. Antikorların raf ömürleri kısadır, soğuk zincirde taşınmalı ve saklanmalıdır. Buna nazaran aptamerler protein yapılar olmadıkları için bu tip çevresel koşullara daha dayanıklıdır ve soğuk zincir ihtiyaçları yoktur ve raf ömürleri de daha uzundur (Mascini, 2008).

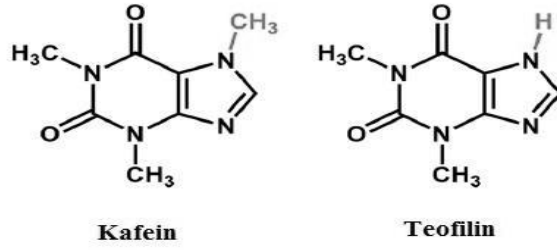
Aptamerlerin antikora göre bağışıklık yanıtına daha az neden oldukları bilinmektedir çünkü nükleik asitler insan immün sistemi tarafından yabancı ajanlar olarak algılanmazlar (Ireson ve Kelland, 2006). Vasküler Endotelial Büyüme Faktörüne (VEGF) özgü aptamerlerin maymunlara 1000 kat daha fazla yüksek dozda verildiğinde dahi çok düşük immün etki oluşturduğunu gözlemlenmiştir (Eyeteck Study Group, 2002).

Aptamerler üniform aktivite gösterirken antikorlar her üretim serisinde farklı aktivite gösterebilirler. Antikorlar daha pahalı ve zahmetli bir yöntem olan *in vivo* ortamda üretilmektedir, aptamerler ise daha ucuz ve basit bir yöntem olan *in vitro* ortamda üretilmektedir bu yüzden antikorların üretimi aptamerlere göre daha pahalıdır (Birch ve Racher, 2006).

Aptamerlerde hedef bölgeyi araştırmacı belirlerken antikorlarda hedef bölgeyi immün sistem belirler yani antikorların hedef skalası aptamerlere göre daha dardır. Aptamerler herhangi bir hedefe karşı seçilebilirken, toksik veya non-immünojenik moleküllere karşı antikorlar geliştirmek oldukça zordur (Jayasena, 1999).

Aptamerler ve antikorların boyut farklılıkları vardır. Antikorlar büyük moleküller oldukları için böbrek süzülümüne maruz kalmamaktadır ancak büyüklükleri hücre içine girmelerini engeller. Aptamerler ise böbrek süzülümüne maruz kalacak kadar küçük moleküllerdir ancak hücre içine girebilirler. Aptamerlerin antijenlere göre daha küçük olması hedef başına bağlanabilme sayılarını oldukça arttırmaktadır ve hücre içi, dokular arası taşınmasını kolaylaştırmaktadır. Antikorlarda üretim sonrası herhangi bir modifikasyon yapılması oldukça zordur ancak aptamerlerde modifikasyonlar sentez esnasında kolayca yapılabilir. Bu sayede aptamerlerde böbrek süzülümü gibi negatif etkiler yok edilebilmektedir. Aptamerler hedefe yönelik hiçbir ön bilgi olmadan üretilirlerken, antikorlar için ön bilgiye ihtiyaç vardır. Hedef moleküle karşı seçilmiş olan aptamerlerin dizileri kolayca belirlenebileceğinden, yüksek miktarda ve saflıkta sentezlenebilir (Jayasena, 1999).

Teofilin ve kafein moleküllerinin yapıları Şekil 2.2.1.1'de de gösterildiği gibi birbirlerinden sadece bir metil grubuyla ayrılmaktadır. Ancak teofilin için seçilen aptamer ve kafein için seçilen aptamer teofilin ile inkübe edildiğinde, teofilin için seçilen aptamer kafein için seçilen aptamerden 10.000 kat daha fazla teofiline bağlanabilmektedir (Jenison ve ark., 1994).



Şekil 2.2.1.1. Kafein ve teofilin molekülü (Jenison ve ark., 1994)

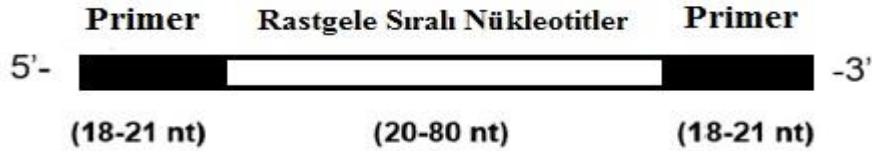
Çizelge 2.2.1.1’de de verildiği üzere yapılan bazı çalışmalarda aynı hedefe yönelik aptamer ve antikorların afinitelerine bakıldığında aptamerlerin önemi daha net anlaşılmaktadır.

Çizelge 2.2.1.1. Bazı biyolojik belirteçlerde aptamer ile antikorlar arasında bağlanma afinitesinin karşılaştırılması

Biyolojik Belirteçler	Eksprese Olduğu Tümörler	Antikor K_d(nM)	Aptamer K_d(nM)
Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü	Yumurtalık, göğüs, serviks vb.	0,49 (Witte ve ark., 1998)	0,14 (Green ve ark., 1995)
İntegrin $\alpha 3 \beta \gamma$	Pankreas, lösemi, prostat vb.	3,1 (Eble ve ark., 1998)	2 (Mi ve ark., 2005)
Musin 1	Yumurtalık, göğüs, akciğer, prostat vb.	1,7 (Lavrsen ve ark., 2013)	0,13 (Ferreira ve ark., 2006)
Trombosit kaynaklı büyüme faktörü	Gastrointestinal stromal tümör, lösemi vb.	0,9 (Fretto ve ark., 1993)	0,1 (Green ve ark., 1996)
Prostat-spesifik membran antijeni	Prostat, böbrek, idrar kesesi vb.	18 (Smith-Jones ve ark., 2000)	2,1 (Lupold ve ark., 2002)
Protein trozin kinaz 7	Lösemi, akciğer, gastrit kanseri vb.	50 (Bratu ve ark., 2003)	0,8 (Shangguan ve ark., 2006)

2.3. SELEX

SELEX prosedüründe ilk adım yaklaşık 10^{15} farklı diziden oluşan DNA kütüphanesinin kimyasal olarak sentezlenmesidir (James, 2000). Bu kütüphane Şekil 2.3.1’de gösterildiği gibi iki ucunda primer bağlanma bölgeleri bulunan ve orta kısmında 20-80 arası rastgele nükleotidler içeren nükleik asit dizileridir.



Şekil 2.3.1. Kütüphane dizaynı

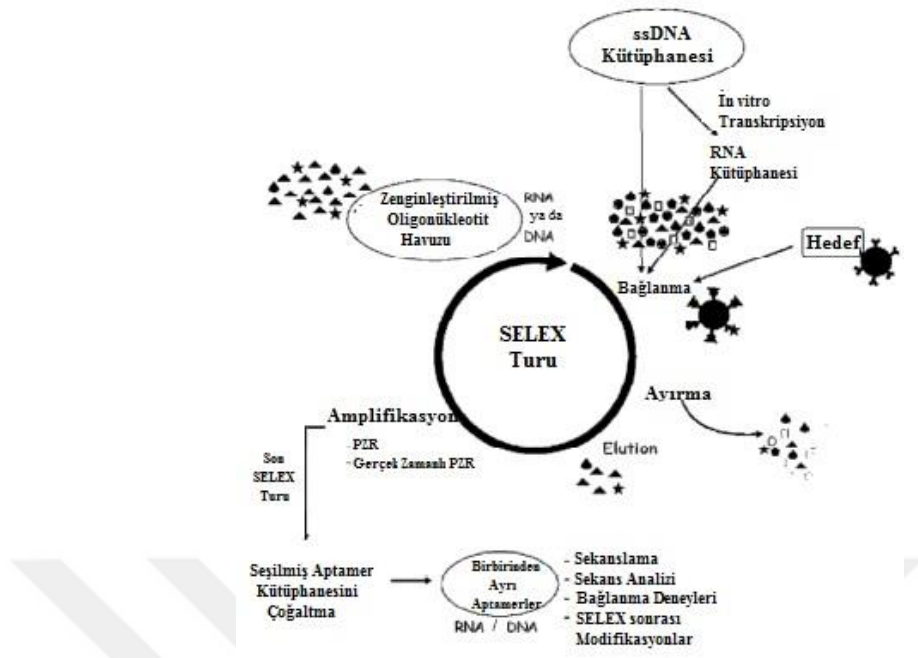
Kütüphane sentezlendikten sonra hedef moleküller ile inkübasyona tabi tutulur. İnkübasyon süresince kütüphanede bulunan birçok tek zincirli DNA dizisi, sahip oldukları özgün üç boyutlu yapıları sayesinde farklı afinitelerle hedef moleküle ya da hücre yüzeyinde bulunan çeşitli hedef moleküllerle etkileşime girerek bağlanırlar. İnkübasyon sonrasında hedefe bağlanmamış ya da zayıf bir etkileşimle bağlanmış nükleik asit dizilerini uzaklaştırmak için yıkama işlemleri yapılır. Yıkama işlemlerinden sonra ortamda hedef ve ona bağlı bulunan aptamer adayları kalır, bundan sonraki adım ise bu aptamer adaylarını hedeften ayırarak PZR yolu ile çoğaltmak olacaktır. Çoğaltılan bu diziler bir sonraki SELEX döngüsü için kütüphane görevini görecekler, başlangıçta rastgele oluşturulan nükleik asit havuzu tekrarlayan seçimlerle hedefe yüksek afiniteyle bağlanan daha az çeşitte dizilere indirgenmiş olur (Dua ve ark., 2011). Genellikle PZR’da kullanılan primerlerden bir tanesi FAM, diğeri de biyotin modifikasyonuna sahip şekilde seçildiği için biyotin bağlı sarmalın ucundan streptavidin kürelere güçlü bir şekilde bağlanacaktır. Bu bağlanmadan sonra ortama NaOH ya da üre gibi kırıcılar eklenip çift zincirli DNA’nın ayrılması ve FAM içeren diğer zincirin serbest kalması sağlanmaktadır. Serbest kalan tek zincir halindeki bu diziler ortamdan alınarak NAP5 kolonları ile tuzlar ve üreden temizlenir ve kurutma cihazı ile kurutularak bir sonraki SELEX turu için hazır hale getirilmektedir. Bir sonraki turda, kurutulan kütüphane, bağlanma tampon çözeltisinde çözülüp kullanılmakta ve döngü birinci turda olduğu gibi tekrar edilmektedir (Sefah ve ark., 2010).

İlerleyen SELEX turlarında hedef ve kütüphanenin inkübasyon süresi kısaltılıp, yıkama koşulları her bir döngüde arttırılarak hedefe en iyi afiniteye sahip olan dizinin seçilimi sağlanmaktadır. Eğer ortamda hedef moleküle benzer moleküller varsa seçecek olduğumuz aptamerin özgünlüğünü arttırma amaçlı, benzer moleküllere karşı negatif-SELEX de yapılarak özgüllük sağlanabilmektedir. Negatif-SELEX'te hedefe bağlanmış nükleik asitler elde edildikten sonra bunların bağlanmasını istemediğimiz moleküle inkübasyonu gerçekleştirilmektedir. Buradan ise moleküle bağlanmamış olanlar yıkama aşamalarından sonra elde edilerek diğer SELEX döngüsüne geçilmektedir.

SELEX'te kullanılan döngü sayısı hedef molekülün konsantrasyonuna, özelliklerine, kompleksliğine, kütüphanenin tasarımına, SELEX prosedürünün koşullarına, yıkama işlemlerinin etkinliği gibi birçok parametreye bağlı olarak 8 ila 20 tur arasında değişmektedir. SELEX turları, seçilen havuzlar belirli bir bağlanma değerine erişinceye kadar devam ettirilmektedir (Djordjevic, 2007).

İlerleyen SELEX turlarında güçlü bağlanabilen dizilerin sayısında artış gözlemlenirken bağlanmayan ya da zayıf bağlanan dizilerin sayısı azalacaktır. SELEX boyunca zenginleştirilmiş dizilerden kaçar adet bulunduğu biyoinformatik analizlerle tespit edilebilmektedir. Günümüzde yeni nesil dizileme işlemi için en çok kullanılan yöntem bizim de tercih etmiş olduğumuz MiSeq Illumina ile yapılan dizileme işlemidir.

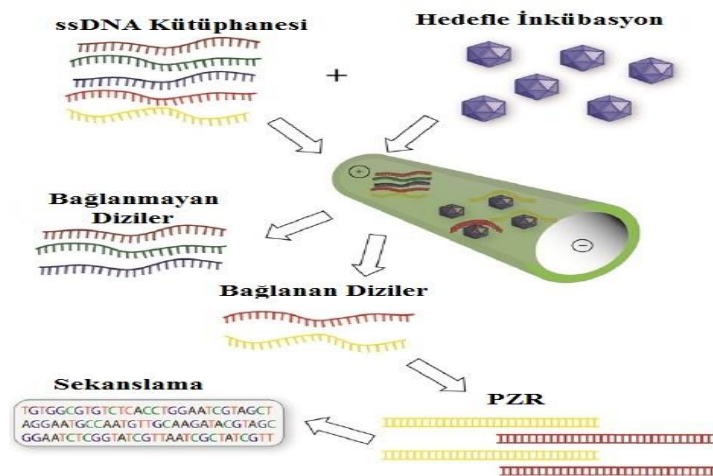
Her SELEX döngüsü sonunda elde edilen havuzların bağlanma afiniteleri belirli miktarda FAM bağlı havuzu belirli sayıda hedef ile inkübe edip yıkadıktan sonra yıkama solüsyonundaki floresansın floresans spektroskopi veya hedef üzerindeki floresansın akış sitometrisi ile belirlenmesi sonucu elde edilebilmektedir.



Şekil 2.3.2. SELEX turu (Stoltenburg ve ark., 2007)

SELEX prosedürü, orijinal seçim prosedürünün temel basamaklarının modifiye edilmesiyle çeşitlendirilmiştir (Aquino-Jarquín ve Toscano-Garibay, 2011). Modifiye edilmiş birçok SELEX metodu mevcuttur bunlardan sık kullanılan bazı çeşitler kapiler elektroforez SELEX, manyetik boncuk SELEX, GO-SELEX, photo-SELEX, bakteriyel-SELEX, hücre SELEX’dir.

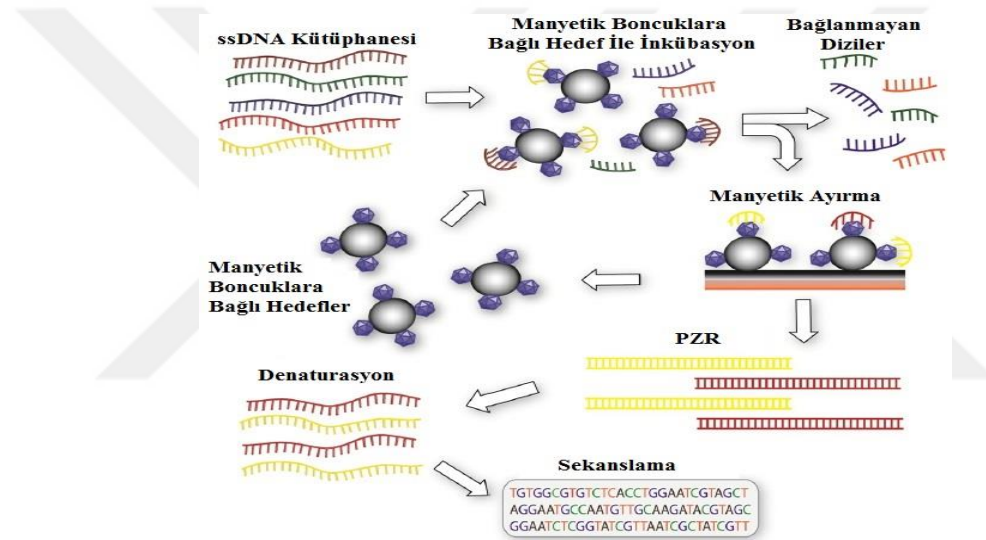
2.3.1. Kapiler Elektroforez-SELEX



Şekil 2.3.1. 1. Kapiler elektroforez-SELEX (Darmostuk ve ark., 2015)

Bu yöntemin prensibi ilk olarak 2004 yılında geliştirilmiştir. Amaç aptamer-hedef kompleksinin bağlanmayan oligonükleotitlerden elektroforetik hareketlerle ayrılmasıdır. Hedefe bağlanan oligonükleotitler serbest nükleotitlerden çok daha yavaş hareket ederler. Hızla kapilerden akan serbest oligonükleotitler ortamdan uzaklaştırılır. Daha sonra basınç uygulanarak aptamer-hedef kompleksi toplanır (Şekil 2.3.1). Bu SELEX tekrarlanan az sayıda döngüde bile yüksek verimlilik sağlayabilmektedir, ancak büyük moleküler ağırlığa sahip moleküller için uygun değildir (Mendonsa ve Bowser, 2004).

2.3.2. Manyetik Boncuk Tabanlı SELEX



Şekil 2.3.2.1. Manyetik boncuk tabanlı SELEX (Darmostuk ve ark., 2015)

Hedefi manyetik boncuklara bağlayarak oluşturulan bu SELEX metodu ilk defa 1997 yılında kullanılmıştır. Genel olarak proteinlerin kullanıldığı bu metotta, hedef protein manyetik boncuklar üzerinde sabitlendikten sonra oligonükleotit kütüphanesiyle inkübe edilir, daha sonra hedef-aptamer kompleksi manyetik ayırıcı ile bağlanmayan oligonükleotitlerden temizlenir (Şekil 2.3.2) (Bruno, 1997).

2.3.3. GO-SELEX

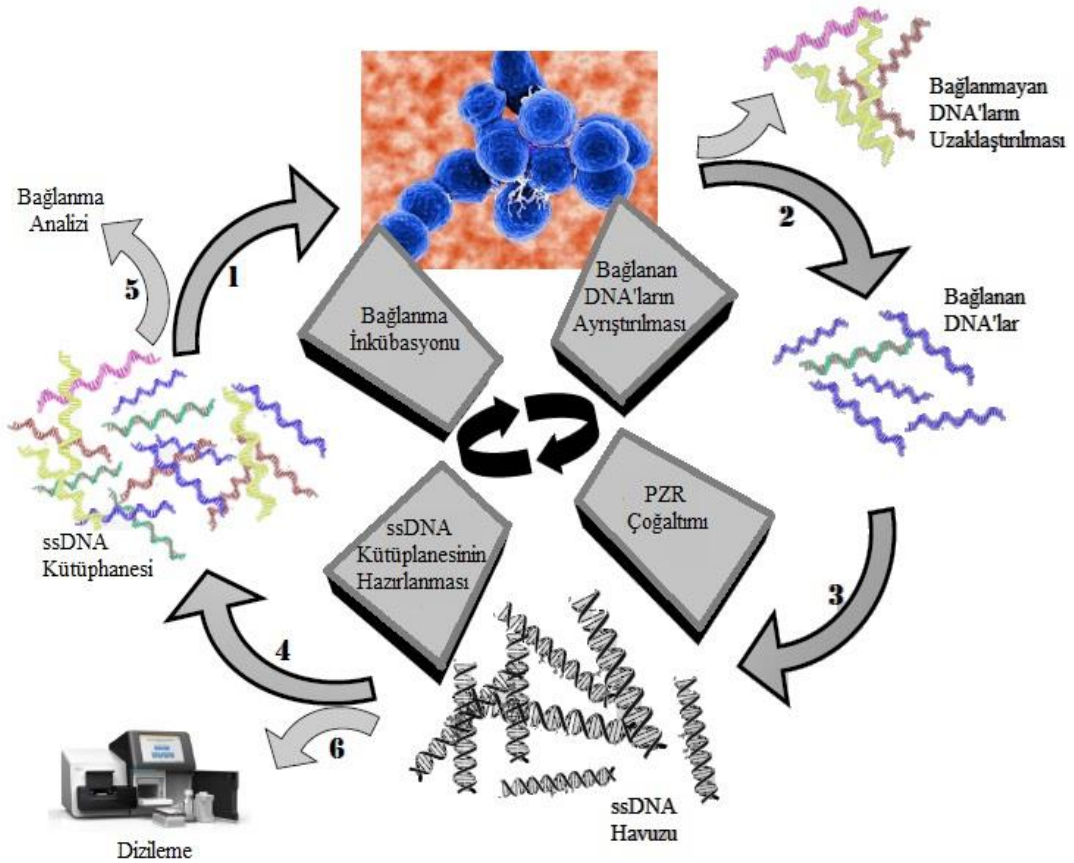
GO-SELEX yönteminde, tek tabaka karbon atomundan oluşan grafen oksit (GO) materyali kullanılmaktadır. Kütüphane ilk önce hedefle inkübe edilir. Daha sonra bu karışıma GO eklenir. Hedefe bağlanmamış olan oligonükleotitler π - π bağı yaparak GO'ye bağlanırlar, santrifüj ile çöktürme sonrası bu moleküllerin ortamdan temizlenmesi

amaçlanmaktadır. Bu yöntemle hedefin sabitlenmesine gerek kalmadan, düşük maliyetli ve hızlı bir şekilde yüksek afiniteli aptamerlerin seçimi sağlanabilir (WooáKim ve BockáGu, 2012).

2.3.4. Photo-SELEX

Bu teknikte ışığa duyarlı nükleotitler başlangıç kütüphanesine eklenir. UV ile uyarıldıkları zaman bu modifiye nükleotitler hedef proteinin aromatik ve kükürt bağlı amino asitleriyle çapraz kovalent bağlar oluşturur. Bağlanan ve bağlanmayan nükleotitler SDS-PAGE yöntemi kullanılarak tespit edilir. Daha sonra bağlı oligonükleotitler jelden izole edilip hedeften ayrılır. Bu yöntemle yüksek afiniteli aptamerler tespit edilebilirken, sadece tepkime gösteren bölge içeren ligandlarla sınırlıdır (Golden ve ark., 2000).

2.3.5. Bakteriyel-SELEX



Şekil 2.3.5.1. Bakteriyel-SELEX işlemi

Bakteriyel-SELEX Şekil 2.3.5.1’de gösterildiği gibi, bakteri hücreleri için modifiye edilmiş bir SELEX çeşididir. Bu SELEX çeşidinde hücreye bağlanan aptamerlerin

seçilmesi hedeflenmektedir, yani aslında hücre yüzeyinde bulunan hedeflere bağlanacak aptamerler seçilmiş olacaktır.

İki farklı hücre tipinin yüzey farklılıkları çoğunlukla burada bulunan proteinlerdeki sadece birkaç farklı moleküler diziden ibarettir. Bakteriyel-SELEX’de bu moleküler dizilerin her biri potansiyel birer hedeftir bu nedenle başarılı bir seçim için aptamer adaylarının bağlanabileceği çok farklı hedefler bulunacaktır. Böylece aptamerler kişiselleştirilmiş tıp için yeni fırsatlar doğuracak ve çoğu hastalığın tanısında daha çok veri sunacaktır (Tan ve ark., 2013).

Bakteriyel-SELEX’de hedef hücrelerin moleküler özellikleri hakkında ön bilgiye gerek yoktur, çok farklı hücre tipleri aralığı için bile Bakteriyel-SELEX kullanılarak özgün aptamerler tanımlanabilir. Bakteriyel-SELEX’de hedef moleküller hücre yüzeyi üzerindedir, böylece SELEX sürecinde bağlanmamış oligonükleotidler kolaylıkla santrifüjle ve yıkayarak uzaklaştırılabilir. SELEX öncesi hedef molekülleri arındırmak ya da katı destek materyalleri üzerine sabitlemek gereksizdir. Bakteriyel-SELEX aynı zamanda yeni biyomarkerları keşfetmek için olanak sağlar. Patolojik veya fizyolojik değişiklikler hücrelerin moleküler seviyesindeki değişiklikleri içerir. Bu değişikliklerin birçoğu bilinmemektedir. Bakteriyel-SELEX’le aptamer bilinmeyen biyomarkere bağlanacak ve hedefe yönelik bilgi olmasa bile hedefin tespit edilmelerini sağlayacaktır (Shangguan ve ark., 2015).

Bakteriyel-SELEX işlemi de Şekil 2.3.1’de de görüldüğü gibi bağlanma inkübasyonu, bağlanan DNA’ların ayrıştırılması, PZR çoğaltımı, tek zincirli DNA havuzu oluşturulması ve dizileme gibi temel basamakları içermektedir. Bağlanma inkübasyonu aşamasından önce kullanılacak olan bakteri ekimi yapılarak büyütülmeye başlanmalıdır. Spektrofotometrik ölçümlerde OD (optik yoğunluk) değeri istenilen değere ulaştığında yeteri kadar bakteri alındıktan sonra kütüphane ile inkübasyona bırakılabilir. Yaşayan bir canlıyla çalışıldığı için tekrar eden her SELEX turunda kullanılacak bakteri aynı fiziksel ve kimyasal şartlarda ve aynı kararlılıkla çoğaltılmalıdır.

Son yıllarda bütün hücre ile yapılan SELEX çalışmaları gittikçe artmaktadır. Birçok hastalığın erken teşhisi için umut vaat eden, birçok başarılı aptamer çalışması bulunmaktadır.

Enfeksiyona sebebiyet veren organizmaların tespiti için geleneksel yöntemler karmaşıktır, birden fazla adım gerektirir ve hızlı tespite ihtiyaç vardır. Biyosensörler patojenlerin hızlı tespiti için büyük bir potansiyel göstermektedir. Aptamerler de bahsedildiği üzere küçük olmaları, sentezinin ve etiketlemesinin kolay olması, toksik olmaması, antikorlara göre düşük üretim maliyetinin olması ve hedef spesifikliği göz önüne alındığında biyosensör çalışmalarının gelişimi için büyük bir potansiyele sahiptir. Yapılan bir bakteriyel-SELEX çalışmasında *Salmonella typhimurium*'a özgü ssDNA aptamerleri bakteri tabanlı SELEX prosedürü ile elde edilmiştir. *S. typhimuriumun* hedef olarak seçilirken, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* karşıt hedef olarak seçilmiş ve 10 SELEX turundan sonra, zenginleştirilmiş oligonükleotit havuzundan, akış sitometrisi kullanılarak 12 aptamer adayları dizilenmiştir. Floresan analizi ile aptamerlerin hedefe yüksek bağlanma afinitesine ve seçiciliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Moon ve ark., 2013).

Salmonella için yapılan başka bir çalışmada *S. typhimurium* ve *Salmonella enteritidis* bakterileri hedef olarak kullanılmıştır. Çalışmada bakteriyel-SELEX prosedürü kullanılmış ve seçiciliği arttırmak için gram negatif bakteriler olan *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* karşıt hedef olarak kullanılarak ilk 10 turda toplam 12 aptamer adayları dizilenmiştir. Bu 12 adaydan hedefe yüksek bağlanma afinitesi ve düşük çözülüm katsayısı gösteren (*S. enteritidis* için $57,86 \pm 14,5$ nM ve $55,84 \pm 27,7$ nM, *S. typhimurium* için $25 \pm 5,6$ nM) üç aptamer tespit edilmiştir (Park ve ark., 2014). Ayrıca Labib ve arkadaşları *S. typhimurium*'a yönelik yapılan başka bir bakteriyel-SELEX çalışmasında 25 nM çözülüm katsayısıyla bağlanabilen aptamer tespit ederken (Labib ve ark., 2012), Pan ve arkadaşları da aynı yöntemle *Salmonella enterica*'ya karşı 8,56 nM çözülüm katsayısıyla bağlanan bir aptamer tespit etmişlerdir (Pan ve ark., 2005).

Hamula ve arkadaşlarının yaptığı bir bakteriyel-SELEX çalışmasında hedef molekülün saflaştırılması ihtiyacını ortadan kaldırmak için hücre yüzeyindeki moleküllere ssDNA aptamerlerinin seçilmesi amaçlanmış ve bunun için hedef olarak süspansiyon halde

bulunan canlı *Lactobacillus acidophilus* bakterisi belirlenmiştir. Bakteriyel-SELEX yöntemi kullanılarak 6-8 tur SELEX sonrası dizilenen 27 aptamer adayının akış sitokiyometrisi ve mikroskop kullanılarak floresans miktarları ölçülmüş ve bir sekansın 13 ± 3 nM gibi yüksek bir afiniteyle *L. acidophilus*'a bağlandığı tespit edilmiştir. Seçilen aptamerin sıkı bir saç tokası şeklinde ikincil bir yapıya sahip olduğu ve *L. acidophilus* hücrelerinin yüzeyinde bulunan hemag1P proteinine bağlandığı tespit edilmiştir (Hamula ve ark., 2008).

Bakteriyel-SELEX çalışmalarında hedef olarak kullanılmış bir diğer bakteri olan *S. pyogenes*, hücre yüzeyinden eksprese edilen M proteini farklılıklarıyla çeşitli serotipleri olan, klinik olarak önemli bir patojendir. Böylece M tipi proteinleri *S. pyogenes*'in popülasyonlarının invazif yayılmasını izlemek için belirteç olarak kullanılabilir. M tipi proteinlerin tanımlanması için serotiplendirilmesi ve nükleik asit dizilerinin dizilemesi zahmetli ve pahalıdır, ayrıca bunu yapacak olan referans laboratuvarlar sınırlıdır. Yine Hamula ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada doğrudan canlı bakteri hücrelerinin yüzeyinde bulunan M-tip11 proteinine karşı SELEX yöntemiyle aptamer geliştirilmesi hedeflenmiştir. Pozitif SELEX'te *S. pyogenes* kullanılırken karşıt SELEX'te *Streptococcus bovis*, *S. pneumoniae* kullanılmıştır. Çeşitli aptamer sekansları *S. pyogenes*'in M-tip11 proteinine bağlanırken karşıt SELEX'te kullanılan hedeflere bağlanmamış ve bağlanan sekanslardan bir kısmının 7 ± 1 nM gibi düşük K_d değerlerine sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu aptamerler *S. pyogenes*'i tespit etmek için kullanılabilecekken aynı zamanda nokta tedavi testleri ya da yeni M tiplene testleri için kullanılabilecektir (Hamula ve ark., 2016). Ayrıca yine Hamula ve arkadaşlarının 2015 yılında *S. pyogenes*'e karşı bakteriyel-SELEX kullanarak 4 nM'lık çözünüm katsayısına sahip aptamer tespit ettiği başka bir çalışma da bulunmaktadır (Hamula ve ark., 2015).

E. coli çoğu hayvanın bağırsak florasında yaygın olarak bulunan bir bakteri türü olmasına rağmen patojenik varyantları önemli halk sağlığı sorunlarına neden olmaktadır. Bakteriyel-SELEX'i kullanılarak yapılan bir çalışma sonucunda 4 tane aptamer dizisinin *E. coli* hücrelerine bağlandığı tespit edilmiştir. İçlerinden en iyi bağlanma afinitesine sahip dizinin K_d 'si 11,97 nM olarak bulunmuştur. Floresan mikroskopuyla, floresan etiketli bu dizilerin *E. coli* hücre yüzeylerine tutunduğu görülmüştür. *E. coli* için seçilen bu aptamerlerden iki tanesiyle 12 karşıt bakteri

kullanılarak tutunma deneyleri yapılmıştır ve bu aptamerlerin sadece *E. coli*'ye spesifik olduğu görülmüştür. Tespit edilen bu aptamer, menenjit ilişkili *E. coli*'nin klinik izolatlarına bağlanmaktadır ve *E. coli* kökenli menenjit kaynaklı patojenlerin tedavisinde kullanılabilmek için tanımlanan ilk aptamer olma özelliğini gösterir (Marton ve ark., 2016).

Diğer bir bakteriyel-SELEX çalışması *Mycobacterium tuberculosis* bakterisi kullanılarak yapılmıştır. Dünya çapında en yaygın ve en önemli enfeksiyon hastalıklarından biri olan tüberküloz ve buna bağlı ölümlere neden olan *M. tuberculosis* bakterisinin mevcut ilaçlara karşı dirençli hale gelmesi büyük sorunlara kapı aralamış ve yeni ilaç sistemleri geliştirmek kaçınılmaz olmuştur. Bu sebeple yola çıkan bir çalışma *M. tuberculosis*'e karşı aptamer geliştirilmeyi amaçlamıştır. Tüm bakteri hücresi hedef olarak kullanılarak SELEX işlemi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca aptamerlerin özgünlüğünü arttırmak için *Mycobacterium bovis* bakterisi de karşıt hedef olarak kullanılmıştır. Seçilen aptamer ile tedavi edilen farelerin dalaklarındaki bakteri sayıları önemli ölçüde düşmüştür. Yapılan akciğer biyopsi örneklerinin histopatolojik incelemesi aptamer varlığında daha az pulmoner alveoler füzyon ve daha az şişlik göstermiştir. Bu sonuçlar, çalışmada bulunan aptamerin *M. tuberculosis* üzerinde önleyici etkilerinin olduğunu ve antimikrobakteriyel madde olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Chen ve ark., 2007). Ayrıca *M. tuberculosis* bakterisine karşı yapılan başka çalışmalarda da K_d 'leri 22 nM (Baig ve ark., 2015) ve 12 nM (Aimaiti ve ark., 2015) olan aptamerler seçilmiştir.

Özellikle çiğ ya da kısmen pişirilmiş kümes hayvanı ürünlerinden, süt ürünlerinden, işlenmemiş su ve deniz ürünlerinden kaynaklı olan ve gastritin başlıca sebebi olan *Campylobacter jejuni*'ye yönelik yapılan bir çalışmada doğal ortamında bulunan bütün bakteriye karşı SELEX işlemi kullanılarak aptamer seçilimi sağlanmıştır. SELEX, FAM etiketli ssDNA kütüphanesi kullanılarak uygulanmıştır ve SELEX işleminin ardından akış sitometresi ile *C. jejuni*'ye yüksek bağlanma eğilimi olan diziler tespit edilmiştir ($K_d=292,8\pm53,1$ nM) (Dwivedi ve ark., 2010).

Başka bir çalışmada bakteriyel-SELEX işlemi deri ve solunum sisteminde çeşitli enfeksiyonlara sebep olan *Staphylococcus aureus*'a aptamer seçmek için bütün bakteriye karşı uygulanmıştır. Ayrıca spesifikliği arttırmak için *Streptococcus* ve

Staphylococcus epidermidis'de karşıt hedef olarak kullanılmıştır. SELEX işleminde elde edilen 11 adayın nükleotit dizisi çıkarılmış ve bunlardan 5 tanesinin hedefle yüksek bağlanma afinitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Bu 5 aptamer hem ayrı ayrı hem de hepsinin karışımı şeklinde kullanılarak hedefe bağlanabilme yetenekleri tespit edilmiştir. Sonuçlar 5 dizinin karışımının bireysel aptamerlerden daha iyi bir şekilde hedefi tanıdığını göstermiştir. Böylece bu çalışmada bulunan 5 aptamerin kombinasyonu, irinli sıvılardan alınan örneklerde *S. aureus*'u tanımaya yönelik problemler tasarlanabilecektir (Cao ve ark., 2009). Yine bakteritel-SELEX'le *S. aureus*'a karşı 2015 yılında K_d 'si 3,5 nM (Moon ve ark., 2015), 2016 yılında ise K_d 'si 2,3 nM (Cha ve ark., 2016) olan aptamerler geliştirilmiştir.

Dizanteriye sebep olan *Shigella dysenteriae* için DNA aptameri seçmek amacıyla yapılan bir çalışmada yine bakteriyel-SELEX yöntemi kullanılmıştır. Yapılan seçim turlarından sonra zenginleştirilmiş oligonükleotit havuzları dizilenip gruplandırılmıştır. Bu dizilerden en iyi bağlanan dizi $23,47 \pm 2,48$ nM çözünme katsayısı değerine sahiptir. Ayrıca aptamer özgüllüğünü değerlendirmek için yapılan bağlanma deneyleri hedef olarak belirlenen *S. dysenteriae*'e yüksek bağlanma afinitesi gösterirken diğer bakteriler için belirgin seviyede düşük bağlanma afinitesi göstermiştir. Böylece tespit edilen bu aptamerle bakteri gibi karmaşık bir hedef için uzun izolasyon ve saflaştırma gereksinimlerinin üstesinden gelinerek yeni tür problemler için ön adım sağlanmıştır (Duan ve ark., 2013). Ayrıca Gong ve arkadaşları da *Shigella sonnei*'ye karşı yaptıkları bakteriyel-SELEX sonucunda 5,98 nM çözünme katsayısına sahip bir aptamer seçmişlerdir (Gong ve ark., 2015).

Yapılan bakteriyel-SELEX çalışmaları bir tabloda özetlenecek olursa;

Çizelge 2.3.5.1. Bakteriyel-SELEX’lerle çeşitli bakterilere karşı seçilmiş aptamerler

Bakteriyel-SELEX yapılan bakteri	Sebebi olduğu hastalıklar	Seçilen en iyi aptamerin K_d’si (nM)	Kaynak
<i>S. typhimurium</i>	Tifo, gıda zehirlenmesi	25±5,6	(Park ve ark., 2014)
		25	(Labib ve ark., 2012)
		-	(Moon ve ark., 2013)
<i>S. enteritidis</i>	Gıda zehirlenmeleri, tifo	57,86±14,5	(Park ve ark., 2014)
		55,84±27,7	(Park ve ark., 2014)
<i>Salmonella enterica</i>	Tifo	8,56	(Pan ve ark., 2005)
<i>L. acidophilus</i>		13±3	(Hamula ve ark., 2008)
<i>S. pyogenes</i>	Deri enfeksiyonları, faranjit	4±1	(Hamula ve ark., 2015)
		7± 1	(Hamula ve ark., 2016)
<i>E.coli</i>	İshal, kanlı ishal, idrar yolu enfeksiyonları	17,97	(Marton ve ark., 2016)
<i>M. tuberculosis</i>	Tüberküloz	-	(Chen ve ark., 2007)
		22,35	(Baig ve ark., 2015)
		12,02	(Aimaiti ve ark., 2015)
<i>C. jejuni</i>	Gastrit	292,8±53,1	(Dwivedi ve ark., 2010)
<i>S. aureus</i>	Deri ve solunum sisteminde enfeksiyonlar	61,50±22,43	(Cao ve ark., 2009)
		2,3	(Cha ve ark., 2016)
		3.49 ± 1.43	(Moon ve ark., 2015)
<i>S. dysenteriae</i>	Dizanteri	23,47± 2,48	(Duan ve ark., 2013)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Merkezi sinir sistemine ait bozukluklar	0,002017	(Lee ve ark., 2015)
		48,74 ± 3,11	(Duan ve ark., 2013)
<i>S. sonnei</i>	Dizanteri	5,98 ± 0,835	(Gong ve ark., 2015)

Bütün hücre kullanılarak yapılan SELEX, bakteri, virüs ve çeşitli mikroorganizmalarla sınırlı kalmamıştır. Memeli hücreleriyle yapılan birçok hücre-SELEX çalışması mevcuttur. Zhao ve ark., bütün hücre-SELEX'i kullanılarak memeli hücrelerine karşı yapılan aptamer seçimlerini bir tablo haline getirmişlerdir (Zhao ve ark., 2015) (Tablo 2.3.5.2).

Çizelge 2.3.5.2. Bütün hücreye yönelik yapılan SELEX'le çeşitli memeli hücrelerine seçilmiş aptamerler

Alınan kaynak bölgesi	Hedef hücre	Bağlandığı protein	Seçilen en iyi aptamerin K_d'si (nM)	Kaynak
Lösemi	Akut lenfoblastik T-hücreleri	PTK7	$0,8\pm0,09$	(Shangguan ve ark., 2008)
	B-hücresi lenfoma hücre hattı		$0,76\pm0,13$	(Tang ve ark., 2007)
Beyin	Glioblastoma hücreleri		61,82	(Bayraç ve ark., 2011)
	Glioblastoma hücreleri	Tenasin-C	104	(Hicke ve ark., 2001)
	Primer glioblastoma	EGFR VIII	$0,62\pm0,04$	(Tan ve ark., 2013)
Akciğer	Büyük akciğer kanser hücreleri		$28,2\pm5,5$	(Zhao ve ark., 2009)
	Akciğer adenokarsinomu		45 ± 5	(Jimenez ve ark., 2012)
Bağırsak	Bağırsak kanser hücreleri		$32,1\pm3,4$	(Sefah ve ark., 2010)
	Fare kolon karsinoma hücreleri	GlikoproteinE2	$1,05\pm0,4$	(Chen ve ark., 2009)
Yumurtalık	Berrak hücreli adenokarsinom		$0,25\pm0,08$	(Van Simaey ve ark., 2010)
	Seröz adenokarsenom		39 ± 20	(Van Simaey ve ark., 2010)

Rahim ağızı	Serviks adenokarsinoma		1,6±0,4	(Graham ve Zarbl , 2012)
Göğüs	Metastatik göğüs kanseri		2,6±1,2	(Li ve ark., 2014)
	Göğüs kanseri	HER2	45,8	(Thiel ve ark., 2012)
Karaciğer	Hepatoselüler karsinoma		4,51±0,39	(Shangguan ve ark., 2008)
	Metastatik hepatoselüler karsinoma		167,3±30,2	(Wang ve ark., 2013)
Pankreas	Pankreatik karsinoma	ALPPL-2	22,5	(Dua ve ark., 2013)
Prostat	Kanser kök hücresi		2,2±0,8	(Sefah ve ark., 2013)
	Prostat kanseri		73,59±11,01	(Wang ve ark., 2014)
Yağ doku	Olgun adipositler		17,8±5,1	(Liu ve ark., 2012)
Böbreküstü bezi	Fare feokromositoma	RET RTK	35±3	(Cerchia ve ark., 2005)
Fare embriyosu	Fare embriyonik kök hücresi		-	(Iwagawa ve ark., 2012)
Lenfoblastom	İnsan Burkitt lenfoması	c-kitt	12,21	(Meyer ve ark., 2013)

3. MATERYAL & METOT

3.1. MATERYAL

Tez çalışmasında kullanılan bakteriler; *Streptococcus pneumoniae* (Klein) Chester (ATCC® 49619™), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 19433™), *Streptococcus pyogenes* (ATCC® 19615™), *Streptococcus mutans* (ATCC® 25175™), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC® 6301™), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC® 6303™) ve *Streptococcus pneumoniae* (ATCC® 49136™) Microbiologics firmasından temin edilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallardan; Sodyum klorit (BCBJ7747V), sodyum hidroksit (SZBD0940V), sodyum fosfat dibazik dihidrat (SZBC162AV), potasyum fosfat monobazik (SZBC3290V), kalsiyum klorür dihidrat (SZBC346AV), magnezyum klorür heksahidrat (SZBC2070V), D-(+)-glikoz (SLBF1738V), gliserol (SHBF0091V), aseton (SZBD331SV), etanol (SZBF1240V), agoroz (SLBL4377V), etidyum bromür (MKBJ1136V), sığır serumu (13J360), sığır serum albumini (SLBJ9814V) Sigma'dan temin edilmiştir.

Bakterilerin büyütülmesinde kullanılan besi yerleri ve anaerob ortam sağlayan malzemeler olan; Brain Heart Agar (1.13825.0500), Brain Heart Broth (1.10493.0500), Tryptic Soy Broth (1.05459.0500), Tryptic Soy Agar (1.05458.0500), Anaerocult (1.13829.0001), Anaerotest (1.15112.0001) ve Anaerobic jar (1.16387.0001) Merck'den temin edilmiştir. Bunların yanı sıra GE Healthcare'den, Streptavidin sepharose high performance (10239342) ve Beckman Coulter'den, Agencourt AMPure XP (15294900) temin edilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılmış olan cihazlardan; spektrofotometre (Optizen, POP), manyetik karıştırıcı (Torrey Pines Scientific, HS10-2), pHmetre (İnolab Ph7110), santrifüj (Eppendorf centrifuge, 5810R), mini santrifüj (Scilogex, D1008), gerçek zamanlı PZR(Qiagen, Rotorgene Q), termal cykler (Biorad, C 1000 Touch), termal cykler (Proflex, EN61326;Class B, Group 1), jel elektroforez sistemi (Thermo, OWL B1A), jel görüntüleme cihazı (Biorad, ChemiDoc MP), güç kaynağı (Consort, EV 231), mikrodalga fırın (Vestel, 1120135), vorteks (WiseMix, VM-10), thermo mixer

(Eppendorf, Thermomixer C), dry block thermostat (Biosan, TDB-120), revolver rotator (Thermo, 88881002), florometre (Invitrogen, Qubit 2.0), su banyosu (Daihan, Wisecircu, WCB-22), çeker ocak (Hedlab), hassas terazi (And, HR-250AZ), hassas terazi (Highland, HCB1002), -20 dondurucu (Sanyo, MDF-U334), buzdolabı (Vestel BZP-XL3302W), buzdolabı (Samsung, RSA1STSL), -80 dondurucu (Thermo Scientific, Forma 88000 Series), inkübatör (Daihan, WiseCube WIS-30R), inkübatör (Nüve, EN 120), steril kabin (Nüve, MN 120), otoklav (Nüve, OT 90L) ve görüntü almak için kullanılan mikroskop (LEICA, DM3000) Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Biyomühendislik Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir ayrıca Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Merkezi Laboratuvar'dan, freze dryer (Scanvac, coolsafe,110-4PRO), Miseq cihazı (Illumina, MiSeq) ve flow sitometri cihazı (BD Accuri, C6) kullanılmıştır. Buz tedariği için ise Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Laboratuvarı'ndan, buz makinası (Hoshizaki, FM-80EE) kullanılmıştır.

3.2. METOT

3.2.1. SELEX'te Kullanılacak Mikroorganizmalar ve Büyütülme Koşulları

Aptamer seçilimi için *Streptococcus pneumoniae* (Klein) Chester (ATCC® 49619™) suşu kullanılmıştır. Bu suşun seçilme sebebi VITEK, BD Phoenix™, Sensititre gibi otomatik mikrobiyoloji tanımlama sistemlerinde *S. pneumoniae* için kalite kontrol ve disk testlerinde kontrol suşu olarak kullanılmasıdır. Aptamer geliştirilirken literatürde yaygın bir uygulama olan negatif seçim de kullanılmış böylece geliştirilen aptamerlerin türe özgü olması, çapraz reaktivite göstermemesi ve hücre zarında bulunan yaygın proteinlere bağlanmaması sağlanmaya çalışılmıştır. Negatif seçim için 3 mikroorganizma karışımından oluşan bir kokteyl kullanılmıştır. Bu mikroorganizmaların belirlenmesinde *S. pneumoniae*'ya yakın, yaygın ve kolay elde edilebilir 3 suş belirlenmiştir. Belirlenen türler ve suşları *Streptococcus mutans* (ATCC® 25175™), *Streptococcus pyogenes* (ATCC® 19615™) ve *Enterococcus faecalis*'dir (ATCC® 19433™). Filogenetik açıdan yakın türlerin kullanılması ile hücre yüzeyinde bulunan benzerlikler arttırılmaya çalışılmıştır. Liyofilize olarak gelen bakteriler öncelikli olarak Brain Heart Agar (BHA)'a ekilmiş, bunlardan *S. mutans*, *S. pyogenes*, *S.pneumoniae* ve suşları anaerobik olarak, *E. faecalis* ise aerobik olarak

37°C’lik etüvde büyütülmüştür. Seçilim için kullanılacak *S. mutans*, *S. pyogenes* bakterileri katı besi yerinde büyüdüktan sonra tek kolonileri alınarak 50 mL Brain Heart Broth (BHB) sıvı besi yerine anaerob ekilmiş, *E. faecalis* ise 50 mL’lik tüpteki 20 mL BHB sıvı besiyerine çalkalamalı inkübatörde aerob olarak 37°C’lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır. *S.pneumoniae* suşları ise %5 sığır serumu içeren BHB’da 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Her saat başı OD değerlerine bakılarak büyüme eğrileri elde edilmiştir. Büyüme eğrileri elde edilen bakteriler log fazına kadar büyütülmüş ve her biri için daha sonra kullanılmak üzere gliserol stokları hazırlanmıştır. Büyüme eğrileri çıkarılan bu bakterilerin sayısını hesaplayabilmek için bakteriler log fazındayken yarım saat arayla bakterilerin OD’leri ölçülmüş ve OD’leri kaydedilen bu bakterilerden petrilere 100’er µL yayma yapılarak büyütülmüş ve sayılmıştır. OD değerine karşılık bakteri sayısı grafikleri oluşturulmuştur, böylece artık herhangi bir OD değerindeki bakteri sayısı hesaplanabilir hale getirilmiştir. Böylece kullanılan mikroorganizmaların farklı SELEX basamaklarında birbirine yakın büyüme fazlarında bulunarak daha yakın yüzey karakterine sahip olması ve SELEX’teki kompleksliği azaltması beklenmektedir.

3.2.2. SELEX’te Kullanılan Kütüphane ve Primerler

SELEX işleminin başarısında, aptamer seçiminde kullanılacak olan kütüphane ve primer dizaynı oldukça önemlidir. Tasarlamış olduğumuz 80 baz uzunluğunda kütüphane ve primerler PZR’da 95°C’de kolayca denatüre olacak şekilde %51,3 ve %52,6 oranlarında GC içeriğine sahiptir. Ayrıca seçilen primer ve kütüphanenin 5’ ve 3’ uçlarının guanin olmamasına dikkat edilmiştir çünkü 5’ ucunda bulunan guanin, floresans ajanlarda sönmeye etkisi yaparken 3’ ucunda bulunan guanin ise DNA sentezini zorlaştırmaktadır. Bunlarla beraber primerlerin uzunluğu 19 baz uzunluğunda seçilirken, erime sıcaklığı 55-65°C arasında bir sıcaklık seçilmiştir ayrıca primer çiftlerinin erime sıcaklıkları arasında 1°C’den fazla fark olmamasına dikkat edilmiştir.

1.kütüphane:5-TGACGAGCCCAAGTTACCT(42N)AGAATCTCCGCTGCCTACA-3

1.kütüphanenin primerleri: 5-FAM-TGACGAGCCCAAGTTACCT-3

5-Biotin-TGTAGGCAGCGGAGATTCT-3

2.kütüphane:5-AAGGGCTGGCTGGGATGGA(42N)TCACTTCACGGACCCCACT-3

2.kütüphanenin primerleri: 5-FAM-AAGGGCTGGCTGGATGGA-3

5-Biotin-AGTGGGGTCCGTGGAGTGA-3

SELEX süresince kullanılan primerlerin 5' uçlarına FAM ve biyotin eklenmiştir. FAM modifikasyonu ile seçilen havuzların floresans spektroskopisi ile bağlanmalarının ölçümünde belirteç, biyotin modifikasyonu ise her tur sonrasında PZR yolu ile çoğaltılan havuzları çift zincirden tek zincire indirgemede kullanılmıştır.

3.2.3. SELEX İçin Kullanılacak Kütüphanenin PZR Optimizasyonu

SELEX'te kullanacak olduğumuz kütüphaneye primer, $MgCl_2$, T_m ve döngü optimizasyonu yapılmıştır. Primer konsantrasyonunun optimum değerini belirlemek için 3, 5, 8 ve 10 μM 'lık konsantrasyonlar kullanılarak PZR yapılmıştır. $MgCl_2$ optimizasyonu için 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4 ve 5 mM'lık konsantrasyonlar kullanılarak en iyi konsantrasyon seçilmiştir. T_m optimizasyonu için 55,5-65°C sıcaklıklar arasından PZR işlemi yapılmış ve en uygun bağlanma sıcaklığı seçilmiştir. Döngü optimizasyonu için ise 6-20 turluk döngülerle PZR yapılarak en iyi döngü sayısı da belirlenmiştir.

Çizelge 3.2.3.1. T_m optimizasyonu için kullanılan PZR şartları

Bileşenler	Stok konsantrasyonları	Miktar (μL)
10X PCR Buffer		2 μL
dNTP	2,5 mM	1,6 μL
Primer	10 μM	1 μL
DNA	5 nM	2 μL
dH ₂ O		11,74 μL
Taq Enzimi	5 U/ μL	0,06 μL
$MgCl_2$	25 mM	1,6 μL
Toplam	20 μL	
Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman (saniye)
Başlama Sıcaklığı	95	180
Denatürasyon	95	30
Bağlanma	Gradient sıcaklık*	30
Uzama	72	30
Final	72	120
Bekleme	12	∞
Döngü Sayısı : 20		

Çizelge 3.2.3.2. Primer optimizasyonu için kullanılan PZR şartları

Bileşenler	Stok konsantrasyonları	Miktar (µL)
10X PCR Buffer		2 µL
dNTP	2,5 mM	1,6 µL
Primer	3µM, 5µM, 8 µM, 10µM	1 µL
DNA	5 nM	2 µL
dH ₂ O		11,74 µL
Taq Enzimi	5 U/µL	0,06 µL
MgCl ₂	25 mM	1,6 µL
Toplam	20 µL	
Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman (saniye)
Başlama Sıcaklığı	95	180
Denatürasyon	95	30
Bağlanma	59,3	30
Uzama	72	30
Final	72	120
Bekleme	12	∞
Döngü Sayısı : 20		

Çizelge 3.2.3.3. MgCl₂ optimizasyonu için kullanılan PZR şartları

Bileşenler	Stok konsantrasyonları	Miktar (µL)
10X PCR Buffer		2 µL
dNTP	2,5 mM	1,6 µL
Primer	10 µM	1 µL
DNA	5 nM	2 µL
dH ₂ O		
Taq Enzimi	5 U/µL	0,06 µL
MgCl ₂	5mM, 4mM, 3mM, 2mM, 1mM, 0,5mM	
Toplam	20 µL	
Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman (saniye)
Başlama Sıcaklığı	95	180
Denatürasyon	95	30
Bağlanma	59,3	30
Uzama	72	30
Final	72	120
Bekleme	12	∞
Döngü Sayısı : 20		

Çizelge 3.2.3.4. Döngü optimizasyonu için kullanılan PZR şartları

Bileşenler	Stok konsantrasyonları	Miktar (µL)
10X PCR Buffer		2 µL
dNTP	2,5 mM	1,6 µL
Primer	10µM	1 µL
DNA	5 nM	2 µL
dH ₂ O		11,74 µL
Taq Enzimi	5 U/µL	0,06 µL
MgCl ₂	25 mM	1,6 µL
Toplam	20 µL	
Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman (saniye)
Başlama Sıcaklığı	95	180
Denatürasyon	95	30
Bağlanma	59,3	30
Uzama	72	30
Final	72	120
Bekleme	12	∞

3.2.4. SELEX

SELEX sırasında kullanılmak üzere DPBS, yıkama solüsyonu ve bağlanma solüsyonu hazırlanmıştır. 1X DPBS için önce aşağıda verilmiş olan solüsyonlar hazırlanmıştır.

Solüsyon1= 80 g NaCl + 2 g KCl + 7,18 g Na₂HPO₄.2H₂O + 2 g KH₂PO₄ + 800 mL dH₂O eklenerek pH 7,4'e ayarlanmış ve bu karışım etiketlenerek otoklavlanmıştır.

Solüsyon2= 1 g MgCl₂.6H₂O + 100 mL dH₂O eklenerek otoklavlanmıştır.

Solüsyon3= 1,3 g CaCl₂.2H₂O + 100 mL dH₂O eklenerek otoklavlanmıştır.

Solüsyon4= solüsyon1 ve solüsyon2'nin tamamı karıştırılarak oluşturulmuştur.

Solüsyon4'ten 10 hacim alınarak üzerine 80 hacim dH₂O eklenmiş ve bu karışıma eklenmek üzere ayrı bir yerde solüsyon3'den 1 hacim alınarak üzerine 9 hacim dH₂O eklenmiştir. Hazırlanan bu iki solüsyon karıştırılarak 1X DPBS oluşturulmuştur. Hazırlanmış olan 40 mL 1X DPBS'in üzerine 18 g glukoz ve 1 M 0,2 mL MgCl₂ eklenerek 1X yıkama solüsyonu ve yine 40 mL 1X DPBS'in üzerine 0,8 g glukoz, 1 M 0,2 mL MgCl₂ ve 0,04 g BSA eklenerek 1X bağlanma solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan DPBS, yıkama solüsyonu ve bağlanma solüsyonu otoklavlanmış ve 0,45 µm'lik filtrelerden geçirilmiştir.

Pozitif SELEX'te kullanacak olduğumuz *S. pneumoniae* (Klein) Chester (ATCC® 49619™) suşunu %5'lik Bovine calf serum içeren BHB'da büyüterek ilk SELEX turuna başlanmıştır. Bulanıklaşmaya başlayan sıvı besi yerinden plastik küvete 1 mL alınarak, spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçülmüştür. OD değeri 0,3 olduğunda $y=9^{-10}x+0,1815$ denkleminde y'nin yerine ölçülen OD değeri yazılarak, 10^9 adet bakteri için sıvı besi yerinden alınması gereken miktar hesaplanmış ve uygun tüpe aktarılmıştır. Tüpe alınan bakteriler 3200 g'de 5 dk santrifüjledikten sonra bakteriler pellet halinde çökerken, besi yeri üst fazda kalmıştır. Üst fazda bulunan besi yeri daha sonra pipet yardımıyla çekilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Pellet olarak kalan bakterilerin üzerine daha sonra 1000 µL yıkama solüsyonu eklenmiş ve nazikçe vortekslenerek yıkanmıştır. Yıkanan bakteriler 3200 g'de 5 dk santrifüjlendikten sonra üst fazda bulunan yıkama solüsyonu pipetle çekilerek, bakterinin tüpün altında pellet halinde kalması sağlanmıştır. Yıkama işlemi iki kere tekrarlanmıştır.

Aptamer kütüphanesi, daha önceden sıcaklığı 95°C'ye getirilmiş olan ısıtıcıda 5 dk bekletilmiş ve sonra çıkarılarak buza alınmış ve 10 dk da buzda bekletilmiştir. İlk önce 95°C'de daha sonra buzda bekletilen aptamer kütüphanesinden 5 nmol 300 µL olacak şekilde alınarak, yıkanmış ve çöktürülmüş bakterinin üzerine eklenmiştir. Üzerine kütüphanenin eklendiği bakteriler nazikçe vortekslenerek karışımları sağlanmıştır. Bu kütüphane-bakteri karışımı, 4°C'de çalkalamalı karıştırıcıda 15 rpm'de 60 dk inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sırasında aptamer kütüphanesinde bulunan birçok tek zincirli DNA dizisi, sahip oldukları özgün 3 boyutlu yapıları sebebi ile farklı afinitelerle hücre yüzeyinde bulunan çeşitli moleküllerle etkileşime girerek hedefe bağlanmıştır.

Inkübasyon süresi biten bakterilere, 3200 g'de 5 dk 4°C'de santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj işleminden sonra bir kısım tek zincirli DNA dizisi hedefe bağlanıp bakterilerle birlikte pellet şeklinde çökerken, bir kısmı da hedefe bağlanmayarak üst fazda kalmıştır. Üst fazda bulunan bağlanmayan diziler pipetle çekilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bakterilere bağlanan dizilerden, zayıf bağlanmış olan dizilerin uzaklaştırılması için de bakterilerin üzerine 300 µL yıkama solüsyonu eklenmiş ve hafifçe vortekslenerek karıştırılmıştır. Zayıf bağlanmış dizilerin uzaklaştırılması amacıyla vortekslenen karışıma 3200 g'de 5 dk 4°C'de santrifüj işlemi yapılmış ve üst fazda bulunan zayıf

bağlanmış diziler pipet yardımıyla ortamdan alınmıştır. Bakterilere bağlanan dizileri, bakterilerden ayırmak için ise sıcaklığı 95°C olan 500 µL saf su, çökeltinin üzerine eklenerek vortekslenmiştir ve 5 dk boyunca 95°C’de spontane şekilde bağlanan dizilerin ayrılması için inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda örnek bekletilmeden 37°C’de 12000 g’de 10 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda, yaklaşık olarak 500 µL olan üst fazda sadece hedefe bağlanan diziler kalmıştır. Hedefe bağlanan bu diziler, üst fazdan pipet yardımıyla alınarak uygun bir tüpe aktarılmış ve ‘elüsyon’ olarak etiketlenmiştir.

SELEX 1’e özel olarak, bu elüsyon tamamını kullanılarak hacmi 1 mL olan karışımla daha önceden yapılmış PZR optimizasyon şartlarında 10 turluk bir PZR yapılmıştır.

Çizelge 3.2.4.1. SELEX 1 için yapılacak 1 mL’lik PZR koşulları

Bileşenler	Stok konsantrasyonları	Miktar (µL)
10X PCR Buffer		100 µL
dNTP	2,5 mM	80 µL
Primer	10 µM	50 µL
DNA seleksiyon havuzu	5 nM	500 µL
dH ₂ O		187 µL
Taq Enzimi	5 U/µL	3 µL
MgCl ₂	25 mM	80 µL
Toplam	1000 µL	
Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman (saniye)
Başlama Sıcaklığı	95	180
Denatürasyon	95	30
Bağlanma	59,3	30
Uzama	72	30
Final	72	120
Bekleme	12	∞

PZR ürünümüz sonraki basamakta template olarak kullanılıp 1.SELEX havuzu olarak etiketlenmiştir. Bu SELEX havuzunun döngü optimizasyonu için 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 turluk döngülerle PZR işlemi yapılmıştır.

Çizelge 3.2.4.2. Bütün SELEX'ler için yapılacak olan döngü optimizasyonu PZR koşulları

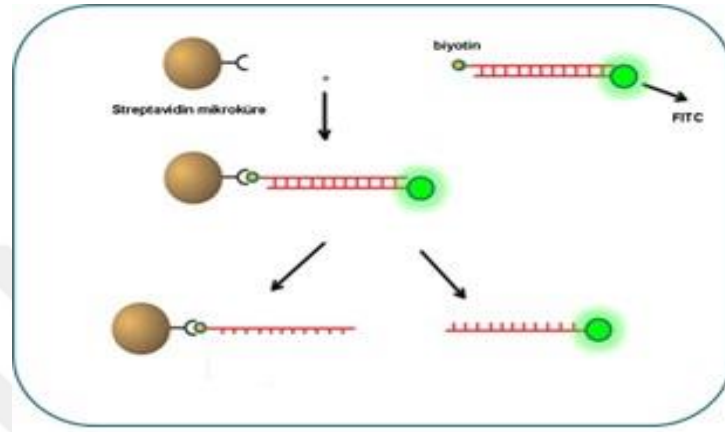
Bileşenler	Stok konsantrasyonları	Miktar (µL)
10X PCR Buffer		2 µL
dNTP	2,5 mM	1,6 µL
Primer	10 µM	1 µL
DNA	5 nM	2 µL
dH ₂ O		9,34 µL
Taq Enzimi	5 U/µL	0,06 µL
MgCl ₂	25 mM	4 µL
Toplam	20 µL	
Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman (saniye)
Başlama Sıcaklığı	95	180
Denatürasyon	95	30
Bağlanma	59,3	30
Uzama	72	30
Final	72	120
Bekleme	12	∞

Bu PZR ürünleri %3'lük agaroz jele yüklenmiş ve en uygun banda göre kullanılacak olan döngü sayısı belirlenmiştir ve bu döngü sayısını kullanarak toplam hacmi 2 mL olan karışım ssDNA oluşturmak üzere PZR yapılmıştır. Yapılmış olan PZR koşulları Çizelge 3.2.4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2.4.3. Bütün SELEX'ler için yapılacak olan 2 mL'lik PZR koşulları

Bileşenler	Stok konsantrasyonları	Miktar (µL)
10X PCR Buffer		200 µL
dNTP	2,5 mM	160 µL
Primer	10 µM	100 µL
DNA	5 nM	200 µL
dH ₂ O		934 µL
Taq Enzimi	5 U/µL	6 µL
MgCl ₂	25 mM	400 µL
Toplam	2000 µL	
Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman (saniye)
Başlama Sıcaklığı	95	180
Denatürasyon	95	30
Bağlanma	59,3	30
Uzama	72	30
Final	72	120
Bekleme	12	∞

PZR ürününü tek zincirli hale getirmek için streptavidin sepharose bead kullanılmıştır. Streptavidin çok güçlü bir şekilde biyotine bağlanmaktadır. Streptavidinin bu özelliğinden yararlanarak biyotin bağlı DNA ipliğinin streptavidine bağlanması sağlanmış, DNA iplikleri arasındaki hidrojen bağı çözücü yardımıyla kırılıp tek zincirli DNA elde etmek amaçlanmıştır (Şekil 3.2.4.1).



Şekil 3.2.4.1. Çift zincirli DNA kütüphanesinin tek zincir hale getirilmesi

ssDNA elde etmek amacıyla, iyice karıştırılan streptavidin sepharose bead stoğundan her 1 mL PZR ürünü için ayrı ayrı 200 µL alınarak 2 mL'lik tüplere alınmıştır. Tüpler spin down yapılarak çöktürülmüş ve üst fazları atılmıştır. Çöktürülmüş sepharose bead üzerine, yıkama yapmak için 1 mL 1X DPBS eklenerek vortekslenmiş ve karışım spin down yapılarak çöktürülmüş, üst faz atılmıştır. Bu yıkama işlemi 2 kez gerçekleştirilmiştir. PZR ürününden 1'er mL alınarak her iki tüpteki yıkanmış sepharose beadlerin üzerine eklenmiş ve 1 saat oda sıcaklığında çalkalamalı karıştırıcıda 15 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sırasında biyotinin bağlı olduğu uç çok sıkı bir şekilde streptavidine bağlanmıştır ve bu bağlanma ssDNA elde etmek için kullanılmıştır. Yapılan 1 saatlik inkübasyon sonrasında karışım spin down yapılarak çöktürülmüş, üst faz atılmış ve pellette bulunan sepharose beادلere bağlı dizilere 1 mL 1X DPBS eklenerek vortekslenmiş ve yıkanmıştır.

Yıkanan sepharose beadler spin down yapılarak çöktürülmüş ve üst fazı atılmıştır. Bu yıkama işlemi iki kere tekrarlanmıştır. Yıkanan sepharose beادلere çift ipliğin ayrılması için 500 µL 200 mM NaOH eklenmiştir. NaOH'ın homojen etki göstermesi için karışım hafifçe vortekslenmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda karışım spin down yapılarak çöktürülmüş ve floresan bağlı tek zincirli DNA'yı içeren üst faz alınmıştır.

Tek zincirli DNA elde etme sırasında kullanılan tuzlardan kurtulmak için Nap5 kolon kullanılmıştır. Öncelikle Nap5 kolonu üzerine yaklaşık 30 mL dH₂O eklenmiş ve suyun tamamının akması beklenerek kolonun yıkanması sağlanmıştır. Yıkama sonrasında kolon üzerinde hiç sıvı kalmayınca kadar beklenmiştir. Kolon elüsyon hacmi 500 µL olduğu için tek zincirli hale getirilmiş 500 µL DNA örneği, üstünde sıvı bulunmayan bu kolona eklenmiş ve içerdeki 500 µL suyun dışarı çıkması sağlanmıştır. Kolon altına 2 mL'lik boş tüp koyulmuş ve kolon üstünden de kolona 1 mL dH₂O eklenmiştir. Kolondan çıkan örnek, kolonun altında bulunan 2 mL'lik tüpte toplanmış ve ilgili SELEX turuna ait tek zincirli DNA olarak etiketlenmiştir.

Quartz bir küvet, 1 kez asetonla sonra 1 kez etanolle ve daha sonra da 3 kez dH₂O ile yıkanarak temizlenmiştir. Temizlenmiş quartz küvete, tek zincirli hale getirilmiş ve daha sonra tuzlarından arındırılmış DNA havuzundan 1 mL örnek alınarak eklenmiş, 260 ve 280 nm dalga boylarında spektrofotometrede okunmuş ve ssDNA miktarı hesaplanmıştır. ssDNA miktarı tespit edilen karışım freze drier kullanılarak kurutulmuştur. Kurutulan ssDNA daha sonra bağlanma solüsyonunda çözülmüş ve ikinci tur SELEX için kullanılmaya hazır hale getirilmiştir.

Çizelge 3.2.4.4. SELEX turlarına ait bilgiler

SELEX Turu	Kullanılan Bakteri Sayısı	Kullanılan Kütüphane Konsantrasyonu	İnkübasyon Süresi(dk)	Yıkama Sayısı	Kullanılan Bakteri
1	10 ⁹	100 pmol	60	0	<i>S. pneumoniae</i>
2	10 ⁸	120 pmol	60	1	<i>S. pneumoniae</i>
3	10 ⁸	118,103 pmol	60	1	<i>S. pneumoniae</i>
4	10 ⁸	100,665 pmol	50	2	<i>S. pneumoniae</i>
5	10 ⁸	110,337 pmol	50	2	<i>S. pneumoniae</i>
6	10 ⁸	104,4 pmol	40	2	<i>S. pneumoniae</i>
7	10 ⁸	105,52 pmol	40	3	<i>E. feacalis</i>
8	10 ⁸	106,205 pmol	30	3	<i>S. pneumoniae</i>
9	10 ⁸	100,97 pmol	30	3	<i>S. pyogenes</i> + <i>S. mutans</i>
10	10 ⁸	85,51 pmol	30	3	<i>S. pneumoniae</i>
11	10 ⁸	100 pmol	30	3	<i>S. pneumoniae</i>
12	10 ⁸	113 pmol	30	3	<i>S. pneumoniae</i>
13	10 ⁸	100,9 pmol	30	3	<i>S. pneumoniae</i>
14	10 ⁸	107,5 pmol	30	3	<i>S. pneumoniae</i>
15	10 ⁸	106,875 pmol	30	3	<i>S. pneumoniae</i>
16	10 ⁸	100 pmol	30	3	<i>S. pneumoniae</i>
17	10 ⁸	104,8 pmol	30	3	<i>S. pneumoniae</i>
18	10 ⁸	103,4 pmol	30	3	<i>S. pneumoniae</i>
19	10 ⁸	100 pmol	30	3	<i>S. pneumoniae</i>
20	10 ⁸	100 pmol	30	3	<i>S. pneumoniae</i>

3.2.5. Dizileme ve Biyoinformatik

Havuzların dizilenmesi için Illumina Miseq pyrosequencing sistemi kullanılmıştır. Aptamer havuzlarının dizilenmesinde yeni nesil dizileme sistemleri literatürde kullanılmış olmasına rağmen dizileme için gerekli kütüphanelerin hazırlanmasında okuma için gerekli adaptör dizilerin eklenmesi için genom dizileme sistemlerinde kullanılan Nextera, TruSeq vb. kitler kullanılmaktadır. Bu kitler genom dizileme yapılırken enzim temelli veya fiziksel kuvvetlerle genomu parçalamakta ve gerekli diziler enzimler yolu ile parçalanan dizilere eklemektedir. Oldukça karmaşık işlevleri ve enzim içerikleri sebebiyle bu kitler Türkiye şartlarında bir SELEX dizilemesi için yaklaşık 15.000 TL'ye mal olmaktadır. Tez kapsamında bu maliyetli sistemi kullanmak yerine metagenomics çalışmalarında kullanılan yeni nesil dizilme metodunu modifiye ederek SELEX'e uyarladık böylece bu yüksek masraf ve iş yükünden kaçınmayı başardık. Metagenomics genellikle prokaryotik 16S ribozomal RNA genlerinde bulunan türlere özgü bölgeleri dizilemek ve bu sayede kompleks örneklerde filogenetik sınıflandırmayı sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Metagenomics yöntemlerin dizilenmesinde gerekli kütüphanenin oluşturulması PZR temelli olduğu için görece ucuz ve kolaydır. Dizilemede

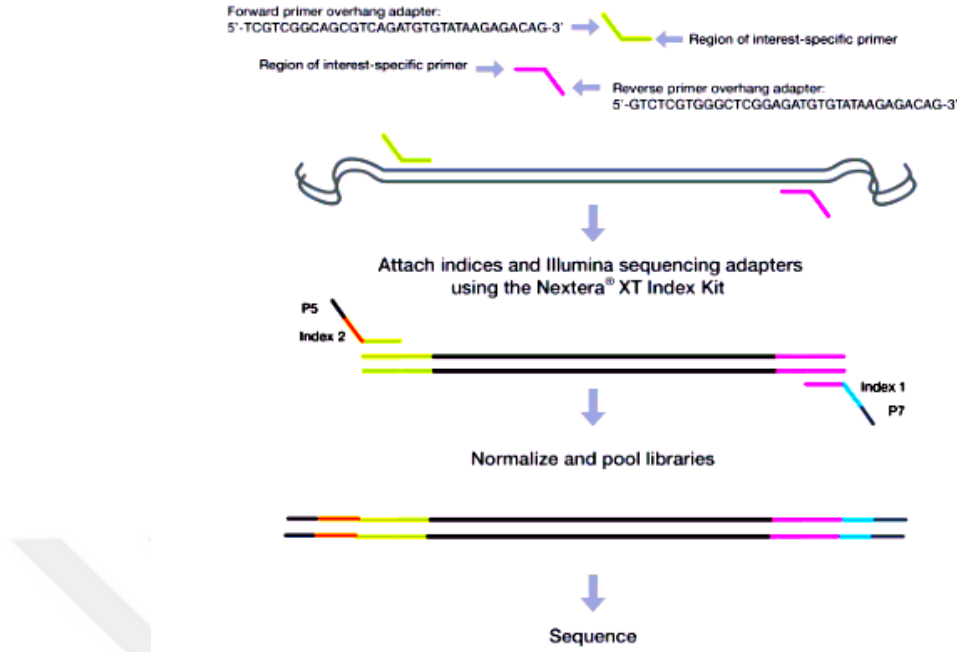
16S Amplikon PZR İleri Primer:

5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCA
G

16S Amplikon PZR Geri Primer:

5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCT
AATCC

kullanılarak türler arası varyasyonları oluşturan 16S ribozomal RNA bölgeleri uçlarına dizilemede gerekli adaptörün bir kısmı eklenerek çoğaltılmış olur. Bu daha sonra farklı örnekleri ayırt etmek ve yine dizileme için gerekli bazı dizileri içeren indeks primerleri ile tekrar PZR yolu ile çoğaltılarak dizilemeye hazır hale getirilir (Şekil 3.2.5.1).



Şekil 3.2.5.1. Miseq dizilemede kullanılan primerler

Tez kapsamında SELEX turları sonucunda elde edilen her bir DNA havuzu öncelikle

5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-[lokusa özgü dizi]

5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-[lokusa özgü dizi]

dizilerinin “lokusa özgü dizi” yazan bölümüne SELEX kütüphanesinde kullanılan primer bölgeleri eklenerek yapılan ilk 20 turluk SELEX’te

5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-TGACGAGCCCAAGTTACCT3'

5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-GTAGGCAGCGGAGATTCT3'

ikinci 10 turluk SELEX’te ise

5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-AAGGGCTGGCTGGGATGG-3'

5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-AGTGGGGTCCGTGGAGTGA-3'

primerleri kullanılmış ve SELEX’de optimize edilmiş PZR şartları ve döngü sayısı ile çoğaltılmıştır, bu PZR basamağı amplikon PZR olarak adlandırılmıştır. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforez yöntemi ile görüntülenmiştir. Elde edilen PZR ürünler

Ampure XP bead kiti kullanılarak primer, dNTP vb. arındırılmış ve tekrar agaroz jel elektroforez sisteminde görüntülenmiştir.

Elde edilen PZR ürünü Nextera Index Kitinde bulunan primerlerden N701, N702, N703, N704, N705, N706, S502 ve S503 kullanılarak çift taraflı farklı varyasyonlarda PCR yolu ile indekslenmiştir. Bu PZR indeks PZR olarak adlandırılmıştır. Bu indeksler daha sonra biyoinformatik araçlar kullanarak elde edilen dizinlerin birbirinden ayrılmasında (demultiplexing) kullanılmıştır.

Çizelge 3.2.5.1. Index 1 Primer Dizisi

	N701	N702	N703	N704	N705	N706
N502	SELEX 4	SELEX 6	SELEX 8	SELEX 10	SELEX 12	SELEX 14
N503	SELEX 16	SELEX 18	SELEX 20	2.SELEX-8	2.SELEX-9	2.SELEX-10

Index 1 Primer Dizisi;

5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[i7]GTCTCGTGGGCTCGG kullanılan bu primerde i7 bölgesi yerine aşağıda belirtilen diziler eklenerek indeks primerleri üretilmiştir (N701-TCGCCTTA, N702-CTAGTACG, N703-TTCTGCCT, N704-GCTCAGGA, N705-AGGAGTCC, N706-CATGCCTA).

Index 2 Primer Dizileri

5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCGGCAGCGTC kullanılan bu primerde i5 bölgesi yerine aşağıda belirtilen diziler eklenerek indeks primerleri üretilmiştir (S502-CTCTCTAT , S503-TATCCTCT).

İndeks PZR sonuçları agaroz jel elektroforezde görüntülendikten sonra AmpureXP Bead kiti kullanılarak temizlenmiş ve tekrar Agaroz jel sisteminde kontrol edilmiştir.

Elde edilen temizlenmiş indeks PCR ürünlerin Qubit Assay kiti kullanılarak Qubit 2.0 cihazında miktar tayini ng/μL cinsinden yapılmış ve

'nM konsantrasyon= (ng/μL konsantrasyon x 10⁶) / (660g/mol x ortalama kütüphane uzunluğu)'

formülü kullanılarak nM cinsine çevrilmiştir. Daha sonra hazırlanan her bir indekslenmiş dizi grubu 10mM Tris (pH 8.5) tamponu kullanılarak 4nM konsantrasyona seyreltilmiştir.

Seyreltilen indekslenmiş her bir DNA havuzundan 5 µL alınarak birleştirilmiş ve vorteks yolu ile karıştırılarak final DNA havuzu elde edilmiştir. Final DNA havuzunun 5 µL alınmış 0,2 N 5µL NaOH eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek denatüre edilmiştir. Elde edilen 10 µL denatüre DNA üzerine dizileme kitinin içinden bulunan ve içeriği firma tarafından belirtilmeyen HT1 tampon çözeltisinden 990 µL eklenmiştir. Bu basamak sonucunda 1mM NaOH içinde denatüre 20 pM final kütüphane elde edilmiştir. Elde edilen 20 pM final kütüphane tekrar HT1 tampon çözeltisi kullanılarak 6 pM'a seyreltilmiş ve PhiX kütüphanesi hazırlanıncaya kadar buz üzerinde bekletilmiştir.

PhiX kütüphanesi Illumina temelli dizilemelerde integral kontrol olarak kullanılan ve hazır satılan parçalanmış uçlarına dizileme için gerekli adaptörler eklenmiş bir virüs genomudur. Bu genom aynı dizilenmesi hedeflenen kütüphaneye uygulandığı gibi önce 4 nM'e seyreltilmiş, NaOH ekleyerek denatüre edilmiş ve sırasıyla 20 pM ve 6 pM konsantrasyonlara indirilmiştir. Denatüre ve seyreltilmiş dizilenmesi hedeflenen kütüphane ve PhiX kontrol, %10 PhiX olacak şekilde karıştırılmış (60 µL PhiX + 540 µL kütüphane) ve böylece dizilemeye hazır hale getirilmiştir.

Dizileme kartuşunun eritilmesi sağlandıktan sonra gerekli dizileme bilgileri cihaza girilerek örnek kartuşa yüklenmiş ve dizileme başlatılmıştır. Dizileme için 150 döngülük bir kit kullanılmış 1x150 bç tek taraflı okuma ve 16 turluk indeks okuması gerçekleştirilmiştir. Dizileme yaklaşık 20 saat sürmüştür.

Dizileme sonuçları cihazda bulunan lisanslı reporter programı kullanılarak öncelikle fastq formatında demultipleks dosyalar haline getirilmiştir böylece her bir SELEX havuzu ayrı listeler halinde analize tabi tutulabilecektir. Elde edilen her bir DNA havuzu dosyası öncelikle NextGen Sequence Workbench v3.2.3 kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sonucu öncelikli olarak okuma sayıları, kaliteleri, baz dağılımları, okuma uzunluk dağılımı gibi veriler elde edilmiştir. Ön veri analizi sonrasında her bir dizi grubunda okuma aralığı 79-81 baz olarak ayarlanmış ve bu aralık dışında kalan daha kısa ve daha uzun diziler ilerleyen analizlerde kullanılmamıştır.

Elde edilen yeni dizlerde öncelikli olarak zenginleşmeyi belirlemek için normalde genom okumalarında birden fazla okunmuş dizileri dizi listesinden çıkararak alignment programlarının daha kolay çalışmasını sağlayan overrepresented/contaminat belirleme için Avalanche Sequence Dereplicator kullanılmıştır. Bu program kullanılarak dizi gruplarında en çok tekrar eden diziler belirlenmiştir. Bütün diziler içinde en çok tekrar eden 25 dizi belirlenerek diğer analizler bu diziler üstünden devam ettirilmiştir.

Belirlenen bu 25 dizi öncelikle MAFFT v.7 kullanılarak birbirlerine align edilmiştir. Alignment öncesinde bütün dizilerde aynı primer bölge bulunmasından dolayı primer bölgeleri çıkarılmıştır. Oluşturulan alignment jalview kullanılarak clustalX ve baz benzerliği verilerine göre renklendirilmiştir. Alignment sonrasında diziler bir hiyerarşik kümeleme metodu olan UPMGA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) kullanılarak filogenetik sınıflandırmaya tabi tutulmuş ve ağaçları oluşturulmuştur. Oluşturulan ağacın her bir kolunda en çok zenginleşmiş dizi aday aptamer olarak belirlenmiştir. Aptamerlerin tahmini ikincil yapıları NUPACK programı kullanılarak tespit edilmiştir.

3.2.6. Bağlanma Afinitesinin Belirlenmesi

Afinitelerin belirlenmesinde 10^8 adet hücre farklı konsantrasyonlarda (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 nM) FAM işaretli aday aptamerlerin bulunduğu 1 mL tampon çözeltide 30 dakika 4°C’de hafif çalkalamada inkübe edilmiş sonra hücreler santrifüj yolu ile 3200 g’de çöktürülmüştür. Çöken bakterilerin üst fazında bulunan besiyeri pipetle çekilerek atılmıştır. Çöken bakterilerin üzerine 1 mL yıkama solüsyonu eklenmiş ve sonra hafifçe vortekslenmiştir. Bu yıkama işlemi sayesinde bağlanmayan aday aptamerler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Son olarak hücreler 200 µL bağlanma solüsyonunda çözöldürülmüştür. Qubit floresans spektrofotometresinde uyarım filtresi blue, 430-495 nm ve emisyon filtresi green, 510-580 nm seçilmiş ve bağlanma solüsyonunda çözöldürülen örneklerin floresans yoğunluğu ölçülmüştür. Bağlanma afinitesinin (K_d) hesaplanması için her bir mikroorganizma örneğinde floresans yoğunluğuna karşı eklenen aday aptamer konsantrasyonunun grafiği çizilmiştir. Daha sonra lineer olmayan regresyon analizi ile bulduğumuz 3 farklı aptamerin hedef bakterimiz olan *S.*

pneumoniae 'ya karşı göstermiş olduğu K_d değeri Sigma Plot kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.7. Akım Sitometresi ile Aptamerlerin Bağlanma Etkinliklerinin Belirlenmesi

S. pneumoniae, BHA katı besi yerlerine ekilip büyütüldükten sonra tek koloni alınıp BHB sıvı besi yerlerine ekilip büyümeleri beklenmiştir. Bakteriler lag fazlarının başlarında her birinden ayrı ayrı 10^7 bakteri hesaplanarak tüplere alınmış, çöktürülmüş ve süpernatant kısımları atılmıştır. Her bir bakteri için; sadece bakterinin olduğu, bakteri+kontrol aptamerinin olduğu, bakteri+10_1 aptamerinin olduğu, bakteri+20_4 aptamerinin olduğu ve bakteri+20_7 aptamerinin olduğu toplam 5 örnek hazırlanmıştır. Her bir tüpün üzerine 300 μ L bağlanma solüsyonu eklenerek hafifçe vortekslenmiş, karışmaları sağlanmıştır daha sonra 4°C'de çalkalamalı karıştırıcıda 15 rpm'de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 3200 g'de 5 dk santrifüjleme yapılarak süpernatantı alınan örneklerin üzerlerine 300 μ L bağlanma solüsyonu eklenmiş ve flow sitometrede 10000 hücre/sn hızda ölçümleri alınmıştır.

3.2.8. Floresans Mikroskopi ile Aptamerlerin Bağlanma Etkinliklerinin Belirlenmesi

S. pneumoniae, BHA katı besi yerine çizilip, 37°C'lik etüvde büyütüldükten sonra tek kolonisi alınıp BHB sıvı besi yerine ekilmiş ve büyütülmüştür. Büyüyen bakterilerden 1 mL küvete alınarak spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçülmüştür. OD=0,3 olduğunda 10^8 bakteri hesaplanarak hem 10_1, 20_4, 20_7 aptamerleri hem de kontrol aptameri için tüplere alınmış, 3200 g'de 5 dk çöktürülmüş, üst fazları atılmıştır. Her bir tüpteki çöken bakterilerin üzerine 20 μ L bağlanma solüsyonu ve sırasıyla 100 μ M'lık 20_7 aptamerinden 20 μ L, 100 μ M'lık 20_4 aptamerinden 20 μ L, 100 μ M'lık 10_1 aptamerinden 20 μ L alınarak eklenmiştir. Kontrol aptameri için ise çöken bakterinin üzerine 20 μ L bağlanma solüsyonu ve 100 μ M'lık kontrol aptamerinden 20 μ L alınarak eklenmiştir. Her tüp 4°C'de çalkalamalı karıştırıcıda 15 rpm'de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda çöktürme yapılmadan örneklerden birer damla lam üzerine damlatılmış, bakteriler tespit edilmiştir. Daha sonra 100X'te hem beyaz ışık hem de floresans ışık altında görüntüleri alınmıştır.

3.2.9. Aptamerlerin Biyofilm Oluşturma Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

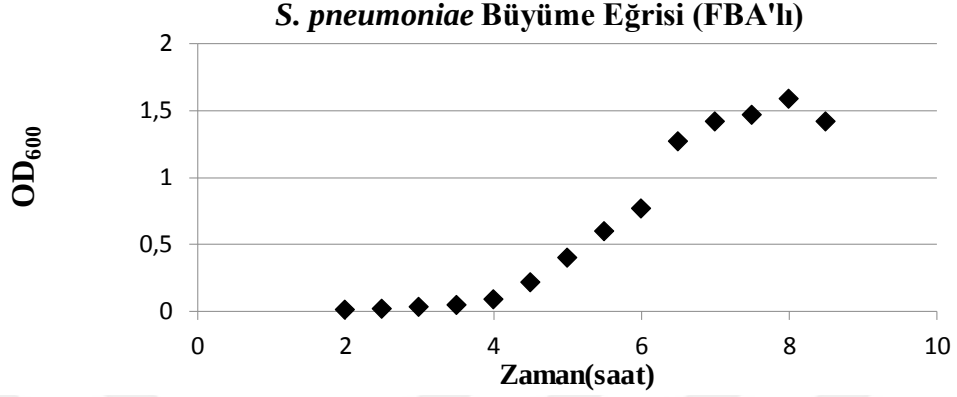
Seçilen aptamerlerin hedef üzerinde biyofilm oluşumuna etkisine bakmak için aptamer hedefi olarak seçtiğimiz *S. pneumoniae*'nın 49619 suşu sıvı besi yerinde büyütüldükten sonra, sıvı besi yerinden 1 mL küvete alınarak spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Bakteriler OD=0,3 olduğunda, flaska, her bir kuyucuk için 100 µL bakteri eklenmiştir. Bakteriler kuyucuk yüzeyine tutunup burada biyofilm oluşturmaktadırlar. En iyi biyofilm tabakasının hangi saatte oluştuğunu tespit edebilmek için bakteriler sırasıyla 4, 8, 12 ve 24 saat kuyucuklarda büyütülmüş, saatleri tamamlanan bakteriler kuyucuklardan alınmıştır. Her bir kuyucuğa çok yavaş bir şekilde 150 µL dH₂O eklenmiş ve eklenen bu su pipetleme yapılmadan yine çok yavaş bir şekilde pipet yardımıyla kuyucuktan çekilerek yıkama işlemi yapılmıştır. Biyofilm tabakasına zarar vermeden yapılan yıkama işlemi iki kere tekrarlanmıştır. Oluşan biyofilm tabakasını tespit etmek için yıkanan kuyucukların üzerine 25 µL %1'lik kristal viyole boyası eklendikten sonra boyanın biyofilme tutunması için 15 dk 37°C'lik etüvde inkübasyonda bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kuyucuk içerisi pipetle dikkatlice boşaltılmıştır. Sonra kuyucuğa 400 µL %96'lık etil alkol eklenerek pipetleme yapılmış ve boya bağlı bakterilerin yani biyofilm tabakasının yerinden kaldırılması sağlanarak ayrı ayrı tüplere alınmıştır. Tüpler üzerlerine 600 µL su eklenerek 1 mL'ye tamamlanmıştır. Toplam hacmi 1 mL olan bu örnekler spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Bu deney sonunda kullanabilecek olduğumuz en iyi biyofilm tabakasının kaçırıncı saatte oluştuğunu tespit ettikten sonra farklı aptamer konsantrasyonlarının biyofilm tabakası üzerindeki etkisine bakmak için, bakteri eklenen kuyucukların üzerine son konsantrasyonu sırasıyla 1000, 800, 600, 400 ve 200 nM olacak şekilde ayrı ayrı aptamerler eklenmiştir. 12 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra her bir kuyucuğun üzerine %1'lik 25 µL kristal viyole eklenip 15 dk tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kuyucuk içerisi pipetle boşaltılmıştır. Sonra kuyucuğa 400 µL %96'lık etil alkol eklenerek pipetleme yapılmış ve boya bağlı bakteriler yerlerinden kaldırılıp ayrı ayrı tüplere alınmıştır. Üzerlerine 600 µL su eklenip 1 mL'ye tamamlanan örnekler spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Üç ayrı aptamer için bu işlem ayrı ayrı tekrarlanmıştır. Biyofilm oluşturma üzerinde en çok etkiye sahip olan aptamer seçilerek, SELEX'te kullandığımız *S. pneumoniae*'nın elimizde bulunan 3 farklı suşu için de biyofilm oluşturma üzerindeki etkisine bakılmıştır. Bunun için her bir suştan 3 farklı kuyucuğa 100'er µL 4 tekrar

olacak şekilde eklenmiştir. İlk kuyucuğa son konsantrasyon 1000 nM olacak şekilde 20_7 aptameri eklenmiş, ikinci kuyucuğa da yalnız bakteri ekilmiştir. Daha sonra 12 saat inkübasyona bırakılan her bir kuyucuğun üzerine %1'lik 25 µL kristal viyole boyası eklenip 15 dk tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kuyucuk içerisi pipetle boşaltılmıştır. Sonra kuyucuğa 400 µL %96'lık etil alkol eklenerek pipetleme yapılmış ve boya bağlı bakteriler yerlerinden kaldırılıp ayrı ayrı tüplere alınmıştır. Üzerlerine 600 µL su eklenip 1 mL'ye tamamlanan örnekler spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

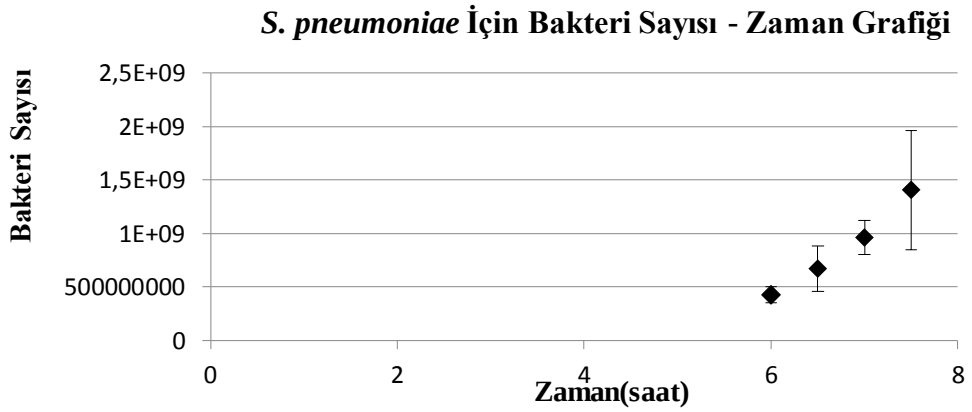


4. BULGULAR

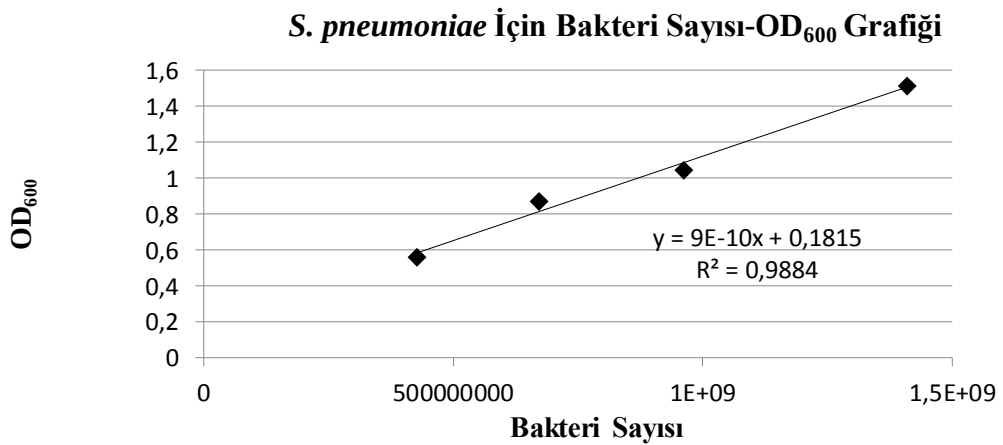
4.1. Bakterilerin Büyüme Eğrileri ve Bakteri Sayısı Hesaplama



Şekil 4.1.1. *S. pneumoniae* 'ya ait büyüme eğrisi



Şekil 4.1.2. *S. pneumoniae* için bakteri sayısı-zaman grafiği



Şekil 4.1.3. *S. pneumoniae* için bakteri sayısı-OD₆₀₀ grafiği

Yukarıda verilen Şekil 4.1.1.'de görüldüğü üzere *S. pneumoniae* sıvı besiyeri yerine tek koloni ekildikten sonra 4. saate kadar lag fazında kalmış, 4. saate log fazına geçmiştir ve

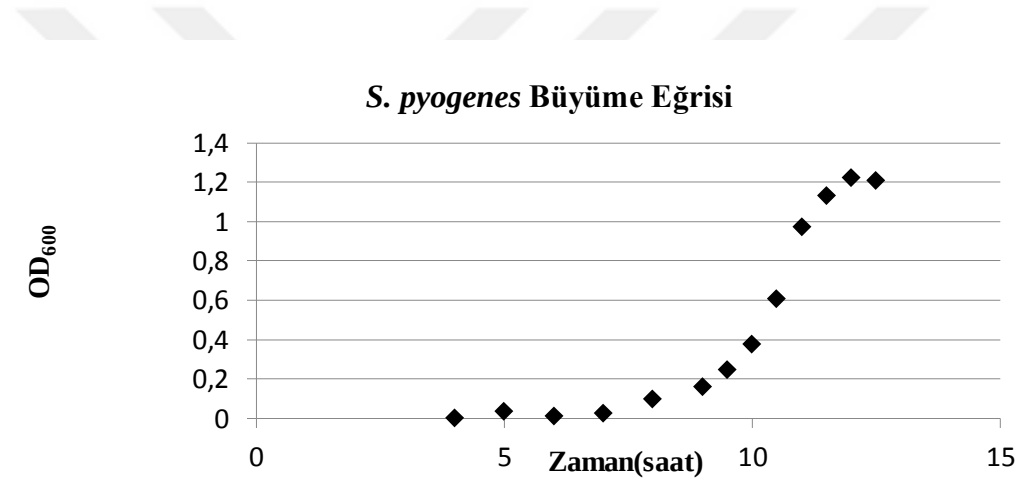
7. saate kadar da logaritmik bir şekilde artış göstermiştir. 7. saatten sonra da duraklama fazına girmiştir. Şekil 4.1.3.'de oluşturulan grafikteki lineer denklem $y = 9E-10x + 0,1815$ logaritmik fazda OD'ye bağlı bakteri sayısının belirlenmesinde bütün deneyler boyunca kullanılmıştır. *E. faecalis*, *S. pyogenes*, *S. mutans* bakterileri için de aynı grafikleri elde edebilmek için aynı işlemler tekrarlanmıştır.

Bu denklemler

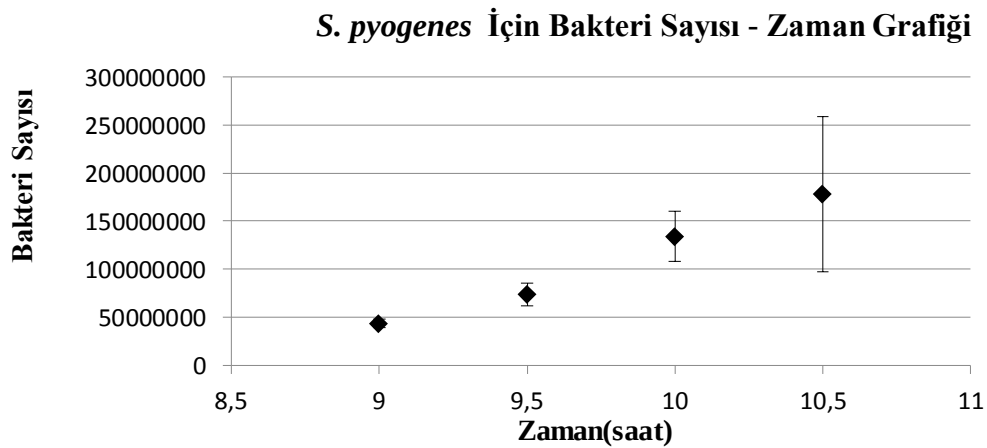
S. pyogenes için $y=4E+08x-2E+09$,

E. faecalis için $y=6E+08x-6E+08$,

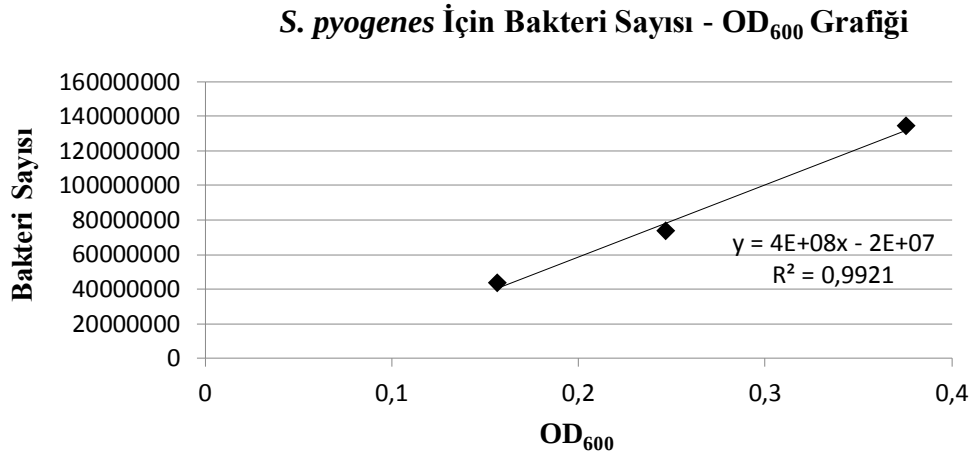
S. mutans için ise $y=4E+09x-2E+09$ 'dur.



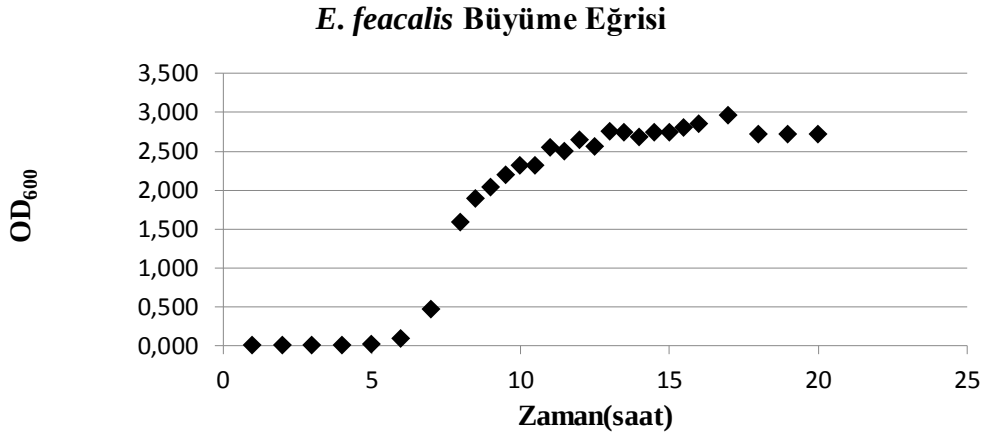
Şekil 4.1.4. *S. pyogenes*'e ait büyüme eğrisi



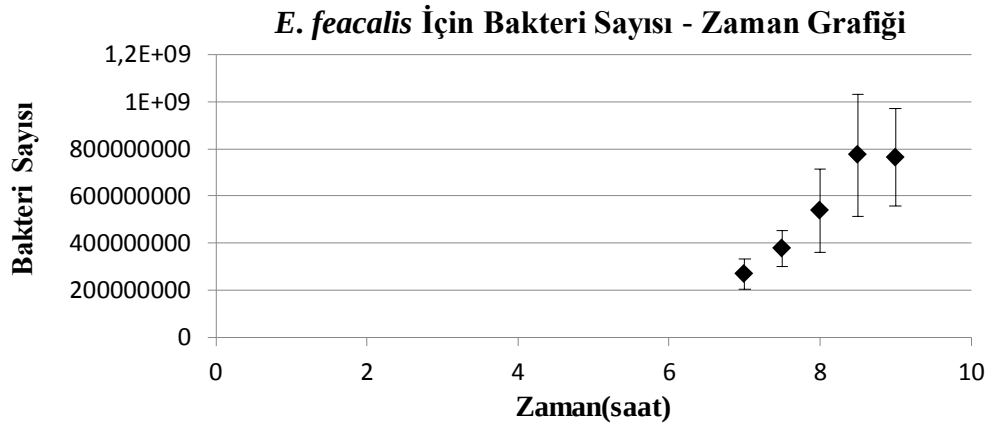
Şekil 4.1.5. *S. pyogenes* için bakteri sayısı-zaman grafiği



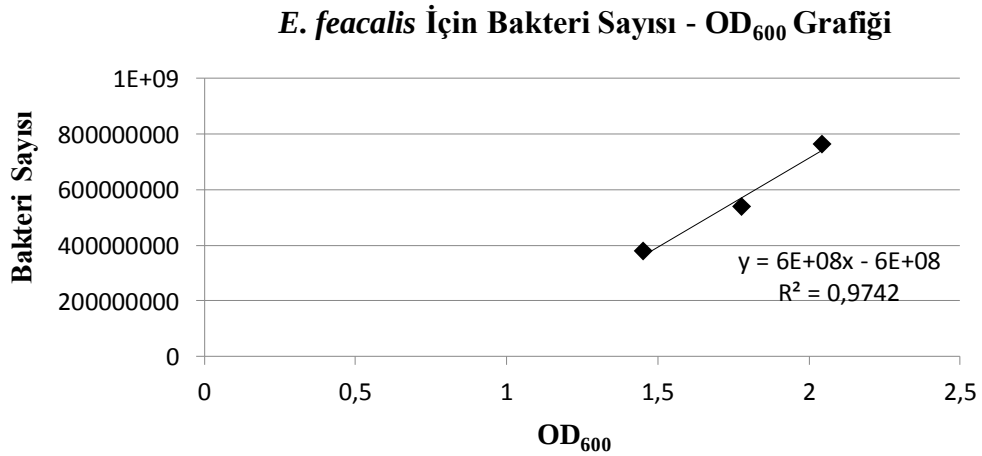
Şekil 4.1.6. *S. pyogenes* için bakteri sayısı-OD₆₀₀ grafiği



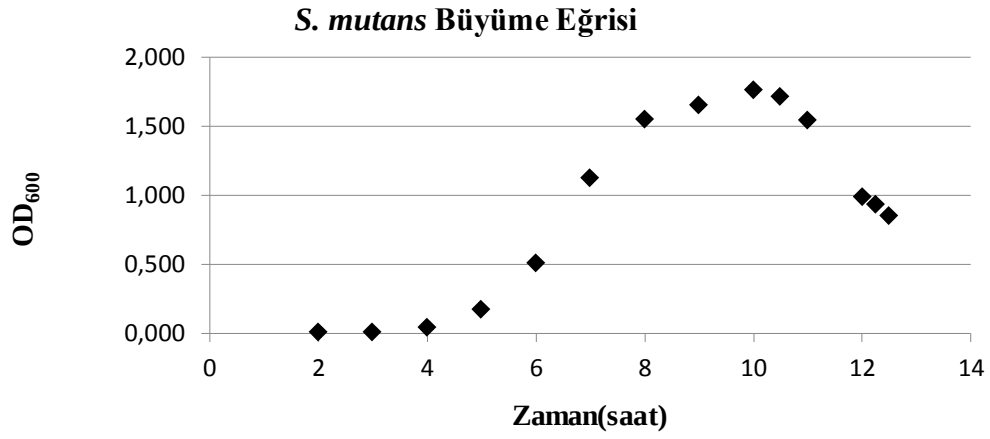
Şekil 4.1.7. *E. feacalis*'e ait büyüme eğrisi



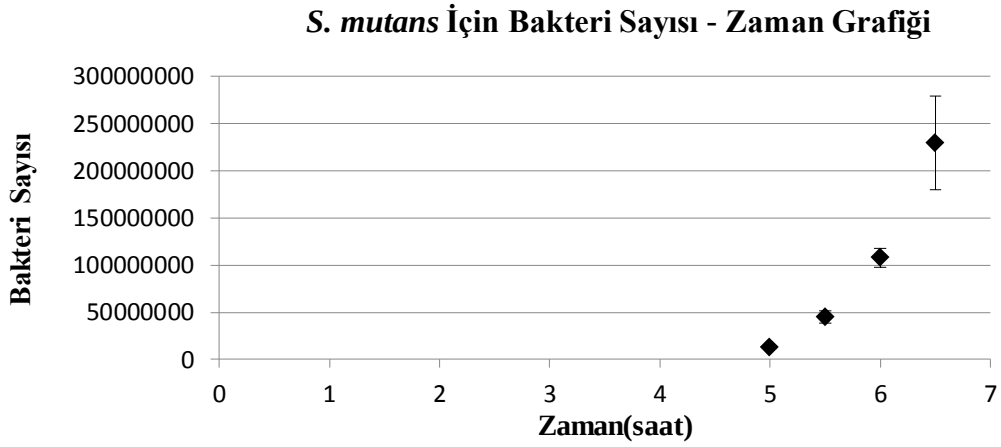
Şekil 4.1.8. *E. feacalis* için bakteri sayısı-zaman grafiği



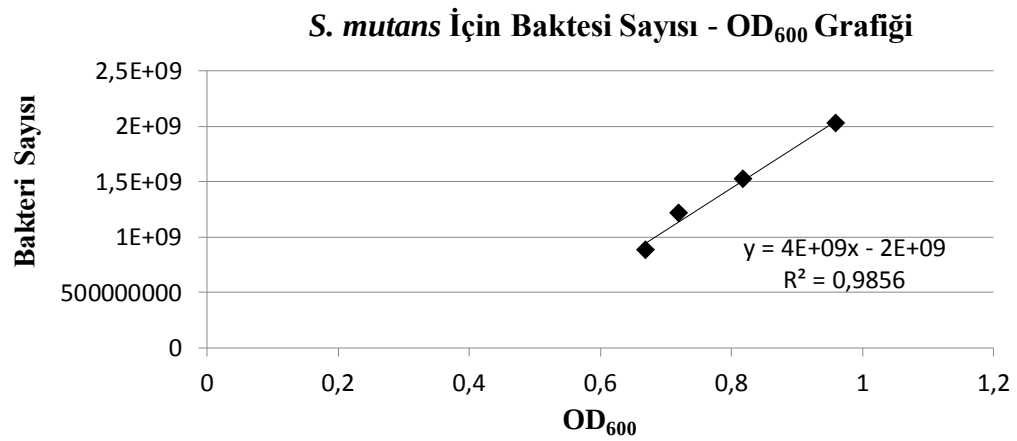
Şekil 4.1.9. *E. feacalis* için bakteri sayısı-OD₆₀₀ grafiği



Şekil 4.1.10. *S. mutans*'a ait büyüme eğrisi



Şekil 4.1.11. *S. mutans* için bakteri sayısı-zaman grafiği



Şekil 4.1.12. *S. mutans* için bakteri sayısı-OD₆₀₀ grafiği

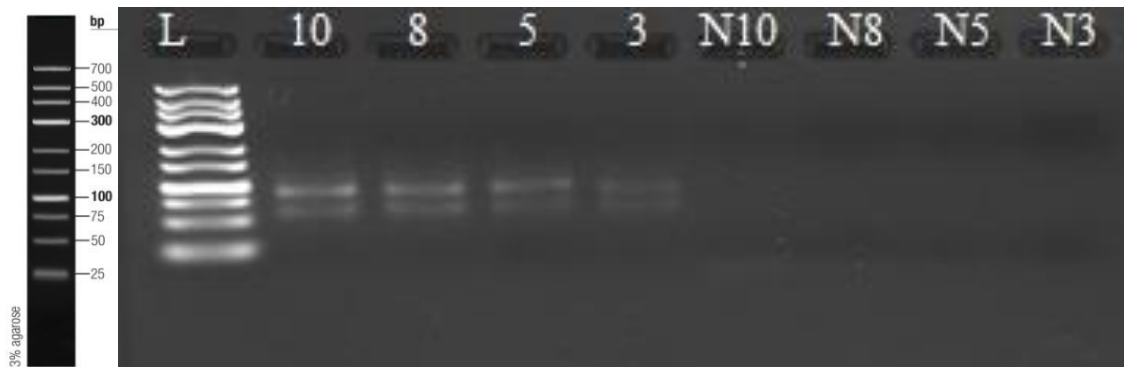
4.2. PZR Optimizasyonu

Optimizasyon için öncelikle primer bağlanma sıcaklığının ne olacağına karar vermek için Çizelge 3.2.3.1’de verilen bileşenler kullanılarak gradiyent PZR yapılmıştır. Primer bağlanma sıcaklıkları olarak 65-64,5-63,4-61,5-59,3-57,4-56,1-55,5°C’leri kullanılmış ve istenilen bandın en parlak olduğu aynı zamanda istenmeyen yan ürünlerin az olduğu 59,5°C T_m sıcaklığı olarak seçilmiştir (Şekil 4.2.1).



Şekil 4.2.1. T_m optimizasyonu jel görüntüsü

Primer optimizasyonu için Çizelge 3.2.3.2’de verilen PZR şartlarında 3 μ M, 5 μ M, 8 μ M, 10 μ M konsantrasyonları denenmiştir. Şekil 4.2.2’de görüldüğü üzere en iyi bant parlaklığı 10 μ M’da sağlandığı için bir sonraki PZR’larda kullanılmak üzere bu konsantrasyon seçilmiştir.



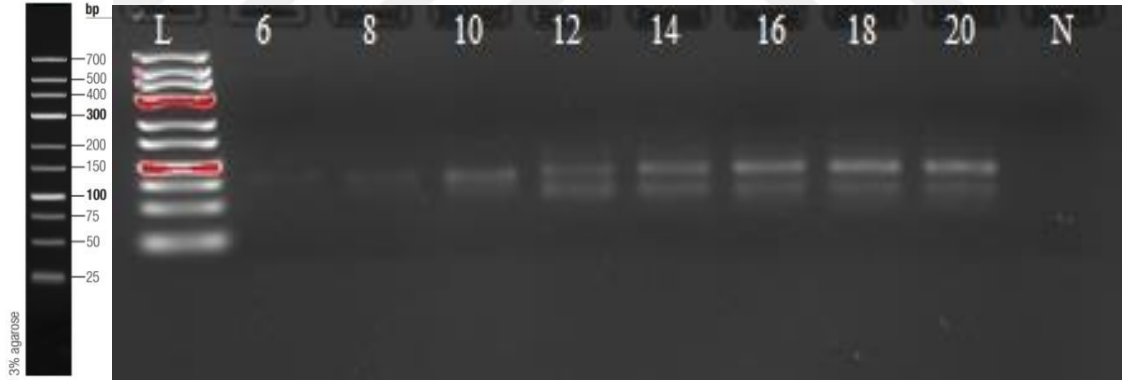
Şekil 4.2.2. Primer optimizasyonu jel görüntüsü

Optimize edilen primer konsantrasyonu ve T_m sıcaklığı kullanılarak farklı konsantrasyonlarda $MgCl_2$ ile Çizelge 3.2.3.3'deki şartlar sağlanarak PZR yapılmıştır. Yapılan PZR ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra kullanılan konsantrasyonların en yükseği seçilerek optimizasyona devam edilmiştir (Şekil 4.2.3).



Şekil 4.2.3. $MgCl_2$ optimizasyonu jel görüntüsü

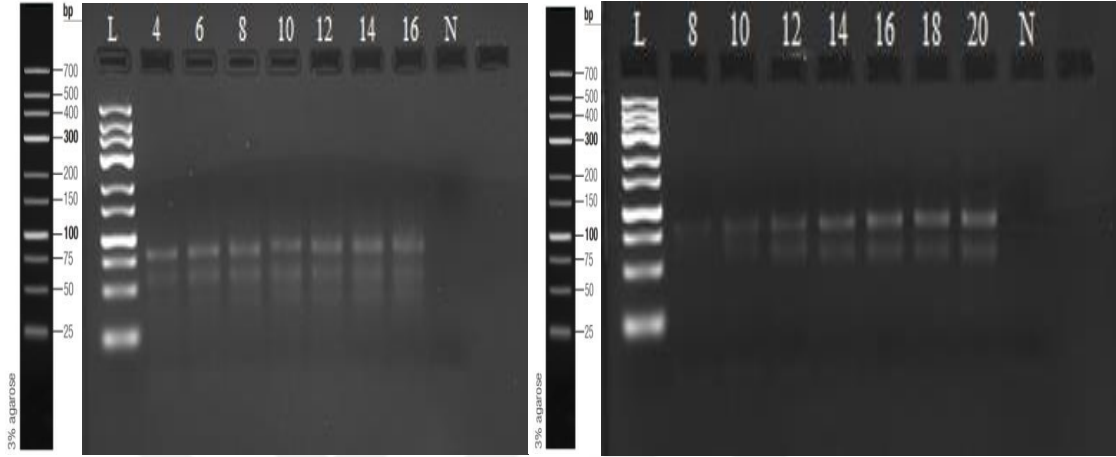
T_m , primer, $MgCl_2$ optimizasyonu yapıldıktan sonra, bu optimizasyonlarda tespit edilen en iyi şartlar ve Çizelge 3.2.3.4'de gösteriler PZR şartları kullanılarak döngü optimizasyonu yapılmıştır.



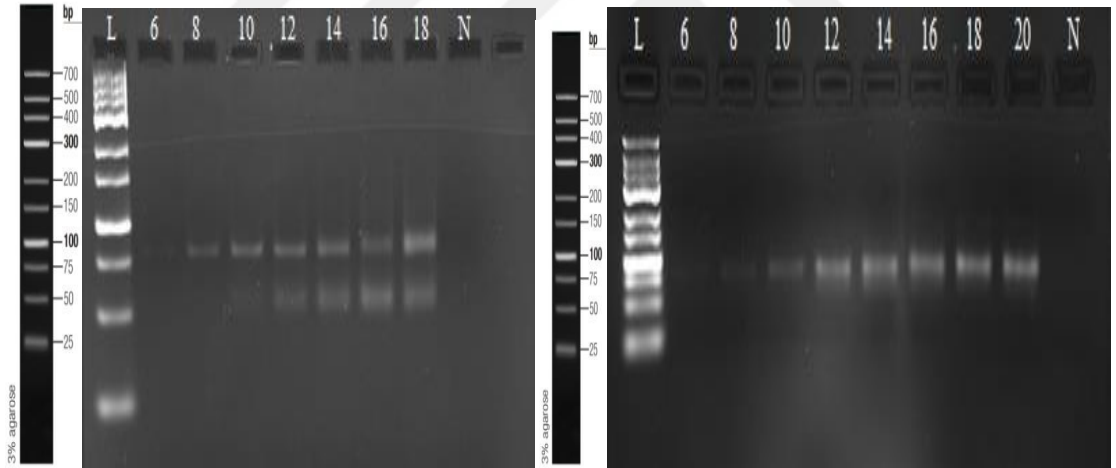
Şekil 4.2.4. Döngü optimizasyonu jel görüntüsü

4.3. SELEX Turları

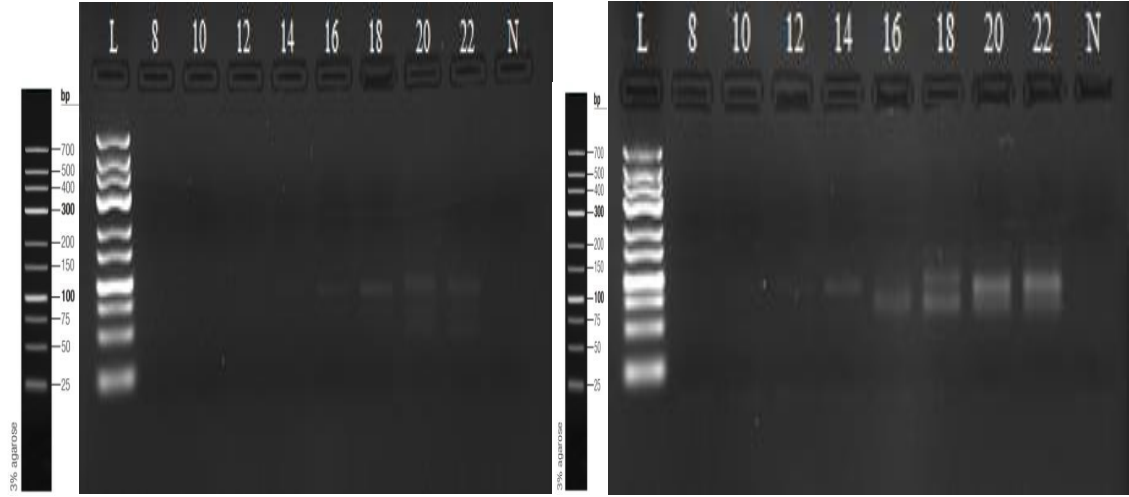
SELEX turlarında kullanılacak en uygun döngü sayısını belirlemek amacıyla her SELEX sonunda o tura ait döngü optimizasyonu yapılmıştır.



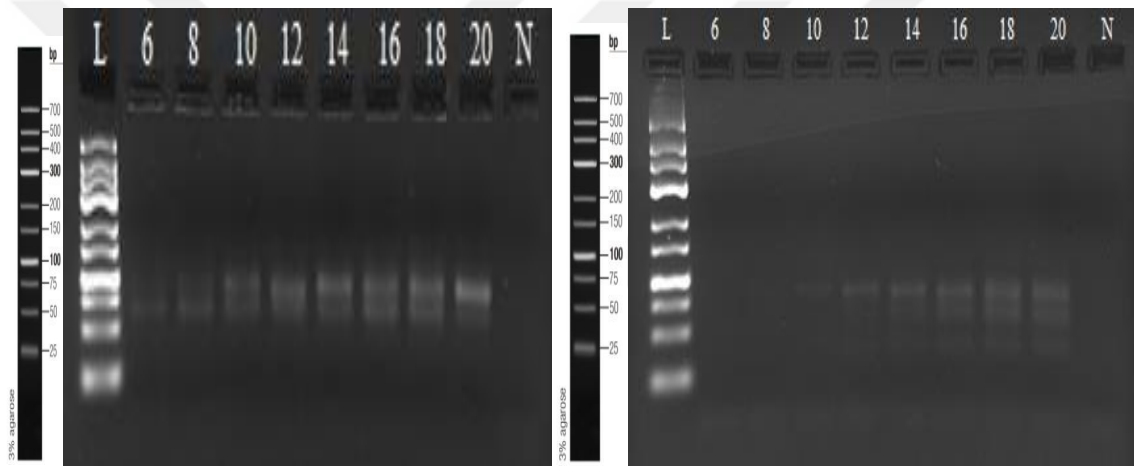
Şekil 4.3.1. SELEX 1 ve SELEX 2 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri



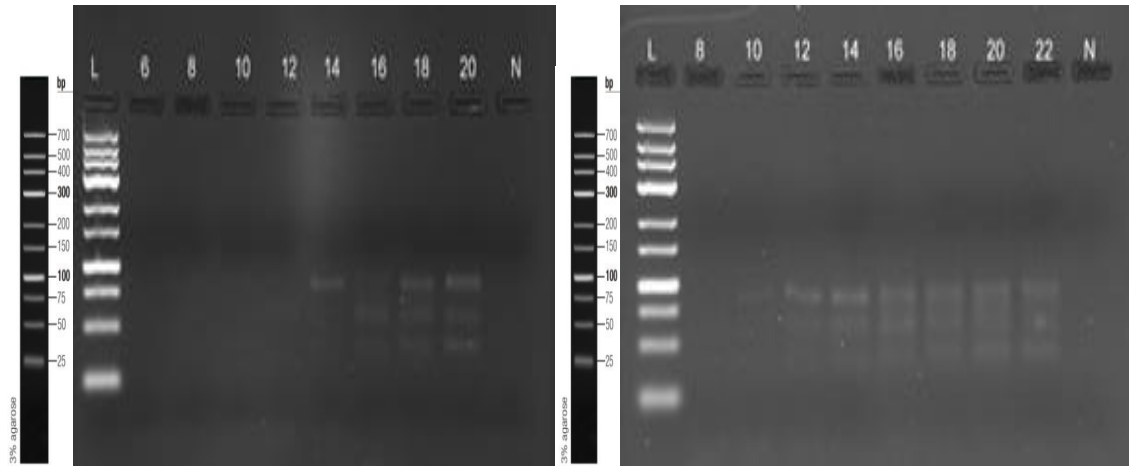
Şekil 4.3.2. SELEX 3 ve SELEX 4 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri



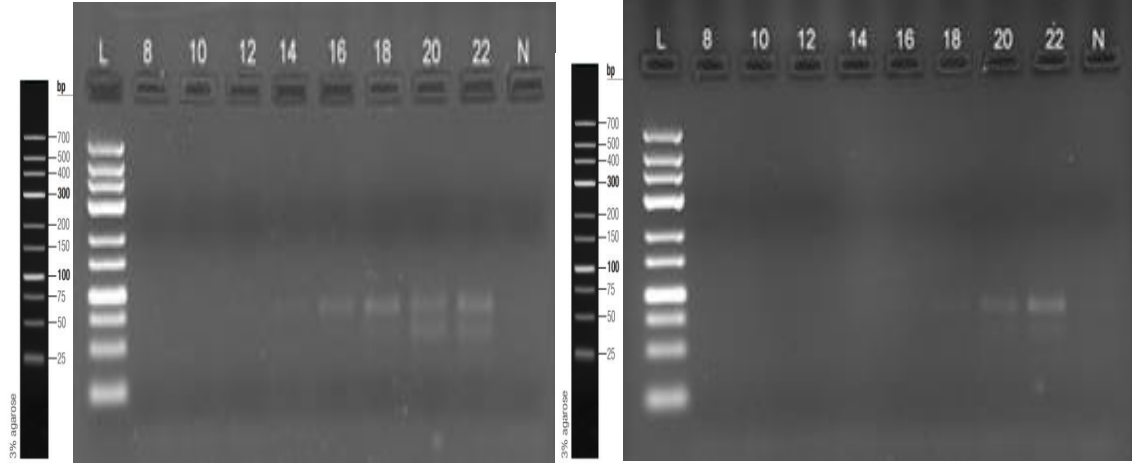
Şekil 4.3.3. SELEX 5 ve SELEX 6 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri



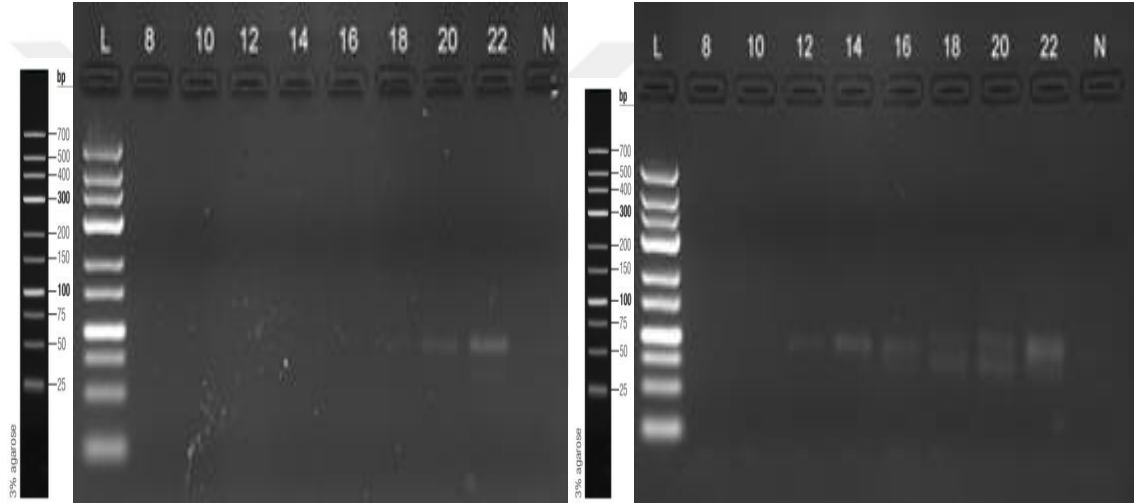
Şekil 4.3.4. SELEX 7 ve SELEX 8 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri



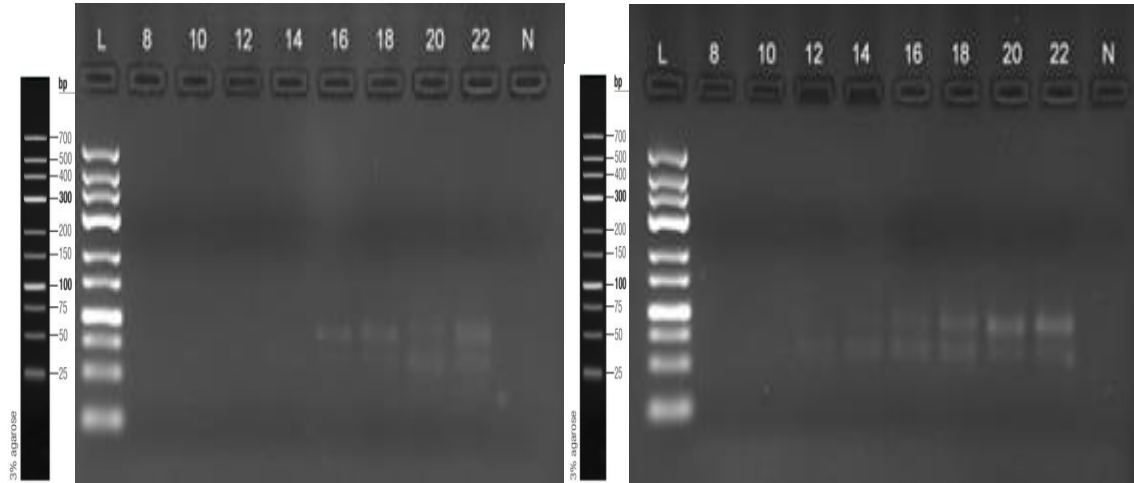
Şekil 4.3.5. SELEX 9 ve SELEX 10 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri



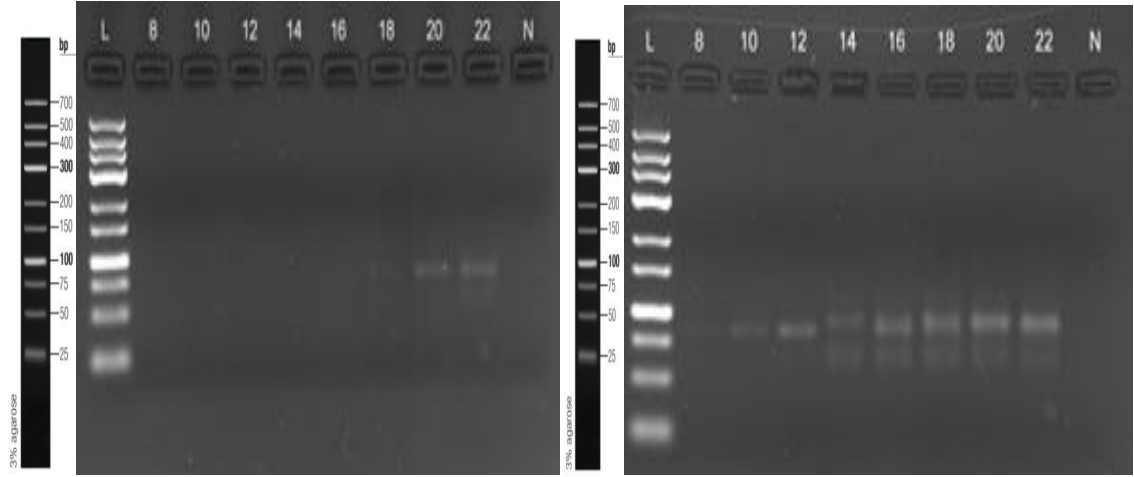
Şekil 4.3.6. SELEX 11 ve SELEX 12 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri



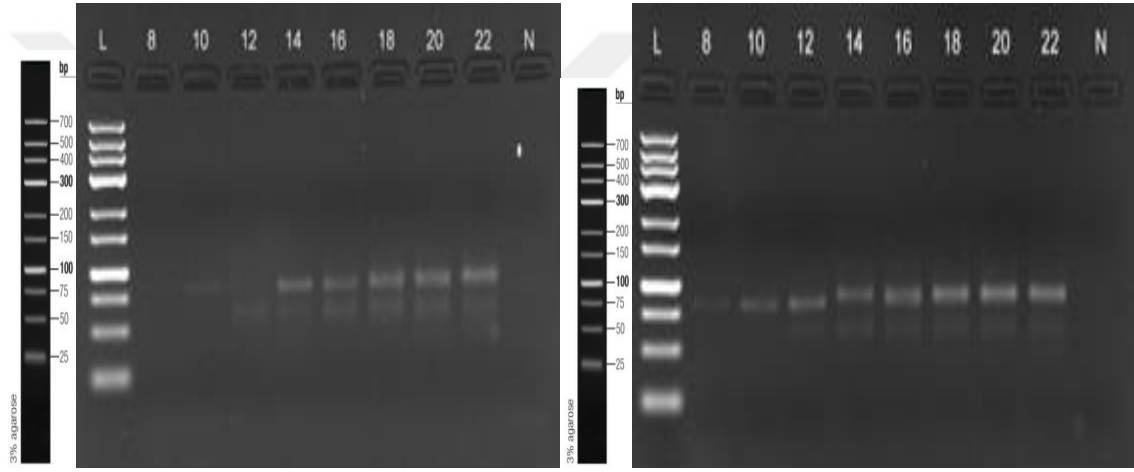
Şekil 4.3.7. SELEX 13 ve SELEX 14 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri



Şekil 4.3.8. SELEX 15 ve SELEX 16 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri



Şekil 4.3.9. SELEX 17 ve SELEX 18 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri



Şekil 4.3.10. SELEX 19 ve SELEX 20 için yapılan PZR döngü optimizasyonu jel görüntüleri

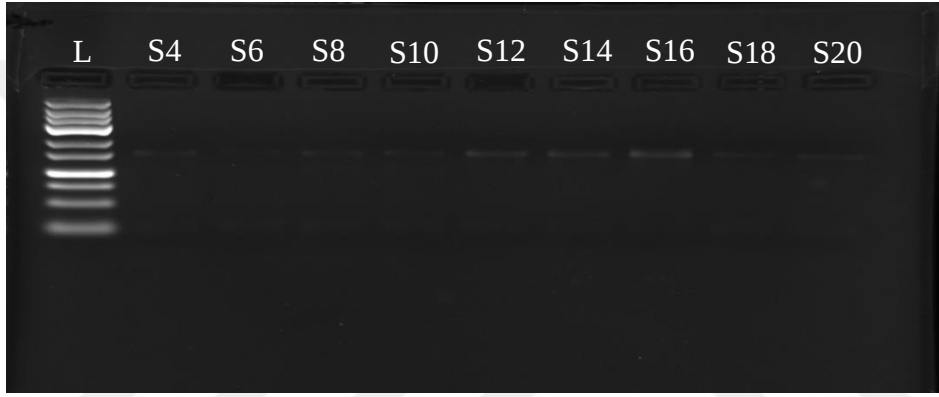
Çizelge 4.3.1. SELEX turlarında seçilen optimum PZR döngü sayıları

SELEX Turları	Seçilen PZR Döngü Sayısı
1	6
2	8
3	8
4	12
5	17
6	12
7	14
8	12
9	14
10	12
11	16
12	18
13	20
14	14
15	16
16	20
17	20
18	12
19	10
20	10

SELEX’lerde yapılan döngü optimizasyonlarında seçilen en uygun döngü sayıları Çizelge 4.3.1’de gösterilmiştir.

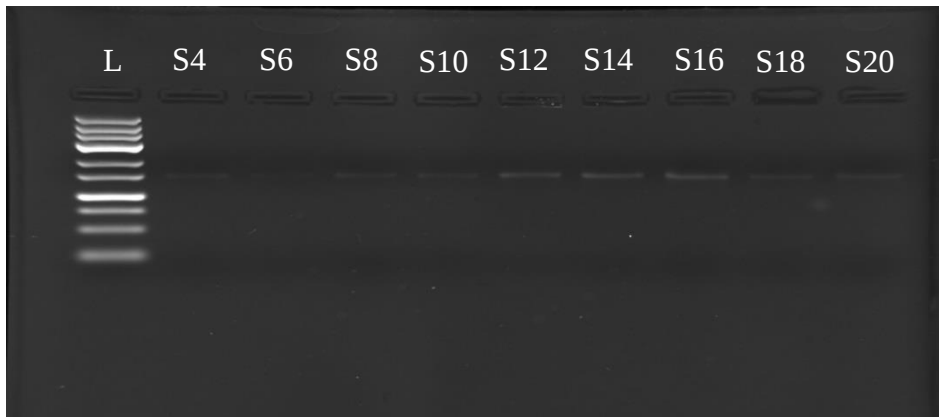
4.4. Dizileme ve Biyoinformatik Analizler

SELEX sonunda 20 turluk SELEX 1'den 2., 4., 6., 8., 10., 12., 14., 16., 18. ve 20. turlar ve 10 turluk SELEX 2'den 8., 9. ve 10. turlar seçilerek yöntem bölümünde belirtilen ampikon primerleri ile çoğaltılmıştır. Ampikon PZR sonucu SELEX dizilerine ek olarak 67 bç eklenmiş olması gerekmektedir. Kullanılan 80 bazlık kütüphanelerin 67 bazlık primer eklentisi sonucu 147 bç'lik bir bant vermesi beklenmektedir Şekil 4.4.1'de SELEX 1 DNA havuzlarının ampikon PZR sonuçları beklenen bant büyüklüğünde görülmektedir.



Şekil 4.4.1. SELEX 1 DNA havuzlarının ampikon PZR sonuçları

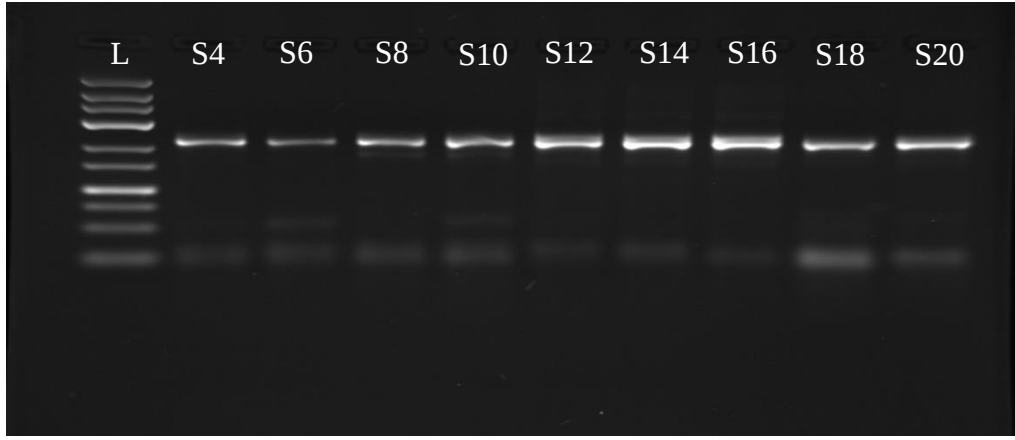
Elde edilen amplicon PZR ürünleri AmpureXP Beads kullanılarak primerlerden temizlenmiş ve agaroz jel elektroforez yöntemi ile görüntülenmiştir (Şekil 4.4.2).



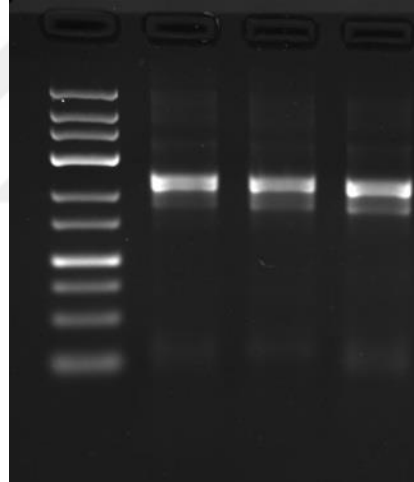
Şekil 4.4.2. SELEX 1 DNA havuzlarını ampikon PZR ürünlerinin AmpureXP bead ile temizlenmesi sonrası jel görüntüsü

Elde edilen temizlenmiş amplicon PZR ürünleri farklı varyasyonlarda indeks primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. İndeks PZR sonucunda 216 bç'lik bir ürün beklenmektedir. Şekil 4.4.3 ve Şekil 4.4.4'de SELEX 1 ve 2 indeks PZR ürünlerinin agaroz jel

elektroforez sonuçları beklenen büyüklükte görülmektedir.

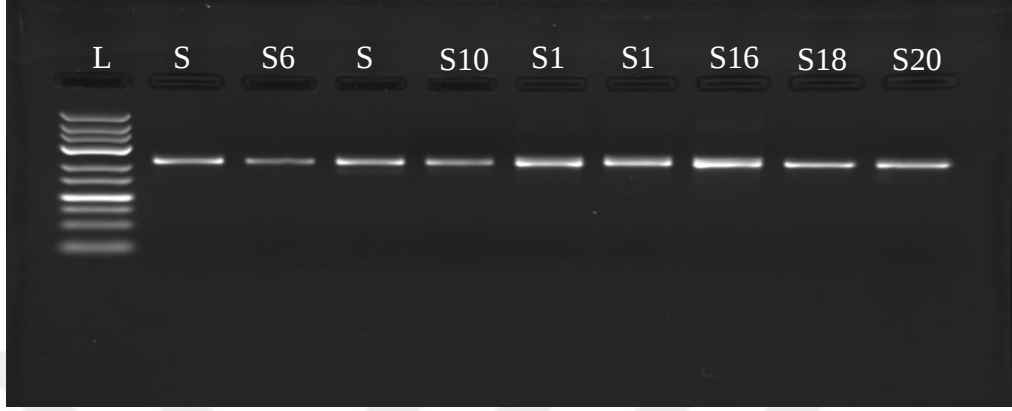


Şekil 4.4.3. SELEX 1 DNA havuzlarının indeks PZR ürünleri

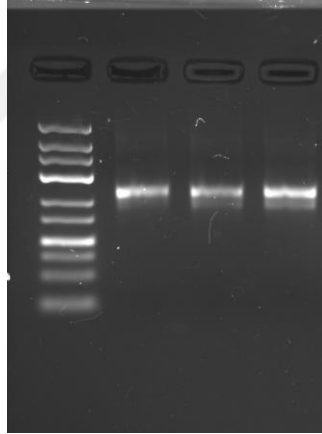


Şekil 4.4.4. SELEX 2 DNA havuzlarının indeks PZR ürünleri

Elde edilen indeks PZR ürünleri AmpureXP Beads kullanılarak temizlenmiş ve tekrar agaroz jel elektroforezde gözlemlenmiştir (Şekil 4.4.5, Şekil 4.4.6).



Şekil 4.4.5. SELEX 1 DNA havuzlarını indeks PZR ürünlerinin AmpureXP bead ile temizlenmesi sonrası jel görüntüsü



Şekil 4.4.6. SELEX 2 DNA havuzlarını indeks PZR ürünlerinin AmpureXP bead ile temizlenmesi sonrası jel görüntüsü

Çizelge 4.4.1. İndeks PZR ürünlerinin Qubit sonuçları ve konsantrasyonları

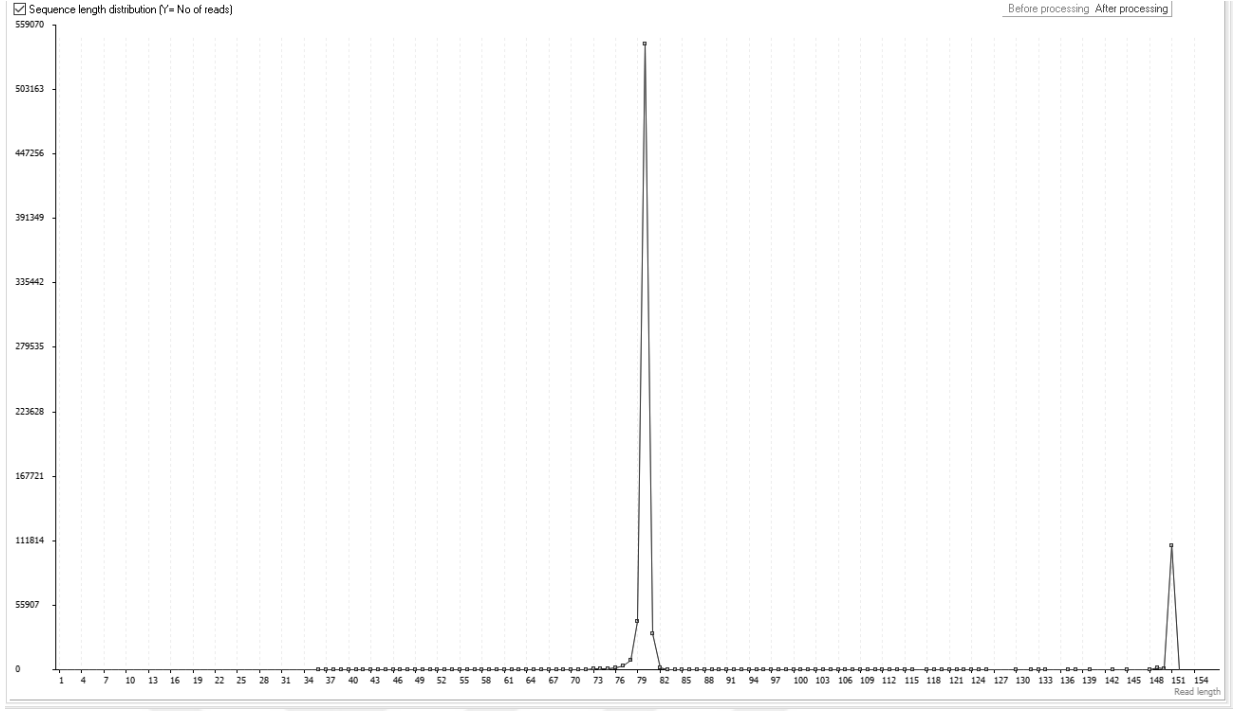
SELEX	TUR	Assay Konsantasyonu (ng/mL)	Stok Konsantrasyonu (ng/mL)	Stok Konsantrasyonu (ng/μL)	Konsantrasyon (nM)
SELEX 1	4	160,00	10667	10,67	75
SELEX 1	6	90,50	603	6,03	42
SELEX 1	8	182,00	12133	12,13	85
SELEX 1	10	137,00	9133	9,13	64
SELEX 1	12	221,00	14733	14,73	103
SELEX 1	14	220,00	14667	4,67	103
SELEX 1	16	244,00	16267	16,27	114
SELEX 1	18	164,00	10933	10,93	77
SELEX 1	20	174,00	11600	11,60	81
SELEX 2	8	223,00	14867	14,87	104
SELEX 2	9	232,00	15467	15,47	108
SELEX 2	10	235,00	15667	15,67	110

Çizelge 4.4.2. Dizileme sonrası elde edilen okuma sayıları

SELEX	TUR	Okunan Dizi Sayısı
SELEX 1	4	552553
SELEX 1	6	699190
SELEX 1	8	720912
SELEX 1	10	806457
SELEX 1	12	771550
SELEX 1	14	725854
SELEX 1	16	833268
SELEX 1	18	701985
SELEX 1	20	746060
SELEX 2	8	1406076
SELEX 2	9	908225
SELEX 2	10	1410689
Toplam		10282819

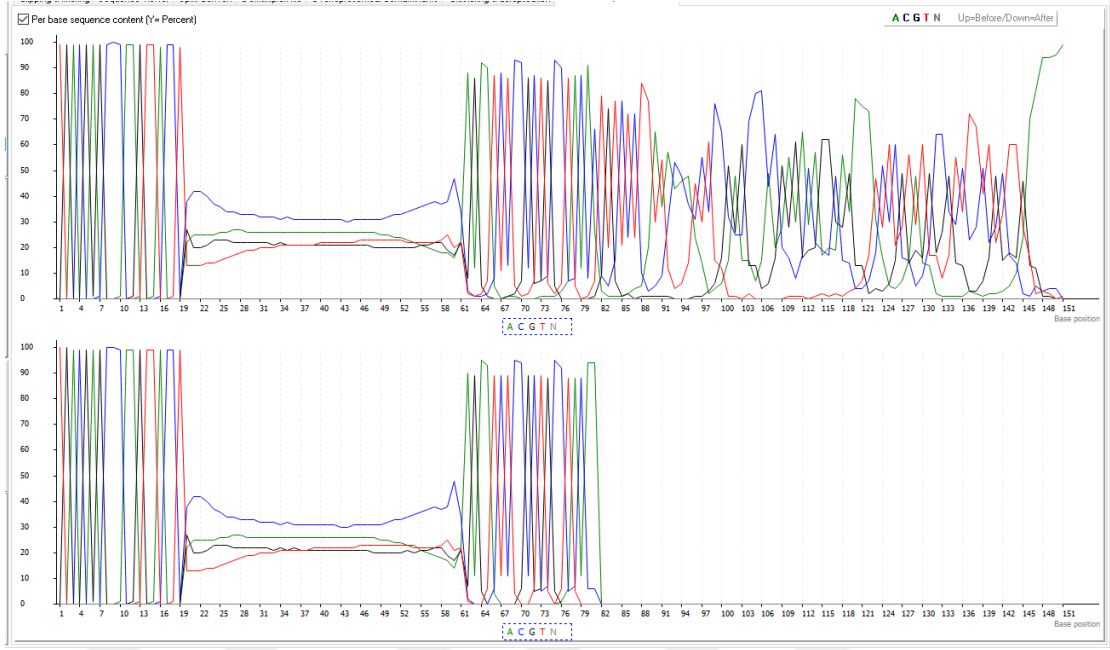
Yapılan dizileme sonucunda kalite filtresinin üstüne geçen okuma sayısı turlar arasında yaklaşık 500 bin ile 1 milyon 400 bin arasında değişmektedir. Her tur için okunan dizi sayısı detaylarına Çizelge 4.4.2’den ulaşılabilir. Dizileme sonucunda kalite skorları yüksek, toplam 10 milyon 282 bin 819 farklı dizi elde edilmiştir. Her bir dizi yaklaşık 80 bç olması sebebi ile yaklaşık 800 milyon baz okuması gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen dizileme sonuçlarının öncelikle kalite kontrolleri yapılmış adaptör dizileri kesilmiş ve oluşan DNA havuzlarında bulunan dizilerinin okuma uzunluklarına göre dağılım grafikleri oluşturulmuştur. Şekil 4.4.7’de 20. tur SELEX’den elde edilmiş DNA dizilerinin uzunluk dağılımı bulunmaktadır. Beklenildiği gibi dizilerin çok büyük bir kısmını kütüphane uzunluğumuz olan 80 bç uzunluğundadır. 20. tur SELEX’in dizilenmesinden elde edilen 740060 diziden 79 ila 81bç arasında uzunluğa sahip olanların sayısı 616370 olarak belirlenmiştir. 150 bç uzunluğunda bulunan ikinci yoğunlaşmanın bu boyuttaki dizilerin incelenmesi sonucunda ufak baz farklılıkları sebebi ile biyoinformatik programı tarafından tanınmayıp kesilemeyen adaptör dizilerin sahip olduğu belirlenmiştir. Analizi yapılan bütün DNA havuzlarında 80bç’lik dizi uzunluklarının toplam dizi sayısının %80’ninden fazlasını oluşturması dizileme için örnek hazırlama ve dizileme esnasında bir problem oluşmadığını göstermektedir.



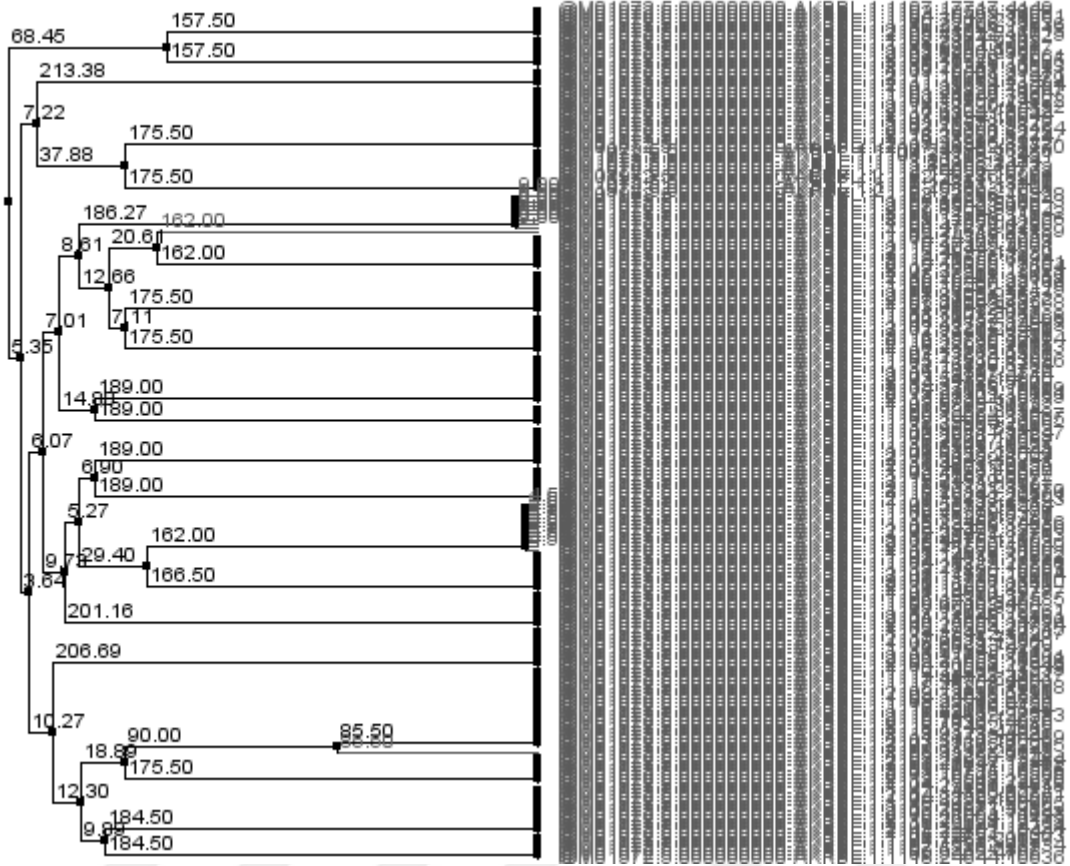
Şekil 4.4.7. SELEX 1, 20. Turda bulunan dizi uzunluk dağılımı

Yapılan baz dağılımı analizinde (Şekil 4.4.7) ilk 1-19 ve 62-80 arası bazların her bir dizide aynı olduğu ortada bulunan 20-61 baz arası bölgenin ise sitozin ağırlıklı olmak üzere 4 bazın farklı dağılımlarını içerdiği gözlemlenmektedir. Bu veriler kütüphanenin primer bölgeleri ve 42N'den oluşan rastgele sentezlenmiş bölgelerinin doğru dizilendiğini göstermektedir.

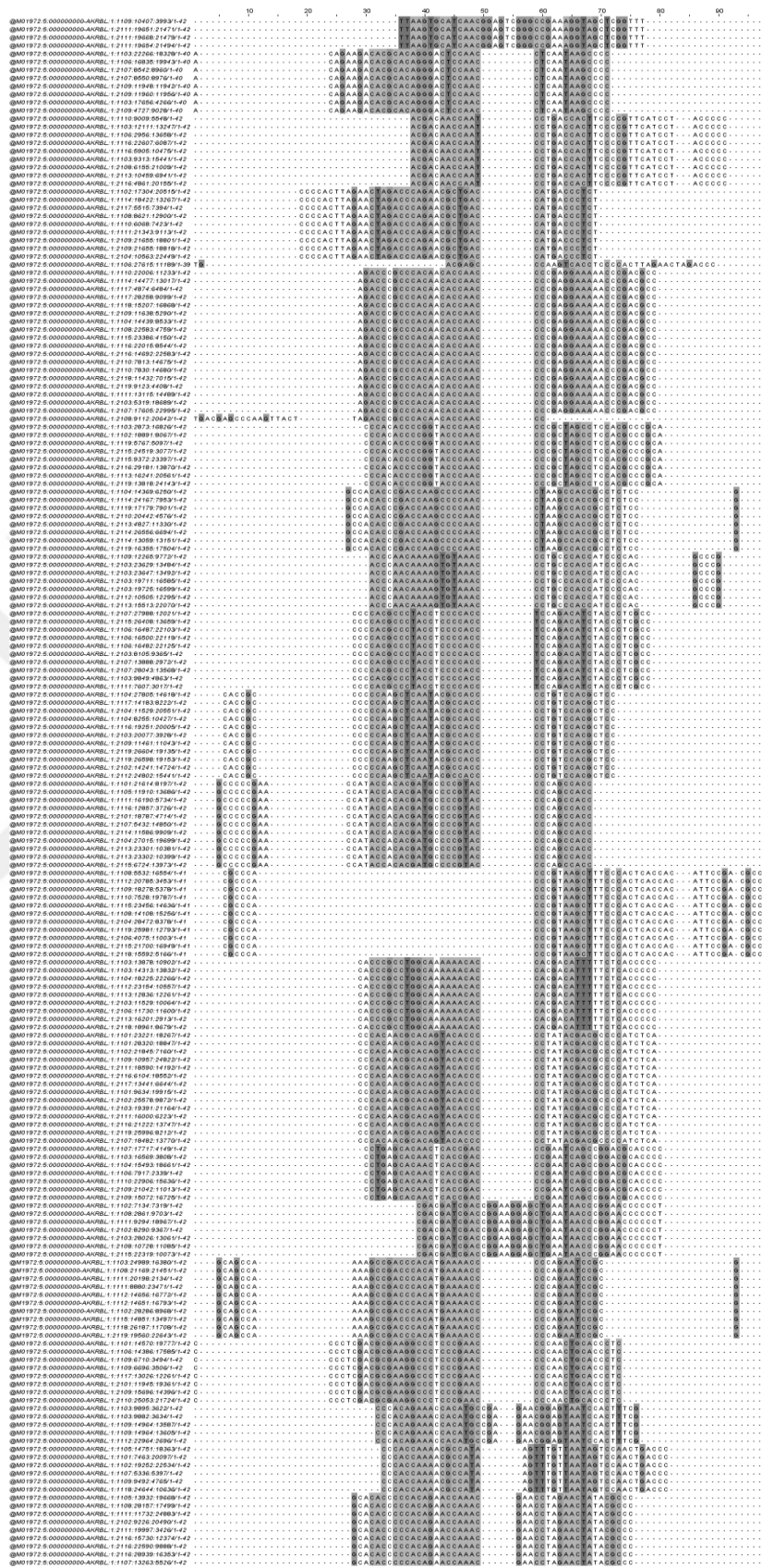


Şekil 4.4.8. SELEX 1, 20. turun baz dağılım grafiği (a:ham data, b: 79-81 baz uzunluğunda olan diziler)

Öncelikli olarak MAFFT programı DNA havuzlarının bütününde kullanılarak alignment yapılmaya çalışılmış fakat veri sayısının fazlalığından dolayı oluşan alignment ve ağaç anlaşılabilir karmaşıklıkta ve büyüklükte olmuştur. Verinin daha anlaşılabilir olması için yalnız over-represented datanın BLAST ve ağaç oluşturmada kullanılmasına karar verilmiştir. Şekil 4.4.10'da 20. tur SELEX'in overrepresented dizilerin 200 adedi fastq dosyasından ayıklanmış fasta formatına çevrilmiş ve MAFFT ile alignmentı yapılmış ve ağacı oluşturulmuştur (Şekil 4.4.9). Her ne kadar alignmentta renklendirme ile benzer ve aynı diziler bu şekil ile gözlemlenebilse ve oluşturulan ağaçta gruplaşan diziler belli olsa da verilerin daha net anlaşılabilmesi ve sunulabilmesi için over-represented diziler bir sonraki paragrafta açıklandığı şekilde tekrar düzenlenmiş ve biyoinformatik analizleri bu halleriyle sürdürülmüştür.



Şekil 4.4.9. Seçilen overrepresented dizilerin filogenetik ağacı

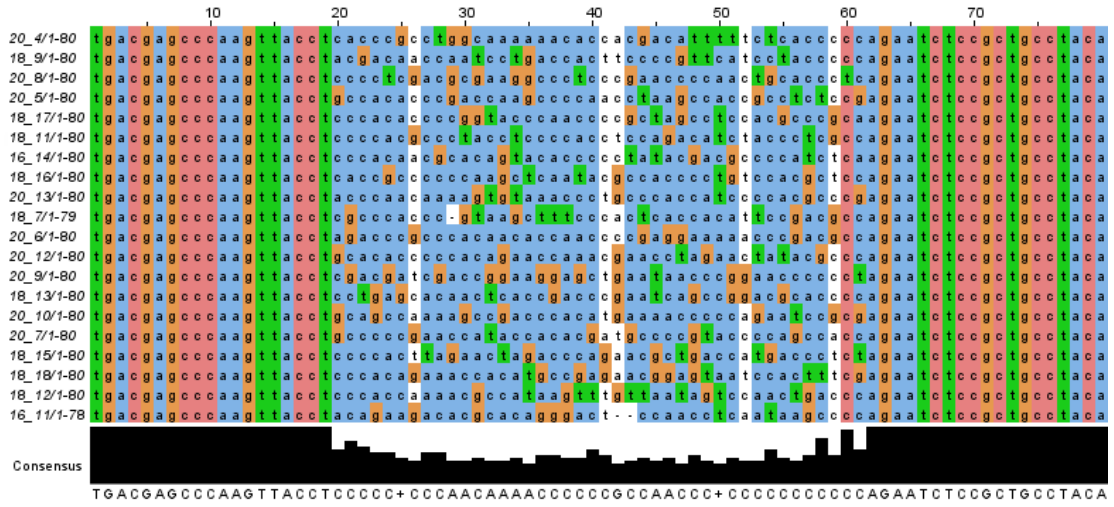


Şekil 10. Seçilen overrepresented dizilerin MAFFT alignmentları

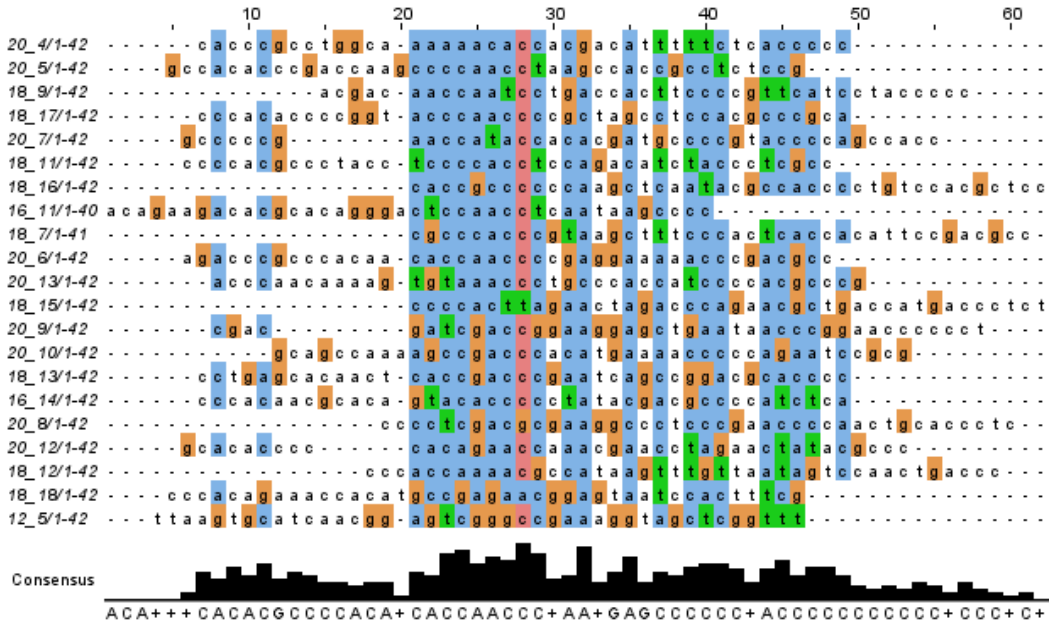
Her bir DNA havuzunun analizi yapılarak over-represented diziler oluşturulmuştur. Her havuzda oluşan bu çok tekrarlı diziler son tur olan 20. turdan başlayarak en çok tekrar edenleri sırayla 20_1, 20_2 vb. şekilde isimlendirilmiş ve sonrasında primer dimer vb. diziler elemine edilmiştir. Bütün diziler arasında en çok tekrarlayan 20 dizi seçilerek aday aptamer listesi oluşturulmuştur. Aşağıda aday aptamerlerin primer bölgesi içermeyen dizi bilgileri fasta formatında bulunmaktadır.

```
>20_4 CACCCGCCTGGCAAAAAACACCACGACATTTTTCTCACCCCC
>20_5 GCCACACCCGACCAAGCCCCAACCTAAGCCACCGCCTCTCCG
>20_6 AGACCCGCCACAACACCAACCCCGAGGAAAAACCCGACGCC
>20_7 GCCCCGAACCATAACCACACGATGCCCCGTACCCAGCCACC
>20_8 CCCCTCGACGCGAAGGCCCTCCCGAACCCCAACTGCACCCTC
>20_9 CGACGATCGACCGGAAGGAGCTGAATAACCCGGAACCCCCCT
>20_10 GCAGCCAAAAGCCGACCCACATGAAAACCCCCAGAATCCGCG
>20_12 GCACACCCCCACAGAACCAAACGAACCTAGAACTATACGCC
>20_13 ACCCAACAAAAGTGTAACCCCTGCCCACCATCCCCACGCCG
>18_7 CGCCCACCCGTAAGCTTTCCCACTCACCACATTCCGACGCC
>18_9 ACGACAACCAATCCTGACCACTTCCCCGTTTCATCCTACCCCC
>18_11 CCCCACGCCCTACCTCCCCACCTCCAGACATCTACCCTCGCC
>18_12 CCCACCAAAACGCCATAAGTTTGTTAATAGTCCAAGTACCC
>18_13 CCTGAGCACAACCTACCGACCCGAATCAGCCGGACGCACCCC
>18_15 CCCCACTTAGAACTAGACCCAGAACGCTGACCATGACCCTCT
>18_16 CACCGCCCCCAAGCTCAATACGCCACCCCTGTCCACGCTCC
>18_17 CCCACACCCCGGTACCCAACCCCGCTAGCCTCCACGCCCGCA
>18_18 CCCACAGAAACCACATGCCGAGAACGGAGTAATCCACTTTTCG
>16_11 ACAGAAGACACGCACAGGGACTCCAACCTCAATAAGCCCC
>16_14 CCCACAACGCACAGTACACCCCTATACGACGCCCATCTCA
```

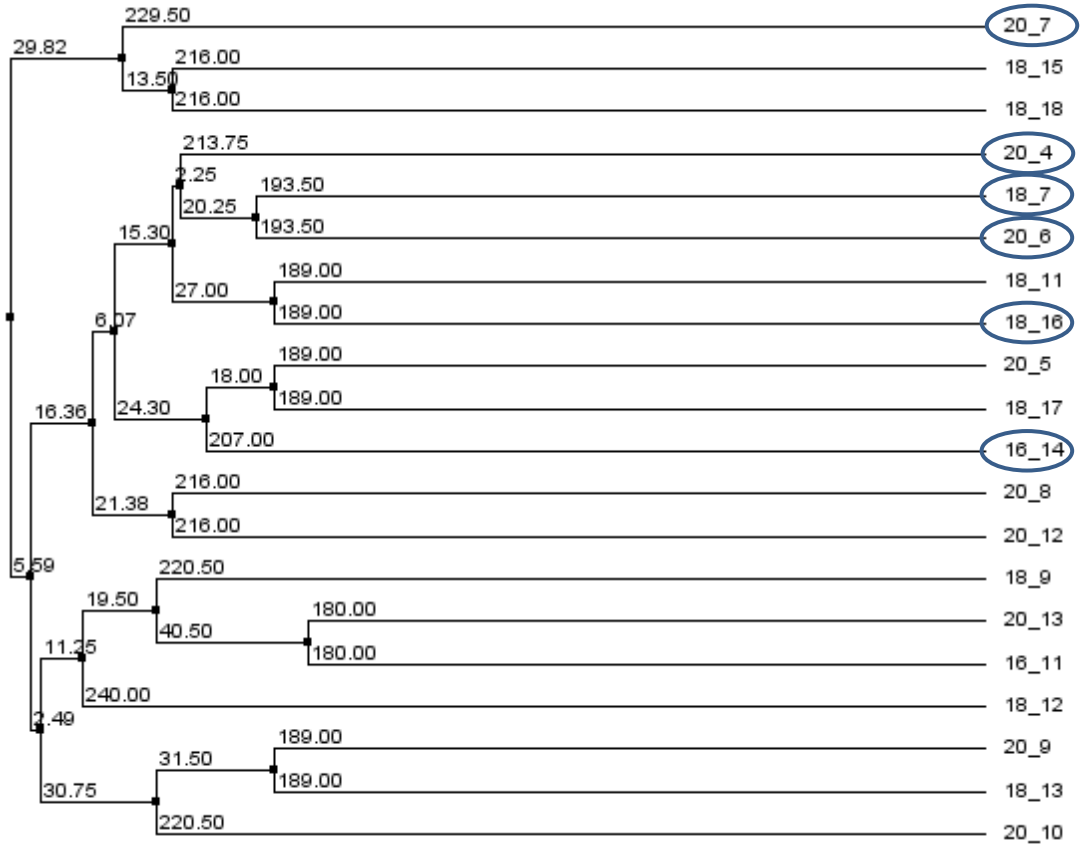
Elde edilen bu diziler öncelikle MAFFT kullanılarak primer bölgeleri ile birlikte alignment yapılmıştır fakat her birinin primer bölgelerinin aynı olması sebebi ile program toplam 38 bazdan oluşan benzerliği göz önünde bulundurarak primerlere göre bir alignment yapmıştır (leave gappy regions opsiyonunun açık bırakılmasına rağmen) (Şekil 4.4.11). Bunun üzerine bu alignmentın kullanılarak filogenetik ağacın oluşturulmasının mantıklı olmadığına karar verilmiş ve alignment yalnız ortada bulunan 42 bazlık bölüm kullanılarak yapılmış ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4.4.12, Şekil 4.4.13).



Şekil 2 AdA aptamerlerin MAFFT alignmentı (primer bölgeleri dahil)

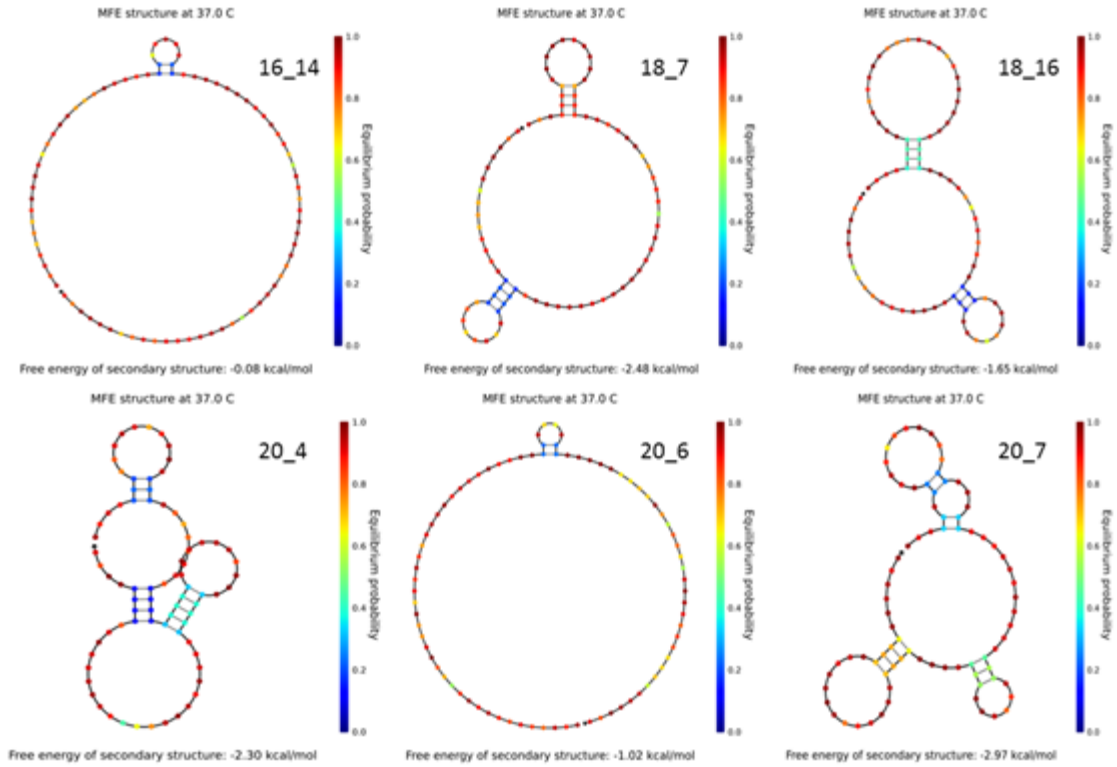


Şekil 3 AdA aptamerlerin MAFFT alignmentı (primer bölgeleri hariç)



Şekil 4.4.13. Aday aptamerlerin filogenetik analizi

Aday aptamerlerden yalnız 3'ünün sentezlenerek denenmesine karar verilmiştir. Seçilen aday dizilerden hangilerinin sentezleneceğinin belirlenebilmesi için öncelikli olarak seçilimin dizilenmiş son 2 turu olan 18 ve 20. turdan en çok tekrar eden 20_4 ve 18_7 nolu aptamer ve bütün havuzlarda tekrar miktarı yüksek olan 20_6, 20_7, 18_16 ve 16_14 isimli adayların 37°C'de almaları beklenen 3 boyutlu tahmini yapıları nupack kullanılarak çizilmiştir (Şekil 4.4.8). Adayların 3 boyutlu şekilleri sayesinde 4°C'de yapılan SELEX'e rağmen 37°C'de de şeklini koruyabilen ve bağlanma afinitesini kaybetmeyen aday aptamerler belirlenmeye çalışılmıştır.



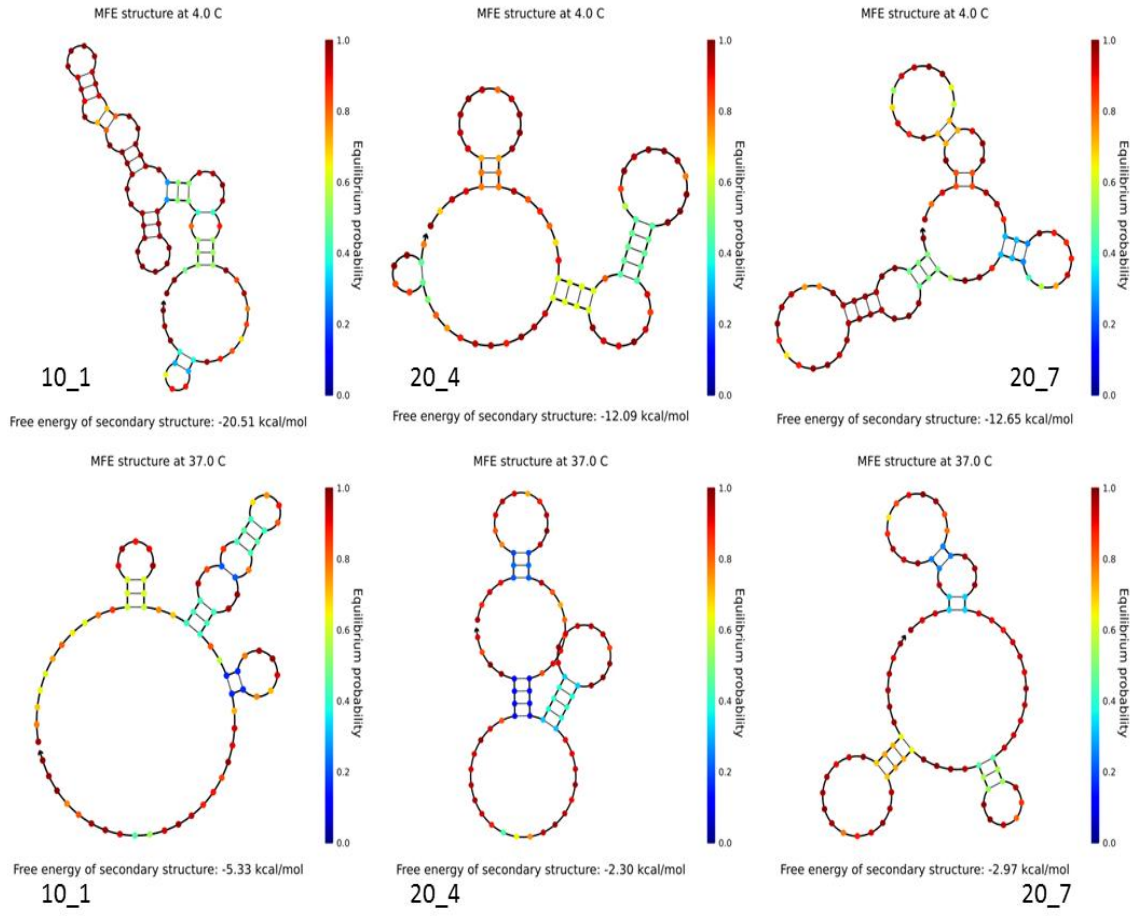
Şekil 4.4.14. Aday aptamerlerin 37°C'de oluşturdukları şekiller

Aday aptamerlerin 3 boyutlu şekilleri, oluşturulan Filogenetik ağaçta farklı kollarda yer alması, alignment verileri değerlendirilerek 20 turluk *S. pneumoniae* SELEX'imizden 20_4 ve 20_7 isimli adaylar sentezlettirilmek üzere seçilmiştir. Sentezlettirilmek için seçilen 3. aday aptamerimiz ise yapılan 10 turluk 2. SELEX'in dizilenen her 3 kütüphanesinde de baskın ve en çok şekilde bulunan ve 10_1 olarak adlandırılan dizi olarak belirlenmiştir. Belirtilen dizilerin 4°C ve 37°C'de oluşturdukları şekiller Şekil 4.4.15 ve Şekil 4.4.16 'da bulunmaktadır.

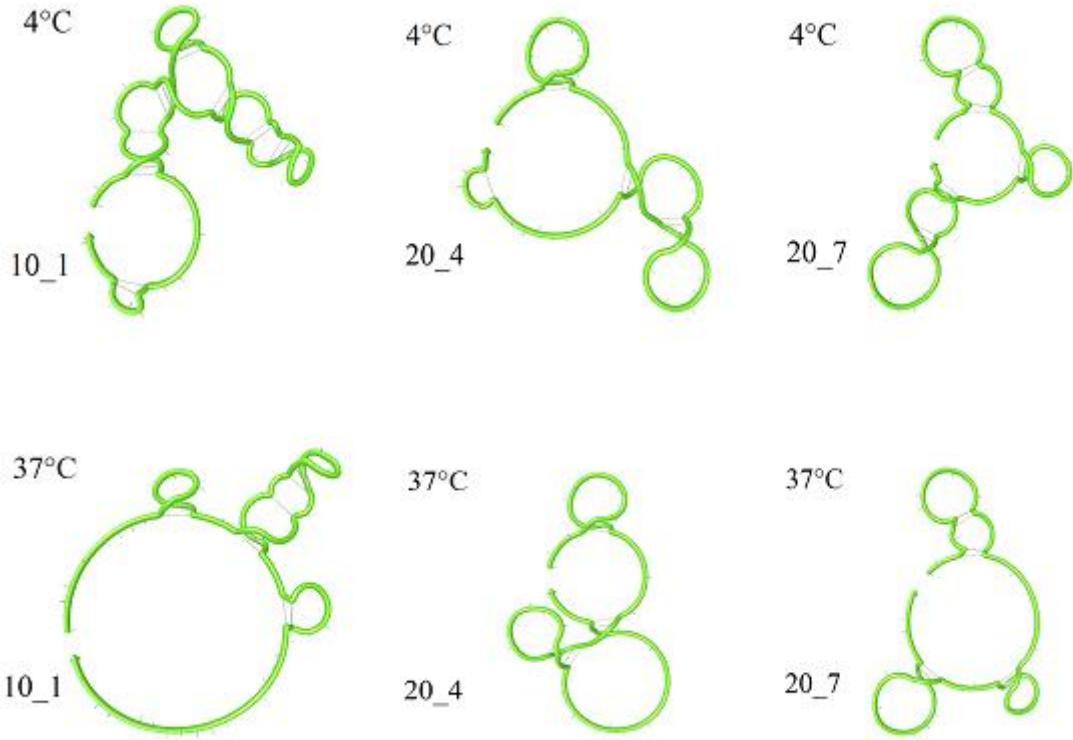
>20_4 TGACGAGCCCAAGTTACCTCACCCGCCTGGCAAAAAACACCACGAC
ATTTTCTCACCCCCAGAATCTCCGCTGCCTACA

>20_7TGACGAGCCCAAGTTACCTGCCCCGAACCATACCACACGATGCCCC
GTACCCCAGCCACCAGAATCTCCGCTGCCTACA

>10_1 AAGGGCTGGCTGGGATGGACCCTCCCGAAACGAGCTGTCTCTTAAC
GGAAGCTAATCTGCCTCACTCCACGGACCCCACT



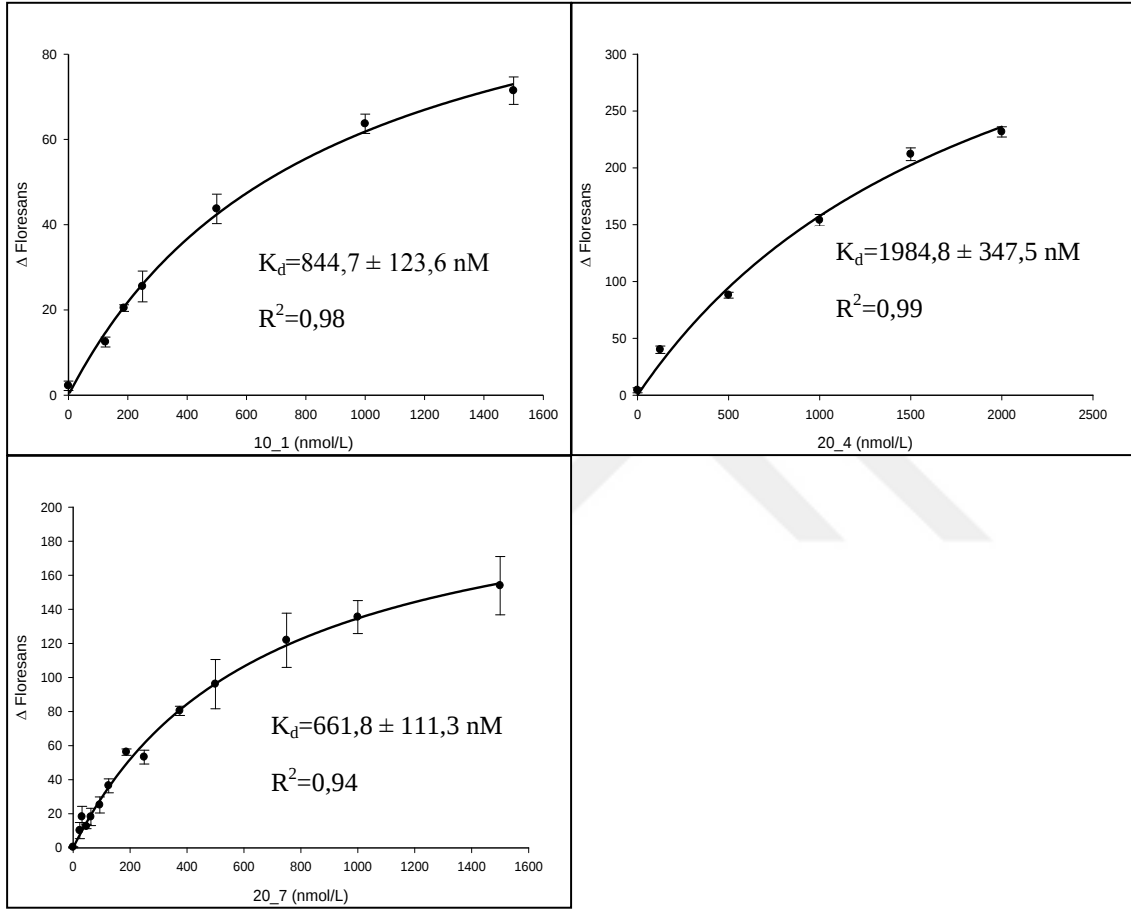
Şekil 4.4.15. Sentezlenen aday aptamerlerin 4 ve 37°C'deki ikincil yapıları



Şekil 4.4.16. Sentezlenen aday aptamerlerin 4 ve 37°C'deki üç boyutlu yapıları

4.5. Bağlanma Afinitesinin Belirlenmesi

Bağlanma afinitesinin (K_d) hesaplanması için her bir mikroorganizma örneğinde floresans yoğunluğuna karşı eklenen aday aptamer konsantrasyonunun grafiği çizilmiştir. Daha sonra lineer olmayan regresyon analizi ile bulduğumuz 3 farklı aptamerin hedef bakterimiz olan *S. pneumoniae*'ya karşı göstermiş olduğu K_d değeri hesaplanmıştır. Elde edilen grafikler ve K_d değerleri Şekil 4.5.1'de verilmiştir.

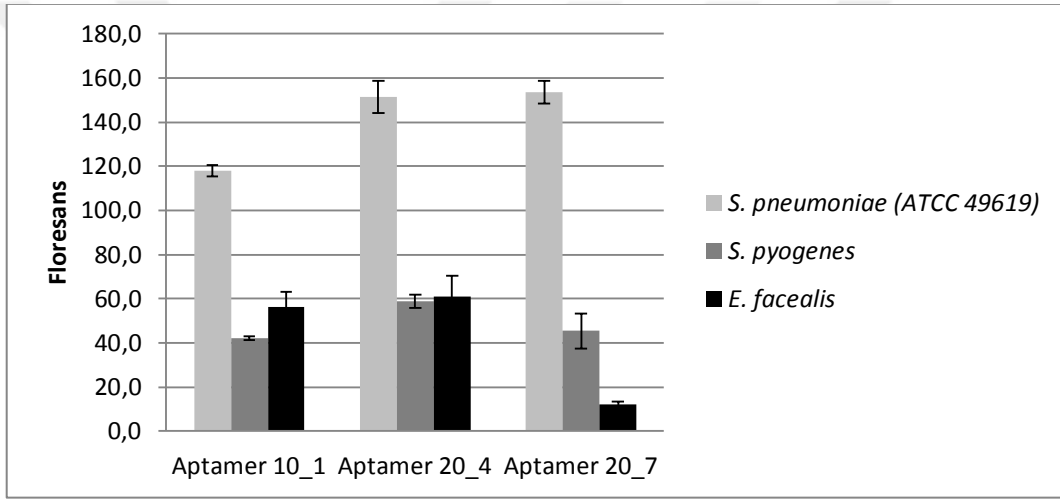


Şekil 4.5.1. 10_1, 20_4 ve 20_7 aptamerlerine ait K_d grafikleri

10_1 aptameri $K_d=844,7\pm123,6$ nM, 20_4 aptameri $K_d=1984,8\pm347,5$ nM, 20_7 aptameri ise $K_d=661,8\pm111,3$ nM'lık bir çözüşüm katsayısıyla hedefi olan *S. pneumoniae*'ya bağlanmaktadır.

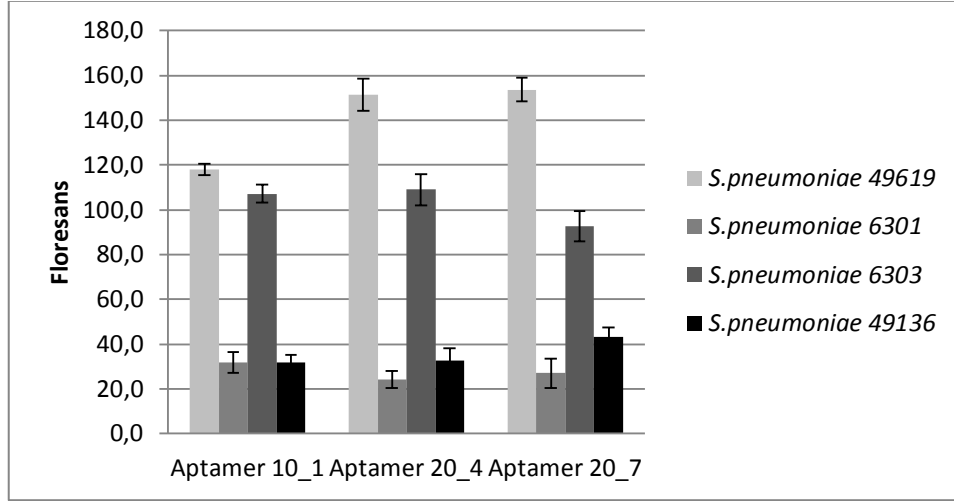
4.6. Aptamerlerin Bağlanma Profilleri

SELEX sonucu seçilen aptamerlerin floresans spektroskopisi kullanılarak farklı mikroorganizmalara ve farklı *S. pneumoniae* suşlarına bağlanma etkinlikleri belirlenmiştir. Bu kapsamda seçilen aptamerlerin hedef *S. pneumoniae*'ya yüksek etkinlikte bağlandığı fakat *S. pyogenes* ve *E. faecalis*'e karşı seçici bir bağlanma göstermediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.6.1). Seçim esnasında kullanılan *S. mutans* bağlanma deneylerinde tampon çözelti ile yıkanmalar sonrasında birleşerek topakçıklar oluşmuş bu da floresans ölçümlerin sağlıklı bir şekilde yapılamamasına sebep olmuştur. Bu sebep dolayısıyla *S. mutans*'a karşı bağlanma etkinliği belirlenememiştir.



Şekil 4.6.1. Aptamerlerin *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* ve *E. faecalis*'e bağlanma etkinlikleri

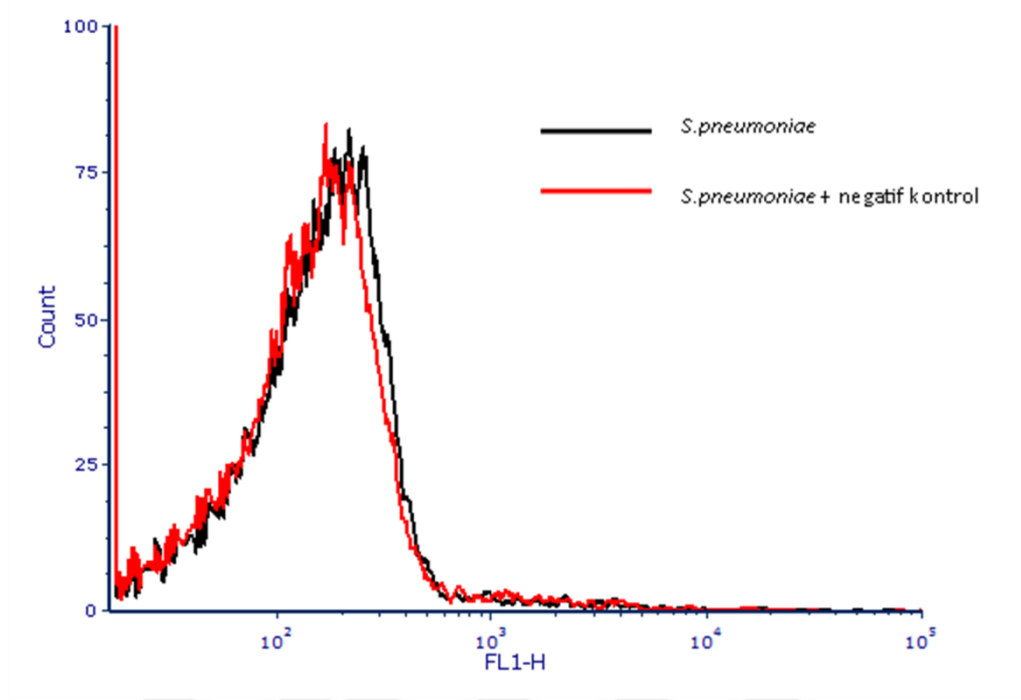
Seçilen aptamerlerin farklı *S. pneumoniae* suşlarına bağlanma etkinliği için farklı 4 serotip denenmiş ve bu bağlamda geliştirilen aptamerlerin ATCC 49619 ve 6303 suşlarına etkin olarak bağlandığı fakat denenilen diğer suşlara karşı seçici bir bağlanmanın olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.6.2). Bu sonuçlar aptamerlerin farklı *S. pneumoniae* suşlarına karşı farklı seçicilikte bağlandığını ve suşa özgü bir karakter sergilediğini göstermektedir.



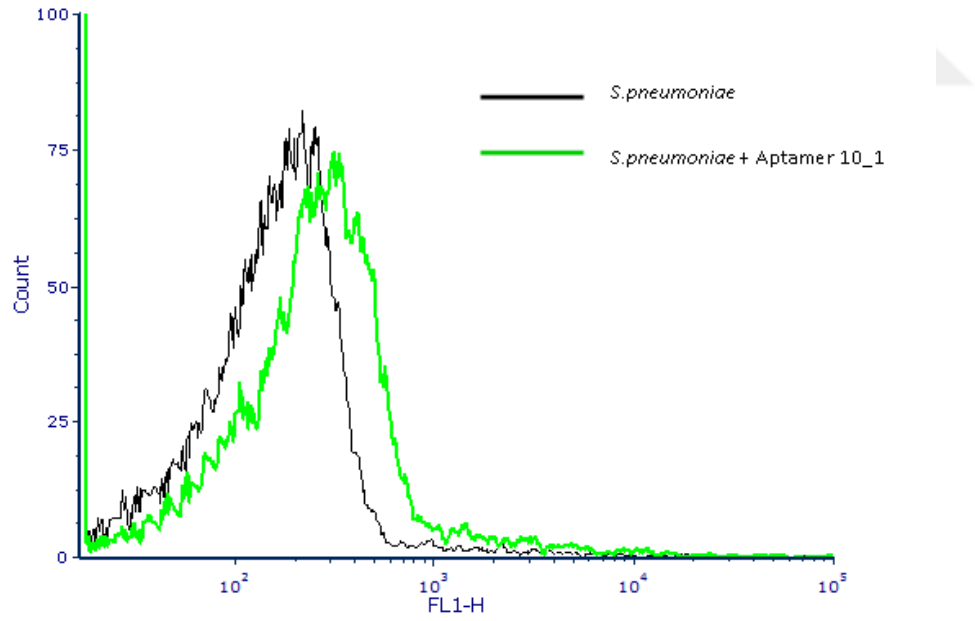
Şekil 4. Aptamerlerin farklı *S. pneumoniae* suşlarına bağlanma etkinlikleri

4.7. Akım Sitometrisi

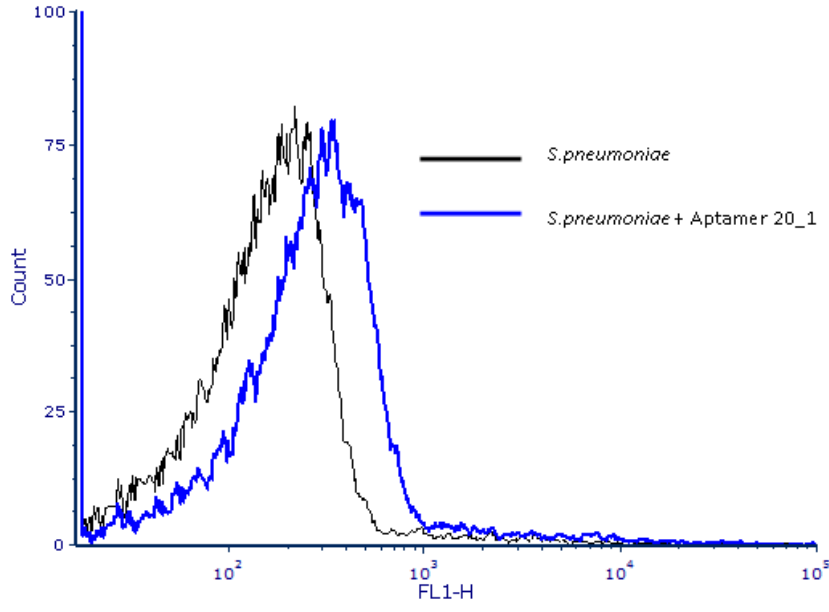
Aptamerlerin hedef hücrelere bağlanmasını akım sitometrisi yöntemi ile de desteklemek için floresans tagleri bulunan aptamerler ve kontrol dizisi (rastgele dizi) hücrelerle inkübe edilerek floresans dağılımları belirlenmiştir. Şekil 4.7.1, Şekil 4.7.2, Şekil 4.7.3 ve Şekil 4.7.4’de görüldüğü gibi sadece bakteri ve kontrol aptamerinin kullanımında elde edilen FL-1 histogramı aynı iken aptamerler floresans yoğunluğunda ciddi bir artışa sebep olarak peakin logaritmik skalada sağa kaymasına sebep olmuştur. Elde edilen veriler değerlendirilerek hücrelerin aritmetik floresans ortalamaları alındığında aptamerlerin kontrol DNA dizisine göre 7 ila 40 kat arası bir floresans yoğunluğu artışına sebep olduğu gözlemlenmektedir.



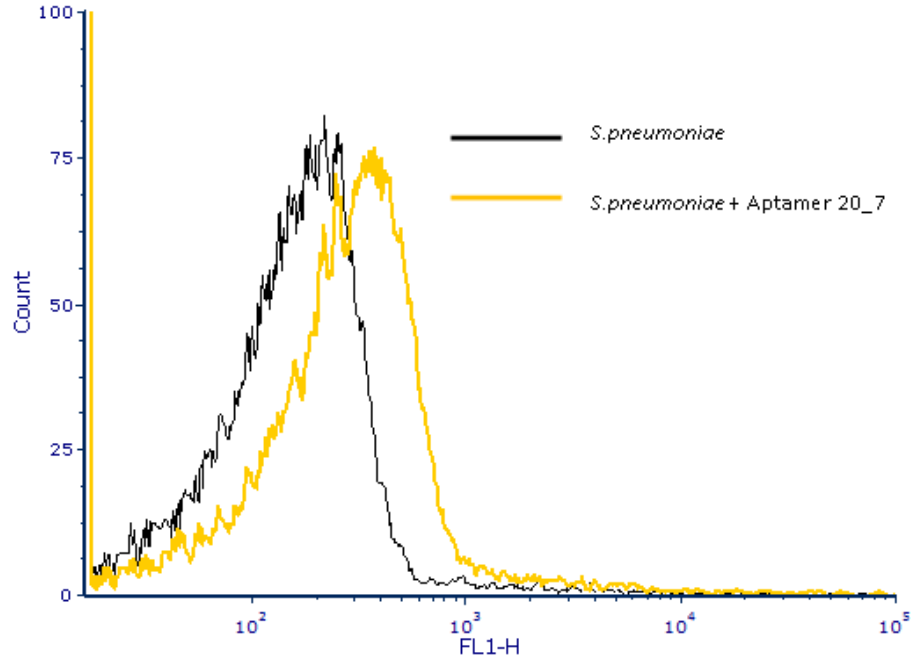
Şekil 5. *S. pneumoniae* ve kontrol aptameri ile inkübe edilmiş *S. pneumoniae*'nın akım sitometrisi FL-1 histogramı



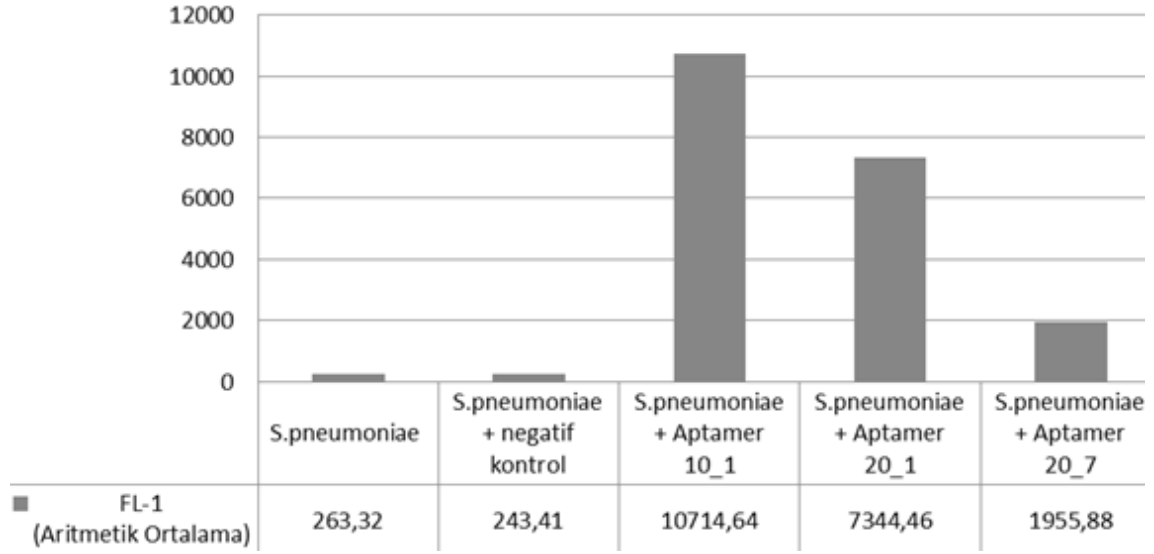
Şekil 4.7.2. *S. pneumoniae* ve Aptamer 10_1 ile inkübe edilmiş *S. pneumoniae*'nın akım sitometrisi FL-1 histogramı



Şekil 4.7.3. *S. pneumoniae* ve aptamer 20_4 ile inkübe edilmiş *S. pneumoniae*'nın akım sitometrisi FL-1 histogramı



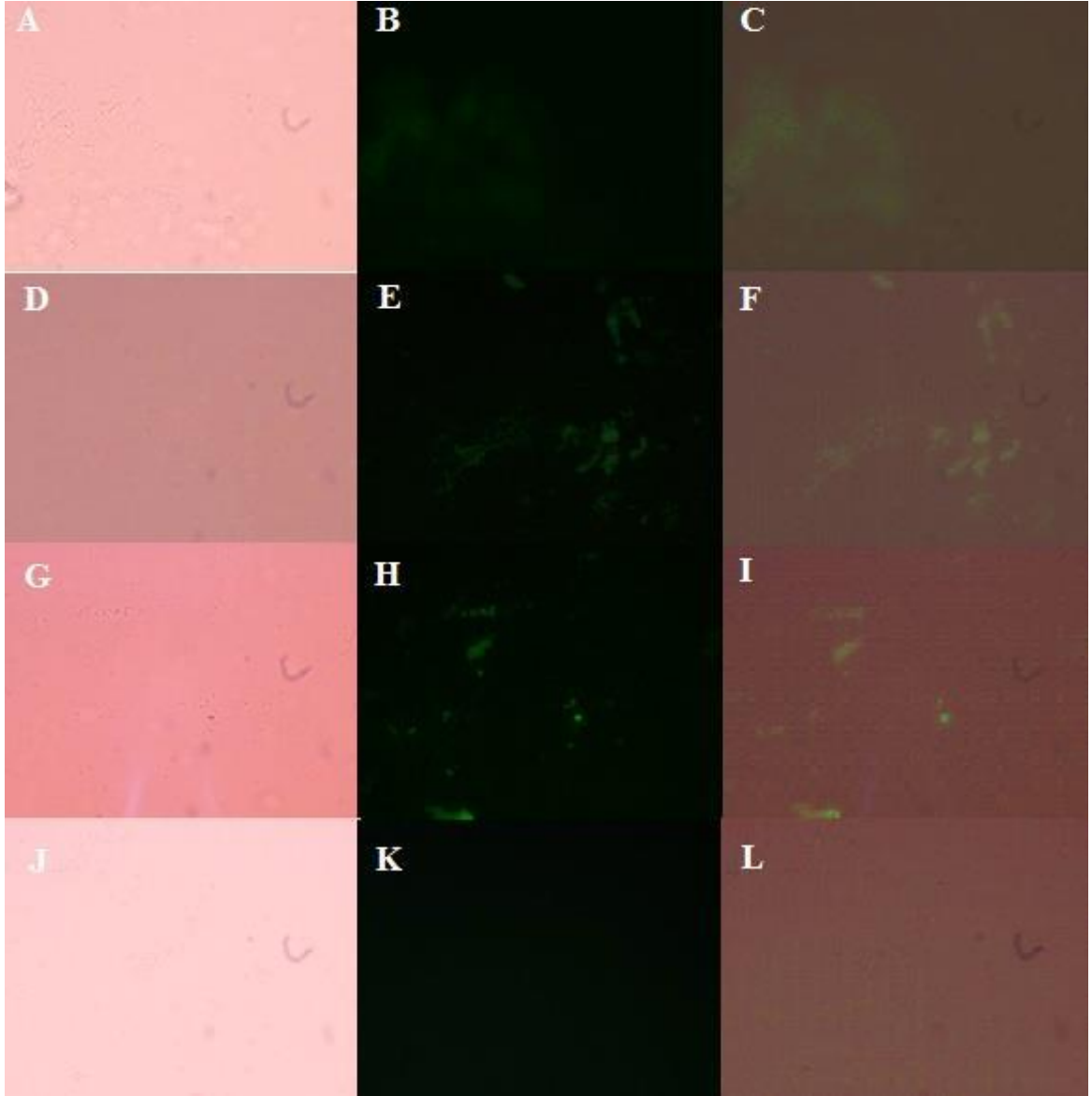
Şekil 6. *S. pneumoniae* ve aptamer 20_7 ile inkübe edilmiş *S. pneumoniae*'nın akım sitometrisi FL-1 histogramı



Şekil 4.7.5. *S. pneumoniae*'ya bağlanan aptamerlerin floresans yoğunlukları

4.8. Floresans Modifiyeli Aptamerlerle Mikroskop Görüntüsü Alma

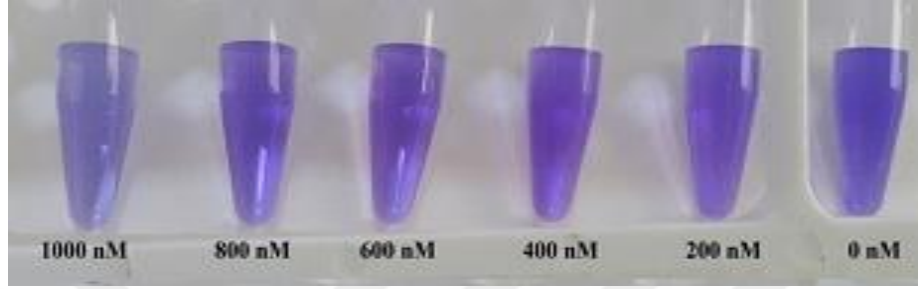
SELEX'te kullandığımız *S. pneumoniae*'nın 49619 suşuna seçmiş olduğumuz, FAM bağlı 10_1, 20_4 ve 20_7 aptamerlerin hedef hücrelere bağlanmaları Şekil 4.8.1'de gösterilmektedir. Floresans görüntülerde seçilen aptamerlerin hedef hücreye bağlanarak floresans kanalda ışıma sağladığı görülmektedir. Kontrol olarak kullanılan FAM işaretli DNA dizisi ise ışıma göstermemektedir. Bu sonuçlar aptamerlerimizin *S. pneumoniae*'ya bağlandığını ispatlamaktadır.



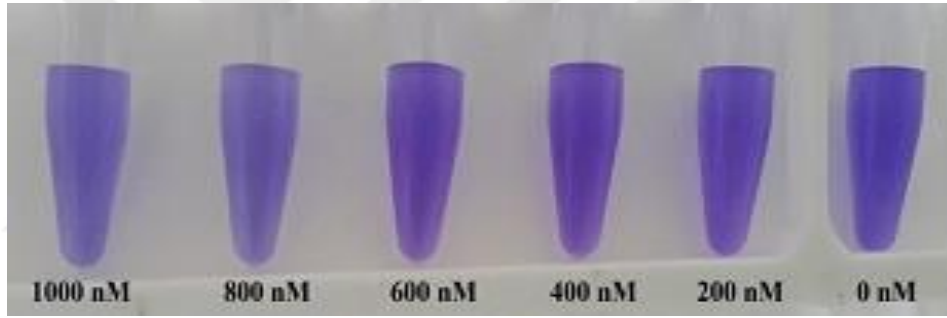
Şekil 4.8.1. 10_1, 20_4 ve 20_7 aptamerleri bağlı *S. pneumoniae*'nin floresan görüntüsü, beyaz ışık görüntüsü ve bu iki görüntünün üst üste oturtulmuş halleri (10_1 aptameri bağlı *S. pneumoniae*'nin beyaz ışık görüntüsü (A), 10_1 aptameri bağlı *S. pneumoniae*'nin floresan ışık görüntüsü (B), 10_1 aptameri bağlı *S. pneumoniae*'nin beyaz ışık ve floresan görüntülerinin üst üste oturtulmuş hali (C), 20_4 aptameri bağlı *S. pneumoniae*'nin beyaz ışık görüntüsü (D), 20_4 aptameri bağlı *S. pneumoniae*'nin floresan ışık görüntüsü (E), 20_4 aptameri bağlı *S. pneumoniae*'nin beyaz ışık ve floresan görüntülerinin üst üste oturtulmuş hali (F), 20_7 aptameri bağlı *S. pneumoniae*'nin beyaz ışık görüntüsü (G), 20_7 aptameri bağlı *S. pneumoniae*'nin floresan ışık görüntüsü (H), 20_7 aptameri bağlı *S. pneumoniae*'nin beyaz ışık ve floresan görüntülerinin üst üste oturtulmuş hali (I), kontrol aptameri bağlı *S. pneumoniae*'nin beyaz ışık görüntüsü (J), kontrol aptameri bağlı *S. pneumoniae*'nin floresan ışık görüntüsü (K), kontrol aptameri bağlı *S. pneumoniae*'nin beyaz ışık ve floresan görüntülerinin üst üste oturtulmuş hali (L))

4.9. Aptamerlerin Biyofilm Oluşturma Üzerine Etkileri

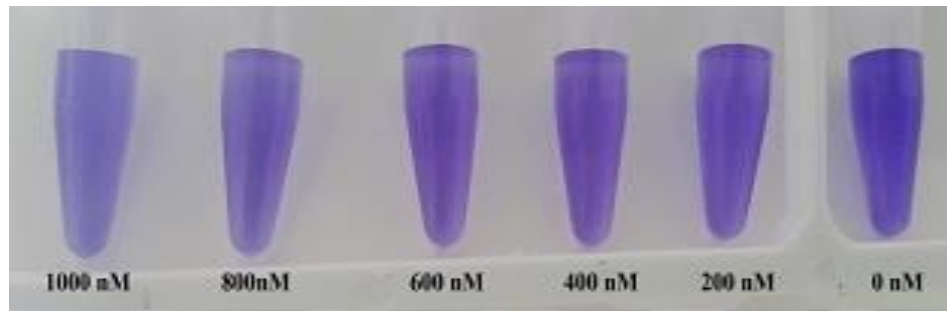
Biyofilm oluşturabilme etkinliğinin belirlenebilmesi için biyofilm oluşturmayan bakteriler ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra biyofilm oluşturan bakteriler boyanarak biyofilm miktarı belirlenmiştir (Şekil 4.9.1, Şekil 4.9.2 ve Şekil 4.9.3).



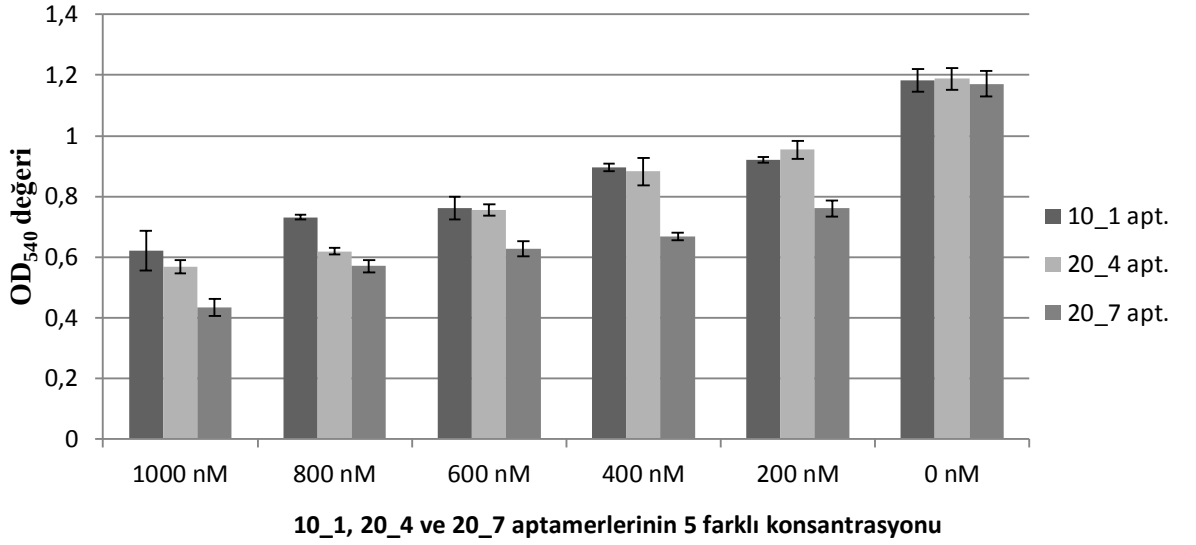
Şekil 4.9.1. 10_1 aptamerinin farklı konsantrasyonlarının, *S. pneumoniae*'nin 49619 suşunda biyofilm oluşturma etkisi



Şekil 4.9.2. 20_4 aptamerinin farklı konsantrasyonlarının, *S. pneumoniae*'nin 49619 suşunda biyofilm oluşturma etkisi

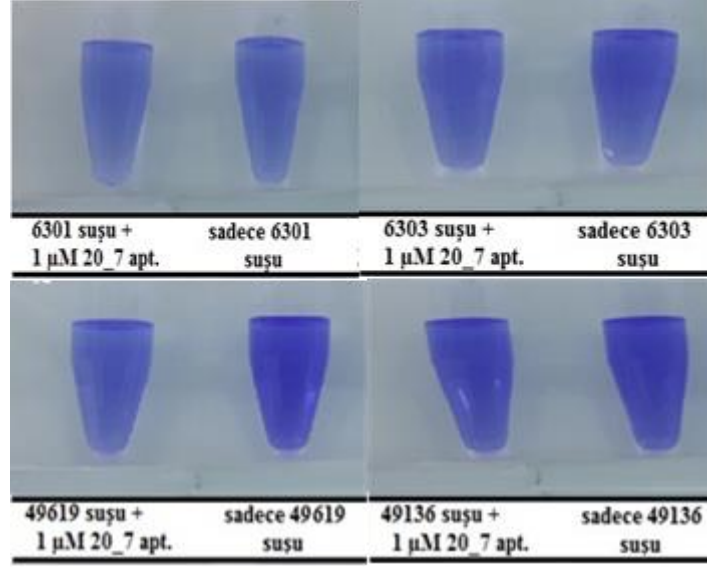


Şekil 4.9.3. 20_7 aptamerinin farklı konsantrasyonlarının, *S. pneumoniae*'nin 49619 suşunda biyofilm oluşturma etkisi

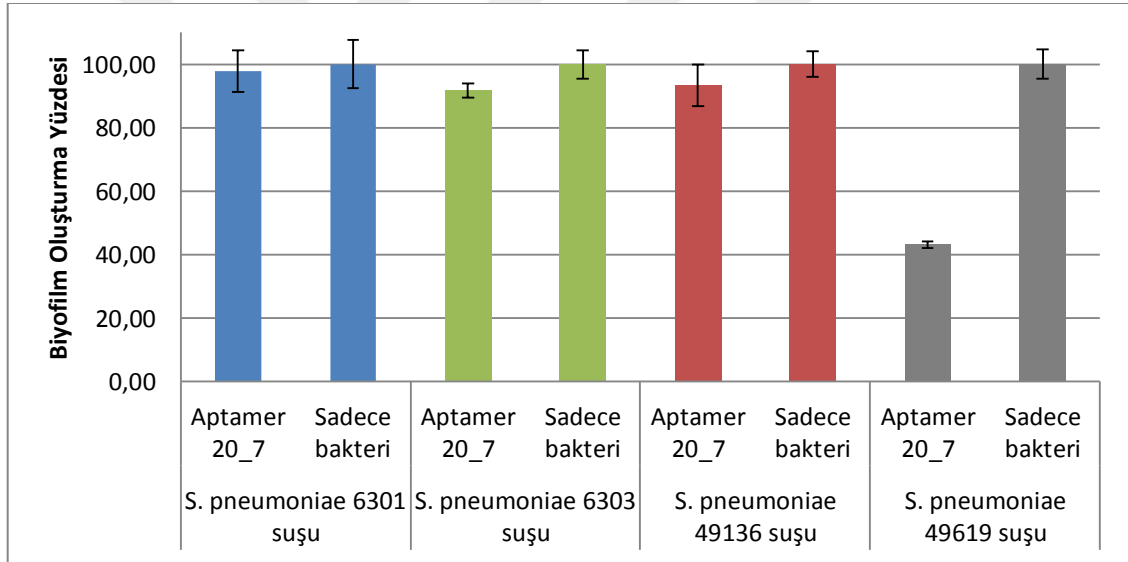


Şekil 4.9.4. 10_1, 20_4, 20_7 aptamerlerinin 5 farklı konsantrasyonunun, *S. pneumoniae*'nin 49619 suşu üzerinde biyofilm oluşturma etkisi

10_1, 20_4 ve 20_7 aptamerlerinin her üçünde de aptamer konsantrasyonunun artışına bağlı olarak absorbans değeri azalmaktadır. Bu azalış her üç aptamerinde *S. pneumoniae*'nin 49619 suşunun biyofilm oluşturma üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Aptamer konsantrasyonu arttıkça bakteri yüzeye tutunamamış, biyofilm oluşturmamış ve buna bağlı olarak ölçülen absorbans değeri azalmıştır. Absorbans değerindeki en fazla azalış 20_7 aptamerinin artan konsantrasyonlarında ölçüldüğü için, biyofilm tabakası oluşturma üzerindeki en etkin aptamer 20_7 olarak tespit edilmiştir. *S. pneumoniae*'nin 49619 suşunun biyofilm oluşturma yeteneğine en fazla etki gösteren aptamer, 20_7 aptameri olarak seçildikten sonra 20_7 aptamerinin *S. pneumoniae*'nin farklı suşları üzerinde biyofilm oluşturma etkinliğine bakılmıştır.



Şekil 7. Aptamer 20_7'nin farklı *S. pneumoniae* suşlarında biyofilm oluşturmaya etkisi



Şekil 4.9.6. 20_7 aptamerinin *S. pneumoniae*'nin 6301, 6303, 49136 ve 49619 suşu üzerinde biyofilm oluşturma etkisi

S. pneumoniae'nin 6301, 6303, 49136 ve 49619 suşları üzerinde 20_7 ve kontrol aptamerinin absorbans değerlerine bağlı olarak biyofilm oluşturma etkinliğine bakıldığında, 20_7 aptamerinin seçilmiş olduğu 49619 suşu üzerinde etkiye sahip olduğu diğer suşlar üzerinde etkin ve istatistiksel olarak anlamlı bir azalış göstermediği saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

S. pneumoniae, *Streptococcaceae* ailesinden gram pozitif, alfa hemolitik, fakültatif anaerobik bir mikroorganizma türüdür. Otitis media (orta kulak iltihabı), sinusitis (sinüzit), pneumonia (zatürre) ve meningitis'in (menenjit) temel etkenlerindendir (Török ve Day, 2014). Daha az rastlansa da bakteremia (toksemi), perikardit, endokardit, peritonit, septik artrit (eklem iltihabı), osteomyelitis ve yumuşak doku enfeksiyonlarına da yol açabilmektedir. Orta kulak iltihabı ve menenjite yol açan mikroorganizmalar arasında *S. pneumoniae* ilk sırayı yer almaktadır (Sommerflack vd., 2013; Bhattacharya vd., 2013). *S. pneumoniae* ve *Neisseria meningitidis* Avrupa ve Amerika Birleşik Devletlerindeki menenjit vakalarının 2/3'ünden sorumludur ve gelişen tıbbi tekniklere rağmen ölüm oranı %37 civarındadır (Mook-Kanamori ve ark., 2011). Ülkemizde 2408 hasta üzerinde yapılmış bir araştırmada *S. pneumoniae*'nin %58,2 ile en sık rastlanan menenjit ajanı olduğu ve *S. pneumoniae* temelli menenjit hastalarında ölüm oranının %29,7 olduğu belirlenmiştir (Arda ve ark., 2008). Bunun dışında WHO verilerine göre her yıl dünyada 5 yaş altı 1,2 milyon çocuk pnömokok sebebi ile hayatını kaybetmektedir ve bu kayıplara % 18'lik oranla birinci sırada *S. pneumoniae* sebep olmaktadır (WHO, 2013).

1881 yılında Louis Pasteur tarafından ilk defa izole edilen *S. pneumoniae* (Pasteur, 1881) tıp ve teknolojiye bütün ilerlemelere rağmen hala ciddi problemler oluşturmakta ve ölümlere sebep olmaktadır. Tez kapsamında modern mikrobiyolojinin tarihi kadar eski olan bu bakteriye özgün olarak bağlanan aptamerlerin seçilmesi ve bu aptamerlerin karakterizasyonu hedeflenmiştir. Tezimizin geliştirilen bu aptamerler üzerinde 3 hedefi bulunmaktadır:

- *S. pneumoniae*'ya submikromolar ya da nanomolar aralıkta bir çözülüm katsayısı (K_d) ile bağlanabilen aptamerlerin geliştirilmesi.
- *S. pneumoniae*'nin farklı suşlarına bağlanabilen fakat araştırmada negatif seçim için kullanılan *S. mutans*, *S. pyogenes* ve *E. faecalis*'e bağlanmayan, özgün aptamerlerin geliştirilmesi

- Floresans etiketlenmiş aptamerler kullanılarak hedef mikroorganizmanın ayırt edilmesi.

Bu kapsamda *Streptococcus pneumoniae* (Klein) Chester (ATCC® 49619™) suşuna karşı 20 turluk bir SELEX yapılmıştır. Yapılan bu SELEX sürecinde *S. mutans*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*'e karşı negatif seçim uygulanmış ve seçilen aptamerlerin özgün olması hedeflenmiştir. Yapılan 20 turluk SELEX sonrası grubumuz tarafından SELEX'te kullanılmak üzere modifiye edilmiş bir metagenomiks dizileme tekniği kullanılarak birçok SELEX turu dizilenmiş ve SELEX turları süresince zenginleşen aptamerler belirlenmiştir.

Tez kapsamında ayrıyeten belirlenen aday aptamerlerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda öncelikle aptamerlerin hedefe karşı çözünüm katsayıları belirlenmiştir. Çözünüm katsayıları $844,7 \pm 163,6$ nM, $1984,8 \pm 347,5$ nM, $661,8 \pm 111,3$ nM olarak belirlenen aptamerlerden 2 adedi submikromolar aralıkta bir bağlanma katsayısı ile tez hedeflerine ulaşılmasını sağlamıştır.

Bu üç aptamerin negatif seçimde kullanılan bakteriler karşı bağlanma etkinlikleri araştırıldığında *S. pyogenes* ve *E. faecalis*'e karşı etkin bir bağlanma göstermedikleri bu bakterilere karşı hedef hücremizi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ayırt edebildiği belirlenmiştir. Negatif seçimde kullanılan *S. mutans* hem seçimde hem de karakterizasyon esnasında yıkama ve bağlanma solüsyonlarında ve santrifüjler esnasında ayrılmayan kümeleşmeler oluşturarak spektroskopi, akım sitometrisi ve mikroskopi deneylerini tutarsız ve anlamsız hale getirmiş bundan dolayı tez kapsamından çıkarılmıştır.

Seçilen aptamerlerin farklı *S. pneumoniae* suşlarına bağlanma etkinliği de tez kapsamında araştırılmış, bunun için dört farklı serotip denenmiş ve bu bağlamda geliştirilen aptamerlerin ATCC 49619 ve 6303 suşlarına etkin olarak bağlandığı fakat denenilen diğer suşlara karşı seçici bir bağlanmanın olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar aptamerlerin farklı *S. pneumoniae* suşlarına karşı farklı seçicilikte bağlandığını ve suşa özgü bir karakter sergilediğini göstermektedir.

Karakterizasyon kapsamında aptamerlerin bağlanması floresans mikroskopi ve akım sitometrisi yöntemleri ile rastgele DNA dizilerinden oluşan kontroller de kullanılarak teyit edilmiş ve *S. pneumoniae*'ya aktif ve ayırt edici bir şekilde bağlandığı kanıtlanmıştır.

Seçilen aptamerlerin *S. pneumoniae*'nın biyofilm oluşturmaya etkisi incelenmiş ve bu kapsamda geliştirilen aptamerlerin hedef olarak seçilen suşun biyofilm oluşturma kapasitesini ciddi miktarda düşürdüğü gözlemlenmiştir. Aynı aptamerlerin diğer *S. pneumoniae* suşlarının biyofilm oluşturmaya karşı bir etki göstermemiş olması dikkat çekici bulunmuş belirlenen aptamerlerin hücre yüzeyinde bağlanan hedeflerinin biyofilm oluşumu ve/veya kolonizasyonda görevli bir biyomarkör olma olasılığını güçlendirmiştir.

Tez kapsamında *S. pneumoniae*'ya karşı geliştirilen bu aptamerler literatürde bir ilktir. Bununla birlikte literatürde *S. pneumoniae*'nın biyofilm oluşumunun inhibisyonu ile ilgili oldukça az veri bulunup biyofilm oluşumunu özgün bir şekilde engelleyen bir çalışma veya yayın bulunmamaktadır. Çalışmanın devamı niteliğinde yapılabilecek birçok araştırma ve sorular ortaya çıkmıştır. Bu kapsamda belirlenen hedeflerin hasta izolatlarında taranması sonucu elde edilecek veriler kapsamında tıbbi kullanım yolu açılabilir. Bir diğer konu olarak bağlanan aptamerlerin hedef moleküllerinin proteomik veya glykomik yöntemlerle belirlenmesi sonucu bu hedeflerin hücrelerde susturulması veya fazla ekspresyonu ile farklı biyomarkörlerin belirlenmesi ihtimal dahilindedir. Birçok aptamer çalışmada olduğu gibi geliştirilen aptamerlerin farklı biyosensör platformlarda (SPR, QCM, floresans temelli vb.) kullanılması kolaylıkla araştırılabilir. Bu kapsamda hastanede PZR kullanımı ortadan kaldırmaya yönelik kağıt tipi renk değişimi temelli bir proje hedeflenmektedir.

6. KAYNAKÇA

- Abigail, A., Salyers, D. ve Whitt, D., 1994. *Streptococcus pneumoniae*. *Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach*, Abigail, A. ve Salyers, D. ASM Press, Washington, 322-331.
- Abigail, A., Whitt, S. ve Whitt, D.D., 1994. Streptococcal Sore Throat, Rheumatic Fever, and Glomerulonephritis, Bacterial Pathogenesis. *Clinical Microbiology*, 332-388.
- Abramson, J.S. ve Overturf, G.D., 2004. *Streptococcus pneumoniae*(Pneumococcus). *Nelson Textbook of Pediatrics*, Behrman, R.E. WB SaundersCo, Philadelphia, 867-880.
- Aimaiti, R., Qin, L., Cao, T., Yang, H., Wang, J., Lu, J., Huang, X. ve Hu Z., 2015. Identification and Application of ssDNA Aptamers Against H37Rv in the Detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 21, 9073–9083.
- Akan, E., 1993. *Streptococcus pneumoniae*. *Tibbi Mikrobiyoloji*. İstanbul: Saray Kitabevi, 40-48.
- Appelbaum, P.C., 1992. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an Overview. *Clin. Infect. Dis.*, 77-83.
- Arda, B., Sipahi, O.R., Atalay, S. ve Ulusoy, S., 2008. Pooled Analysis of 2,408 Cases of Acute Adult Purulent Meningitis from Turkey. *Medical Principles and Practice*, 17, 76-79.
- Aquino-Jarquin, G. ve Toscano-Garibay, J.D., 2011. RNA Aptamer Evolution: Two Decades of SELEction. *Int. J. Mol. Sci.*, 9155-9171.
- Baig, I.A., Moona, J.Y., Lee, S.C., Ryoob, S.W. ve Yoona, M.Y., 2015. Development of ssDNA Aptamers as Potent Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Acetohydroxyacid Synthase. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1854, 1338–1350.
- Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D. ve Shadomy, H.J., 1991. *Streptococcus*. *Manual of Clinical Microbiology*, Falcham, W.I. ASM Pres, Washihgton D.C, 238-257.
- Bayraç, A.T., Sefah, K., Parekh, P., Bayraç, C., Gülbakan, B., Oktem, H.A. ve Tan, W., 2011. In Vitro Selection of DNA Aptamers to Glioblastoma Multiforme. *ACS chemical neuroscience*, 175-181.
- Berkiten, R., 2006. *Streptococcus pneumoniae*: Klasik ve Moleküler Tanıda Karşılaşılan Sorunlar. *ANKEM Derg*, 186.
- Bhattacharya, S., McCracken Jr., G. H. ve Ramilo, O., 1996. Management of meningitis caused by penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(3), 827-828.

- Birch, J.R. ve Racher, A.J., 2006. Antibody production. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 671–685.
- Bogaert, D., Groot, R. ve Hermans, P.W.M., 2004. *Streptococcus pneumoniae* Colonisation: The Key to Pneumococcal Disease. *THE LANCET Infectious Diseases*, 144-154.
- Bratu, D.P., Cha, B.J., Mhlanga, M.M., Kramer, F.R. ve Tyagi, S., 2003. Visualizing the Distribution and Transport of mRNAs in Living Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 13308–13313.
- Bruno, J.G., 1997. In vitro Selection of DNA to Chloroaromatics Using Magnetic Microbead-Based Affinity Separation and Fluorescence Detection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234, 117-137.
- Cao, X., Li, S., Chen, L., Ding, H., Xu, H., Huang, Y., Li, J., Liu, N., Cao, W., Zhu, Y., Shen, B. ve Shao, N., 2009. Combining Use of a Panel of ssDNA Aptamers in the Detection of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Research*, 37, 4621–4628.
- Cerchia, L., Duconge, F., Pestourie, C., Boulay, J., Aissouni, Y., Gombert, K., Tavitian, B., de Franciscis, V. ve Libri, D., 2005. Neutralizing Aptamers from Whole-Cell SELEX Inhibit the RET Receptor Tyrosine Kinase. *PLoS Biol.*, 3, 697–704.
- Cha, M.H., Amania, J., Sedighiana, H., Aminb, M., Salimianc, J., Halabiana, R. ve Fooladi, A.A.I., 2016. Isolation of a New ssDNA Aptamer Against Staphylococcal Enterotoxin B Based on CNBr-Activated Sepharose-4B Affinity Chromatography. *J. Mol. Recognit.*, 29, 436-481.
- Chen, F., Hu, Y., Li, D., Chen, H. ve Zhang, X.L., 2009. CS-SELEX Generates High-Affinity ssDNA Aptamers as Molecular Probes for Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2. *Plos One*, 12, 8142-8153.
- Chen, F., Hu, Y.L., Li, D.Q., Chen, H.D. ve Zhang, X.L., 2009. CS-SELEX Generates High-Affinity ssDNA Aptamers as Molecular Probes for Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2. *Plos One*, 4, 8124-8140.
- Chen, F., Zhou, J., Luo, F., Mohammed, A.B. ve Zhang, X.L., 2007. Aptamer from Whole-Bacterium SELEX as New Therapeutic Reagent Against Virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357, 743–748.
- Cundell, D.R., Gerard, N.P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I. ve Tuomanen, E.I., 1995. *Streptococcus pneumoniae* Anchor to Activated Human Cells by the Receptor for Platelet-Activating Factor. *Nature*, 435–438.
- Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H. ve Ruml, T., 2015. Current Approaches in SELEX: Anupdate to Aptamer Selection Technology. *Biotec. Adv.*, 33, 1141-1161.
- Deisingh, A.K., 2006. Aptamer-Based Biosensors: Biomedical Applications. *Pharmacol*, 330-357.

- Djordjevic, M., 2007. SELEX Experiments: New Prospects, Applications and Data Analysis in Inferring Regulatory Pathways. *Biomol. Eng.*, 179-189.
- Dua, P., Kang, H.S., Hong, S.M., Tsao, M.S., Kim, S. ve Lee, D.K., 2013. Alkaline Phosphatase ALPPL-2 is a Novel Pancreatic Carcinoma-Associated Protein. *Cancer. Res.*, 73, 1934–1945.
- Dua, P., Kim, S. ve Lee, D.K., 2011. Nucleic Acid Aptamers Targeting Cell-Surface Proteins. *Methods*, 54, 215-225.
- Duan, N., Ding, X., He, L., Wu, S., Wei, Y. ve Wang, Z., 2013. Selection, Identification and Application of a DNA Aptamer Against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 33, 239-243.
- Duan, N., Ding, X., Wu, S., Xia, Y., Ma, X., Wang, Z. ve Chen, J., 2013. *In Vitro* Selection of a DNA Aptamer Targeted Against *Shigella dysenteriae*. *Journal of Microbiological Methods*, 94, 170–174.
- Dwivedi, H.P., Smiley, R.D. ve Jaykus, L.A., 2010. Selection and Characterization of DNA Aptamers with Binding Selectivity to *Campylobacter jejuni* Using Whole-Cell SELEX. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 87, 2323–2334.
- Eble, J.A., Wucherpennig, K.W., Gauthier, L., Dersch, P., Krukonis, E., Isberg, R.R. ve Hemler, M.E., 1998. Recombinant Soluble Human $\alpha 3 \beta 1$ Integrin: Purification, Processing, Regulation, and Specific Binding to Laminin-5 and Invasin in a Mutually Exclusive Manner. *Biochemistry*, 10945–10955.
- Ellington, A.D. ve Szostak, J.W., 1990 . Ellington, A.D. and Szostak, JW., 1990, *In Vitro* Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature*, 818-822.
- Eyeteck Study Group., 2002. Preclinical and Phase 1A Clinical Evaluation of an Anti-VEGF Pegylated Aptamer (EYE001) for the Treatment of Exudative Age-Related Macular Degeneration. *Retina*, 143-152.
- Ferreira, C.S.M, Matthews, C.S. ve Missailidis, S., 2006. DNA Aptamers That Bind to MUC1 Tumour Marker: Design and Characterization of MUC1-Binding Single-Stranded DNA Aptamers. *Tumor Biol.*, 289-301.
- Fine, M.J., Auble, T.E. ve Yealy, D.M., 1997. A Prediction Rule to Identify Low-Risk Patients with Community-Acquired Pneumonia. *N. Engl. J. Med.*, 336, 243-293.
- Fretto, L.J., Snape, A.J., Tomlinson, J.E., Seroogy, J.J., Wolf, D.L., LaRochelle, W.J. ve Giese, N.A., 1993. Mechanism of Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) AA, AB, and BB Binding to Alpha and Beta PDGF Receptor. *J. Biol. Chem.*, 3625–3631.
- Golden, M.C., Collins, B.D., Willis, M.C. ve Koch, T.H., 2000. Diagnostic Potential of PhotoSELEX-Evolved ssDNA Aptamers. *J. Biotechnol.*, 81, 167-245.
- Gong, W., Duan, N., Wu, S., Huang, Y., Chen, X. ve Wang, Z., 2015. Selection, Identification, and Application of Dual DNA Aptamers Against *Shigella sonnei*. *Anal. Methods*, 7, 3625–3631.

- Gor, D., Ding, X., Briles, D., Jacobs, M. ve Greenspan, N., 2005. Relationship Between Surface Accessibility for PpmA, PsaA, and PspA and Antibody-Mediated Immunity to Systemic Infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1304-1312.
- Graham, J.C. ve Zarbl, H., 2012. Use of Cell-SELEX to Generate DNA Aptamers as Molecular Probes of HPV-Associated Cervical Cancer Cells. *Plos One* 7, 36103-36118.
- Green, L.S., Jellinek, D., Bell, C., Beebe, L.A., Feistner, B.D., Gill, S.C., Jucker, F.M. ve Janjić, N., 1995. Nuclease-Resistant Nucleic Acid Ligands to Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor. *Chem. Biol.*, 683-695.
- Green, L.S., Jellinek, D., Jenison, R., Östman, A., Heldin, C.H. ve Janjic, N., 1996. Inhibitory DNA Ligands to Platelet-Derived Growth Factor B-Chain. *Biochemistry*, 14413–14424.
- Green, S. ve Rothrock, S., 1993. Single-Dose Intramuscular Ceftriaxone for Acute Otitis Media in Children. *Pediatrics*, 23–30.
- Hamula, C.L.A., Peng, H., Wang, Z., Tyrrell, G.J., Li, X.F. ve Le, C., 2016. An Improved SELEX Technique for Selection of DNA Aptamers Binding to M-Type 11 of *Streptococcus pyogenes*. *Methods*, 97, 51-57.
- Hamula, C.L.A., Peng, H., Wang, Z., Newbigging, A.M., Tyrrell, G.J., Li, X.F. ve Le, X.C., 2015. The Effects of SELEX Conditions on the Resultant Aptamer Pools in the Selection of Aptamers Binding to Bacterial Cells. *J. Mol. Evol.*, 81, 194–209.
- Hamula, C.L.A., Zhang, H., Guan, L.L., Li, X.F. ve Le, X.C., 2008. Selection of Aptamers Against Live Bacterial Cells. *Anal. Chem.*, 80, 7812–7819.
- Hansman, D. ve Bullen, M.M., 1967. A Resistant Pneumococcus . *Lancet*, 264-275.
- He, J., Liu, Y., Fan, M. ve Liu, X., 2011. Isolation and Identification of the DNA Aptamer Target to Acetamiprid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1582-1588.
- Hicke, B.J., Marion, C., Chang, Y.F., Gould, T., Lynott, C.K., Parma, D., Schmidt, P.G. ve Warren, S., 2001. Tenascin-C Aptamers are Generated Using Tumor Cells and Purified Protein. *J. Biol. Chem.*, 276, 48644–48654.
- Ireson, C.R. ve Kelland, L.R., 2006. Discovery and Development of Anticancer Aptamers. *Mol. Cancer Ther.*, 2957-2962.
- Iwagawa, T., Ohuchi, S.P., Watanabe, S. ve Nakamura, Y., 2012. Selection of RNA Aptamers Against Mouse Embryonic Stem Cells. *Biochimie*, 94, 250–257.
- James, W., 2000. Aptamers. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 4848–4871.
- Jayasena, S.D., 1999. Aptamers: An Emerging Class of Molecules that Rival Antibodies in Diagnostics. *Clin. Chem.*, 1628-1650.

- Jedrzejewski, M., 2001. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 187-207.
- Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A. ve Polisky, B., 1994. High-Resolution Molecular Discrimination by RNA. *Science*, 1425-1429.
- Jimenez, E., Sefah, K., Lopez-Colon, D., Van Simaey, D., Chen, H.W., Tockman, M.S. ve Tan, W.H., 2012. Generation of Lung Adenocarcinoma DNA Aptamers for Cancer Studies. *Plos One*, 7, 46222-46224.
- Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C. ve Andrew, P.W., 2008. The Role of *Streptococcus pneumoniae* Virulence Factors in Host Respiratory Colonization and Disease. *Nature*, 288-298.
- Keefe, A.D., Pai, S. ve Ellington, A., 2010. Aptamers as Therapeutics. *Nature*, 537-550.
- Krivan, H., Roberts, D. ve Ginsburg, V., 1988. Many Pulmonary Pathogenic Bacteria Bind Specifically to the Carbohydrate Sequence Gal-Nac β 1-4Gal Found in Some Glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 6157-6161.
- Labib, M., Zamay, A.S., Kolovskaya, O.S., Reshetneva, I.T., Zamay, G.S., Kibbee, R.J., Sattar, S.A., Zamay, T.N. ve Berezovski, M.V., 2012. Aptamer-Based Viability Impedimetric Sensor for Bacteria. *Anal. Chem.*, 84, 8966-8969.
- Lavrsen, K., Madsen, C., Rasch, M., Woetmann, A., Ødum, N., Mandel, U., Clausen, H., Pedersen, A. ve Wandall, H., 2013. Aberrantly Glycosylated MUC1 is Expressed on the Surface of Breast Cancer Cells and a Target for Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. *Glycoconj J.*, 227-236.
- Lee, S.-H., Ahn, J.-Y., Lee, K.-A., Um, H.-J., Sekhon, S.S., Park, T.S., Min, J. ve Kim, Y.-H., 2015. Analytical bioconjugates, Aptamers, Enable specific Quantitative detection of *Listeria monocytogenes*. *Biosensors and Bioelectronics*, 68, 272-280.
- Li, X.L., Zhang, W.Y., Liu, L., Zhu, Z., Ouyang, G.L., An, Y., Zhao, C.Y. ve Yang, C.J., 2014. In Vitro Selection of DNA Aptamers for Metastatic Breast Cancer Cell Recognition and Tissue Imaging. *Anal. Chem.*, 86, 6596-6603.
- Liu, J., Liu, H.X., Sefah, K., Liu, B., Pu, Y., Van Simaey, D. ve Tan, W.H., 2012. Selection of Aptamers Specific for Adipose Tissue. *Plos One*, 7, 37789-37802.
- Livermore, D.M. ve Williams, J.D., 1996. Lactams: Mode of Action and Mechanisms of Bacterial Resistance. L. V içinde, *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Baltimore: Williams and Wilkins Co, 502-578.
- Lupold, S.E., Hicke, B.J., Lin, Y. ve Coffey, D.S., 2002. Identification and Characterization of Nuclease-Stabilized RNA Molecules that Bind Human Prostate Cancer Cells Via the Prostate-Specific Membrane Antigen. *Cancer Res.*, 4029-4033.
- Mannironi, C., Nardo, A.D., Fruscoloni, P. ve Tocchini-Valentini, G.P., 1997. In Vitro Selection of Dopamine RNA Ligands. *Biochemistry*, 36, 9726-9734.

- Martin, J.B., Dolin, R. ve Bennet, J.E., 1995. *Streptococcus pneumoniae*. D. R. Martin J.B. içinde, *Mandell, Douglas and Bennet's In Principles and Practice of Infectious Diseases* (s. 1811-2147). Philadelphia: Churchill Livingstone Inc.
- Marton, S., Cleto, F., Krieger, M.A. ve Cardoso, J., 2016. Isolation of an Aptamer that Binds Specifically to *E. coli*. *Plos One*, 1-17.
- Mascini, M., 2008. Aptamers and Their Applications. *Anal. Bioanal. Chem.*, 987–988.
- McCullers, J. ve Rehg, J., 2002. Lethal Synergism Between Influenza Virus and *Streptococcus pneumoniae*: Characterization of a Mouse Model and the Role of Platelet-Activating Factor Receptor. *J. Infect. Dis.*, 341–350.
- Mendonsa, S.D. ve Bowser, M.T., 2004. In Vitro Evolution of Functional DNA Using Capillary Electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 1-20.
- Meyer, S., Maufort, J.P., Nie, J., Stewart, R., McIntosh, B.E., Conti, L.R., Ahmad, K.M., Soh, H.T. ve Thomson, J.A., 2013. Development of an Efficient Targeted Cell-SELEX Procedure For DNA Aptamer Reagents. *Plos One*, 8, 71798-71813.
- Mi, J., Zhang, X., Giangrande, P.H., McNamara, L.J.O., Nimjee, S.M., Sarraf-Yazdi, S., Sullenger, B.A. ve Clary, B.M., 2005. Targeted inhibition of $\alpha v \beta 3$ integrin with an RNA aptamer impairs endothelial cell growth and survival. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 956–963.
- Mook-Kanamori, B.B., Geldhoff, M., van der Poll, T. ve van de Beek, D., 2011. Pathogenesis and Pathophysiology of Pneumococcal Meningitis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 24, 557-648.
- Moon, J., Kim, G., Lee, S. ve Park, S., 2013. Identification of *Salmonella Typhimurium*-Specific DNA Aptamers Developed Using Whole-Cell SELEX and FACS Analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 95, 162-166.
- Moon, J., Kim, G., Park, S.B., Lim, J. ve Mo, C., 2015. Comparison of Whole-Cell SELEX Methods for the Identification of *Staphylococcus Aureus*-Specific DNA Aptamers. *Sensors*, 15, 8884-8897.
- Musher, D.M., 1995. *Streptococcus pneumoniae*. D. R. Mandell G.L. içinde, *In Principles and Practice of Infectious Diseases* (s. 1811-1830). Churchill Livingstone Inc.
- Neu, H.C., 1992. The Crisis in Antibiotic Resistance. *Science*, 1064-1073.
- Newman, L.J., Platts-Mills, T.A.E., Phillips, C.D., Hazen, K.C. ve Gross, C.W., 1994. Chronic Sinusitis, Relation of Computed Tomographic Findings to Allergy, Asthma, and Eosinophilia. *JAMA*, 363-367.
- Pan, Q., Zhang, X.L. ve Wu, H.Y., 2005. Aptamers that Preferentially Bind Type IVB Pili and Inhibit Human Monocytic-Cell Invasion by *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 4052-4112.

- Park, H.C., Baig, I.A., Lee, S.C., Moon, J.Y. ve Yoon, M.Y., 2014. Development of ssDNA Aptamers for the Sensitive Detection of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*. *Appl Biochem Biotechnol*, 174, 793–802.
- Pasteur, L., Chamberland, C. ve Roux, E., 1881. Compte rendu sommaire des experiences faites a Pouilly-Le-Fort, pres de Melun, sur la vaccination charbonneuse. *C. R. Acad. Sci.*, 92, 1378–1383.
- Pinner, R.W., Teutsch, S.M. ve Simonsen, L., 1996. Trends in Infectious Diseases Mortality in the United States. *JAMA*, 275, 189-193.
- Rajam, G., Anderton, J.M., Carlone, G.M., Sampson, J.S. ve Ades, F.W., 2008. Pneumococcal Surface Adhesin A (PsaA): A Review. *Crit. Rev. Microbio.*, 131-142.
- Robertson, D.L. ve Joyce, G.F., 1990. Selection In Vitro of an RNA Enzyme that Specifically Cleaves Single-Stranded DNA. 344, 467-468. *Nature*, 467-468.
- Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J.N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A. ve Masure, H.R., 1997. Contribution of Novel Choline-Binding Proteins to Adherence, Colonization and Immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, 819–829.
- Savaş, İ. ve Kaya, A., 2000. Guncel Bilgiler Işığında Pnömoniler. W. T. Numanoglu N. içinde, *Toplum Kökenli Pnomoniler* (s. 23). Ankara: Bilimsel Tıp Kitapevi.
- Scott, J.A.G., Hannington, A., Marsh, K. ve Hall, A.J., 1999. Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia in Epidemiological Studies: Evaluation in Kenyan Adults of a Serotype Specific Urine Latex Agglutination Assay. *Clinical Infectious Diseases*, 764-790.
- Sefah, K., Bae, K.M., Phillips, J.A., Siemann, D.W., Su, Z., McClellan, S., Vieweg, J. ve Tan, W.H., 2013. Cell-Based Selection Provides Novel Molecular Probes for Cancer Stem Cells. *Int. J. Cancer*, 132, 2578–2588.
- Sefah, K., Meng, L., Lopez-Colon, D., Jimenez, E., Liu, C. ve Tan, W.H., 2010. DNA Aptamers as Molecular Probes for Colorectal Cancer Study. *Plos One*, 5, 4269-4284.
- Shangguan, D., Bing, T. ve Zhang, N., 2015. Cell-SELEX: Aptamer Selection Against Whole Cells. F. X. Tan W. içinde, *Aptamers Selected by Cell-SELEX for Theranostics* (s. 13-34). Berlin: Springer.
- Shangguan, D., Cao, Z.H., Meng, L., Mallikaratchy, P., Sefah, K., Wang, H., Li, Y. ve Tan, W.H., 2008. Cell-Specific Aptamer Probes for Membrane Protein Elucidation in Cancer Cells. *J. Proteome Res.*, 2007, 2133–2139.
- Shangguan, D., Li, Y., Tang, Z., Cao, Z.C., Chen, H.W., Mallikaratchy, P., Sefah, K., Yang, C.J. ve Tan, W., 2006. Aptamers Evolved from Live Cells as Effective Molecular Probes for Cancer Study. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 11838–11843.

- Shangguan, D.H., Meng, L., Cao, Z.H.C., Xiao, Z.Y., Fang, X.H., Li Y., Cardona, D., Witek, R.P., Liu, C. ve Tan, W.H., 2008. Identification of Liver Cancer-Specific Aptamers Using Whole Live Cells. *Anal. Chem.*, 80, 721–728.
- Smith-Jones, P.M., Vallabahajosula, S., Goldsmith, S.J., Navarro, V., Hunter, C.J., Bastidas, D. ve Bander, N.H., 2000. In Vitro Characterization of Radiolabeled Monoclonal Antibodies Specific for the Extracellular Domain of Prostate-Specific Membrane Antigen. *Cancer Res.*, 5237–5243.
- Sommerfleck, P., González Macchi, M. E., Pellegrini, S., Bernáldez, P., Reijtman, V., Hernández, C. ve Lopardo, H., 2013. Acute otitis media in infants younger than three months not vaccinated against *Streptococcus pneumoniae*. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 77 (6), 976–980.
- Stojanovic, M.N., Prada, P.D. ve Landry, D.W., 2000. Fluorescent Sensors Based on Aptamer Self-Assembly. *Journal of the American Chemical Society*, 122, 11547–11548.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C. ve Strehlitz, B., 2007. SELEX—A (r)evolutionary Method to Generate High-Affinity Nucleic Acid Ligands. *Biomol. Eng.*, 24, 381–403.
- Tan, W., Donovan, M.J. ve Jiang, J., 2013. Aptamers from Cell-Based Selection for Bioanalytical Applications. *Chem. Rev.*, 113, 2842–2862.
- Tan, Y., Shi, Y.S., Wu, X.D., Liang, H.Y., Gao, Y.B., Li, S.J., Zhang, X.M., Wang, F. ve Gao, T.M., 2013. DNA Aptamers that Target Human Glioblastoma Multiforme Cells Overexpressing Epidermal Growth Factor Receptor Variant III In Vitro. *Acta. Pharmacol Sin.*, 34, 1491–1498.
- Tang, Z.W., Shangguan, D., Wang, K.M., Shi, H., Sefah, K., Mallikratchy, P., Chen, H.W., Li, Y. ve Tan, W.H., 2007. Selection of Aptamers for Molecular Recognition and Characterization of Cancer Cells. *Anal. Chem.*, 79, 4900–4907.
- Thiel, K.W., Hernandez, L.I., Dassie, J.P., Thiel, W.H., Liu, X.Y., Stockdale, K.R., Rothman, A.M., Hernandez, F.J., McNamara, J.O. ve Giangrande, P.H., 2012. Delivery of Chemo-Sensitizing siRNAs to HER2(+)-breast Cancer Cells Using RNA Aptamers. *Nucleic Acids Res.*, 40, 6319–6337.
- Tomasz, A., 1981. Surface Components of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev. Infect. Dis.*, 190–211.
- Tombelli, S., Minunni, M. ve Mascini, M., 2007. Aptamers-Based Assays for Diagnostics, Environmental and Food Analysis. *Biomolecular Engineering*, 24, 191–200.
- Török, M.E. ve Day, N.P.J., 2014. Staphylococcal and Streptococcal Infections. *Medicine*, 42, 1–7.
- Tuerk, C. ve Gold, L., 1990. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science*, 249, 505–510.

- Tuomanen, E., 1999. Molecular and Cellular Biology of Pneumococcal Infection. *Cur. Op. in Microbiol.*, 35-39.
- Ustaçelebi, Ş., 1999. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi, 365-584.
- Van Simaeys, D., Lopez-Colon, D., Sefah, K., Sutphen, R., Jimenez, E. ve Tan, W.H., 2010. Study of the Molecular Recognition of Aptamers Selected Through Ovarian Cancer Cell-SELEX. *Plos One*, 5, 3770-3785.
- Wang, F.B., Rong, Y., Fang, M., Yuan, J.P., Peng, C.W., Liu, S.P. ve Li, Y., (2013). Recognition and Capture of Metastatic Hepatocellular Carcinoma Cells Using Aptamer-Conjugated Quantum Dots and Magnetic Particles. *Biomaterials*, 34, 3816–3827.
- Wang, Y.Y., Luo, Y., Bing, T., Chen, Z., Lu, M.H., Zhang, N., Shangguan, D.H. ve Gao, X., 2014. DNA Aptamer Evolved by Cell-SELEX for Recognition of Prostate Cancer. *Plos One*, 9, 100243-100259.
- Watson, D.A., Musher, D.M. ve Verhoef, J., 1995. Pneumococcal Virulence Factors and Host Immune Responses to Them. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 479-490.
- Werno, A.M. ve Murdoch, D.R., 2008. Laboratory Diagnosis of Invasive Pneumococcal Disease. *Clin. Infect. Dis.*, 926-932.
- Witte, L., Hicklin, D., Zhu, Z., Pytowski, B., Kotanides, H., Rockwell, P. ve Böhlen, P., 1998. Monoclonal Antibodies Targeting the VEGF Receptor-2 (Flk1/KDR) as an Anti-Angiogenic Therapeutic Strategy. *Cancer Metastasis Rev.*, 155–161.
- WooáKim, D. ve BockáGu, M., 2012. Immobilization-Free Screening of Aptamers Assisted by Graphene Oxide. *Chemical Communications*, 48, 2071-2073.
- World Health Organization (WHO), 2013. Weekly epidemiological record, 88, 117–128.
- Zhao, Z.L., Xu, L., Shi, X.L., Tan, W.H., Fang, X.H. ve Shangguan, D.H., 2009. Recognition of Subtype Non-Small Cell Lung Cancer by DNA Aptamers Selected from Living Cells. *Analyst*, 134, 1808–1814.
- Zhao, Z.L., Tan, W. ve Fang, X., 2015. Introduction to Aptamer and Cell-SELEX. Aptamers Selected by Cell-SELEX for Theranostics, Tan, W. ve Fang, X. Springer, Berlin, 1-12.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Sultan İlayda Dönmez
Doğum Tarihi ve Yer : 05.08.1992 - Şanlıurfa
Yabancı Dili : İngilizce
e-mail : s.ilyadadnmez@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi	
Lisans	Fırat Üniversitesi	03.07.2014
Lise	Seferihisar Anadolu Lisesi	18.06.2010

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012	İzmir Gıda Kontrol Laboratuvarı	Stajyer
2013	Seferihisar Atık Su Arıtma Tesisi	Stajyer
2014-2016	<i>Streptococcus pneumoniae</i> için DNA Aptamerlerinin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu adlı TÜBİTAK 3001 projesi	Proje Bursiyeri